



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato XXV CICLO

Scienze Infettivologiche e Terapie Immunologiche
Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

Fenotipo dei linfociti T nell'infezione cronica da
Cytomegalovirus

Relatore

Chiar.mo Prof. Vullo Vincenzo

Dottoranda

Serena Vita

Correlatore

Chiar.mo Prof. Kern Florian

Anno Accademico 2011-2012

*alla mia famiglia,
ai miei amici*

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Sistema immunitario	1
1.1.1. Immunità innata	2
1.1.2. Immunità specifica	2
1.2. Linfociti T	3
1.2.1. Attivazione dei linfociti T	4
1.2.2. Sottopopolazioni linfocitarie	5
1.2.3. I linfociti T e Immunosenescenza	14
1.3. Il Cytomegalovirus	15
1.3.1. La struttura del CMV	15
1.3.2. Il CMV e la risposta immunitaria	16
1.3.3. CMV e immunosenescenza	17
1.4 La citofluorimetria	18
2. Materiali e Metodi	19
2.1. Materiali	19
2.1.1. Reagenti	19
2.1.2. Medium e buffer	19
2.1.3. Attrezzatura di laboratorio	19
2.1.4. Pannello anticorpale	20
2.1.5. Software	21
2.2. Metodi	21
2.2.1. Preparazione PBMC	21
2.2.2. Colorazione delle PBMc	21
2.2.3. Ottimizzazione dei pannelli	21
2.2.4. Acquisizione citofluorimetrica	22
2.2.5. Analisi citofluorimetrica e strategie di gating	22
2.2.6. Analisi statistica	24
2.3. Popolazione in studio	24
3. Obiettivi	26
4. Risultati	27
4.1. Conta linfocitaria	27
4.1.1. CD3	27
4.1.2. CD4	28
4.1.3. CD8	29
4.1.4. Rapporto CD4/CD8	30
4.2. Sottopopolazioni linfocitarie	30
4.2.1. Linfociti T Naive	31

4.2.2. Central Memory	43
4.2.3. Linfociti T Effector Memory (TEM)	45
4.2.4. Linfociti T revertant (TEMRA)	47
4.2.5. Espressione del CD127	62
4.2.6. Espressione del CD11a e del CD26	65
4.2.7. Linfociti T TCR gd	71
4.3 Parametri fisici	79
4.3.1 Pressione arteriosa (PA)	79
4.3.2 Body Mass Index (BMI)	81
4.4. Correlazioni tra parametri fisici e popolazioni cellulari	82
4.4.1 Età e sottopopolazioni linfocitarie	82
4.4.2 Pressione arteriosa sistolica (PAs) e sottopopolazioni linfocitarie	85
4.4.3 Body Mass Index (BMI) e sottopopolazioni linfocitarie	86
5. Conclusioni	87
Bibliografia	93

Lista delle abbreviazioni

aa	anni
Abs	anticorpi
ADA	Adenosina Deaminasi
APC	cellule presentanti l'antigene
Atg	antigene
CMV	Cytomegalovirus
FSC	forward scatter
ICAM	molecola di adesione intercellulare
LFA-1	Integrina alfa-1
MAbs	anticorpi monoclonali
MCMV	Cytomegalovirus murino
µl	microlitro
PBMc	cellule mononucleate del sangue periferico
pz	paziente/i
qtà	quantità
SSC	side scatter
TCR	recettore linfociti T
TN	linfociti T naive
TEM	linfociti T di memoria effettrici
TCM	linfociti T di memoria centrali
TEMRA	linfociti T di memoria terminalmente differenziate
TNFR	recettore del tumor necrosis factor
WB	wash buffer

1. Introduzione

1.1. Sistema immunitario

Il sistema immunitario si è sviluppato con il compito di mantenere, preservare e ripristinare l'integrità dell'organismo in seguito all'attacco di agenti esterni. Nell'ambiente che ci circonda sono presenti moltissimi patogeni che possono aggredire l'ospite attraverso la messa in opera di molti meccanismi patologici (Fig. 1.1). Non sorprende, quindi, che il sistema immune utilizzi un complesso assortimento di meccanismi protettivi per controllare ed eliminare tali organismi. Tutti questi meccanismi si fondano sul riconoscimento di caratteristiche strutturali proprie dei patogeni che li contraddistinguono dalle cellule dell'ospite (Abbas et al., 2000).

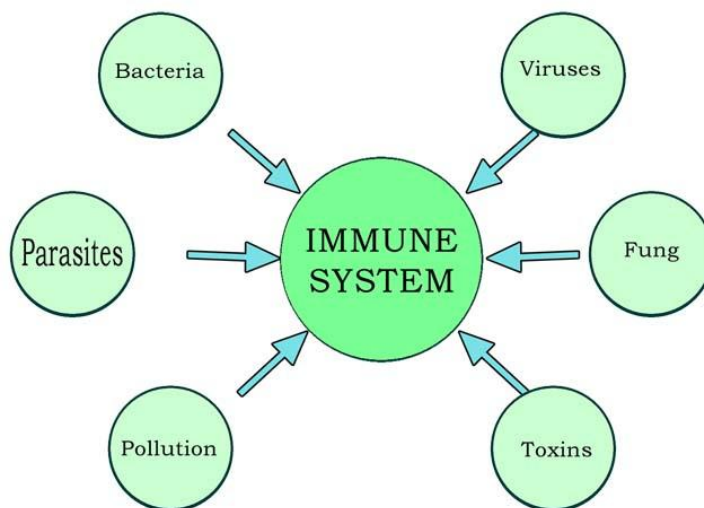


Fig. 1.1. Il sistema immunitario ci difende da agenti infettivi e sostanze dannose che aggrediscono il nostro corpo.

La difesa nei confronti dei microbi si basa su risposte precoci mediate dall'immunità innata e su risposte più tardive mediate dall'immunità specifica. L'immunità innata consta di meccanismi preesistenti alle infezioni, capaci di reagire con rapidità ai microbi, mentre l'immunità specifica o adattativa è attivata in maniera selettiva dai differenti agenti microbici, e le sue risposte vengono potenziate dalla ripetuta esposizione a uno stesso antigene (Fig. 1.2). Anche se le risposte immunitarie, innata e adattativa, sono fondamentalmente differenti nei loro meccanismi di azione, la sinergia tra di loro è essenziale affinché si attui una risposta immune integra e pienamente efficace (Abbas et al., 2000).

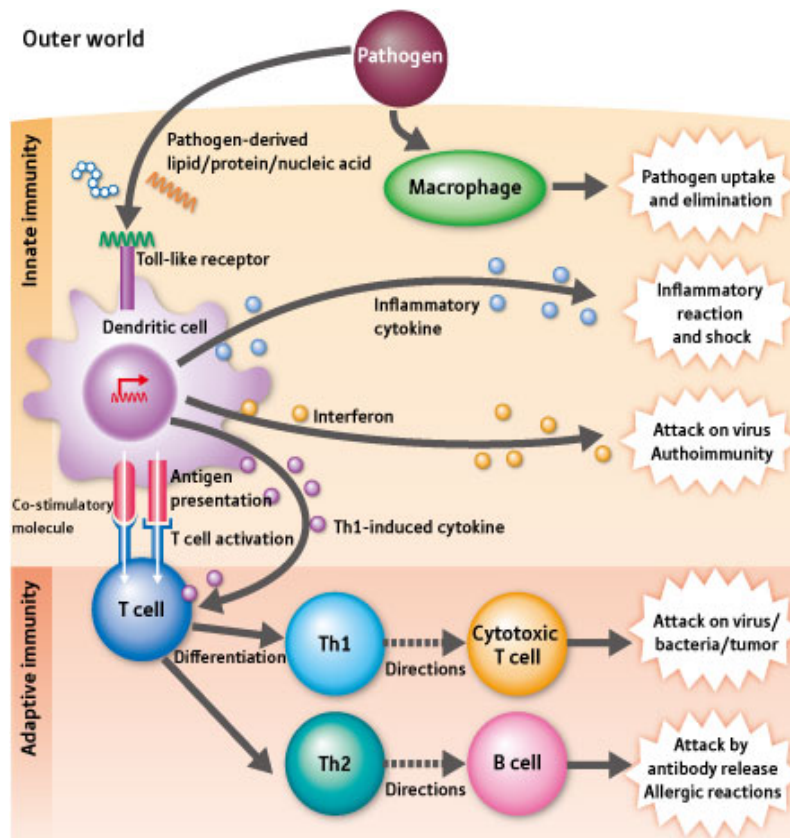


Fig. 1.2. Interazione tra sistema immunitario innato e adattativo (Kaisho, 2007)

1.1.1. Immunità innata

L'immunità innata fornisce la prima linea difensiva contro i microbi. Fanno parte del sistema immunitario innato: a) barriere fisico/chimiche dell'organismo, come le barriere epiteliali e le sostanze antimicrobiche da esse prodotte; b) cellule ad attività fagocitica (neutrofili, macrofagi) e le cellule ad attività citotossica naturale (NK, natural killer); c) proteine solubili e piccole molecole bioattive (complemento, defensine) che sono presenti nei fluidi biologici sia costitutivamente che rilasciate dalle cellule una volta attivate; d) numerose proteine denominate citochine, che regolano e coordinano molte cellule dell'immunità innata. I meccanismi dell'immunità innata sono attivati da strutture molecolari comuni a gruppi di microbi simili tra loro, e non possono discriminare le sottili differenze che esistono tra le diverse sostanze estranee (Abbas et al., 2000).

1.1.2. Immunità specifica

L'immunità specifica, nota anche come immunità acquisita o immunità adattativa, è una risposta immunitaria caratterizzata dal suo adattamento a ciascuna infezione ed è generalmente più efficace e più specifica dell'immunità innata, seppure impieghi più tempo di quest'ultima per agire. Le sue caratteristiche sono: a) la sua specificità per le diverse macromolecole, b) la capacità di avere una memoria immunitaria, ossia di rispondere sempre in maniera più potente in occasione di ripetute esposizioni a uno stesso microbo (Abbas et al., 2000).

Si divide a sua volta in immunità umorale ed immunità cellulomediata. L'immunità umorale è mediata dai linfociti B dal loro prodotto di secrezione, gli anticorpi, che riconoscono specificatamente gli antigeni microbici, neutralizzandone l'infettività e destinandoli all'eliminazione da parte di meccanismi effettori; essa serve per la difesa contro i microbi extracellulari (Sprent, 1994).

L'immunità cellulare è mediata dai linfociti T e dai loro prodotti, quali le citochine, ed è importante nella difesa dei microbi intracellulari che proliferando e sopravvivendo all'interno dei fagociti sono inaccessibili agli anticorpi circolanti (Abbas et al., 2000).

1.2. Linfociti T

I linfociti sono le uniche cellule dell'organismo capaci di riconoscere specificatamente e di distinguere i diversi determinanti antigenici, quindi essi sono responsabili delle due caratteristiche che definiscono le risposte immunitarie: la specificità e la memoria (Askonas et al. 1982; Tough et al., 1995; Abbas et al., 2000).

La popolazione dei linfociti T è definita dall'espressione del recettore di superficie TCR $\alpha\beta$ (Kruisbeek, 1993). I linfociti T hanno origine nel midollo osseo e derivano da progenitori ematopoietici, ma è nel timo che vanno incontro a un processo di selezione e maturazione nel timo (Abbas et al., 2000).

La differenziazione dei linfociti T antigene-indipendente si realizza nel timo a partire da precursori di origine midollare e porta alla produzione di sottopopolazioni funzionalmente diverse di linfociti T maturi che migrano negli organi linfoidi periferici (Schwarz et al., 2006). Tale processo si articola in tre fasi: a) colonizzazione del timo da parte di precursori commissionati in senso T e indotti a proliferare e differenziare dalle influenze del microambiente timico; b) formazione del repertorio immunologico T attraverso il riarrangiamento dei geni che codificano per le catene eterodimeriche del TCR (α/β o γ/δ), analogamente a quanto si verifica per le regioni variabili delle Ig nella linea B, assicurando in tal modo la specificità di riconoscimento; c) selezione del repertorio immunologico T attraverso una serie di processi di reciproco riconoscimento di strutture di membrana tra il compartimento T (TCR) e le cellule accessorie epiteliali e interdigitate (MHC) (Abbas et al., 2000).

La selezione positiva seleziona le cellule T capaci di interagire con le MHC presentate dalle cellule stromali timiche (Kruisbeek, 1993). Solo i linfociti che interagiscono con un'affinità adeguata con gli antigeni self e le MHC ricevono un segnale di sopravvivenza e sono selezionate positivamente, mentre quelle che hanno una scarsa affinità vanno incontro ad apoptosi (Starr et al., 2003).

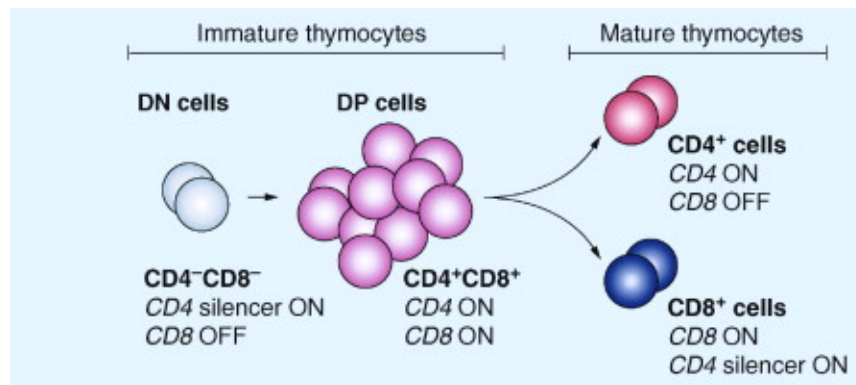


Fig. 1.3. Classificazione dei linfociti T (adattata da Zamoyska, 2003).

I linfociti T possono essere ulteriormente suddivisi in base alla presenza di molecole accessorie, CD4 o CD8, sulla loro superficie (Fig. 1.3). I CD4 riconoscono MHC di classe II che sono espresse sulle APC (cellule presentanti l'antigene) mentre i CD8 MHC di classe I, che sono espressi nella maggior parte delle cellule mononucleate. L'espressione del CD4 o del CD8 da parte del linfocita dipende da chi gli abbia presentato i peptidi self, se le MHC II o MHC I, durante la selezione positiva (Starr et al., 2003).

I CD4 possono ulteriormente essere differenziati in diverse sottopopolazioni, in relazione ai markers di superficie e alla loro abilità di produrre chemochine e citochine. La maggior parte dei CD4 secerne citochine che attivano APC, macrofagi, linfociti B e CD8. Una piccola proporzione dei CD4, i linfociti T regolatori, ha lo scopo di inibire la risposta immunitaria (Abbas et al., 2000). I CD8, sono chiamati anche linfociti T citotossici (CTL) e manifestano questa loro attività nei confronti delle cellule infettate da microbi intracellulari e contro le cellule tumorali, ma esistono in questa popolazione anche cellule che regolano negativamente le risposte immuni ovvero le cellule soppressorie (Abbas et al., 2000).

1.2.1. Attivazione dei linfociti T

Le risposte funzionali dei linfociti T si avviano grazie al riconoscimento dei complessi MHC-peptide esposti sulla membrana delle APC. In seguito all'interazione del linfocita con l'APC si innesca una cascata di eventi molecolari intracitoplasmatici il cui fine è l'attivazione, la proliferazione, la differenziazione delle cellule vergini in cellule effettrici e in cellule T di memoria (Abbas et al., 2000).

Una volta attivati i linfociti sono capaci di risposte biologiche e funzionali estremamente complesse.

La proliferazione e la differenziazione dei linfociti T, oltre al primo segnale prodotto dal riconoscimento dell'antigene, richiedono segnali forniti da molecole espresse sulle APC, dette molecole costimolatorie. In assenza di segnali costimolatori, le cellule T che incontrano l'antigene non riescono a rispondere e muoiono per fenomeni apoptotici o entrano in uno stato di non responsività detta anergia (Abbas et al., 2000).

Un importante segnale costimolatorio è la molecola CD28, espressa sui linfociti T, che interagisce con le molecole costimolatorie B7 presenti sulla membrana delle APC attivate (Linsley et al., 1993). Il CD28 trasmette un segnale che stimola la proliferazione dei linfociti T, la produzione di IL-2, e la differenziazione a cellule effettrici. Il CD28 favorisce anche l'esposizione di altre molecole costimolatorie, come il ligando CD40 (CD40L) e il costimolatore inducibile, creando un feedback positivo e aumentando le interazioni con le APC (Noelle et al., 1992). Il costimolatore inducibile aumenta la secrezione di citochine e la generazione di cellule T della memoria. Un'altra molecola costimolatoria è rappresentata dal CD27 che si lega con il CD70 presente sulle cellule B, la cui espressione aumenta dopo la stimolazione, e questo segnale potenzia l'attivazione, la proliferazione e la stimolazione dei linfociti T (Martorell et al., 1990, Lens et al., 1998) (Fig. 1.4).

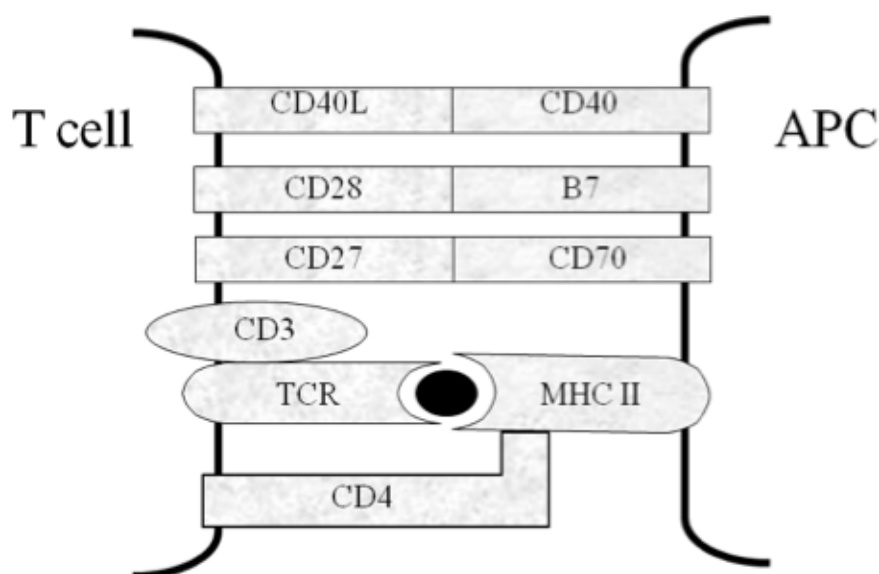


Fig. 1.4. Molecole costimolatorie e recettori che mediano l'attivazione dei linfociti T (adattata da Haanen et al., 2007).

1.2.2. Sottopopolazioni linfocitarie

Per aumentare le probabilità di incontrare l'antigene, i linfociti circolano continuamente attraverso i vari tessuti. Le cellule che non hanno ancora incontrato l'antigene sono dette T naïve (TN). Le TN sono una sottopopolazione molto omogenea, che non presentano funzioni effettrici. In seguito all'incontro con l'antigene, che avviene tramite il riconoscimento dei complessi MHC-peptide espressi sulla membrana delle APC professionali presenti nei linfonodi, è stimolata la risposta primaria dei linfociti T (Abbas et al., 2000). Le principali conseguenze dell'attivazione delle TN sono la proliferazione delle cellule del clone antigene specifico e la sua differenziazione in cellule di memoria e cellule effettrici (Stemberger et al., 2007). Dopo la clearance dell'antigene, la maggior parte delle cellule effettrici muore per apoptosi (Fig. 1.5) e solo una parte sopravvive e si differenzia in cellule di memoria che proteggono, nel corso della vita, l'organismo dallo stesso patogeno (Harari et al., 2002).

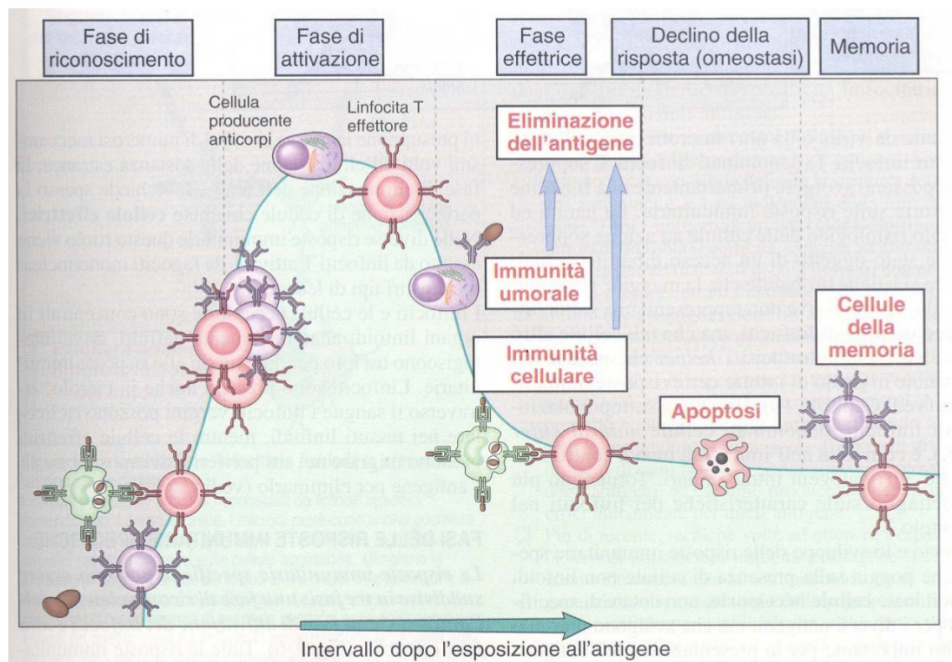


Fig. 1.5. Fasi della risposta immunitaria (Abbas et al., 2000).

Queste cellule di memoria sono responsabili della risposta immune secondaria, ossia della risposta più rapida e più potente che si verifica in occasione di una nuova esposizione all'antigene (Berard et al., 2002).

Vi sono due popolazioni di cellule T destinate alla memoria: le cellule T effettrici (TEM) e quelle della memoria centrale (TCM). Le cellule TEM migrano in periferia e danno un adeguato supporto nei confronti di patogeni, mostrando immediatamente funzioni effettrici producendo citochine. Le TCM esprimono “lymphnode-homing receptors”, e se stimolate dalle APC non mostrano immediate funzioni effettrici ma proliferano e differenziano in TEM possono migrare nei tessuti periferici (Sallusto et al., 1999). In tal modo, esse costituiscono gli elementi cellulari di riserva per la popolazione di cellule effettrici. Vi è un'ulteriore popolazione di cellule T detta cellule T di memoria terminalmente differenziate (TEMRA), che hanno una scarsa capacità replicativa e elevata attività citotossica (Akbar & Fletcher, 2005; Tomiyama et al., 2002) (Fig. 1.6). I diversi markers di superficie permettono di classificare le diverse sottopopolazioni linfocitarie.

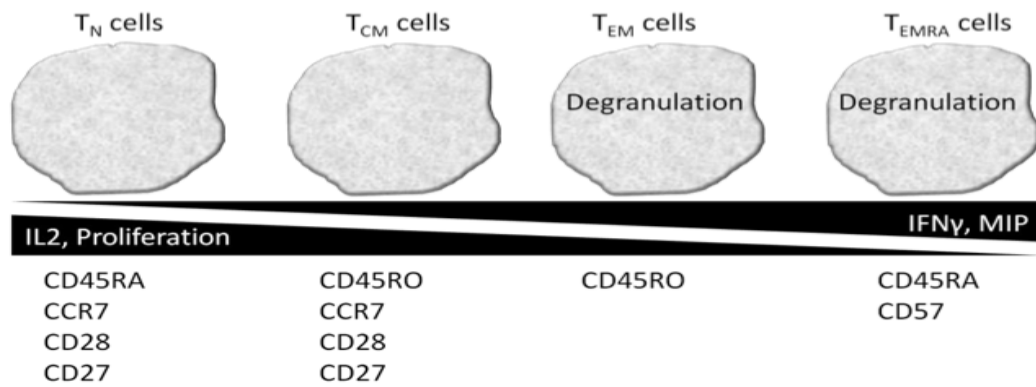


Fig. 1.6. Sottopopolazione dei linfociti T e le loro funzioni (adattata da Tomiyama et al., 2002).

1.2.2.1. CD45R

Il CD45R, è stato il primo recettore simile alle proteine tirosin-kinasi a essere identificato. Il CD45R è espresso su tutte le cellule ematopoietiche e ricopre fino al 10% della superficie, rappresentando una delle glicoproteine di superficie maggiormente presente (Thomas, 1989). Il suo ligando non è stato ancora identificato, ma il target intracellulare sono le famiglie delle Src-kinasi, coinvolte nell'attivazione del TCR (McNeill et al., 2007).

Del CD45R ve ne sono due isoforme: CD45RA la più grande, e la CD45RO la più piccola (Hermiston et al., 2003). Alcuni esperimenti hanno mostrato una maggior espressione del CD45RA (Fig. 1.7) sui linfociti T naïve e uno shift verso l'isoforma CD45RO nelle cellule T experienced (Dutton et al., 1998).

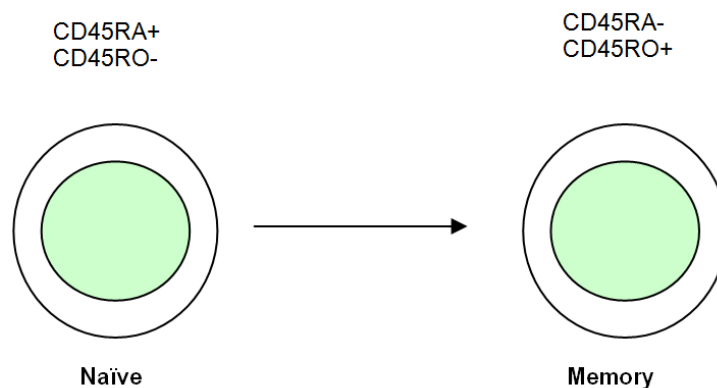


Fig. 1.7. Espressione del CD45RA del CD45RO sulle T naïve e T di memoria (Dutton et al., 1998).

1.2.2.2. Molecole costimolatorie: CD27, CD28, CD26, CD95

Il CD27 e il CD28 sono dei recettori espressi sui linfociti T, in grado di interagire rispettivamente con le molecole costimolatorie CD70 e con il B7 presenti sulla membrana delle APC professionali (Abbas et al., 2000; Haanen et al., 2007) e sono importanti molecole costimolatorie. Queste molecole sono presenti sui CD8 ed i CD4 naïve, ma in risposta allo

stimolo la loro espressione diminuisce sulla superficie (Appay et al., 2002; Azuma et al., 1993). I CD4 differenziati perdono dapprima l'espressione del CD27 ed in seguito dei CD28, mentre i CD8 prima il CD28 e poi il CD27 (Appay et al., 2002; Khan et al., 2002).

1.2.2.3. Molecole di adesione e di homing: CCR7, CD62L e CD11a

I linfociti migrano in continuazione tra il torrente ematico, i vasi linfatici, i tessuti linfoidi secondari e i tessuti non linfoidi periferici. Questo ricircolo linfocitario permette al piccolo numero di linfociti naïve di cercare il loro specifico antigene attraverso il corpo. Differenti sottopopolazioni T migrano in modo diverso verso vari tessuti. Le TN, ad esempio, non sono capaci di produrre una risposta immunitaria fino a quando non vengono attivati, pertanto non devono arrivare ai tessuti infiammati, mentre hanno bisogno di interagire con le cellule dendritiche degli organi linfoidi secondari. Alcuni linfociti, invece attivati migreranno poi verso particolari tessuti, come ad esempio la cute o l'intestino: questo processo di migrazione selettiva è detto homing.

I meccanismi di migrazione linfocitaria sono simili a quelli di migrazione degli altri leucociti ai siti infiammatori. Il traffico tra periferia ed organi linfoidi è determinato dai recettori presenti sulla superficie cellulare. Le molecole di adesione espresse sui linfociti sono spesso dette recettori homing e i loro ligandi espressi dalle cellule endoteliali sono detti adressine. Le chemochine coinvolte nel traffico linfocitario sono prodotte in maniera costitutiva dagli organi linfatici secondari e in maniera inducibile ai siti di infezione.

Le più comuni molecole di adesione sono L-selectina (CD62L), CC chemorecettore 7 e l'integrina alfa-1.

La molecola CD62L interagisce con un adressina (PNAd) espressa sulle venule ad endotelio alto delle venule, che media l'adesione e il "rolling" (Kaech et al., 2002), mentre il CCR7 lega le chemochine CCL19 e CCL21, che sono presenti sulla superficie luminale delle cellule endoteliali dei linfonodi, e la loro interazione causa l'arresto dei linfociti e l'inizio dell'extravasazione (Kaech et al., 2002). Diversi studi hanno dimostrato che le cellule T CD62L^{hi}CCR7⁺ migrano efficientemente verso i linfonodi periferici (Butcher et al., 1996), mentre le cellule che perdono queste due molecole no, e possono essere trovate in altri siti come il fegato ed i polmoni. Le TN esprimono sia il CD62L che il CCR7.

LFA-1 è una glicoproteina transmembrana, facente parte della famiglia delle integrine β_2 , costituita da una subunità α_L (CD11a) ed una subunità β_2 (CD18), non legate covalentemente, che legano i ligandi extracellulari al citoscheletro (Hynes, 1992). I ligandi del LFA-1 sono ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3 (Diamond, 1994). L'interazione tra LFA-1 ed ICAM-1 è importante in una serie di eventi cellulari, come la regolazione della migrazione dei leucociti dal sangue ai tessuti (Shaw et al., 1997; Hogg et al., 1993) e la cooperazione intercellulare durante la risposta immunitaria specifica (Jenks et al., 2000; Wulfing et al., 1998).

In vivo bloccando l'adesione tramite mAbs nel topo ed in altri animali, hanno dimostrato che LFA-1 ed ICAM-1 sono coinvolte nell'infiammazione acuta (Guerette et al., 1997), nel danno da ischemia/riperfusion (Tajra et al., 1999), nel rigetto d'organo (Arai et al., 1999; Suzuki et al., 1999) e nell'immunità antitumore (Bécharde et al., 2001).

LFA-1 partecipa alla formazione di sinapsi immunologiche, che regolano l'attivazione dei linfociti T sinergisticamente all'impegno del TCR (Li et al., 2009). La sinapsi immunologica è una struttura specializzata che si forma tra la cellula T e l'APC dove l'attivazione delle cellule T ha luogo (Grakoui et al., 1999). La funzione della sinapsi immunologica è quella di facilitare l'attivazione dei linfociti T e del segnale di trasduzione (Li et al., 2009).

Studi precedenti hanno dimostrato che il legame di LFA-1 può costimolare i linfociti T per la produzione di IL2, per la proliferazione cellulare e per polarizzare la risposta verso Th1 (Perez et al., 2003).

La bassa espressione del CD11a (CD11a^{dim}) associata all'espressione del CD45RA (CD45RA^{bright}CD11a^{dim}) sembra caratterizzare le cellule naïve, mentre le cellule CD45RA-CD11a^{bright} (elevata espressione del CD11a) quelle di memoria (Höflich et al., 1998). Nel compartimento CD8 le cellule CD45RA^{bright}CD11a^{bright} sono molto più simili CD45RA-CD11a^{bright} quindi al fenotipo di memoria che al fenotipo naïve (CD45RA^{bright}CD11a^{dim}).

L'espressione del CD11a sembrerebbe discriminare meglio le cellule naïve da quelle memory (Höflich C et al., 1998). Inoltre le cellule CD45RA^{bright}CD11a^{bright} rispetto alle CD45RA-CD11a^{bright} differiscono poiché le prime sono più grandi e più ricche di granuli, la maggior parte non esprime il CD28, sono CD57+, ed esprimono più perforina (Höflich et al., 1998). Probabilmente queste cellule derivano dalle CD45RA^{bright}CD11a^{dim} in seguito all'attivazione linfocitaria. L'espressione di alti livelli di CD11a consente ai linfociti T circolanti di infiltrare i tessuti per via endoteliale tramite l'interazione con le ICAMs, e di interagire con le ICAMs con le cellule bersaglio (Itoh et al., 1991).

1.2.2.4. CD26

La molecola CD26 è una glicoproteina di superficie che riveste un ruolo importante nell'attivazione dei linfociti T (Tomori et al., 2001). È costitutivamente espressa, nell'intestino e nel rene, e la sua espressione aumenta dopo l'attivazione delle cellule T (Fleischer, 1987).

La popolazione CD26^{bright}CD4⁺, che è anche CD45RO+CD29+, risponde ad antigeni di richiamo "recall", induce la sintesi di immunoglobuline (Ig) ed attiva i linfociti T citotossici (Morimoto, 1989; Vanham et al., 1993). L'aumento dell'espressione del CD26 sulle cellule T è associato a un aumento della sensibilità agli antigeni, consentendo il mantenimento del pool delle cellule T di memoria nonostante la diminuzione della concentrazione dell'antigene (Falcioni et al., 1996). Inoltre le cellule CD26^{bright}CD4⁺ sono capaci di migrazione

transendoteliale (Brezinschek et al., 1995) e giocano un ruolo nella differenziazione delle cellule epiteliali e dei monociti, nella neurotrasmissione e mantenimento della gravidanza (Moriwaki et al., 1999).

L'adenosina deaminasi (ADA), un enzima che metabolizza l'adenosina extracellulare è il ligando del CD26 presente sulle cellule e del CD26 solubile (De Meester et al., 1994; Morrison et al., 1993).

Il legame ADA-CD26 ha un ruolo enzimatico nella protezione dei linfociti T dall'inibizione della proliferazione mediata dall'ADA (Fleischer, 1987), questo legame quindi stimola la proliferazione dei linfociti T e la produzione di citochine (De Meester et al., 1994). L'espressione del TCR è obbligatoria per i segnali mediati dal CD26. Infatti il segnale del CD26 si sovrappone a quello del TCR/CD3. Entrambi i segnali TCR/CD3 e CD26 mediano segnali che portano all'attivazione e alla traslocazione del fattore di trascrizione (Blazquez et al., 1997). Questa osservazione supporta il ruolo costimolatorio per il CD26 nella trasduzione del segnale indotta dal CD3.

La via del segnale del CD26 stimola cellule preattivate, suggerendo che il CD26 non è essenziale per l'iniziale attivazione, piuttosto potrebbe fornire un segnale di attivazione aggiuntivo, che aumenta la risposta delle cellule CD3+ che già partecipano alla reazione immunitaria (Gorrel et al., 2001).

1.2.2.5. CD95

Il CD95 (FAS) è una proteina transmembrana membro della famiglia dei TNFR (tumor necrosis factor receptors), che nel sistema immunitario funge da recettore di morte cellulare (Paulsen et al., 2011). È espressa su cellule linfoidi e non linfoidi ed è capace di innescare il processo apoptotico in seguito all'interazione con il suo ligando CD95L (FasL) (Abbas et al., 2000). FasL è un trimero composto da subunità identiche, principalmente espresso sulla membrana dei linfociti T una volta attivati dall'atg e dall'IL-2. Quando i linfociti sono stimolati ripetutamente dall'antigene, essi coesprimono Fas e FasL, che interagiscono sulla membrana della stessa cellula o tra cellule vicine. In seguito il dominio di morte intracitoplasmatico di Fas si aggrega a una proteina citosolica detta FADD (Fas-associated Death Domain) contenente anch'essa un dominio di morte (Kischkel FC et al., 1995), questo dominio a sua volta si aggrega a un pro-domino di una caspasi, detta caspasi-8 che in seguito ad attivazione auto-catalitica, diventando capace di attivare altre caspasi effettrici a valle e la cascata apoptotica (Krammer, 2000). Questo tipo di apoptosi è denominata morte cellulare indotta da attivazione, in quanto provocata dall'attivazione linfocitaria, e non dalla deprivazione di stimoli che favoriscono la sopravvivenza della cellula.

Oltre alla funzione pro-apoptotica il CD95 media altre funzioni, inclusa l'amplificazione della proliferazione delle cellule T dopo la costimolazione con dosi subottimali di anticorpi anti-CD3 (Alderson et al., 1993). Funzioni non apoptotiche sono state identificate per cellule del sistema

nervoso, e riguardano la promozione dello sviluppo, della crescita, della differenziazione e della rigenerazione neuronale (Tamm et al., 2004). Nei linfociti T in cui è inibita l'attivazione caspasi (Kennedy et al., 1999), o privi di FADD (Zhang et al., 1998), caspasi-8 (Su et al., 2005) esprimono un'attivazione ed una proliferazione alterata, ciò suggerisce un ruolo per le molecole attivate dal CD95 nell'attivazione dei linfociti T. L'espressione del CD95 sui linfociti così come il numero delle cellule CD95 aumenta con l'aumentare dell'età e raggiunge i livelli più alti nella sesta settima decade di vita, quindi l'aumento del CD95 è correlato con l'espansione dei linfociti T di memoria (Potestio et al., 1999), infatti l'espressione del CD95 è maggiore sui linfociti CD45RO+, quindi su quelli di memoria (Pawelec et al., 1996).

1.2.2.6. CD127

Il recettore IL-7R α , detto anche CD127, ha un ruolo essenziale nello sviluppo e nella regolazione delle cellule T naïve e nell'omeostasi delle cellule T di memoria (Hare et al., 2000). Il CD127 si unisce a CD132, noto anche come la catena gamma comune (γ_c), per formare il recettore IL-7 multi-funzionale (IL-7R). Mentre il CD132 è espresso sulla maggior parte delle cellule ematopoietiche, il CD127 è espresso quasi esclusivamente sui linfociti T (Ziegler et al., 1995). Durante la risposta immunitaria nei confronti di virus, i CD8+ effettori hanno ridotta espressione di CD127 (Mazzucchelli et al., 2007). Comunque il 5-15% di cellule T virus specifiche ha un'elevata espressione di CD127, e da questo pool derivano le cellule di memoria che mantengono livelli elevati di IL-7R α (Kaeche et al., 2003). Il CD127 è stato utilizzato anche per classificare le cellule T di memoria (Sallusto et al., 1999). Sia le TCM che le TEM esprimono alti livelli di CD127 (Huster et al., 2004). Le infezioni virali persistenti, come l'infezione da Cytomegalovirus (CMV) e da EBV (Epstein-Barr virus), inducono la produzione di CD8 exhausted (Mazzucchelli et al., 2007), che è caratterizzata da una bassa espressione di CD127. Il motivo di ciò non è ancora bene chiaro, la riduzione dell'espressione potrebbe essere dovuto alla continua stimolazione del TCR, dovuta alla persistenza dell'antigene o alla stimolazione da parte di citochine come IL-2 e IL-4 (Mazzucchelli et al., 2007).

1.2.1.4. Linfociti T di memoria

I linfociti T di memoria sono caratterizzati dalla presenza sulla superficie del CD45RO. Le TEM migrano verso i tessuti infiammati, sono caratterizzati dalla perdita di CCR7 e CD62L (Sallusto et al., 1999), e rapidamente rispondono all'antigene producendo citochine quali IFN, IL-4, IL-5 e perforina per migrare nei tessuti periferici tramite CCR1, CCR3, CCR5. Le TCM esprimono ancora il CCR7, ma hanno perso le loro funzioni effettrici ed hanno una bassa soglia di attivazione, ma possono ancora andare nei linfonodi (Lanzavecchia & Sallusto, 2005).

1.2.1.5. Linfociti TEMRA

La molecola CD45RA presente sulle TN, viene reversibilmente persa, quindi esiste una

popolazione di cellule di memoria CD45RA+. Inoltre sono caratterizzate dalla perdita del CCR7 e del CD27 (Sallusto et al., 2004).

Rispetto alle naïve le TEMRA mostrano i segni di ripetute attivazioni, come la bassa espressione del CD27 e del CD28, indicanti numerose divisioni cellulari ed esprimono diversi markers di attivazione (Hadrup et al., 2006)). Nonostante la perdita del CD27 e del CD28, le TEMRA CMV specifiche possono aumentare l'espressione del CD137, CD278 (via costimolatoria non classica) e gli homing receptor come CCR5 e CXCR3 (Waller et al., 2007).

1.2.1.6. Sottopopolazioni linfocitarie: problematiche

Non esiste ancora un consenso sulla classificazione delle sottopopolazioni linfocitarie (Appay et al., 2008). In questa tesi le sotto popolazioni saranno definite in base all'espressione di CD45RA, CD45RO, CD27, CD28, CD62L, CCR7, CD95 (Fig. 1.8) (Sallusto et al., 2004; Sallusto et al., 1999).

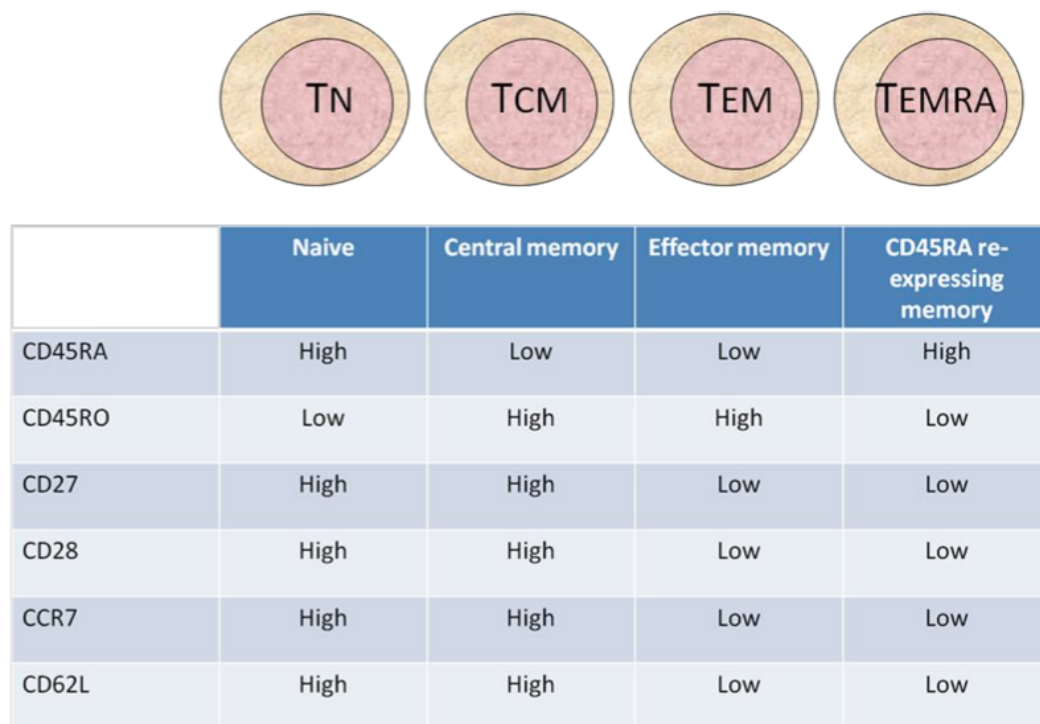


Fig. 1.8. Markers fenotipici delle diverse sottopopolazioni linfocitarie.

1.2.1.7. Linfociti T g/d

Il recettore dei linfociti T (o TCR, da *T cell receptor*) è un recettore transmembrana che si trova sulla superficie dei linfociti T, responsabile del riconoscimento degli antigeni presentati dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) (Abbas et al., 2000). Il legame tra TCR e il complesso MHC-antigene, associata ad altri segnali detti co-stimolatori, porta all'attivazione del linfocita T attraverso una caratteristica trasduzione del segnale di cui però il TCR non fa propriamente parte. Cloni di linfociti T che possiedono una diversa specificità esprimono TCR diversi. Il complesso del TCR è costituito dal TCR stesso e da proteine deputate alla trasduzione

del segnale (principalmente CD3 e ζ) che gli sono legate tramite legami non-covalenti (Abbas et al., 2000). Il TCR è un eterodimero composto nel 95% dei linfociti T da una catena alfa (α) e una beta (β), mentre nel restante 5% dei linfociti T si tratta di una catena gamma (γ) e una delta (δ). Questo permette la distinzione tra linfociti T $\alpha\beta$ e linfociti T $\gamma\delta$.

Il TCR $\gamma\delta$ è strutturalmente molto simile all' $\alpha\beta$, ma non utilizza CD4 e CD8 come co-recettori, per cui i linfociti T $\gamma\delta$ sono CD4- e CD8- o CD8 dim. Questa sottoclasse di linfociti, negli animali, è preponderante a livello epiteliale, nell'uomo però anche nella mucosa intestinale (Groh et al., 1998), che ne è particolarmente ricca, ammontano a non più del 10% del totale, mentre sono il 5% dei linfociti T totali. I TCR $\gamma\delta$ si legano a proteine MHC di classe I non convenzionali e non sono ristretti a soli peptidi proteici, potendo riconoscere anche lipidi e molecole microbiche (Steinle et al., 1998). Tuttavia i loro ligandi, a differenza dei linfociti T $\alpha\beta$ sono poco variabili. Il 3% dei linfociti T $\gamma\delta$ ed hanno un TCR codificato dai segmenti genici Vg9 e Vd2 e vengono dette Vd2+, mentre altre l'altra popolazione viene detta Vd2-, con un TCR codificato dai segmenti genici Vd1, Vd3 o VD5, e rappresentano 1% dei $\gamma\delta$ circolanti e normalmente risiedono a livello epiteliale (Couzi et al., 2009).

1.2.1.7.1. CD16

Il CD16 è il recettore a bassa affinità per il frammento Fc delle immunoglobuline di classe G, anche chiamato FcR γ IIIa, ed è il principale recettore responsabile della citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC), fenomeno esclusivo delle cellule NK (Stewart et al., 2006). È una glicoproteina transmembrana di 70 kDa appartenente alla superfamiglia delle Ig (Ravetch et al., 1989) e risulta essere espresso anche in altri tipi cellulari quali macrofagi, neutrofilii e in una sottopopolazione di linfociti T (Lanier et al., 1985). Le cellule T $\gamma\delta$, sembrano sia la popolazione che esprima più CD16 in condizioni fisiologiche (Lanier et al., 1985), anche se sono state riportate variabilità interindividuali e nessun parametro biologico è stato associato a questa variabilità. Negli individui sani il 50-90% delle cellule T $\gamma\delta$ che esprime un TCR V δ 2, non esprime costitutivamente il CD16 (Lafont et al., 2001). Le cellule T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} risiedono fisiologicamente in diversi tessuti come quello digestivo, riproduttivo e respiratorio, dove rappresentano un'importante prima linea di difesa per i patogeni (Couzi et al., 2012). È stato osservato che alti livelli di CD16 sono costitutivamente espressi sui linfociti T V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ indotti dal CMV sia negli immunocompetenti che negli immunodepressi (Couzi et al., 2012). Circa dieci anni fa è stata osservata una persistenza di V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T nel sangue periferico di individui sottoposti a trapianto di rene dopo l'infezione da CMV (Dechanet et al., 1999). Queste cellule esprimevano un fenotipo citotossico detto TEMRA (CD45RA⁺, CD27⁻) (Pitard et al., 2008).

L'espansione di questa sottopopolazione di cellule T V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ è associata alla risoluzione dell'infezione da CMV, ciò suggerisce un'azione antivirale (Lafarge et al., 2001).

1.2.3. I linfociti T e Immunosenescenza

Le alterazioni che si verificano con l'avanzare dell'età a carico dei linfociti sono complesse e pleiotropiche e riguardano sia un rimodellamento che un'alterazione della funzionalità cellulare. Con l'avanzare dell'età il numero dei linfociti T tende a diminuire, tuttavia esiste un'estrema variabilità individuale che impedisce di annoverare questo parametro tra i marcatori di immunosenescenza. Una delle maggiori caratteristiche dell'immunosenescenza è l'alterazione del rapporto tra linfociti T naïve e di memoria.

Con l'aumentare dell'età vi è una diminuzione delle cellule naïve che risultano quasi esaurite negli ultracentenari, causata dall'involuzione del timo ed un aumento delle cellule di memoria e di cellule effettrici (Fagnoni et al., 1996). Questo fenomeno, che interessa sia i linfociti T CD4+ e CD8+, ma è molto più marcato nel compartimento dei CD8+, in quanto durante il corso della vita sono soggetti ad espansioni clonali più marcate rispetto ai CD4 in seguito a stimolazioni antigeniche acute.

L'immunosenescenza inoltre è caratterizzata da un accumulo progressivo, età dipendente, di linfociti CD28- sia linfociti T CD4+ e CD8+ (Fagnoni et al., 1996; Effros, 2000), e parallelamente una diminuzione fino a scomparsa di linfociti T CD28+. Le cellule T CD28- non sono in grado di andare incontro ad espansione clonale, hanno una lunghezza dei telomeri più breve indicativa di una lunga storia replicativa e sono considerati linfociti T all'ultimo stadio di differenziamento (Pawelec et al., 1997). Altra caratteristica è la comparsa di linfociti T CD45RA+CD28-, detti revertant, poiché pur essendo linfociti T senescenti riesprimono il CD45RA (Hamman et al., 1997). Queste cellule sono molto citotossiche ed esprimono più perforina e granzimi.

Altre modificazioni dovute all'invecchiamento che sono state individuate e descritte in letteratura sono:

- alterazioni nella trasduzione del segnale in seguito ad attivazione delle cellule T. I cambiamenti che avvengono a livello della trasmissione del segnale potrebbero essere responsabili della linfopenia e della diminuzione delle cellule T che si osserva in soggetti di età avanzata (Pollack & Leeuwenburgh, 2001);
- danneggiamento dei telomeri e riduzione dell'attività telomerasica. Weng e colleghi (1995) hanno dimostrato che la lunghezza media dei telomeri in cellule naïve e di memoria si accorciava di 0.3 PD (Population Doubling) ogni anno;
- modifiche nella secrezione delle citochine. Durante l'invecchiamento, vi è uno sbilanciamento delle citochine a favore di quelle infiammatorie, soprattutto di IL-1, IL-6 e Fattore di Necrosi Tumorale- α (TNF- α), con un aumento dello stato proinfiammatorio che potrebbe essere alla base della ridotta capacità dei soggetti anziani di far fronte alla variabilità degli agenti stressanti. Questo stato proinfiammatorio è stato definito "inflammaging" (Franceschi et al., 2007). Segni

in inflamming sono stati trovati anche inaspettatamente in centenari sani, contemporaneamente a un aumento di marcatori anti-infiammatori, come IL-10 e TGF-beta (Caruso et al., 2004; Carrieri et al., 2004).

1.3. Il Cytomegalovirus

Il CMV è un β Herpes virus a DNA, ubiquitario. La sieroprevalenza aumenta con l'età e va dal 40% nei trentenni, al 70-90% negli over 65 nei paesi industrializzati e al 100% nei paesi in via di sviluppo (Hecker et al., 2004).

Il Cytomegalovirus originariamente isolato da pazienti con malattia congenita citomegalica a inclusioni, è ora riconosciuto come importante patogeno per tutte le classi di età. Oltre a causare gravi difetti alla nascita è responsabile di una serie di patologie in adolescenti ed adulti, che vanno da un'infezione subclinica asintomatica, alla sindrome mononucleosica in soggetti sani, alla malattia disseminata nell'ospite immunocompromesso (Kasper et al., 2008).

Come gli altri membri della famiglia ha la capacità di rimanere allo stato latente, integrato nel cromosoma delle cellule ospiti, mantenendo una persistente replicazione resa evidente dall'effetto citopatico indotto nella cellula ospite (Moroni et al., 2008).

Una sindrome clinica legata a riattivazione del CMV è frequente solo quando è compromessa l'immunità legata ai linfociti T, ad esempio dopo un trapianto d'organo, presenza di neoplasie del tessuto linfatico ed alcune forme di immunodeficienza acquisita. La riattivazione può aversi nelle situazioni in cui si determina un rilascio di catecolamine, come uno stress immune, responsabile dell'attivazione di una cascata di citochine e di percorsi di traduzione del segnale che alla fine portano all'attivazione di fattori di trascrizione. La regolazione di tale trascrizione permette al virus di replicarsi velocemente ed ha implicazioni sulla patogenicità del virus e sulla persistenza nello stato di latenza (Sinclair et al., 2006).

La latenza avviene all'interno dei progenitori mieloidi, del tessuto polmonare, renale e nelle cellule endoteliali ed è facilitata dai diversi meccanismi che il CMV ha per evadere il sistema immunitario, infatti è capace di bloccare la presentazione e processazione dell'antigene, di bloccare l'attivazione delle cellule NK, dislocare le molecole di MHC II e conseguentemente diminuirne l'espressione (Noriega et al., 2012). Alcuni studi sostengono che l'organismo umano impiega più risorse per controllare l'infezione da CMV che per qualsiasi altro patogeno.

1.3.1. La struttura del CMV

Il virione maturo, di forma rotondeggiante e di diametro compreso tra i 150-250 nm, è costituito da: un involucro pericapsidico ("envelope"), formato da un doppio strato fosfolipidico tipico delle membrane cellulari, da cui sporgono diversi tipi di glicoproteine virus-specifiche; un nucleocapside icosaedrico di circa 100 nm di diametro, costituito da 162 capsomeri prismatici e, interposto tra quest'ultimo e l'"envelope", uno strato di materiale elettrondenso fibroso e

granulare di natura proteica denominato tegumento (Fig. 1.9) (Gibson, 2008).

I virioni presentano uno spiccato pleiomorfismo, dovuto non solo alla variabilità di spessore del tegumento, ma anche alla possibile presenza in cellule infettate di due tipi di particelle virali difettive: i “Dense Bodies” (DB) e i “Non Infectious Envelope Particles” (NIEP) (Sarov et al., 1975; Irmiere, 1983; Pepperl et al., 2000; Schierling et al., 2005). I DB sono provvisti di un pericapside uguale a quello del virione maturo, ma privi sia di genoma virale, sia di struttura capsidica interna; i NIEP sono anch’essi privi del genoma, ma provvisti di capsid, tegumento e pericapside virale.

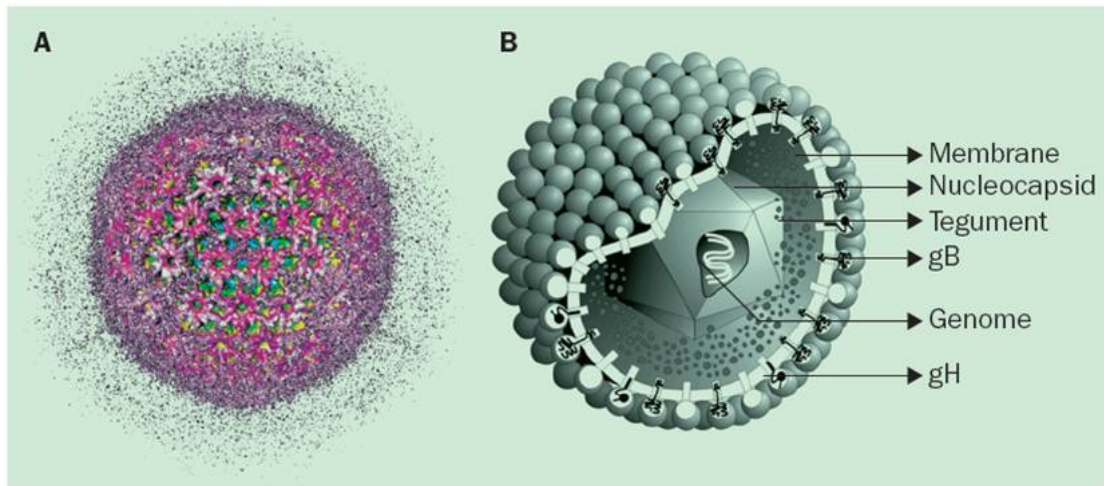


Fig. 1.9. Struttura del Cytomegalovirus. Immagine adattata da http://www.virology.net/big_virology/bvdnaherpes.html

1.3.2. Il CMV e la risposta immunitaria

Il CMV produce una stimola una importante risposta immunitaria, che stimola la produzione di Ig rivolti verso la glicoproteina B (gB/UL55). Questa immunizzazione protegge da una malattia letale negli animali (Schleiss, 2008). Anche le NK sembrano essere importanti nella risposta immunitaria, infatti nei topi senza NK, l’infezione è letale (Brown et al., 2001).

Il braccio dell’immunità maggiormente coinvolto è quello cellulo-mediato, in particolare i CD8, che controllano efficientemente la replicazione del CMV (Harari et al., 2004). I CD8 rispondono a diversi peptidi, anche se il target maggiore sono le proteine della matrice pp65 (UL83) e quelli prodotti dai geni immediate-early (IE) (Sylwester et al., 2005; Kern et al., 2000).

Durante l’infezione da CMV vengono continuamente reclutati linfociti T per cercare di bloccare i continui tentativi di riattivazione del CMV. Ciò fa sì che questa proporzione di linfociti T CMV specifici si sempre più grande ed occupi sempre più spazio immunologico a spese di altre specificità del sistema (Fig. 1.10).

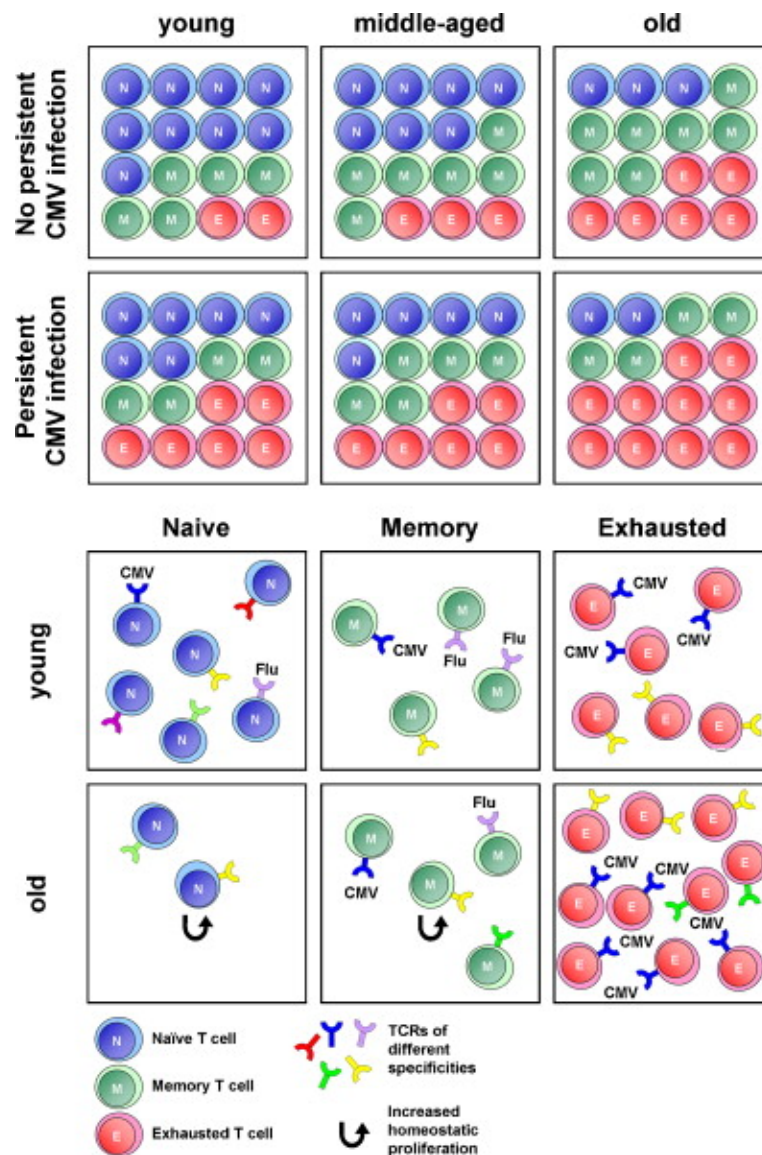


Fig. 1.10. Distribuzione delle sottopopolazioni dei CD8, nei diversi compartimenti del sistema immunitario (Brunner et al., 2011).

1.3.3. CMV e immunosenescenza

Il concetto che il CMV possa portare un rapido declino del sistema immunitario è relativamente nuovo. La prima osservazione che mostrava che il CMV diminuiva la risposta immunitaria è stata fatta nel 1991 in un studio su pazienti HIV positivi ed emofilici, in cui si è visto che i pz HIV-CMV positivi hanno un rischio età correlato maggiore di progressione in AIDS (Webster, 1991).

La CMV sieropositività è associata allo sviluppo di un fenotipo immunologico, detto immune risk phenotype (IRP), che è associato a una minore sopravvivenza.

Due studi svedesi OCTO e NONA (Wikby et al. 2002) hanno stabilito un'associazione tra la presenza di anticorpi anti cmv, l'espansione dei cd8+cd28-, ed altri parametri (bassa conta di cd4, $cd4/cd8 < 1$, elevati livelli di citochine infiammatorie), che vanno a far parte dell'IRP, con una diminuita capacità di sopravvivenza (Fig. 1.11).

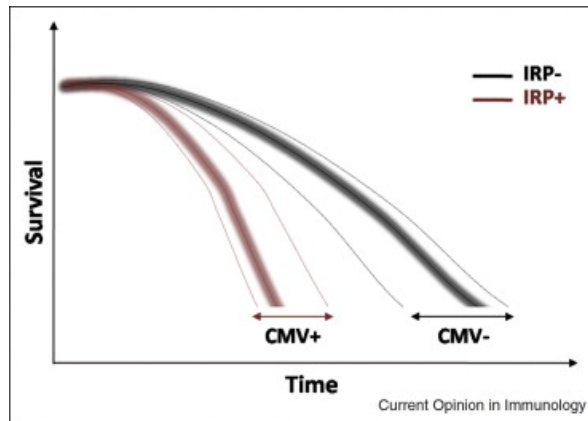


Fig. 1.11. Infezione da CMV, IRP e mortalità (Derhovanessian et al., 2009).

Il ruolo del CMV potrebbe essere dovuto al fatto che durante l'infezione c'è un accumulo di CD8 CMV specifici. Questo contribuisce a variare il rapporto CD4:CD8, parametro che fa parte dell'IRP, di per sé predittore di mortalità (Huppert et al., 2003). Inoltre si assiste a una diminuzione dei linfociti CD8 naive, con un aumento delle CD8 effector memory che causa un aumento dei CD8 (Fig. 8). Inoltre durante l'infezione vi è una diminuzione delle molecole costimolatorie CD27 e CD28, con un aumento dell'espressione del CD57+.

1.4 La citofluorimetria

La citofluorimetria a flusso è una metodica per l'analisi e la caratterizzazione di sospensioni cellulari monodisperse, che ci permette di avere informazioni sulle caratteristiche citologiche e/o biochimiche delle cellule. Il citometro si compone di un sistema fluidico, uno ottico ed uno elettronico.

Una sospensione di particelle (nel nostro caso cellule) viene convogliata da un sistema fluidico laminare di trasporto in un capillare fino al punto di misura. Un fascio luminoso focalizzato intercetta il flusso di particelle e vengono generati segnali dall'incontro di ogni singola particella con la radiazione elettromagnetica. I segnali generati, sono raccolti da un sistema di lenti, specchi diecrici e filtri ottici, e inviati ai rispettivi trasduttori che li convertono in segnali elettrici.

Questi segnali elettrici vengono amplificati ed elaborati da un analizzatore che provvede alla rappresentazione grafica e all'analisi statistica.

2. Materiali e Metodi

2.1. Materiali

2.1.1. Reagenti

Nella tabella 2.1 sono elencati i reagenti utilizzati durante gli esperimenti, la casa produttrice e il luogo di produzione.

Reagente	Casa Produttrice	Luogo di Produzione
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Pierce	USA
Ficoll-Paque TM PLUS Biochrom AG, Germania	Biochrom AG	Germania
Trypan Blue	Biochrom AG	Germania
Acido acetico	Merck	Germania
Bovine Serum albumine (BSA)	Acros	Belgio
Natriumazid (NaNH ₃)	Serva	Germania
Brefeldina A	Sigma	USA
GolgiStop	BD	San Jose, USA
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma	USA
FACSFlow	BD	San Jose, USA
FACS Lysing Solution	BD	San Jose, USA
FACS Permeabilizing Solution	BD	San Jose, USA
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom AG	Germania
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG	Germania
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA	Austria
Paraformaldeide (PFA)	Biochrom AG	Germania
Penicillina	Biochrom AG	Germania
Streptomycina	Biochrom AG	Germania
Staphilococcus enterotoxin B (SEB)	Sigma	USA
L-Glutamina	Biochrom AG	Germania
Cytometer Setup Tracking (CST)	BD	San Jose, USA

Tab. 2.1. Caratteristiche dei reagenti utilizzati.

2.1.2. Medium e buffer

Medium completo RPMI 1640 Medium, 100 U/μl Penicillina, 100 U/μl Streptomicina, 2 mM

L-Glutamina, 10% FCS

Soluzione di fissaggio 0.5% PFA in PBS

FACS wash buffer PBS, 0.5% BSA, 0.1% NaNH₃

2.1.3. Attrezzatura di laboratorio

Nella tabella 2.2 vi è un elenco dell'attrezzatura utilizzata in laboratorio per effettuare gli esperimenti.

Attrezzatura	Casa Produttrice	Luogo di Produzione
Cappa Sterile	Heraeus	Buckinghamshare, UK
Vortex	Scientific Industries	USA
Emocitometro	Neubauer Improved	
Incubatore	Heraeus	Buckinghamshare, UK
Centrifuga 5810	Eppendorf	Germania
Centrifuga multifuge 3 S	Heraeus	Buckinghamshare, UK
Flow Cytometer LSR II	BD	San Jose, CA, USA
Tubi Falcon in polistirene	BD	San Jose, CA, USA

Tab. 2.2. Attrezzatura utilizzata durante gli esperimenti.

2.1.4. Pannello anticorpale

Per la colorazione delle PBMc sono stati utilizzati tre pannelli anticorpali, denominati rispettivamente GS1, GS2, GS3 (Tab. 2.3, 2.4, 2.5).

Laser	Fluorocromo	Compagnia	Anticorpo	Clone	Qtà (µl)
V1	Violetto Brillante (BV)	Sirigen	CD4	-	5
V2	V500	BD	CD3	UCHT1	3
B1	Fluorescina isotiocianato (FITC)	BD	CD62L	DREG-56	1
B2	Ficoeritina (PE)	BD	CD27	L128	1.5
B3	Energy coupled eyes (ECD)	Beckman Coulter	CD45RA	2H4	1.5
B4	Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCp)	Invitrogen	CD45RO	UCHL1	0.75
B5	Ficoeritina Cianina 7 (PeCy7)	BioLegend	CD95	DX2	1
R1	Alexa 647 (A647)	BD	CCR7	150503	7.5
R2	Alexa 700 (A700)	BioLegend	CD28	CD 28.2	0.5
R3	Allofocianina (APC H7)	BD	CD8	SK1	0.75

Tab. 2.3. Pannello Gemstone 1.

Laser	Fluorocromo	Compagnia	Anticorpo	Clone	Qtà (µl)
V1	Violetto Brillante (BV)	Sirigen	CD4	-	5
V2	V500	BD	CD3	UCHT1	3
B1	Fluorescina isotiocianato (FITC)	BD	CD26	M-A261	3
B2	Ficoeritina (PE)	BD	CD27	L128	1.5
B3	Energy coupled eyes (ECD)	Beckman Coulter	CD45RA	2H4	1.5
B4	Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCp)	BioLegend	CD 11a	TS2/4	0.5
B5	Ficoeritina Cianina 7 (PeCy7)	eBioscience	CD127	eBioRDR5	1
R1	Alexa 647 (A647)	BD	CCR7	150503	7.5
R2	Alexa 700 (A700)	BioLegend	CD28	CD28.2	0.5
R3	Allofocianina (APC H7)	BD	CD8	SK1	0.75

Tab. 2.4. Pannello Gemstone 2.

Laser	Fluorocromo	Compagnia	Anticorpo	Clone	Qtà (µl)
V1	Violetto Brillante (BV)	Sirigen	CD4	-	5
V2	V500	BD	CD3	UCHT1	3
B1	Fluorescina isotiocianato (FITC)	Beckman Coulter	TCR pan g/d	IMMU510	5
B2	Ficoeritrina (PE)	BD	CD27	L128	1.5
B3	Energy coupled eyes (ECD)	Beckman Coulter	CD45RA	2H4	1.5
B4	Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCp)	BioLegend	CD16	3G8	1.25
B5	Ficoeritrina Cianina 7 (PeCy7)	Beckman Coulter	TCR vd2	-	1.5
R1	Alexa 647 (A647)	BD	CCR7	150503	7.5
R2	Alexa 700 (A700)	BioLegend	CD56	HCD56	0.5
R3	Allofococianina (APC H7)	BD	CD8	SK1	0.75

Tab. 2.5. Pannello Gemstone 3.

2.1.5. Software

Flowjo 9.4.1 Treestar, USA

FacsDiva 7 BD, USA

Prism 6, USA

2.2. Metodi

2.2.1. Preparazione PBMC

Il sangue eparinato è stato diluito con PBS (1:1) ed adagiato sul Ficoll Paque e centrifugato per 20 minuti a 1000 g senza freni. Tramite le pipette Pasteur è stato aspirato il buffy coat e lavato 2 volte con PBS. In seguito le PBMc sono state risospese nel medium con una concentrazione di $5 \times 10^6/\mu\text{l}$ e messe in incubatore umidificato con 5% CO₂ a 37° tutta la notte.

2.2.2. Colorazione delle PBMc

250.000 di PBMc (50 µl) sono stati dapprima lavate con 3 µl di wash buffer e centrifugate a 4° per 8 minuti a 400 g. Decantato il sovrantante, a ogni tubo (in totale 3 tubi per donatore) sono stati aggiunti gli anticorpi i rispettivi anticorpi dei tre pannelli GS1, GS2, GS3. In seguito i campioni sono stati incubati per 30 minuti a 4°. Le emazie sono state lisate tramite la BD lysing solution per 10 minuti a temperatura ambiente (diluita con acqua distillata con un rapporto di 1:10). In seguito le cellule sono state risospese in wash buffer (3 µl) e centrifugate a 400 g per 8 minuti. Decantato il sovrantante sono state acquisite al citofluorimetro.

2.2.3. Ottimizzazione dei pannelli

Tutti gli anticorpi prima di essere utilizzati per le colorazioni di superficie sono stati titolati, ed è stata utilizzata la concentrazione dell'anticorpo con il più alto Stain Index.

2.2.4. Acquisizione citofluorimetrica

L'acquisizione citofluorimetrica è stata effettuata tramite BD LSR II. Il citofluorimetro LSR II è provvisto di tre laser (linee di eccitazione dei laser a 405 nm, 488 nm e 635 nm), con 11 canali di fluorescenza.

Prima di acquisire i campioni ogni volta è stato effettuato un controllo di qualità mediante calibrazione del citofluorimetro tramite acquisizione di una goccia di CST (Cytometer Setup and Tracking) per avere dei target di fluorescenza e più precisamente di MFI (Mean fluorescence index) dipendenti dalla performance dello strumento.

In seguito alla calibrazione, per migliorare la performance dei canali del citofluorimetro in un'unica acquisizione, sono state acquisite le Rainbow-beads, che sono delle particelle fluorescenti contenenti un mix di fluorocromi, di taglia molto simile con diversa intensità di fluorescenza da 365 a 650 nm.

2.2.5. Analisi citofluorimetrica e strategie di gating

Dopo l'acquisizione le analisi dei dati è stata effettuata in un primo tempo con FACSDIVA v6.1.3 ed in seguito con FlowJo 9.3.3. Sono stati acquisiti 50.000 eventi che ricadevano nel gate dei linfomonociti.

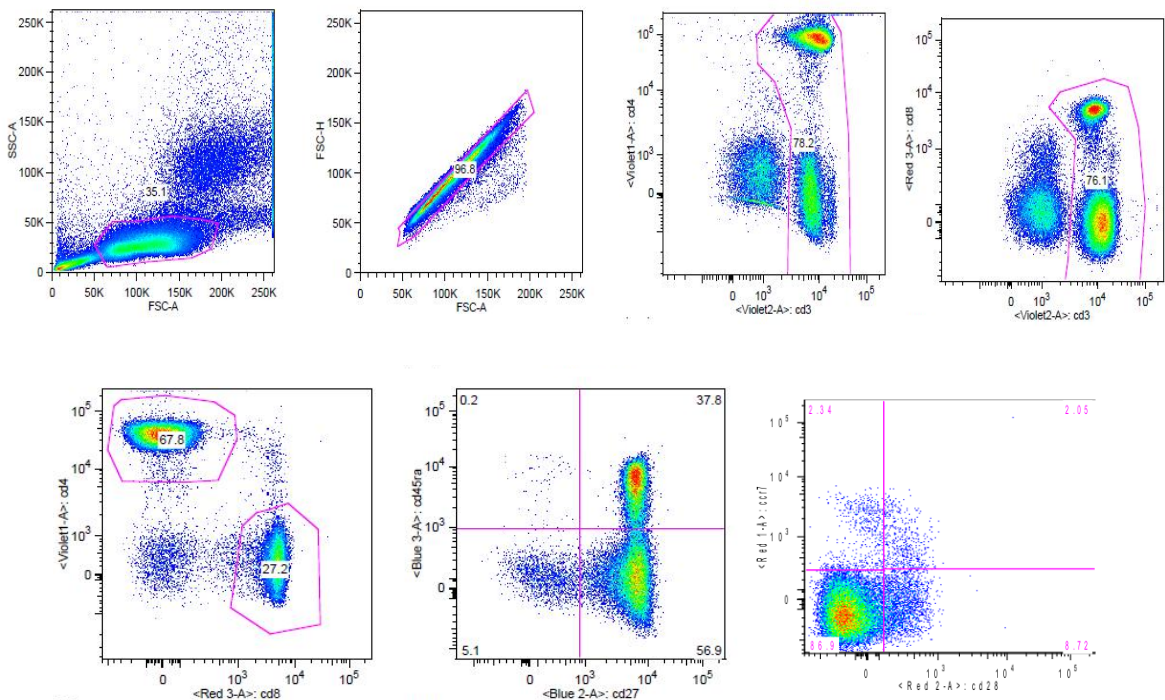


Fig. 2.1. Strategia di gating del pannello GS1, GS2, GS3.

I linfociti sono stati selezionati (Fig. 2.1) mediante SSC (side scatter) ed FSC (forward scatter), ed in seguito le cellule doppie sono state selezionate mediante il FSC-H (altezza) vs FSC-A (area). In seguito per escludere i linfociti T CD3 negativi abbiamo selezionato dai CD3 vs CD4

le cellule CD3+CD4+, e dai CD3 vs CD8 le cellule CD3+CD8+. in seguito tramite un boolean gate (CD3+CD4+ OR CD3+CD8+) abbiamo selezionato i CD3. Dai CD3 abbiamo selezionato i CD4+ ed i CD8+. Su queste cellule abbiamo visto l'espressione del CD45RA e del CD27. Questo processo è stato simile in GS1, in GS2 ed in GS3. Mentre in GS1 ed in GS2 abbiamo selezionato i linfociti CD28 e CCR7 positivi.

In GS1 (Fig. 2.2) abbiamo proseguito l'analisi valutando l'espressione del CD95 e del CD62L sui CD4 e sui CD8, ed in seguito anche del CD45RO.

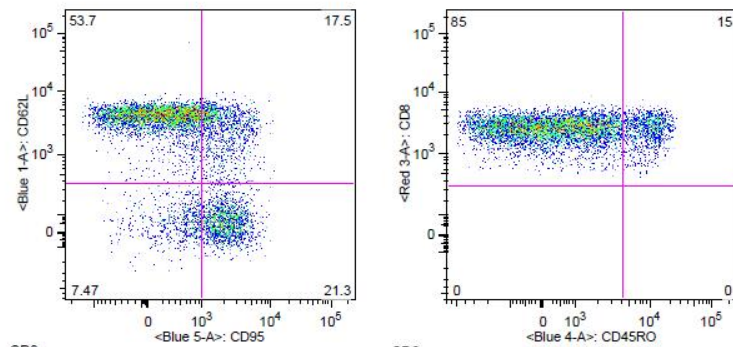


Fig. 2.2. Strategia di gating del pannello GS1.

In GS2 abbiamo proseguito l'analisi valutando l'espressione sui CD4 e sui CD8 del CD28 e del CCR7 ed in seguito del CD11a e del CD26 e del CD127.

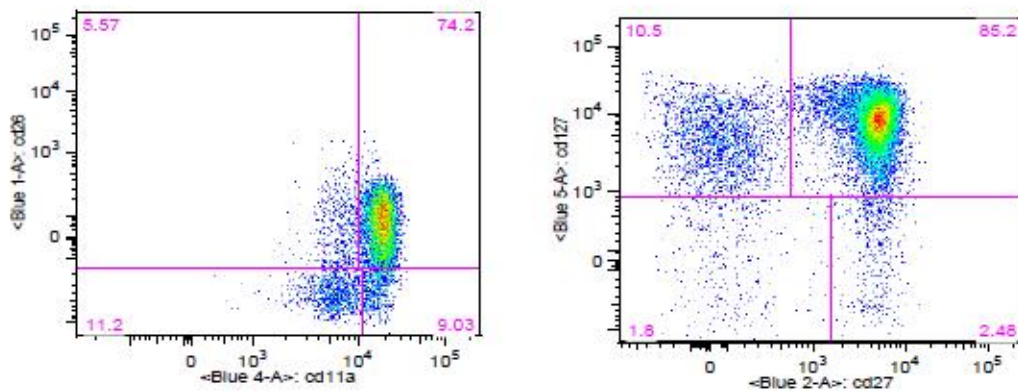


Fig. 2.3. Strategia di gating del pannello GS2.

In GS3 dai CD3 abbiamo selezionato i TCR Pan g/d e da questa popolazione i linfociti T Vd2+, su questa popolazione e sui TCR gd abbiamo visto l'espressione del CD45RA, del CD27 e del CD16.

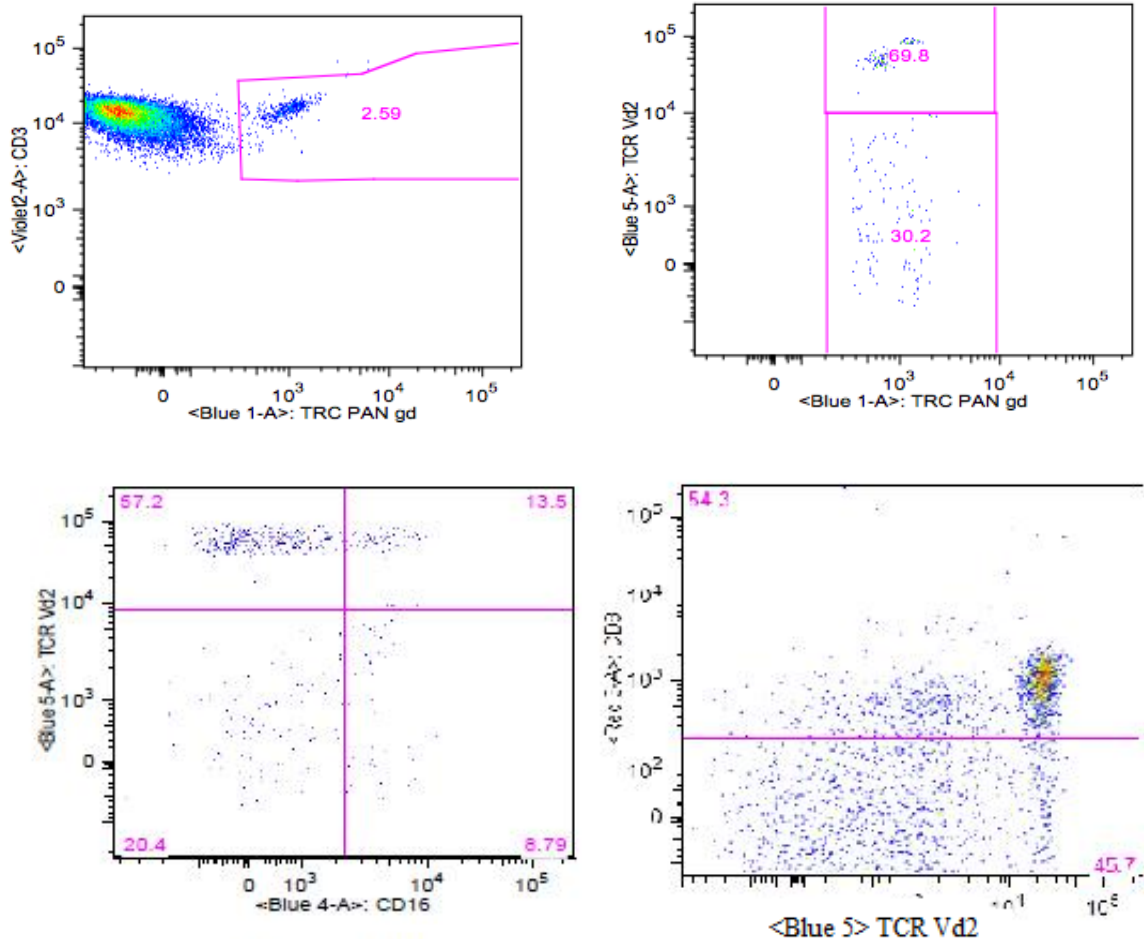


Fig. 2.4. Strategie di gating del pannello GS3.

2.2.6. Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate mediante il programma Prism 6, ed è stato effettuato il test di Mann-Whitney per valutare la significatività dei risultati. Inoltre sono stati effettuati il test di Spearman per valutare il grado di relazione tra le variabili, ed in seguito l'analisi di regressione lineare.

2.3. Popolazione in studio

Giovani volontari sani tra i 18 ed i 35 anni sono stati reclutati dall'università di Brighton e Sussex.

Volontari anziani sani tra i 60 e gli 85 anni sono stati reclutati dai medici di base nel sud-est dell'Inghilterra grazie all'aiuto di un'infermiera dedicata (Primary Care Research Nurse, PCRN).

Nella popolazione in studio sono stati raccolti i dati riguardanti la pressione arteriosa, temperatura corporea, altezza e peso.

Sono stati prelevati circa 10 ml di sangue in provetta contenente citrato di sodio.

Criteri di inclusione

1. Donne e uomini bianchi sani
2. Et  compresa tra i 18-35 anni e tra i 60-85 anni
3. Mini Mental State Examination (MMSE) >27

Criteri di esclusione

1. Trapianto d'organo
2. Utilizzo di terapie immunosoppressive o immunomodulanti nell'ultimo anno
3. Trattamento per cancro nei 5 anni precedenti
4. Malattie autoimmuni
5. Diabete mellito
6. Insufficienza epatica severa
7. HIV o altra immunodeficienza
8. Demenza
9. Alcolista o tossicodipendente
10. Insufficienza renale grave
11. Disordini endocrini
12. Volontari con infezioni acute o recenti sono stati invitati a tornare dopo 4 settimane

3. Obiettivi

Lo scopo dello studio è valutare:

- se durante l'infezione da CMV vi è un cambiamento delle sottopopolazioni linfocitarie nel compartimento dei CD8 e dei CD4, e se
 - negli anziani e nei giovani queste modifiche sono simili;

- se l'infezione da CMV causa dei cambiamenti nell'espressione dei TCRgd, e se:
 - nell'anziano e nel giovane queste modifiche sono simili;

- il contributo del CMV all'immunosenescenza.

4. Risultati

Sono stati testati in totale 66 donatori, 34 anziani (detti OLD) con un'età maggiore di 65 anni e 32 donatori giovani (detti YOUNG) con un'età compresa tra i 20 ed i 35 anni.

Le loro PBMc sono state colorate con il pannello anticorpale Gemstone 1, 2 e 3, per la valutazione delle diverse sottopopolazioni linfocitarie (Tab. 4.1).

Sierostato	Età	N. dei partecipanti
CMV +	OLD	25
	YOUNG	7
CMV-	OLD	19
	YOUNG	15

Tab. 4.1. Caratteristiche della popolazione in studio.

4.1. Conta linfocitaria

4.1.1. CD3

Se valutiamo per percentuale dei CD3 in relazione al sierostato la mediana risulta essere 68% nei sieronegativi e 72.4% nei positivi; mentre l'analisi per età, quindi old vs. young mostra una mediana di 70% e 71% rispettivamente ($p=ns$) (Fig. 4.1). La percentuale dei CD3 nei quattro gruppi esaminati (Fig. 4.2) diminuisce con l'aumentare dell'età in modo significativo infatti si passa dal 69.8% dei giovani negativi al 66.9% degli anziani negativi ($p=0.04$). Questa percentuale però tende ad aumentare nei donatori CMV+ anziani fino ad arrivare al 71.8% ($p=0.03$).

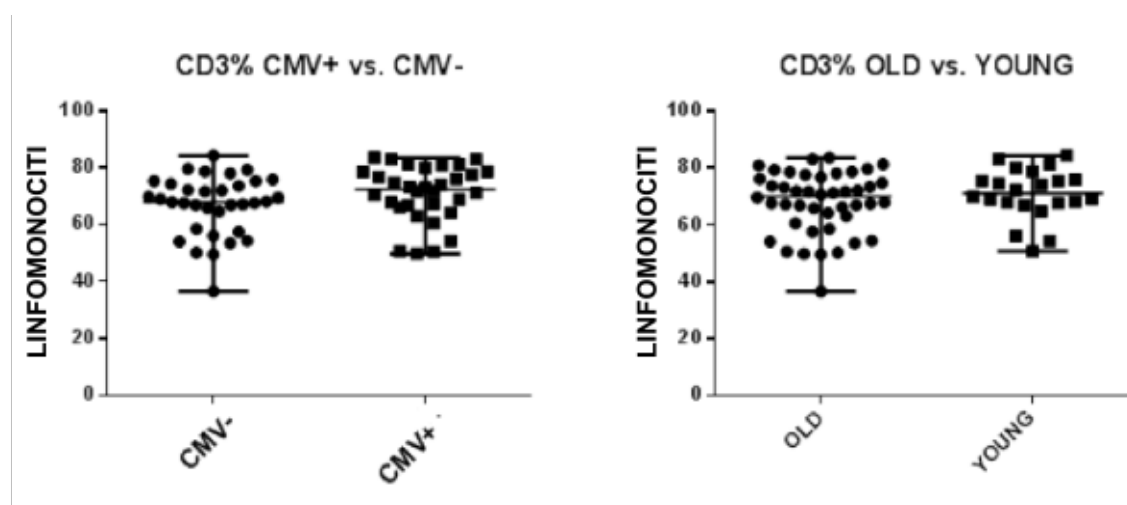


Fig. 4.1. Percentuale dei CD3 nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

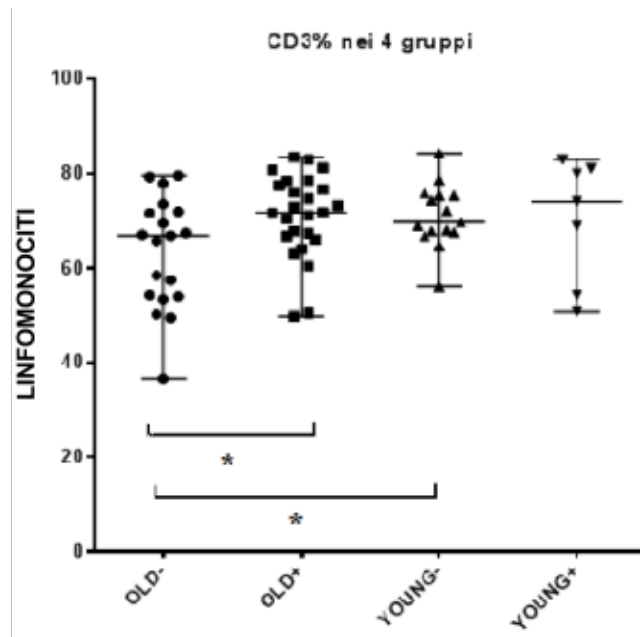


Fig. 4.2. Percentuale dei CD3 nei quattro gruppi esaminati.

4.1.2. CD4

La mediana della percentuale dei CD4 (Fig. 4.3) varia in relazione al sierostato e va dal 61.2% dei CMV- al 63.1% dei CMV+, sebbene non in modo significativo ($p=0.07$) aumenta con l'età, la mediana aumenta con l'età dal 60.6% nei giovani al 65.7% degli anziani ($p=0.06$).

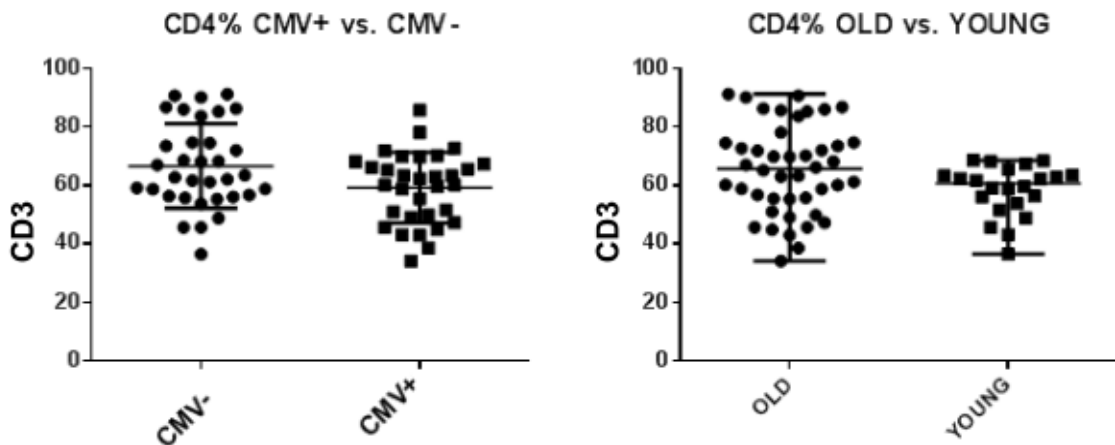


Fig. 4.3. Percentuale dei CD4 nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Dividendo i gruppi per età e per sierostato (Fig. 4.4), la percentuale della mediana dei CD4 aumenta con l'età in modo significativo ($p=0.0010$) dal 59.4% dei giovani al 74.5% negli anziani. All'interno del gruppo di anziani, la percentuale scende a 60.2% (0.0014).

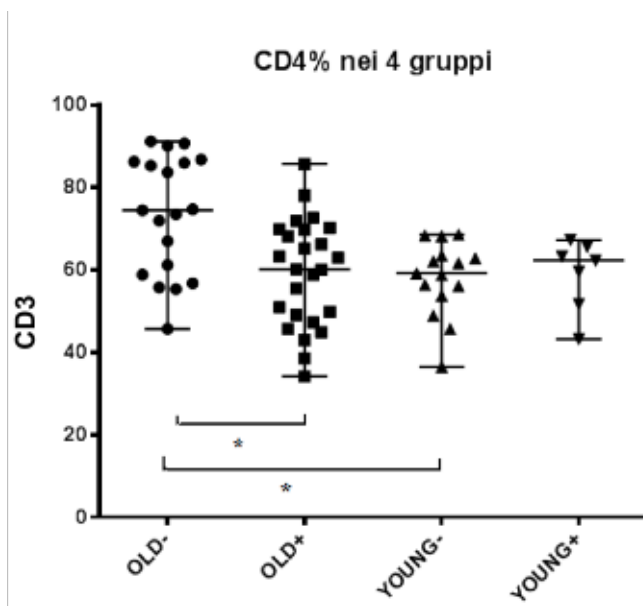


Fig. 4.4. Percentuale dei CD4 nei quattro gruppi esaminati.

4.1.3. CD8

La mediana della percentuale dei CD8 (Fig. 4.5) varia in modo significativo ($p=0.0085$) in relazione al sierostato e va dal 25.6% dei CMV- al 31.5% dei CMV+, mentre l'età non sembrerebbe influire (mediana degli anziani 28.1 vs. 28.6 mediana dei giovani).

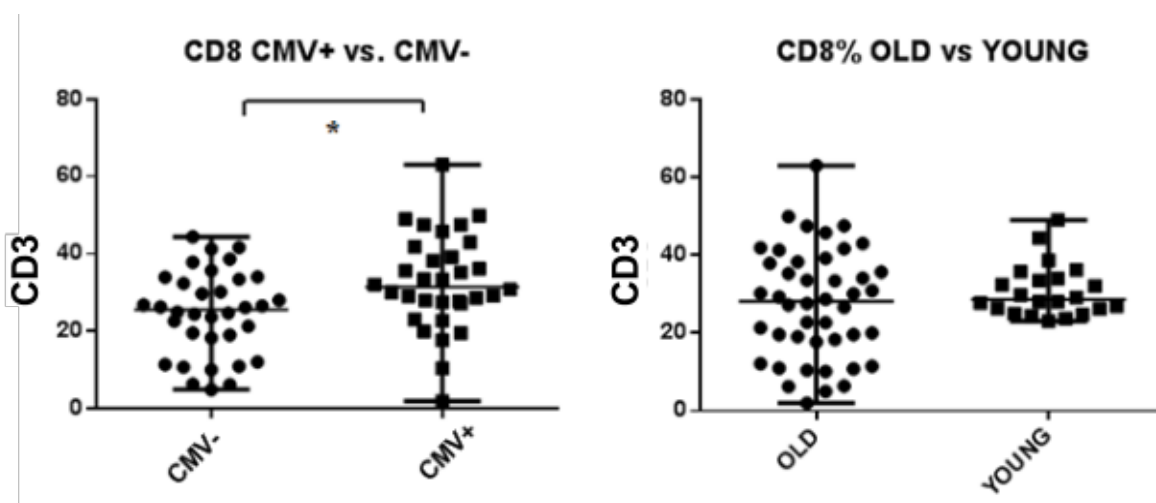


Fig. 4.5. Percentuale dei CD8 nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Analizzando i 4 gruppi separatamente, notiamo che la mediana della percentuale dei CD8 diminuisce con l'avanzare dell'età e va dal 28.1% dei giovani negativi al 19.1% degli anziani negativi ($p=0.0089$). Nel gruppo anziani CMV positivi questa percentuale tende ad aumentare fino al 33.4% ($p=0.0030$), questa tendenza vi è anche nel giovane positivo, dove si arriva al 29.1% (mediana) (Fig. 4.6). Inoltre anche nei giovani positivi la percentuale della mediana dei CD8 è maggiore rispetto agli anziani negativi 29.1% vs. 19.1% ($p=0.02$).

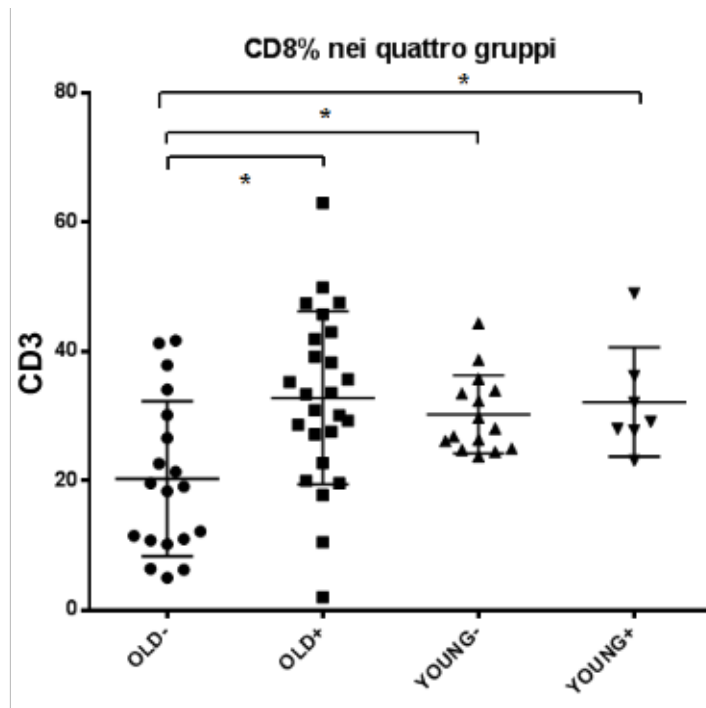


Fig. 4.6. Percentuale dei CD8 nei quattro gruppi esaminati.

4.1.4. Rapporto CD4/CD8

Il rapporto CD4:CD8 è stato sempre maggiore di 1 negli anziani e nei giovani CMV negativi. Negli anziani CMV positivi il 26,3% ha un rapporto CD4:CD8 < 1, mentre nei giovani CMV positivi il 14%.

4.2. Sottopopolazioni linfocitarie

Le diverse sottopopolazioni sono state identificate tramite i markers di superficie CD27, CD45RA, CD28, CCR7, CD95, CD62L, CD45RO. Dapprima sono state identificate con i markers CD45RA e CD27 (vedi Fig. 4.7) e poi mediante gli altri.

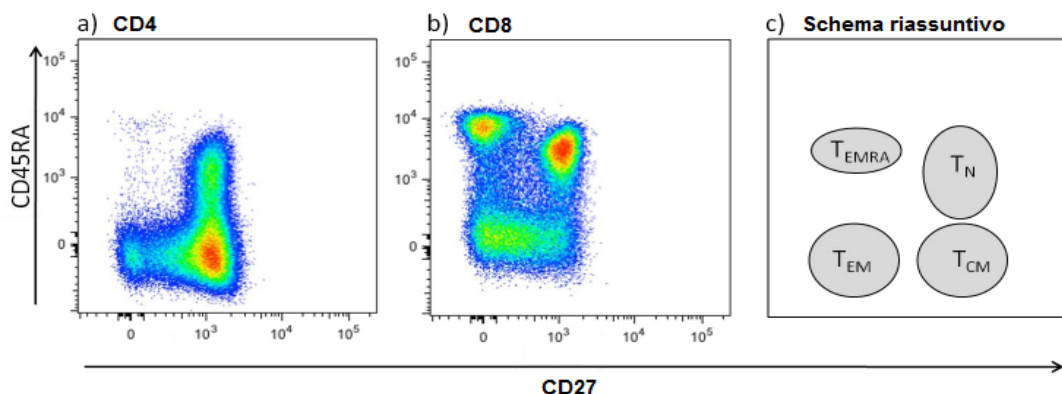


Fig. 4.7. Rappresentazione delle 4 sottopopolazioni individuate mediante i markers CD27 e CD45RA.

4.2.1. Linfociti T Naive

I linfociti T naïve (TN) sono stati identificati dapprima mediante i markers CD27 CD45RA, e sono stati definiti come CD27+CD45RA+. Aggiungendo in seguito gli altri markers di identificazione sono stati selezionati come TN i linfociti CD27+CD45RA+CD28+CCR7+CD62L+CD95-CD45RO-.

4.2.1.1. CD4

Valutando la mediana della percentuale dei CD4 TN (CD27+CD45RA) non sono emerse modifiche sostanziali tra i giovani e gli anziani (Fig. 4.8), rispettivamente (mediana 45.75% vs. 45.65%), mentre l'analisi per sierostato ha mostrato una differenza significativa della mediana delle TN nei sieropositivi di 38.7% vs. 53.05% dei negativi ($p=0.03$).

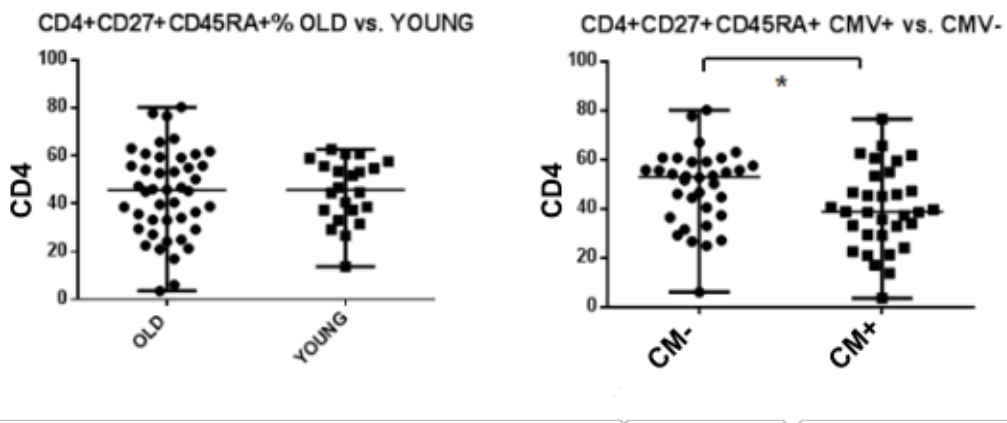


Fig. 4.8. Percentuale dei CD4 naïve nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Analizzando i diversi 4 gruppi, sebbene vi sia una diminuzione della mediana delle cellule CD4N con l'età da 53.3% dei giovani al 52.8% degli anziani, ed una diminuzione CMV correlata (mediana anziani negativi 52.8% vs. 39.7% anziani positivi, e mediana giovani negativi 53.3% vs. 37.4% dei giovani positivi), i risultati non sono significativi (Fig. 4.9).

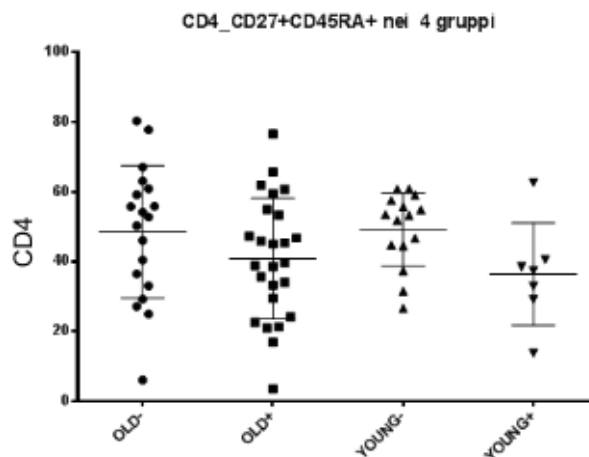


Fig. 4.9. Percentuale dei CD4 naïve nei quattro gruppi esaminati.

Aggiungendo gli altri markers di identificazione alle cellule CD4 N, il CD28, CCR7, CD62L, CD95, CD45RO e definendo le cellule N come CD28+CCR7+CD62L+CD95-CD45RO- (le chiameremo CD4 N7) i risultati sono sovrapponibili ai precedenti, infatti correlando la popolazione dei CD4 N7 al sierostato e all'età, resta significativa la differenza tra i sieropositivi e sieronegativi, con una percentuale della mediana rispettivamente 16.2% vs. 25.8% ($p=0.02$) (Fig. 4.10).

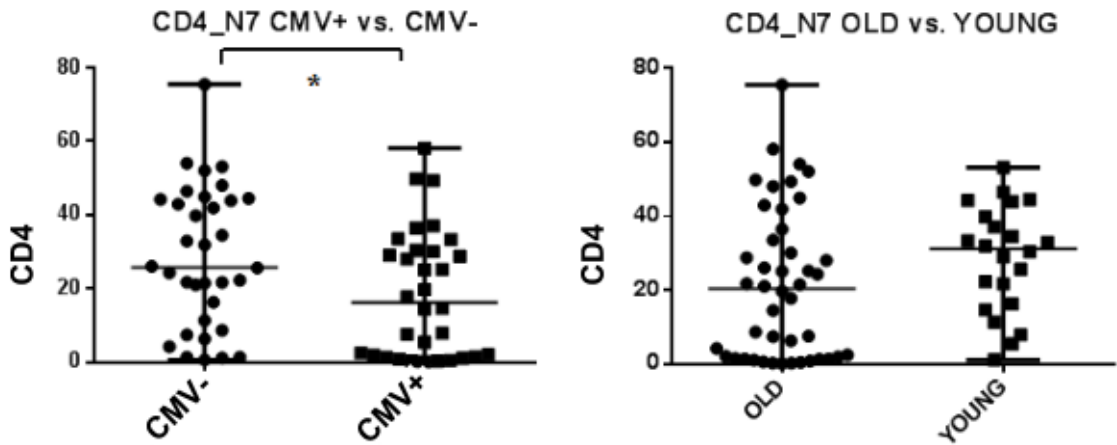


Fig. 4.10. Percentuale dei CD4 N7 nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi per età e sierostato (Fig. 4.11), si nota una tendenza alla diminuzione delle cellule naïve CMV correlata. Infatti, sebbene non siano differenze significative, si osserva una mediana negli anziani negativi di 21.8% vs. 14.5% anziani positivi, e mediana giovani negativi 32.9% vs. 29% giovani positivi.

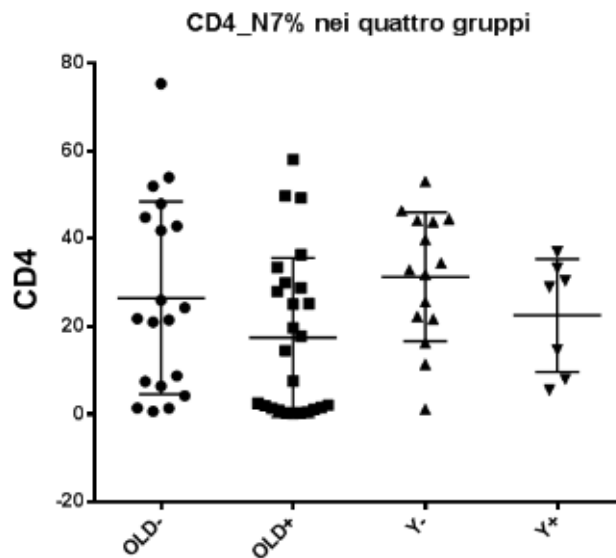


Fig. 4.11. Percentuale dei CD4 N7 nei quattro gruppi esaminati.

All'interno del secondo pannello Gemstone 2, abbiamo definito i naïve come cellule CD27+CD45RA+CD28+CCR7+ ed abbiamo analizzato l'espressione del CD11a e alla molecola di superficie CD26 sui CD4 e sui CD8 (risultati mostrati in seguito).

L'analisi per sierostato ha mostrato un aumento della popolazione CD11a-CD26+ nei CMV+ rispetto ai CMV- (mediana: 10.85% vs. 4.9%, $p=0.042$), ed un aumento all'interno della popolazione anziana rispetto ai giovani (8.6% vs. 3.8%, $p=0.03$) (Fig. 4.12).

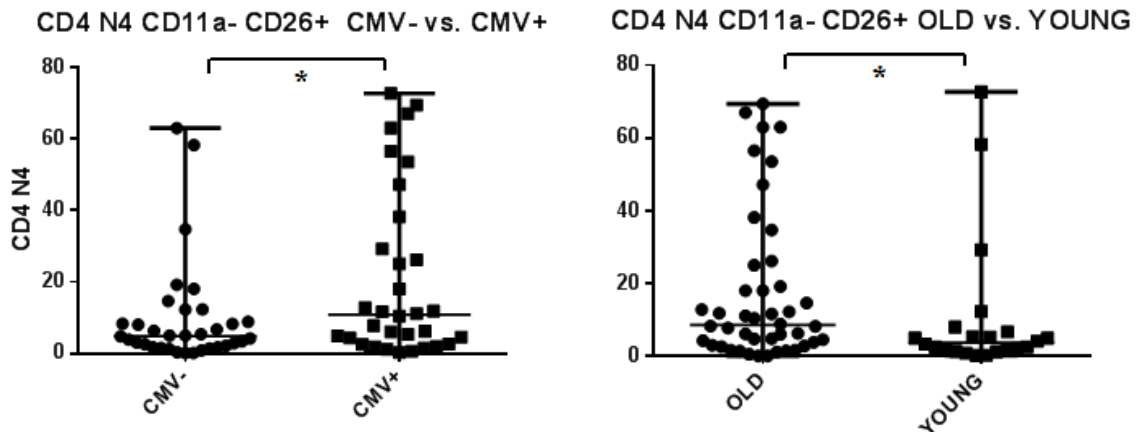


Fig. 4.12. Percentuale dei CD4 N4 CD11a-CD26+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

L'analisi dei 4 gruppi invece (Fig. 4.13) non ha mostrato differenze significative, sebbene negli anziani la percentuale di questa popolazione varia dal 11.7% nei positivi al 6.3% nei negativi con un valore della $p=0.09$, e vi sia un aumento negli anziani positivi rispetto ai giovani negativi (6.3% vs. 4.2%).

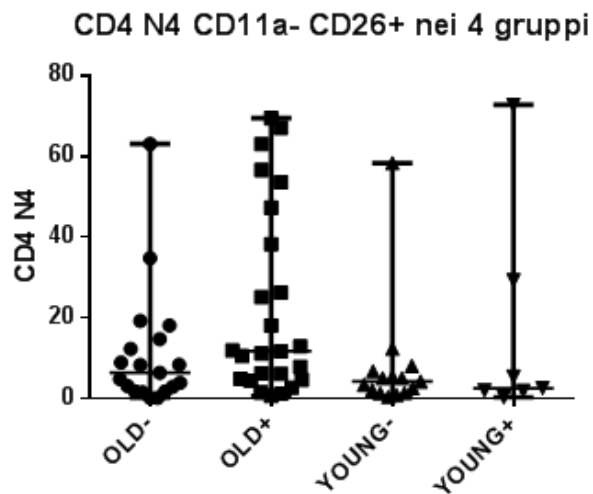


Fig. 4.13. Percentuale dei CD4 N4 CD11a-CD26+ nei 4 gruppi esaminati.

Anche nella popolazione TN CD4+CD11a+CD26+ (Fig. 4.14), non emergono differenze significative, se non una tendenza ad aumentare nei CMV- vs. CMV+ (1.75% vs. 1.072%) e negli anziani (1.7% vs. 0.5% giovani).

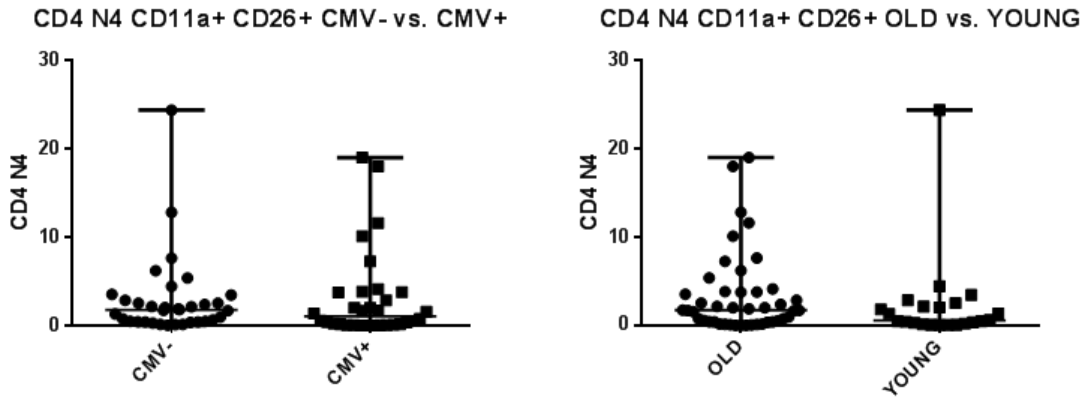


Fig. 4.14. Percentuale dei CD4 N4 CD11a+CD26+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

La divisione in gruppi (Fig. 4.15) non ha mostrato un aumento significativo nei giovani senza infezione (1.3% vs. 0.22%), e negli anziani senza infezione (1.88% vs. 1.6%).

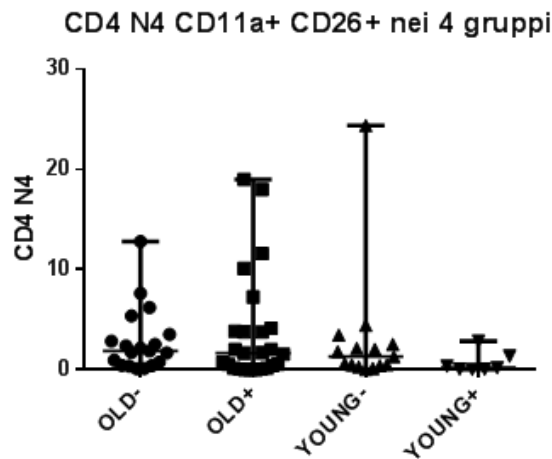


Fig. 4.15. Percentuale dei CD4 N4 CD11a+CD26+ nei 4 gruppi.

L'analisi dei CD11a+CD26- per sierostato (Fig. 4.16) ha mostrato un aumento di questa popolazione nei soggetti CMV-, con una mediana di 6.9% vs. 1.9% dei CMV+, con un $p < 0.0001$, mentre la suddivisione per età non ha mostrato differenze significative, sebbene vi sia

una tendenza a diminuire con l'avanzare dell'età, si passa infatti da una mediana del 5.9% dei giovani al 3.7% degli anziani (p=0.2).

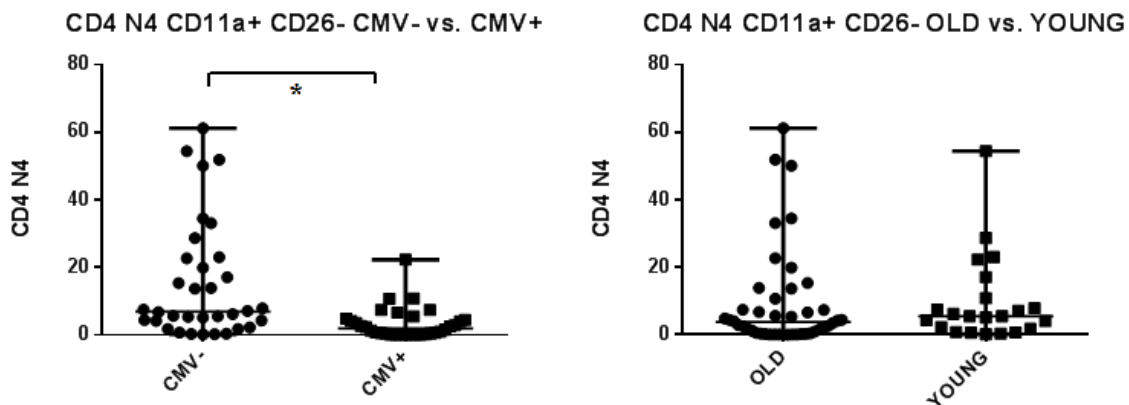


Fig. 4.16. Percentuale dei CD4 N4 CD11a+CD26- nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

La Fig. 4.17, mostra la suddivisione per gruppi. Anche qui emerge una percentuale maggiore negli anziani negativi rispetto agli anziani positivi (13.7% vs. 1.33%), con una $p < 0.0001$. Questo avviene anche nei giovani CMV-, infatti la percentuale è aumentata rispetto al giovane CMV+ (6.1% vs. 4.07%, $p = 0.5$).

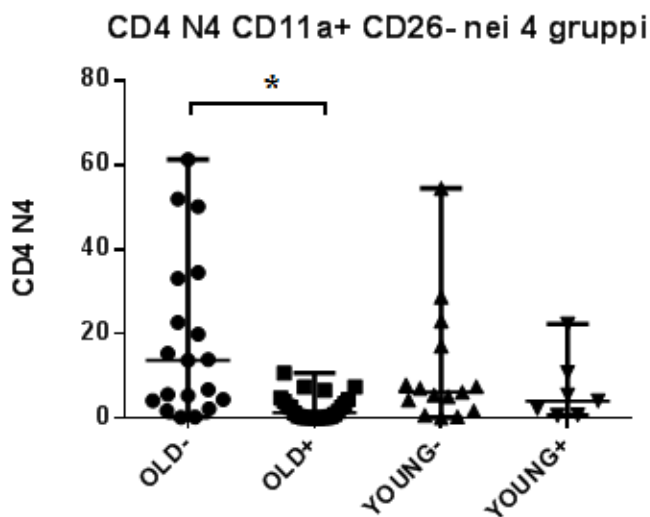


Fig. 4.17. Percentuale dei CD4 N4 CD11a+CD26- nei 4 gruppi.

Analizzando la popolazione doppia negativa (CD11a-CD26-), non emergono differenze significative correlate al sierostato ed all'età (Fig. 4.18), sebbene si noti un aumento di questa popolazione nei CMV+ (83.2% vs. 78.2%), e nei giovani (87% vs. 76%)

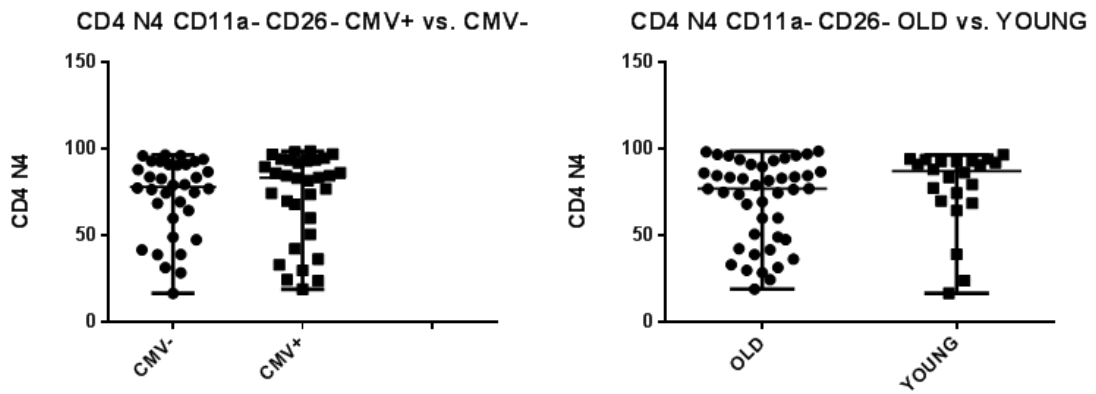


Fig. 4.18. Percentuale dei CD4 N4 CD11a-CD26- nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

La Fig. 4.19 mostra la percentuale dei doppi positivi nei 4 gruppi, si osserva una diminuzione correlata all'età, infatti si passa dal 86.3% dei giovani all'83% degli anziani negativi ed una diminuzione CMV correlata solo negli anziani, si passa dall'83% dei CMV- al 74% dei CMV+ anziani.

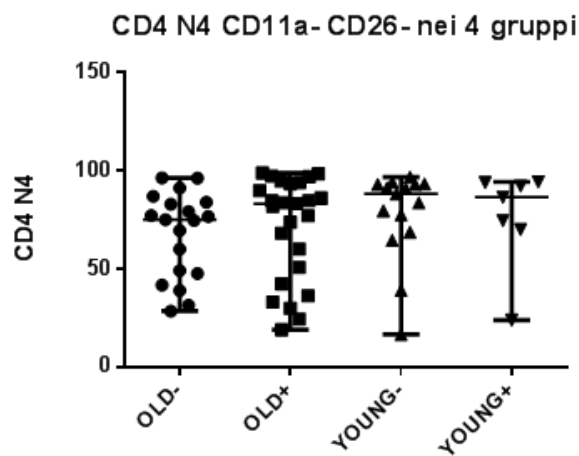


Fig. 4.19. Percentuale dei CD4 N4 CD11a-CD26- nei 4 gruppi esaminati.

Complessivamente nella Fig. 4.20 sono mostrate le differenze in termini di CD11a e CD26 all'interno dei CD4 N4.

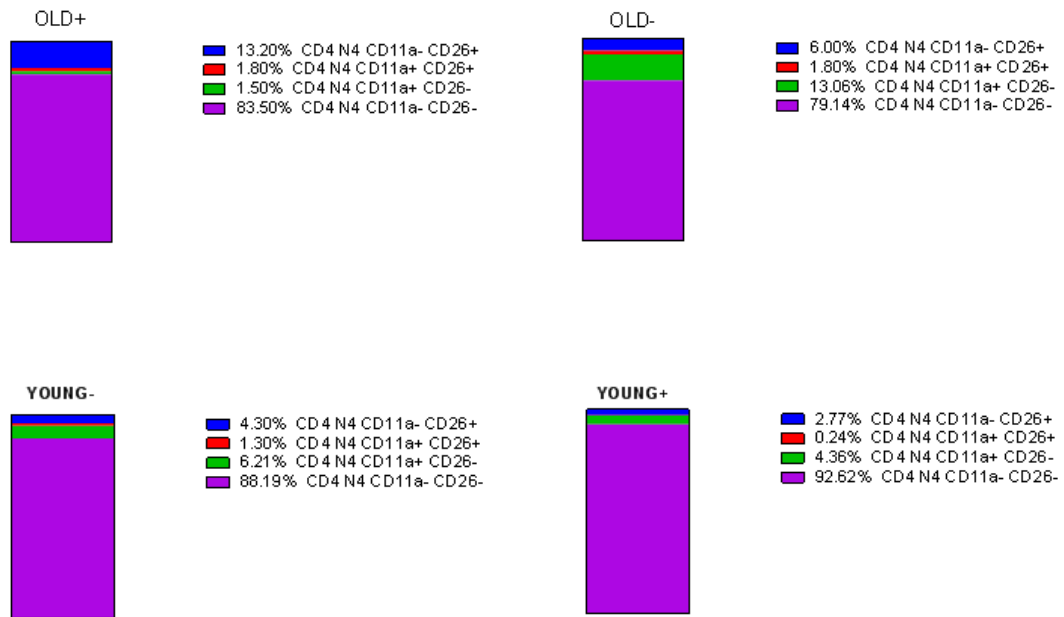


Fig. 4.20. Modifiche dei CD4 N4 CD11a CD26 all'interno dei 4 gruppi.

4.2.1.2. CD8

Dall'analisi dei CD8 TN (CD27+CD45RA+), sono emerse delle modifiche sia correlate al sierostato che all'età. Vi è una diminuzione dei CD8CD27+CD45RA+ con l'avanzare dell'età, con una mediana pari a 54.8% nei giovani vs. 16.6% negli anziani ($p < 0.0001$), ed una diminuzione di questa percentuale anche nei donatori con infezione da CMV (CMV+ 19.05% vs. CMV- 49% con una $p = 0.004$) (Fig. 4.21).

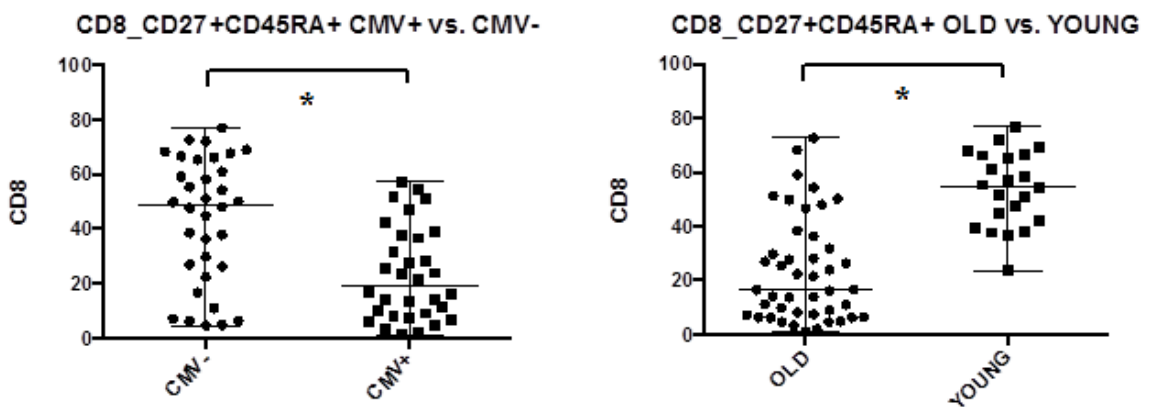


Fig. 4.21. Percentuale dei CD8 naïve nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Analizzando i 4 gruppi esaminati si nota una progressiva diminuzione con l'avanzare dell'età, infatti nei giovani negativi la mediana è del 61%, mentre negli anziani negativi 27% ($p < 0.0001$). Inoltre questa significativa ($p = 0.0006$) resta se paragoniamo la mediana degli anziani positivi e dei giovani positivi, rispettivamente 39.2% vs. 14%. Durante l'infezione da CMV questo trend viene mantenuto ed amplificato, infatti nei giovani CMV negativi la mediana è del 61% e nei

giovani positivi è pari a 39.2% ($p=0.0029$). Questo fenomeno avviene anche negli anziani con infezione da CMV, infatti la percentuale si riduce da 27% al 14% anche se non in modo significativo ($p=0.07$) (Fig. 4.22).

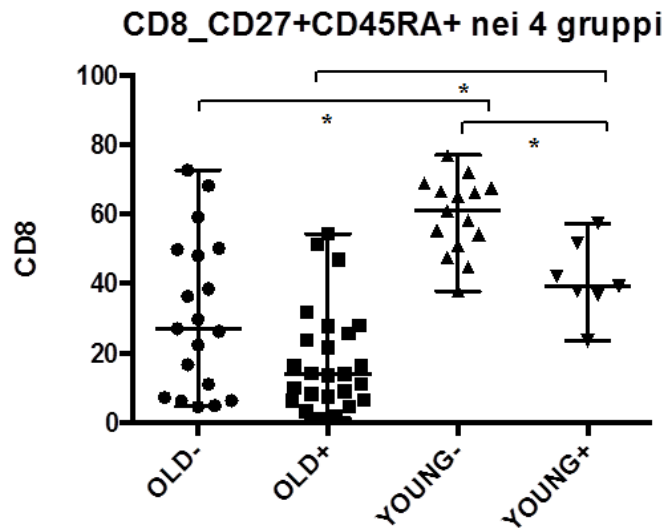


Fig. 4.22. Percentuale dei CD8 naïve nei quattro gruppi esaminati.

Quando andiamo ad aggiungere per l'identificazione delle TN gli altri markers CD28, CCR7, CD95, CD62L, CD45RO, l'analisi per sierostato mostra una differenza significativa tra i CMV+ vs. CMV-, con una mediana che va rispettivamente dall'1.05% al 7.6% ($p=0.0002$), mentre l'analisi per età mostra una diminuzione dei CD8_N7 con l'aumentare dell'età, dal 7.3% dei giovani negativi al 1.9% negli anziani negativi ($p=0.0057$)(Fig. 4.23).

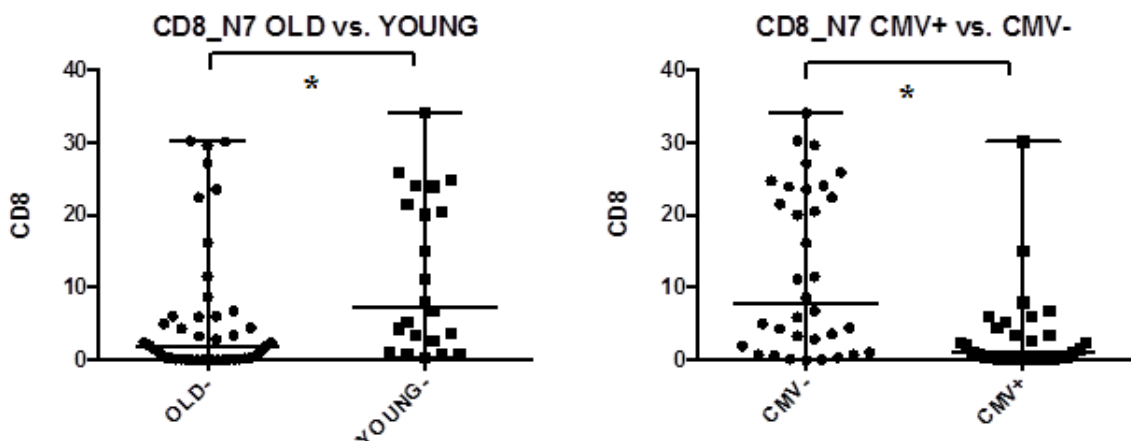


Fig. 4.23. Percentuale dei CD8_N7 nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Quando analizziamo i 4 gruppi (Fig. 4.24), resta una differenza significativa tra gli anziani negativi con una mediana di 5 e gli anziani positivi con una mediana di 0.3 ($p=0.0055$). Mentre nei giovani positivi vi è una tendenza non significativa di questa popolazione a diminuire infatti si fa dal 20% (valore mediano) dei negativi al 3.3% dei positivi (0.06).

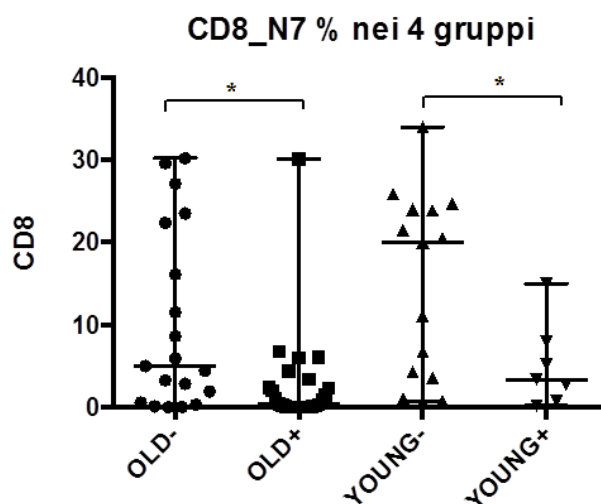


Fig. 4.24. Percentuale dei CD8_N7 nei 4 gruppi esaminati.

All'interno del secondo pannello Gemstone 2, abbiamo definito i naïve come cellule CD27+CD45RA+CD28+CCR7+ ed abbiamo analizzato l'espressione del CD11a e alla molecola di superficie CD26 nei CD8.

I CD8 naïve CD11a-CD26+ (Fig. 4.25), non hanno mostrato grosse modifiche nei CMV+ e nei CMV- (rispettive mediane 16.45% vs. 15.75%), mentre si nota un aumento significativo di questa popolazione ($p=0.0002$) negli anziani rispetto ai giovani (rispettivamente) 24.8% vs. 4.8%.

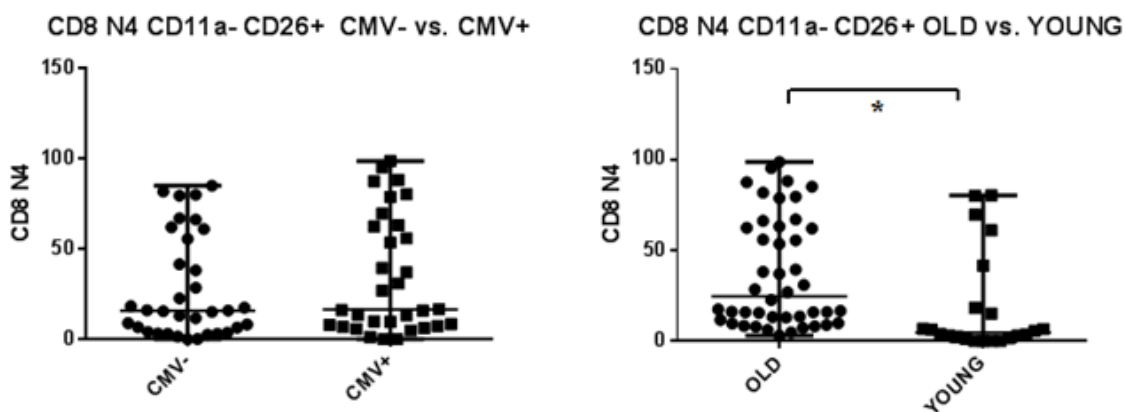


Fig. 4.25. Percentuale dei CD8_N4 CD11a-CD26+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

L'analisi dei 4 gruppi (Fig. 4.26), mostra un aumento dei CD11a-CD26+ età correlato sia nei CMV negativi (giovani negativi 4% vs. 22.7% anziani negativi, $p=0.03$), che nei CMV+ (giovani positivi 5.7% vs. anziani positivi 26.9%, $p=0.04$).

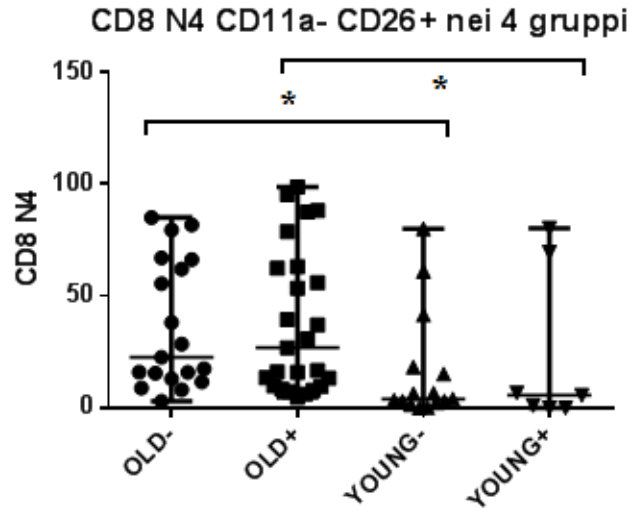


Fig. 4.26. Percentuale dei CD8_N4 CD11a-CD26+ nei 4 gruppi.

Analizzando i CD N4 doppi positivi è emersa una differenza significativa tra i donatori anziani e i giovani (Fig. 4.27), infatti gli anziani hanno una mediana di 2.5% ed i giovani del 0.7% ($p=0.01$), mentre nessuna differenza è emersa in base al sierostato (CMV+ 2.3% vs. 2% CMV-).

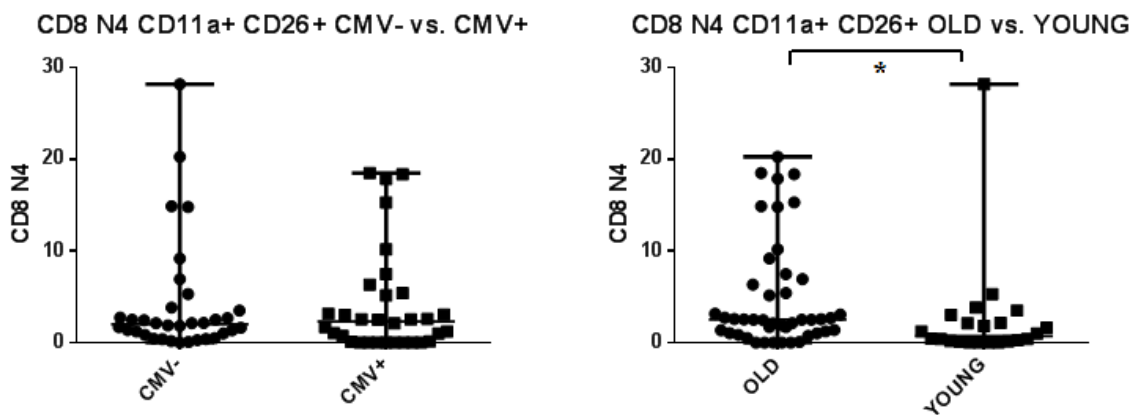


Fig. 4.27. Percentuale dei CD8_N4 CD11a+CD26+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

La Fig. 4.28 mostra l'analisi per gruppi, mostra una tendenza all'aumento negli anziani rispetto ai giovani negativi (2.46% vs. 1.64%, $p=ns$), e nei positivi (2.5% vs. 0.13%, $p=0.03$).

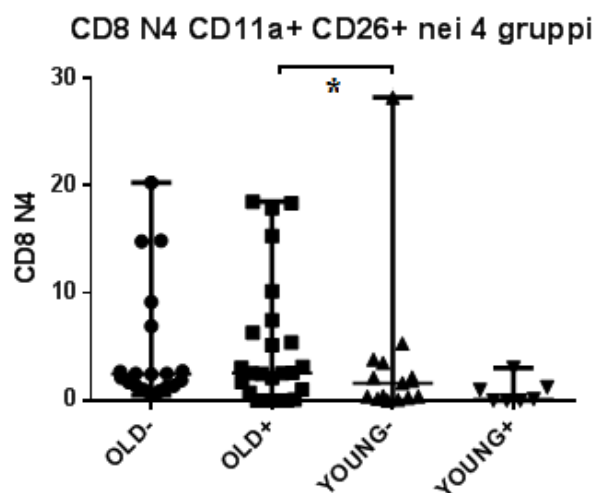


Fig. 4.28. Percentuale dei CD8_N4 CD11a+CD26+ nei 4 gruppi.

I CD8 naïve CD11a+CD26- (Fig. 4.29), mostra una tendenza all'aumento sia con l'età (anziani 3.8% vs. 2.8% giovani, $p=0.4$), ma non durante l'infezione da CMV (CMV+ 2.22% vs. 3.65% CMV-, $p=ns$).

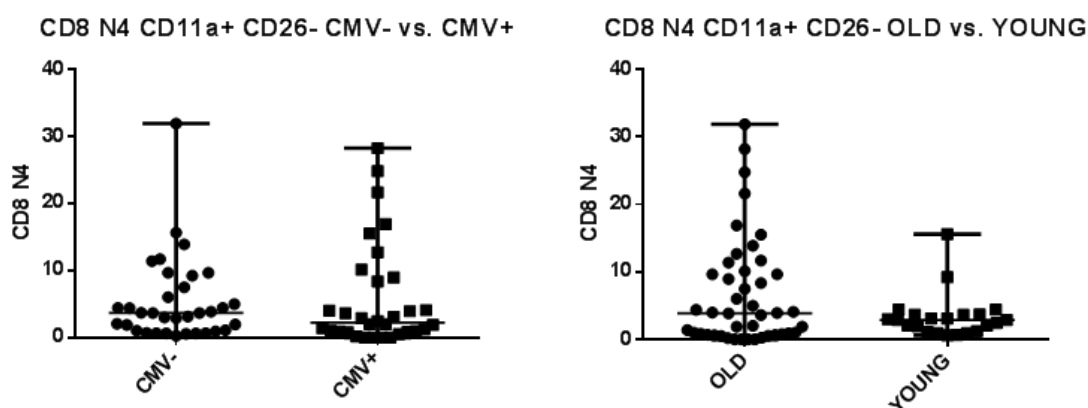


Fig. 4.29. Percentuale dei CD8_N4 CD11a+CD26- nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i 4 gruppi (Fig. 4.30), sebbene si noti un aumento età correlato, sebbene non significativo (giovani negativi 3.1% vs. 4.3% anziani negativi, $p=ns$; giovani positivi 2% vs. 3.6% anziani positivi, $p=ns$). Durante l'infezione da CMV si nota nei positivi una diminuzione di questa sottopopolazione (anziani negativi 4.3% vs. 3.6% anziani positivi, $p=ns$; giovani negativi 3.1% vs. 2% giovani positivi, $p=ns$).

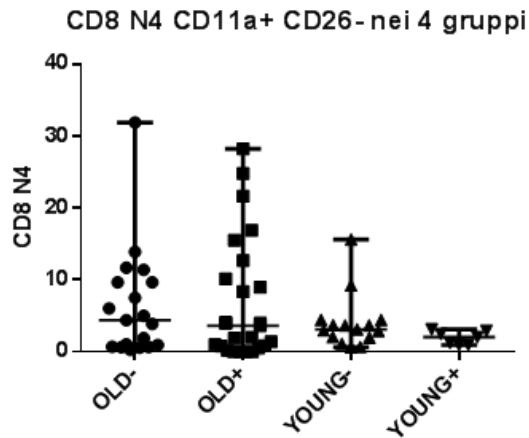


Fig. 4.30. Percentuale dei CD8_N4 CD11a+CD26- nei 4 gruppi.

La popolazione doppia negativa (Fig. 4.31), diminuisce con l'avanzare dell'età, infatti si va da una mediana del 90.8% nei giovani a 51.1% negli anziani ($p=0.0002$). Durante l'infezione da CMV vi è una diminuzione di questa popolazione, si passa da 73.6 dei negativi a 56.9 dei positivi, sebbene con una $p=0.4$).

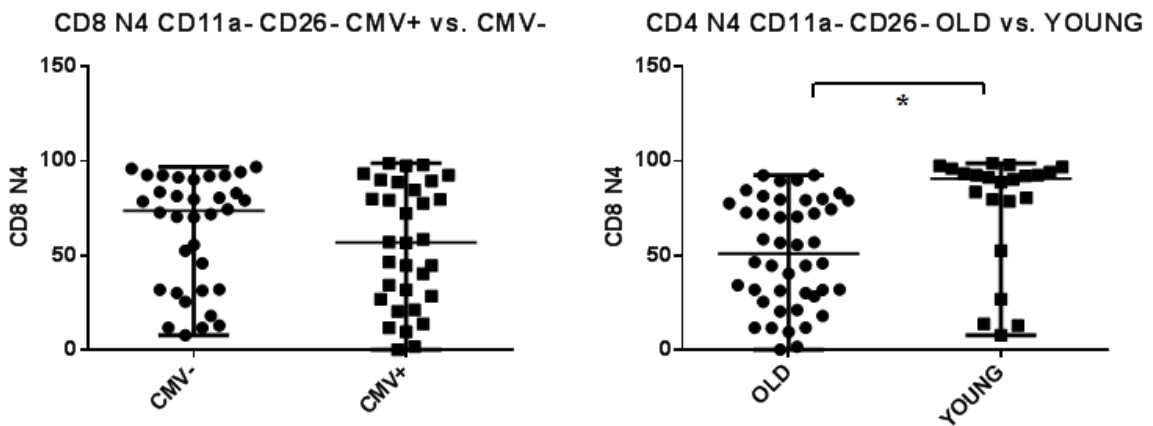


Fig. 4.31. Percentuale dei CD8_N4 CD11a-CD26- nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Analizzando i 4 gruppi (Fig. 4.32), sebbene non vi siano differenze significative tra gli anziani positivi e i giovani positivi, si nota una diminuzione di questa sottopopolazione durante l'invecchiamento, sia nei negativi (giovani 90.3% vs. 55.7% anziani, $p=0.003$), che nei positivi (giovani 93.4% vs. 46.5%, $p=0.04$).

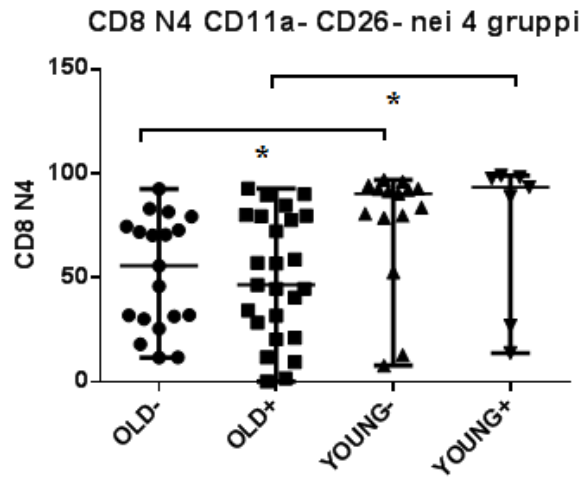


Fig. 4.32. Percentuale dei CD8_N4 CD11a-CD26- nei 4 gruppi.

Complessivamente nella Fig. 4.33 sono mostrate le differenze in termini di CD11a e CD26 all'interno dei CD8 N4.

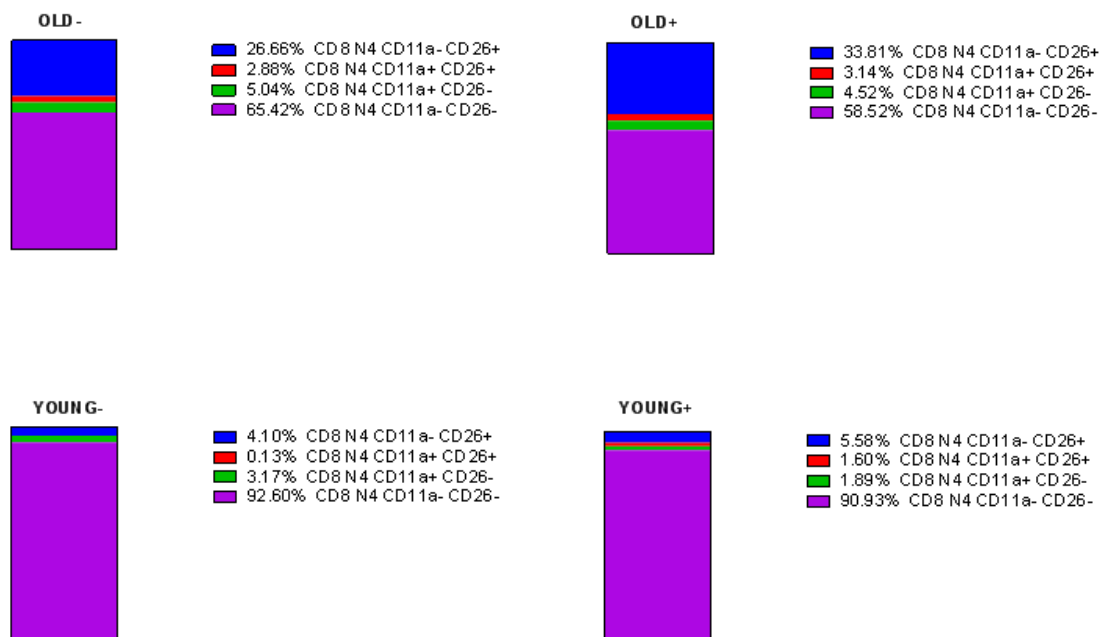


Fig. 4.33. Modifiche dei CD8 N4 CD11a CD26 all'interno dei 4 gruppi.

4.2.2. Central Memory

I linfociti T central memory (TCM) sono stati identificati mediante i markers CD27 CD45RA, e sono stati definiti come CD27+CD45RA-.

4.2.2.1. CD4

Analizzando i CD4 TCM sia per sierostato che per età (Fig. 4.34) emerge un aumento di questa popolazione sia nei CMV+ (50.10% vs. 44.2%) che negli anziani (45% vs. 43.3%), sebbene non significativo (rispettivamente $p=0.65$, $p=0.7$).

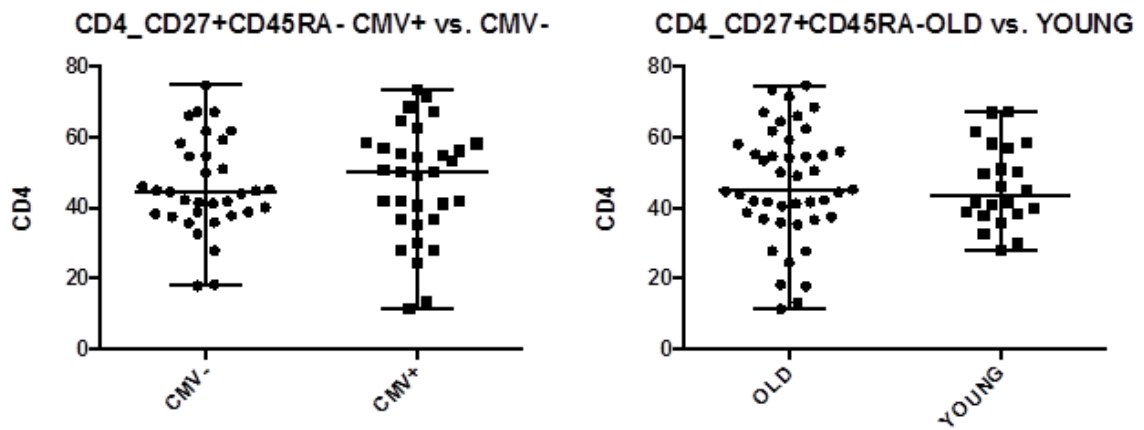


Fig. 4.34. Percentuale dei CD4 TCM nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Analizzando la percentuale dei TCM nei 4 gruppi si nota un aumento di questa sottopopolazione negli anziani positivi vs. anziani negativi (50.1% vs. 44.5%) ed un aumento anche nei giovani positivi vs. giovani negativi (50.1% vs. 41.8%), sebbene siano differenze non significative (Fig. 4.35).

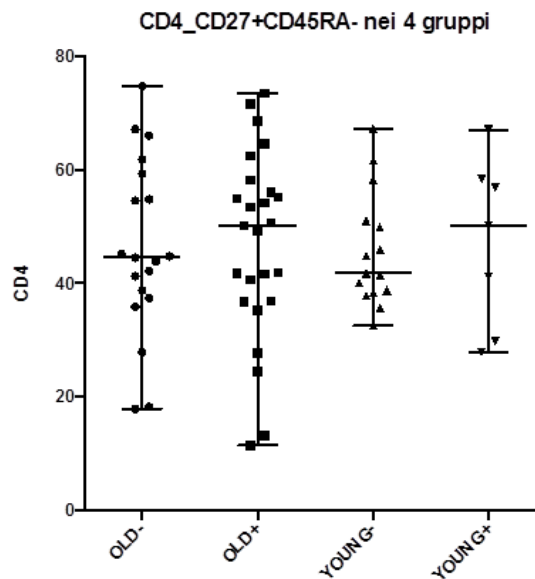


Fig. 4.35. Percentuale dei CD4 TCM nei 4 gruppi.

4.2.2.2. CD8

Dall'analisi delle CD8 TCM (CD27+CD45RA-) per sierostato (Fig. 4.36) emerge che durante l'infezione da CMV vi è una diminuzione di questa sottopopolazione di CD8, infatti si passa dal 28.8% nei sieronegativi al 18.05% nei sieropositivi (valori mediani, $p=0.0003$); mentre c'è una tendenza a diminuire con l'età infatti la mediana va da 27.65% dei giovani al 22.3% degli anziani ($p=0.2$).

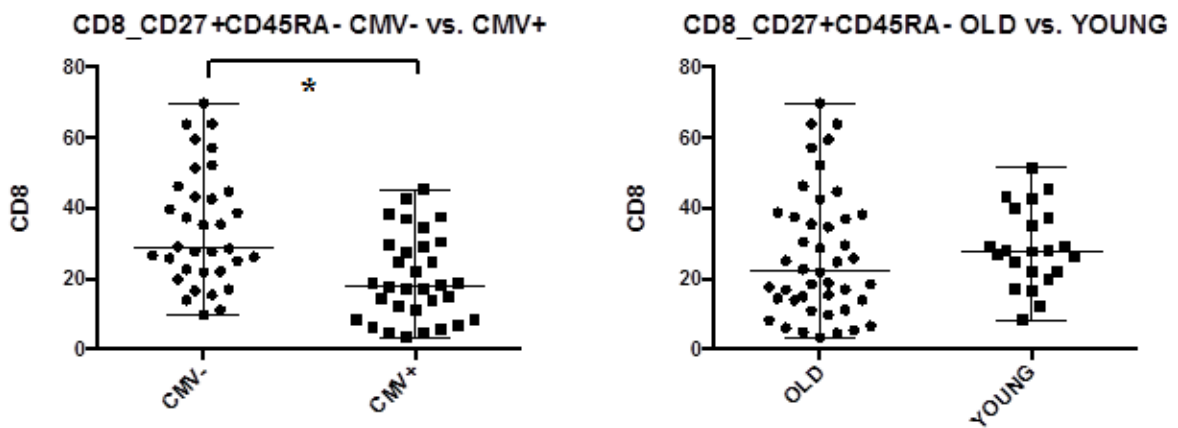


Fig. 4.36. Percentuale dei CD8 TCM nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Analizzando le CD8 TCM nei 4 gruppi il dato è discordante in quanto vi è un aumento, sebbene non significativo, con l'aumentare dell'età, si va dal 27.7% dei giovani negativi al 35.4% degli anziani negativi. Mentre viene confermato il dato correlato all'infezione da CMV, infatti questa percentuale decresce negli anziani positivi, con una mediana 16.9% ($p=0.0016$); la stessa cosa avviene nei giovani CMV positivi infatti la mediana va dal 24.6% nei giovani positivi al 27.7% dei negativi anche se non in modo significativo (Fig. 4.37).

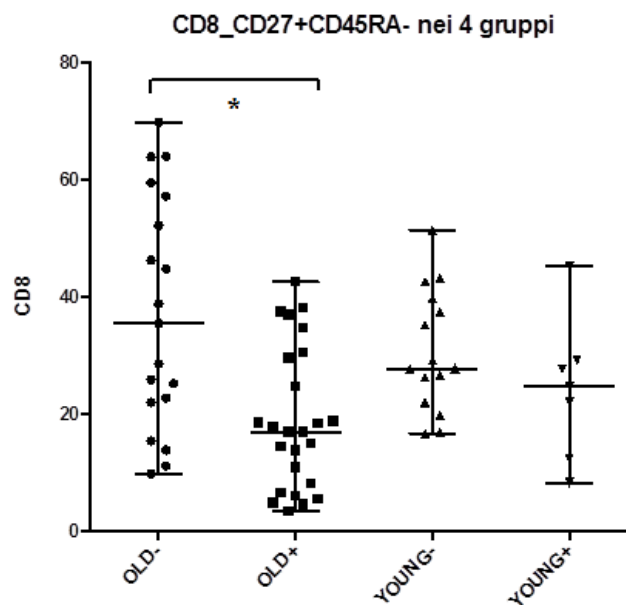


Fig. 4.37. Percentuale dei CD8 TCM nei 4 gruppi esaminati.

4.2.3. Linfociti T Effector Memory (TEM)

I linfociti T Effector Memory (TCM) sono stati identificati mediante i markers CD27 CD45RA, e sono stati definiti come CD27-CD45RA-.

4.2.3.1. CD4

La percentuale dei CD4 TEM (CD27-CD45RA-) risulta essere aumentata nei pz con infezione da CMV, si va da una mediana di 5.6% nei sieropositivi al 3.9% nei sieronegativi ($p=0.0012$), inoltre questa sottopopolazione sembrerebbe diminuire con l'avanzare dell'età (mediana giovani 5.4% vs. 4.2% anziani), sebbene non in modo significativo (Fig. 4.38).

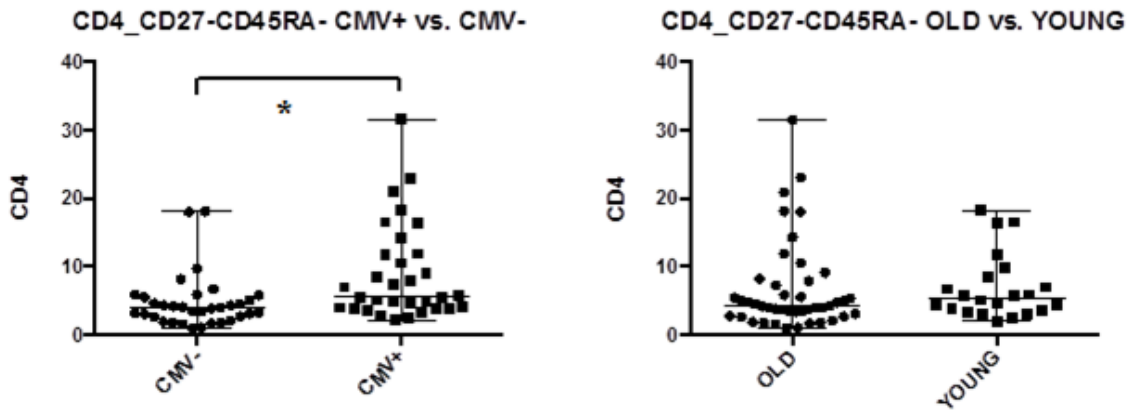


Fig.4.38. Percentuale dei CD4 TEM nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Nei 4 gruppi esaminati, le CD4 TEM aumentano durante l'infezione da CMV, infatti si va dal 3.1% degli anziani negativi al 5.08% degli anziani positivi ($p=0.004$), e dal 4.3% dei giovani negativi al 11.8% dei giovani positivi ($p=0.0084$). Questa sottopopolazione diminuisce al diminuire dell'età sia nei CMV+ che nei CMV-, sebbene le differenze non siano statisticamente significative (Fig. 4.39).

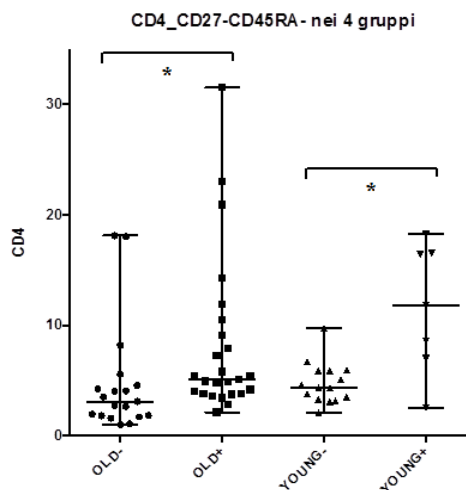


Fig. 4.39. Percentuale dei CD4 TEM nei 4 gruppi.

4.2.3.2. CD8

Le CD8 TEM aumentano nei soggetti CMV+, infatti la mediana è pari al 11.5% mentre nei CMV- è del 3.8% ($p=0.0002$), inoltre aumentano anche all'aumentare dell'età, sebbene non in modo significativo, dal 4.02% dei giovani al 7.5% negli anziani (Fig. 4.40).

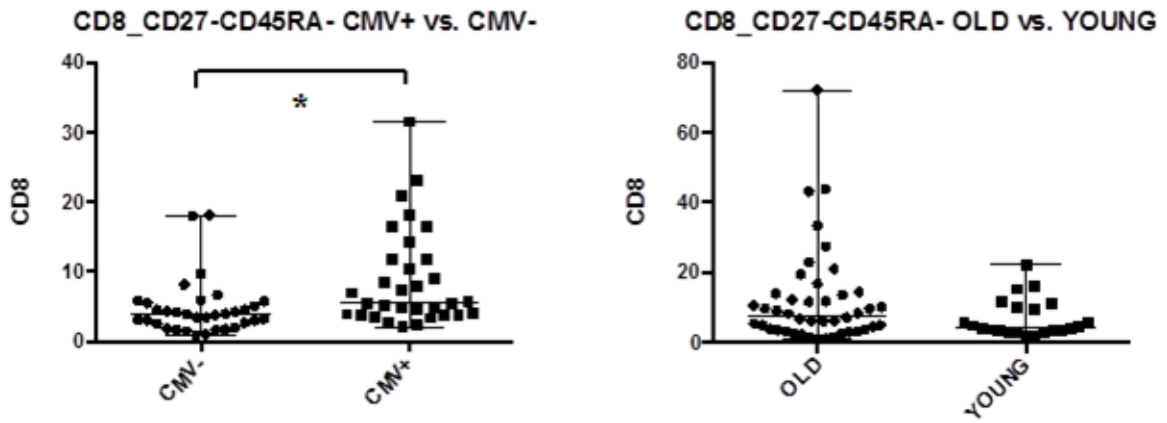


Fig. 4.40. Percentuale delle CD8 TEM in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi, vi è un aumento della sottopopolazione durante l'infezione da CMV (Fig. 4.41), sia nel gruppo degli anziani (old+ 9.4% vs. 4.8% old-) sebbene con una $p=0.06$, sia nel gruppo dei giovani (young+ 11.3% vs. young- 3.4%) con una $p<0.0001$. Inoltre vi è una tendenza all'aumento dei CD8 TEM con l'aumentare dell'età sia nel gruppo dei CMV+ (old- 4.8% vs. 3.4% young+).

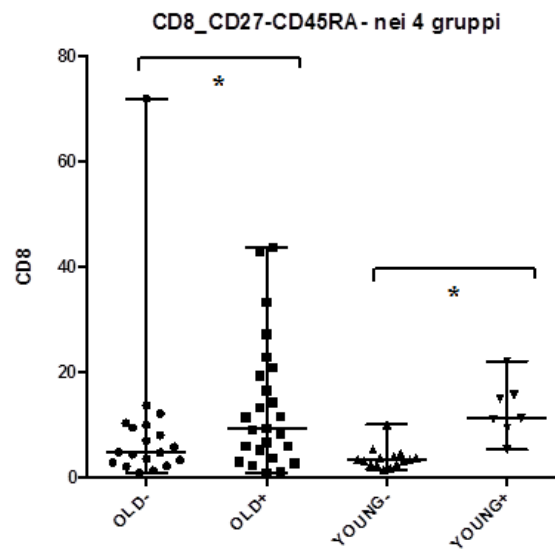


Fig. 4.41. Percentuale dei CD8 TEM nei 4 gruppi.

4.2.4. Linfociti T revertant (TEMRA)

I linfociti T revertant (TEMRA) sono stati identificati dapprima mediante i markers CD27 CD45RA, e sono stati definiti come CD27-CD45RA+. Aggiungendo in seguito gli altri markers di identificazione sono stati selezionati come TEMRA i linfociti CD27-CD45RA+CD28+/-CCR7-CD95+CD62L-.

4.2.4.1 CD4

La percentuale delle TEMRA aumenta nei pz con infezione da CMV e con l'età (Fig.4.42),

infatti l'analisi per sierostato mostra una mediana per i CMV+ pari a 0.92% vs. 0.23 dei CMV- ($p=0.0003$), mentre l'analisi per età mostra un aumento di questa sottopopolazione con una mediana che va da 0.28% nei giovani a 0.85 negli anziani ($p=0.046$).

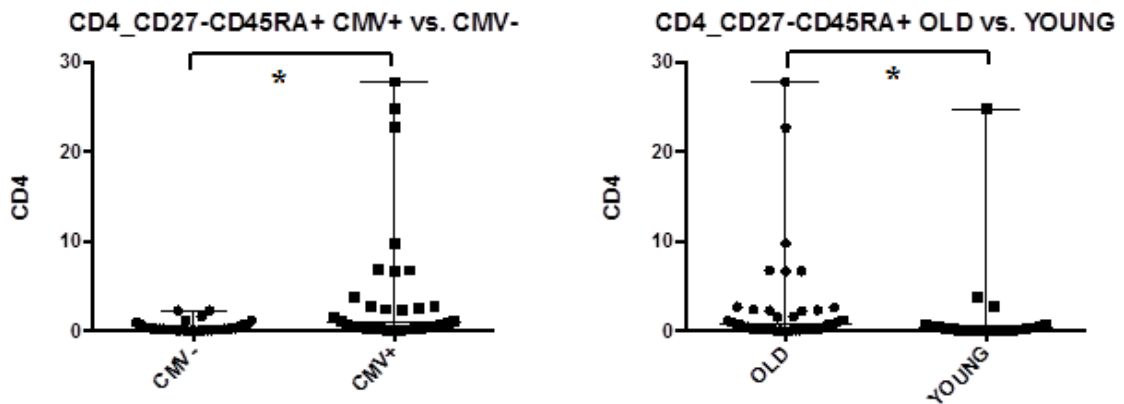


Fig. 4.42. Percentuale delle CD4 TEMRA nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Anche dall'analisi dei 4 gruppi (Fig. 4.43) emerge un aumento di questa popolazione durante l'infezione da CMV sia nei giovani che negli anziani (old+ 1.02% vs. 0.26% old- con una $p=0.01$; young+ 0.63% vs. 0.15 young- con una $p=0.02$). Inoltre si osserva un aumento, seppur non significativo età correlato.

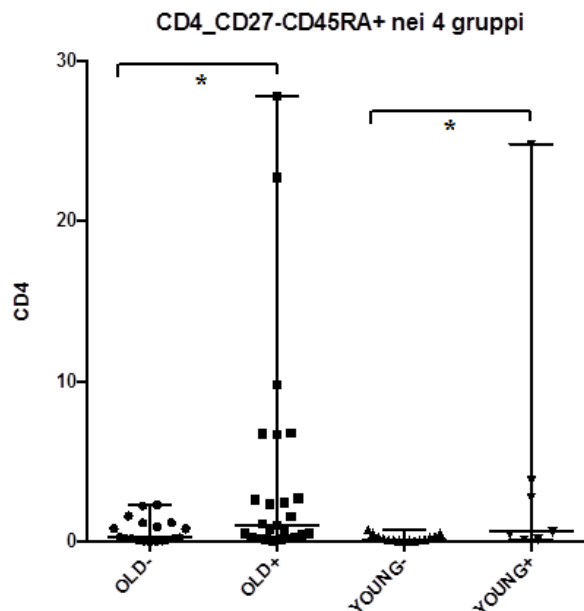


Fig. 4.43. Percentuale dei CD4 TEMRA nei 4 gruppi.

Quando per delineare questa sottopopolazione vengono aggiunti gli altri markers e quindi definiti nel seguente modo $CD28+/-CCR7-CD95+CD62L-$ (CD4 Rev6), la percentuale dei CD4 Rev6 resta predominante nei CMV+ con una mediana dello 0.13% vs. 0.02% nei CMV negativi, anche negli anziani questa popolazione è maggiore rispetto ai giovani (rispettivamente

0.04 vs. 0.02) sebbene non vi sia significatività (Fig. 4.44).

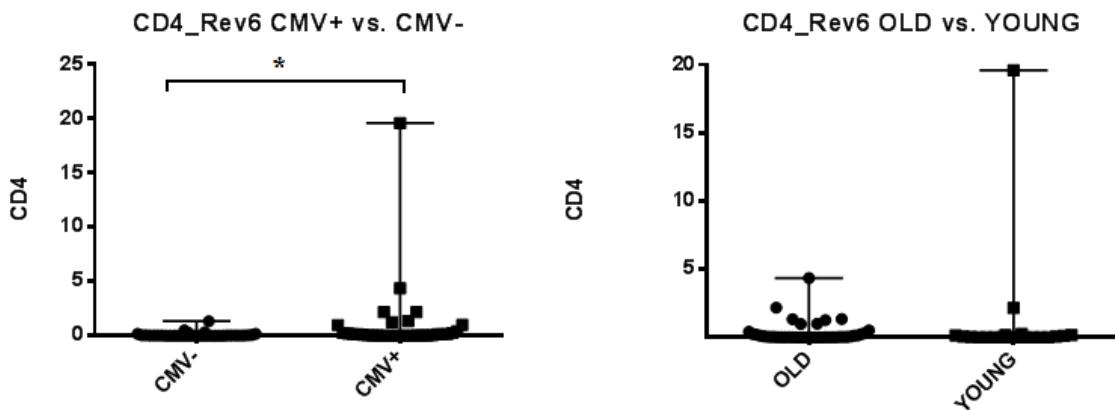


Fig. 4.44. Percentuale delle CD4 Rev6 nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi, è significativa la differenza tra gli old+ vs. old- (0.02% vs. 0.09%, $p=0.04$), anche nei giovani positivi si nota un aumento di questa percentuale (0.16% vs. 0.04% giovani negativi), sebbene non significativa ($p=0.08$) (Fig. 4.45).

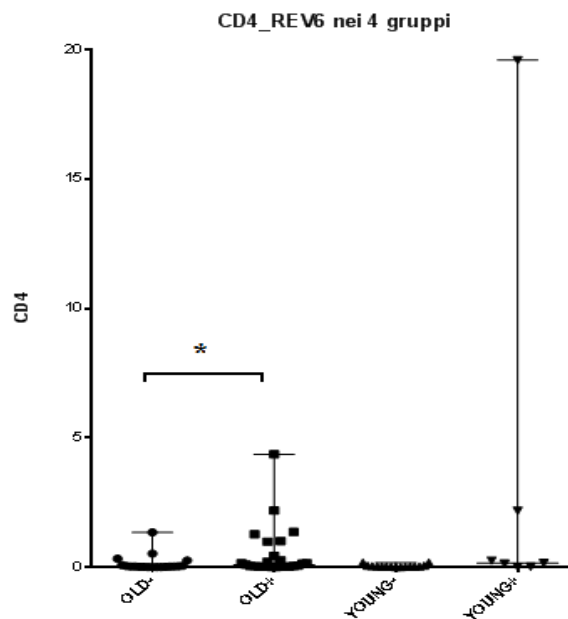


Fig. 4.45. Percentuale dei CD4 Rev6 nei 4 gruppi.

All'interno delle TEMRA abbiamo distinto diversi sottogruppi tramite le molecole CD11a e CD26. La sottopopolazione CD11a-CD26+ delle CD4 TEMRA, non subisce modifiche correlate all'età (Fig. 4.46), infatti la mediana nei giovani è di 9.6% vs. 9.4% degli anziani, mentre questa popolazione diminuisce notevolmente nei CMV- si passa dal 14.7% dei negativi al 3.8% dei positivi ($p=0.03$).

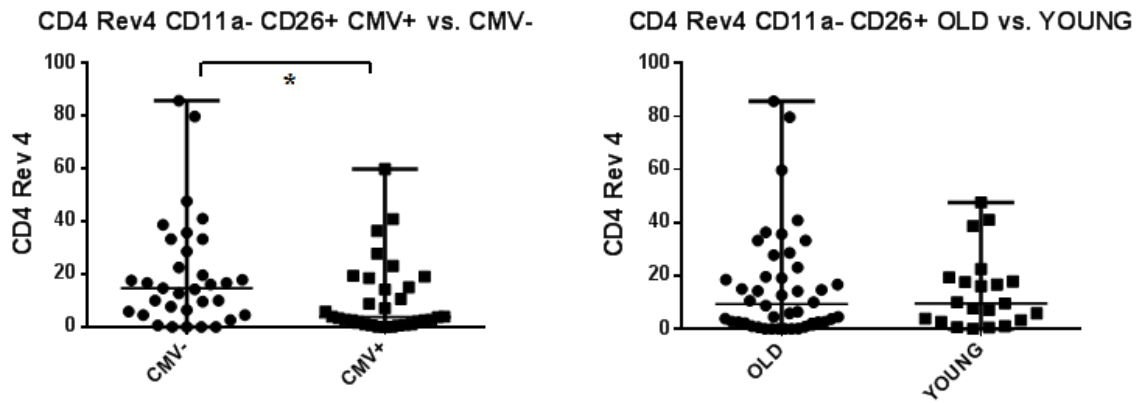


Fig. 4.46. Percentuale delle CD4 Rev4 CD11a-CD26+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

L'analisi dei gruppi (Fig. 4.47), mostra una diminuzione della percentuale di questa popolazione con l'aumentare dell'età (14.3% anziani negativi vs. 16.4% giovani negativi, $p=ns$; anziani positivi 3.8% vs. 3.3% giovani positivi, $p=ns$), ed una diminuzione di questa popolazione nei soggetti CMV-(old+ 3.8% vs. 14.3% old-, $p=ns$; young+ 3.3% vs. 16.4% young-, $p=0.03$).

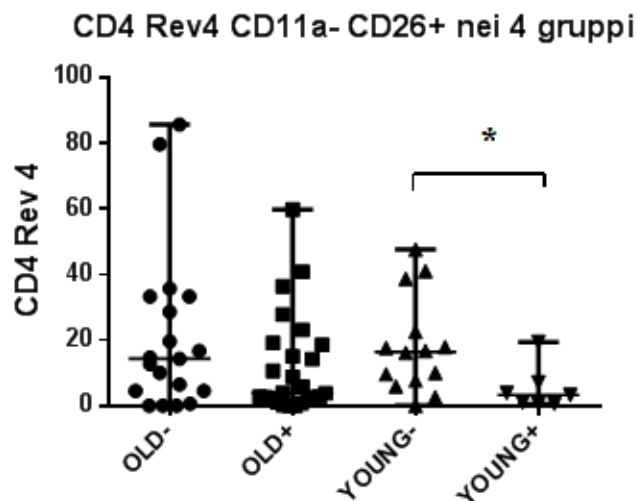


Fig. 4.47. Percentuale delle CD4 Rev4 CD11a-CD26+ nei 4 gruppi esaminati.

La sottopopolazione doppia positiva, CD11a+CD26+, (Fig. 4.48) non mostra variazioni significative né tra i CMV+ e CMV- né tra gli anziani e i giovani.

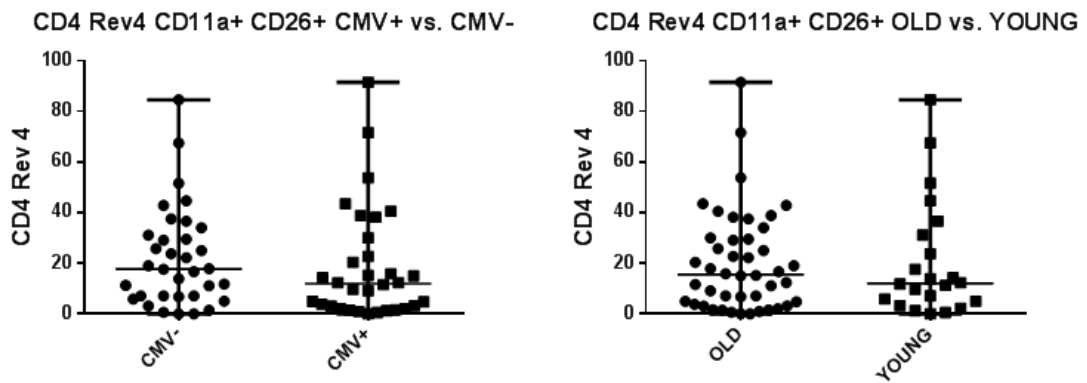


Fig. 4.48. Percentuale delle CD4 Rev4 CD11a+CD26+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i donatori (Fig. 4.49), emerge una diminuzione di questa sottopopolazione durante l'infezione da CMV, maggiormente nei giovani, infatti si va da una mediana dei giovani negativi del 17.6% al 3.3% nei giovani positivi ($p=0.02$).

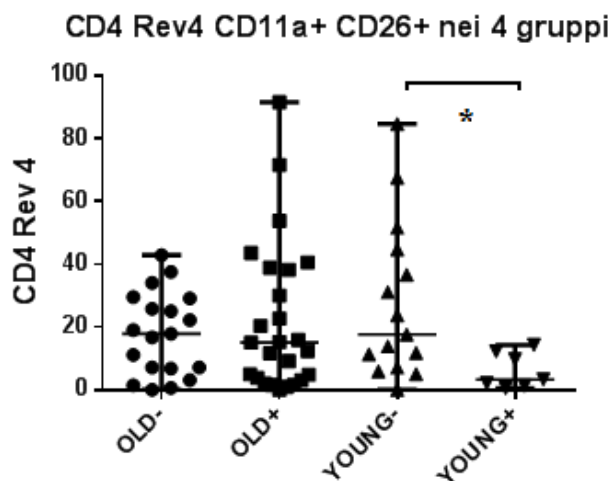


Fig. 4.49. Percentuale delle CD4 Rev4 CD11a+CD26+ nei 4 gruppi esaminati.

Durante l'invecchiamento vi è una tendenza all'aumento della sottopopolazione CD11a+CD26-, anche se non in modo significativo che va dal 42.45% nei giovani al 45.8% negli anziani. L'infezione da CMV contribuisce all'aumento della sottopopolazione CD11a+CD26-, infatti nei CMV- si ha una mediana del 40.5% vs. il 65.8% dei CMV- ($p=0.01$) (Fig. 4.50).

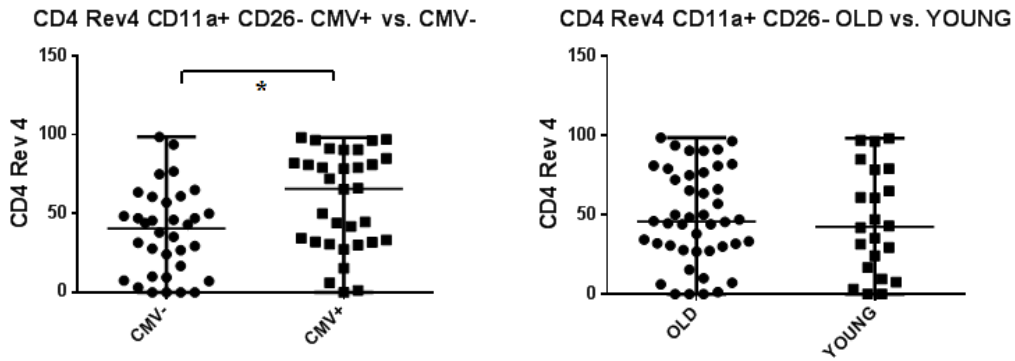


Fig. 4.50. Percentuale delle CD4 Rev4 CD11a+CD26- nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi (Fig. 4.51), si nota un aumento di questa sottopopolazione soprattutto nei giovani positivi rispetto ai giovani negativi (29.4% vs. 85%, $p=0.0002$), ed anche rispetto agli anziani positivi (44.7%, $p=0.01$).

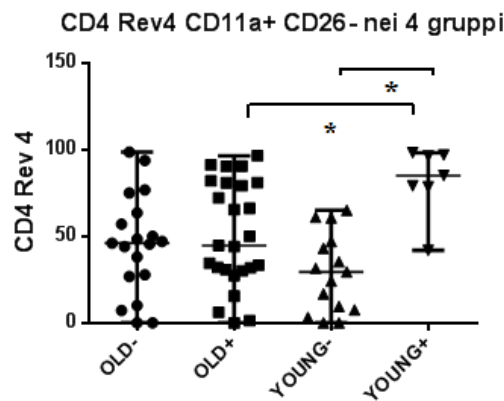


Fig. 4.51. Percentuale delle CD4 Rev4 CD11a+CD26- nei 4 gruppi esaminati.

Nella sottopopolazione doppia negativa (Fig. 4.52), CD11a-CD26-, non vi sono differenze significative tra i giovani e gli anziani, mentre esiste tra i CMV+ ed i CMV-, infatti questa popolazione diminuisce durante l'infezione da CMV, si va da una mediana di 14.3% nei negativi a 5.8% nei positivi ($p=0.004$).

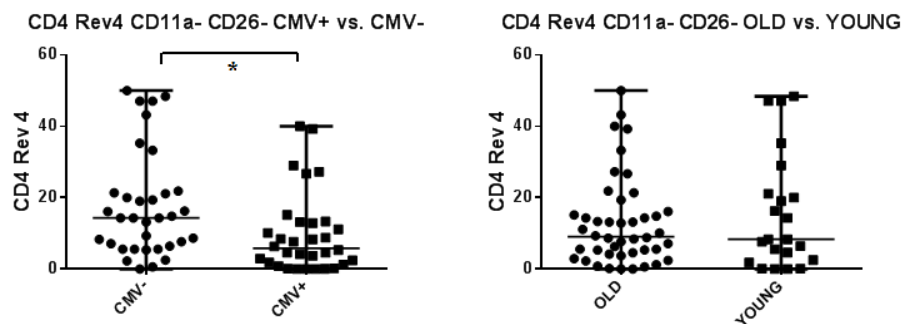


Fig. 4.52. Percent. delle CD4 Rev4 CD11a-CD26- nei donatori in relazione a sierostato ed età.

Nella Fig. 4.53 si nota una tendenza alla diminuzione dei doppi negativi durante l'infezione sia negli anziani (old- 14.3% vs. 5.8% old+, p=0.058) che nei giovani (young+ 16.3% vs. 1.8% young-, p=0.03).

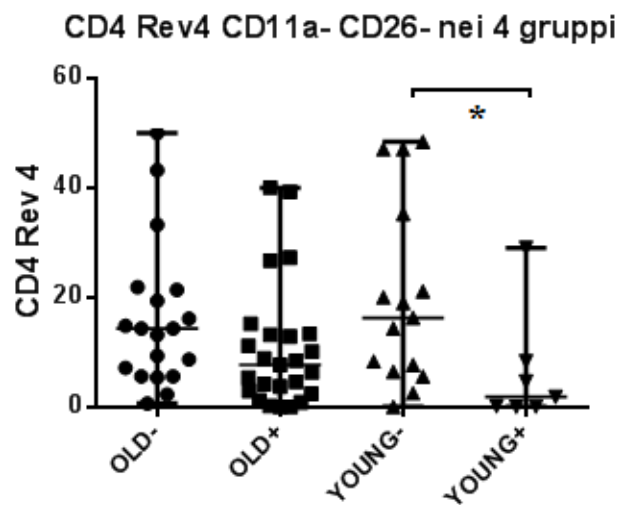


Fig. 4.53. Percentuale delle CD4 Rev4 CD11a-CD26- nei 4 gruppi esaminati.

Le diverse sottopopolazioni presenti nei 4 gruppi sono schematizzate nella Fig. 4.54.

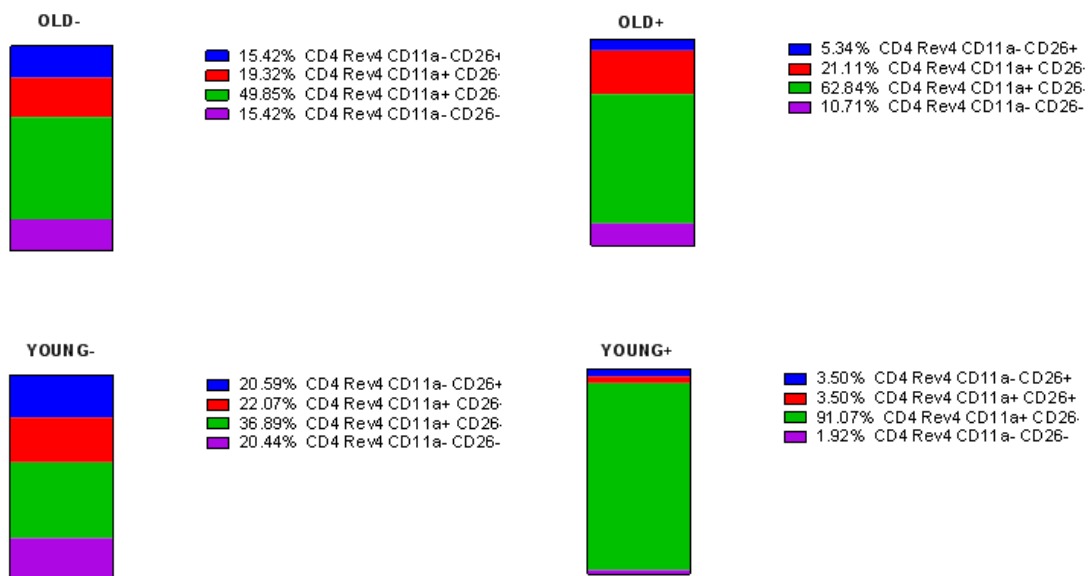


Fig. 4.54. Modifiche dei CD4 Rev4 CD11a CD26 all'interno dei 4 gruppi.

4.2.4.2 CD8

Le cellule CD8 TEMRA aumentano sia durante l'infezione da CMV che durante l'invecchiamento (Fig. 4.55). Infatti si osserva una mediana che va nei CMV- dal 9.9% al 43.15% nei CMV+ (p<0.0001), mentre nei giovani dal 5.8% al 33.4% negli anziani (p<0.0001).

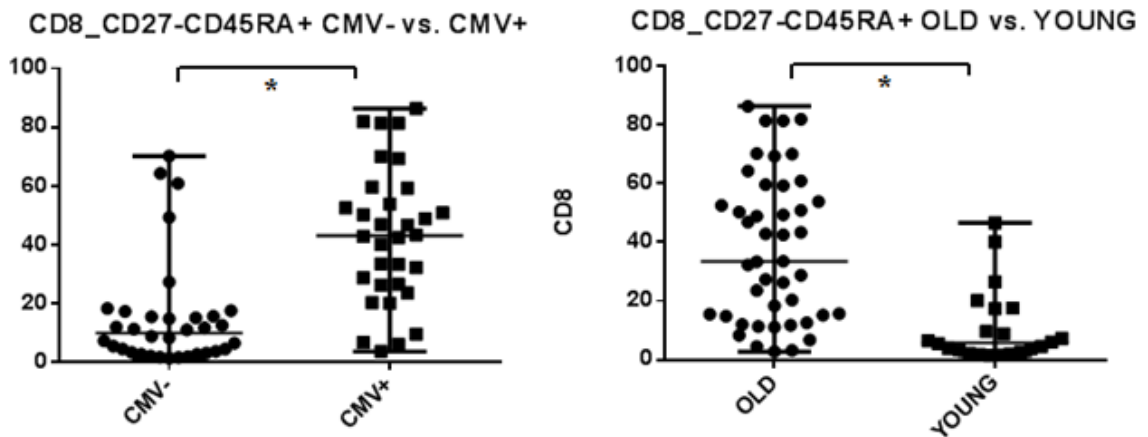


Fig. 4.55. Percentuale delle CD8 TEMRA nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Le TEMRA nei 4 gruppi esaminati, mostrano un aumento fisiologicamente età correlato (Fig. 4.56), dal 3.79% nei giovani negativi al 14.9% negli anziani negativi ($p=0.0006$). Questa caratteristica vi è anche durante l'infezione da CMV, infatti nei giovani positivi si ha una mediana del 20.1% e negli anziani 48.9% ($p=0.002$). Nei soggetti con infezione da CMV queste percentuali aumentano significativamente, infatti nei giovani positivi si arriva al 20.1% ($p=0.0066$) e negli anziani positivi al 48.9% ($p=0.002$).

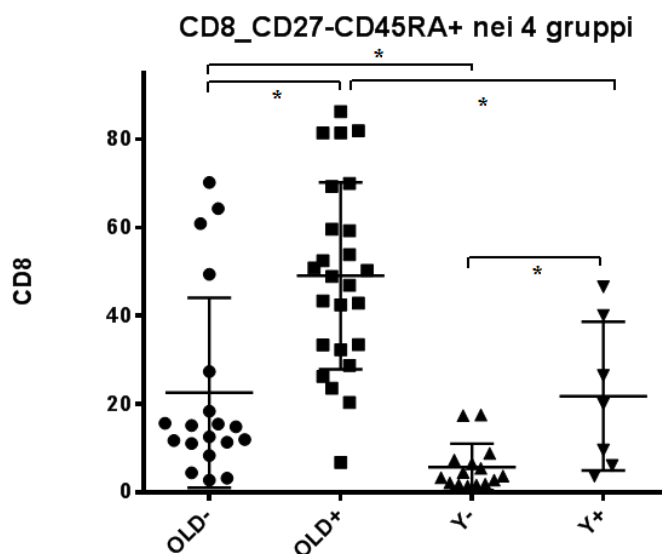


Fig. 4.56. Percentuale dei CD8 TEMRA nei 4 gruppi.

Quando andiamo ad identificare le TEMRA con gli altri markers CD28, CCR7, CD62L, CD95, il risultato non cambia. L'analisi per sierostato mostra un aumento di questa popolazione nei CMV+ (26.05% vs. 3.86% CMV-, $p<0.0001$), e nei donatori anziani con una mediana pari a 20.6% vs. 2.4% ($p<0.0001$) (Fig.4.57).

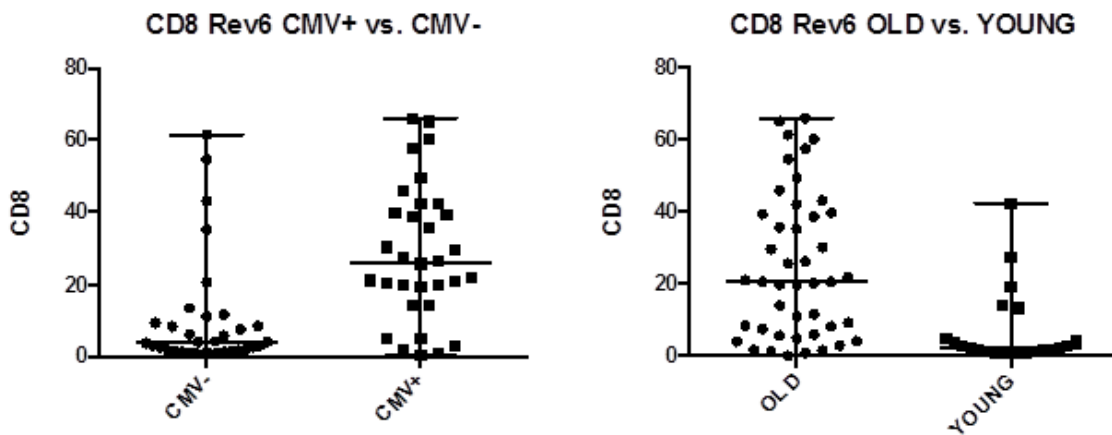


Fig. 4.57. Percentuale delle CD8 Rev 6 nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Analizzando i 4 gruppi, emerge che vi è un aumento delle CD8 Rev6 età correlato (giovani negativi 1.6% vs. anziani negativi 8.27%, $p=0.0001$; CMV+ giovani 14.1% vs. CMV+ anziani 29.7%, $p=0.049$), e CMV correlato. Infatti la mediana dei CD8 Rev 6 negli anziani CMV- è di 8.27% vs. anziani CMV+ 29.7% ($p=0.0048$) (Fig. 4.58), mentre nei giovani CMV- è di 1.6% vs. giovani CMV+ 14.1% ($p=0.0031$).

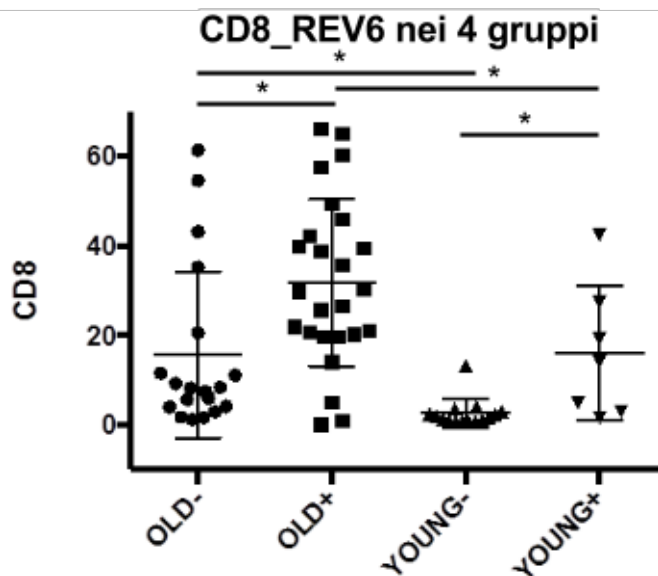


Fig. 4.58. Percentuale dei CD8 Rev 6 nei 4 gruppi.

Anche nei CD8 TEMRA abbiamo distinto diversi sottogruppi tramite le molecole CD11a e CD26.

La Fig. 4.59 mostra che non vi sono differenze significative di questa popolazione nei CMV+ e nei CMV- e nemmeno tra i giovani e gli anziani.

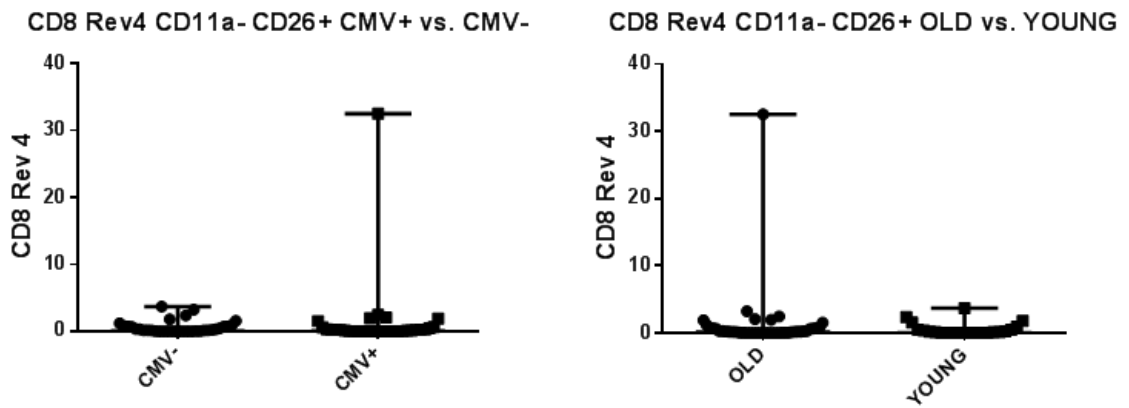


Fig. 4.59. Percentuale delle CD8 Rev 4 CD11a- CD26+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Anche dall'analisi dei 4 gruppi (Fig. 4.60), non emergono differenze significative.

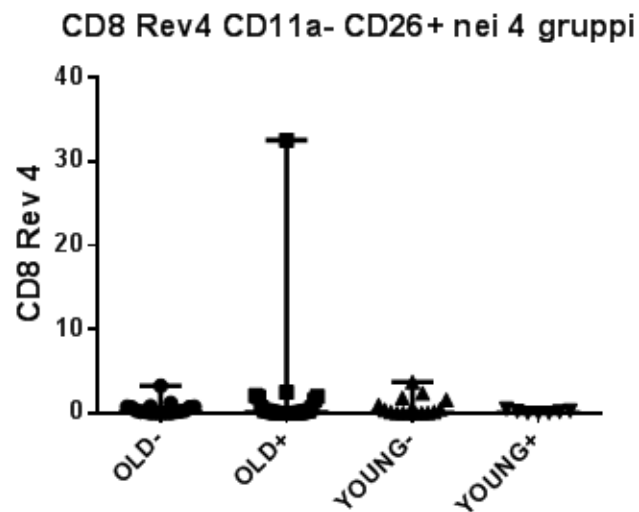


Fig. 4.60. Percentuale delle CD8 Rev 4 CD11a- CD26+ nei 4 gruppi.

Come si può notare dalla figura 4.61, nemmeno nella popolazione doppia positiva ci sono modifiche significative durante l'infezione da CMV (CMV+ 1.02%vs. 2.78% CMV-, $p=ns$) e con l'invecchiamento (giovani 0.88% vs. 2.5% anziani, $p=ns$).

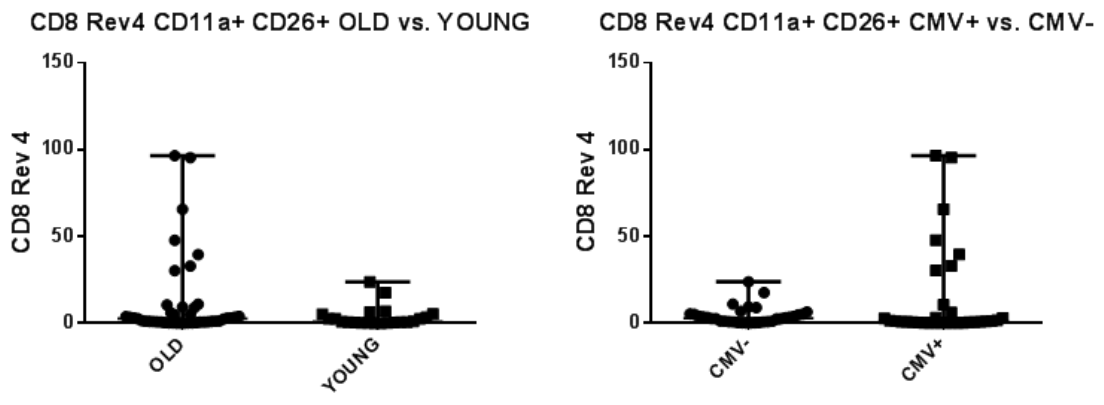


Fig. 4.61. Percentuale delle CD8 Rev 4 CD11a+ CD26+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi si nota un aumento di questa popolazione negli anziani rispetto ai giovani (Fig. 4.62) sia nei donatori negativi (giovani 2.5% vs. 3% anziani, $p=ns$) che nei positivi (giovani 0.38% vs. 1.5% anziani, $p=0.01$). All'interno del compartimento giovanile, i soggetti con infezione da CMV hanno una maggior proporzione di CD8 Rev4 CD11a+CD26+ (young- 2.4% vs. young+ 0.38, $p=0.01$).

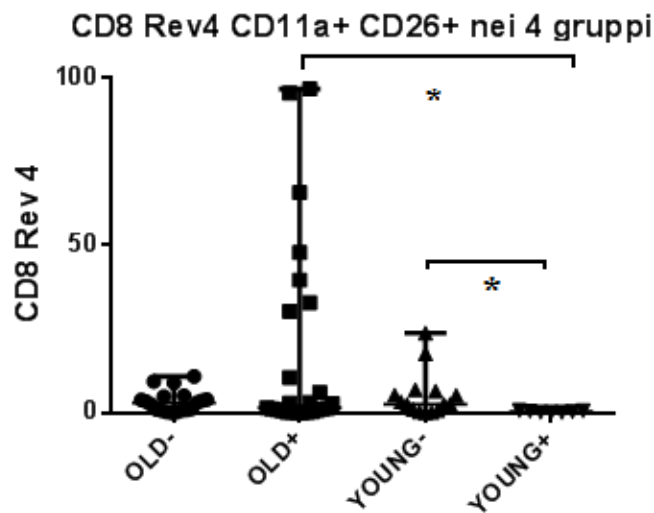


Fig. 4.62. Percentuale delle CD8 Rev 4 CD11a+ CD26+ nei 4 gruppi.

La fig. 4.63 mostra la popolazione CD11a+CD26-. Non vi sono differenze statisticamente significative, né analizzando i gruppi per sierostato né per età.

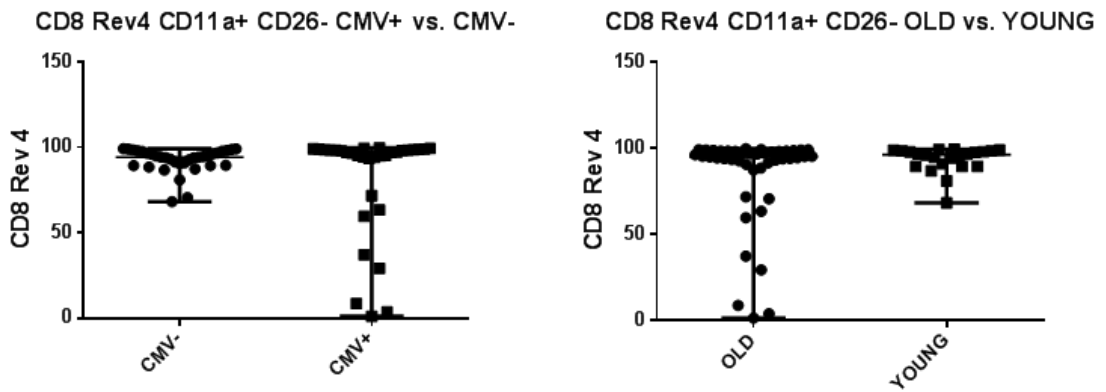


Fig. 4.63. Percentuale delle CD8 Rev 4 CD11a+ CD26- nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Nella Fig. 4.64 variazioni statisticamente significative si osservano nei giovani positivi sia rispetto ai giovani negativi (98.9% vs 94.3% rispettivamente, $p=0.0004$), che rispetto agli anziani positivi (98.9% vs. 95.4, $p=0.0073$).

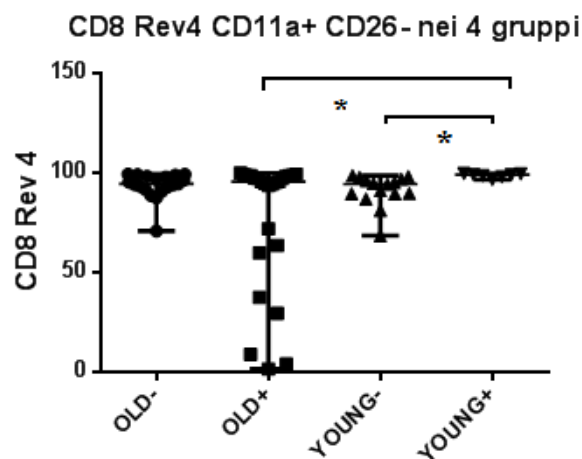


Fig. 4.64. Percentuale delle CD8 Rev 4 CD11a+ CD26- nei 4 gruppi.

Nemmeno nella sottopopolazione CD8 Rev4 doppia negativa, si apprezzano variazioni sia esaminando i gruppi per sierostato e per età, sia scorporandoli (Fig. 4.65).

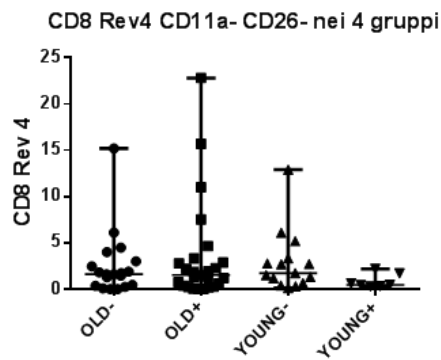
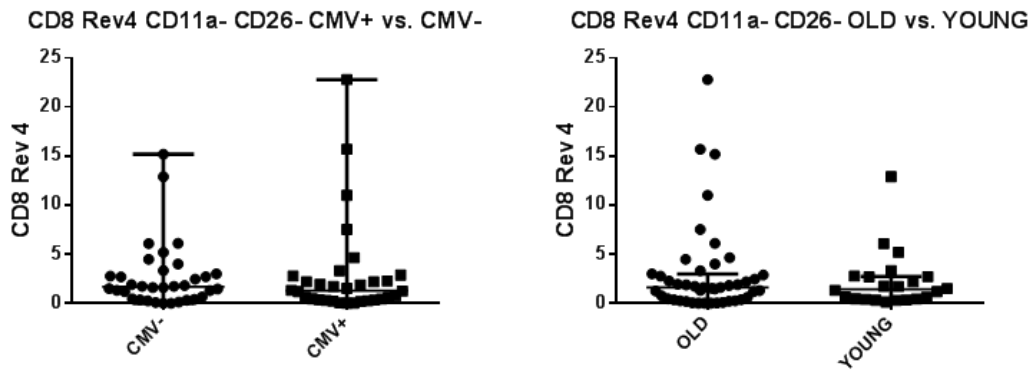


Fig. 4.65. Percentuale delle CD8 Rev 4 CD11a+ CD26- nei donatori in relazione al sierostato, all'età e dei 4 gruppi.

Le diverse sottopopolazioni presenti nei 4 gruppi possono essere schematizzate come Fig. 4.66.

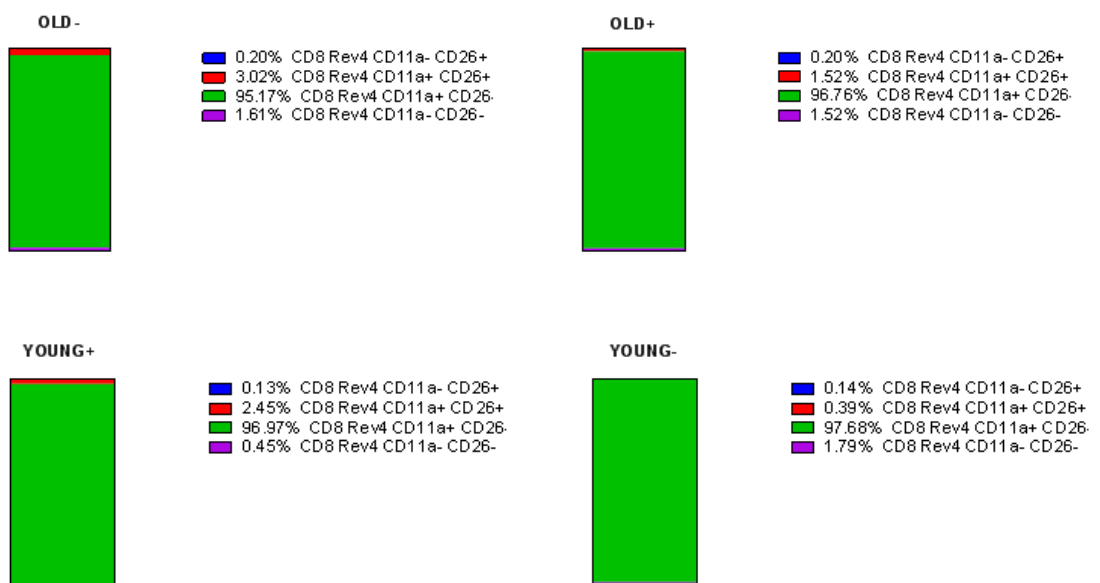


Fig. 4.66. Modifiche dei CD8 Rev4 CD11a CD26 all'interno dei 4 gruppi.

Globalmente, nella Fig. 4.67 sono espresse le sottopopolazioni dei linfociti CD4 in relazione al sierostato. Come abbiamo visto già singolarmente non ci sono molte modifiche in questo compartimento, anche se si osserva una diminuzione dei CD4 naive, ed un aumento delle TEMRA.

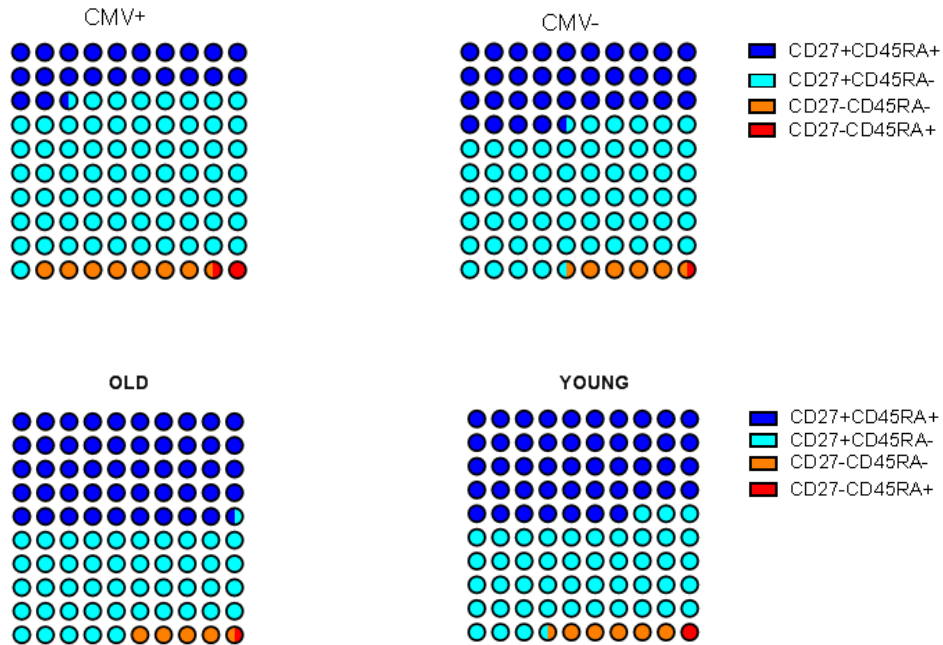


Fig. 4.67. In alto compartimento dei CD4 in relazione al sierostato, in basso in relazione all'età.

Nei 4 gruppi (OLD+ ed OLD-, YOUNG+ e YOUNG-) mostrati nella Fig. 4.68 sono rappresentati le sottopopolazioni dei CD4.

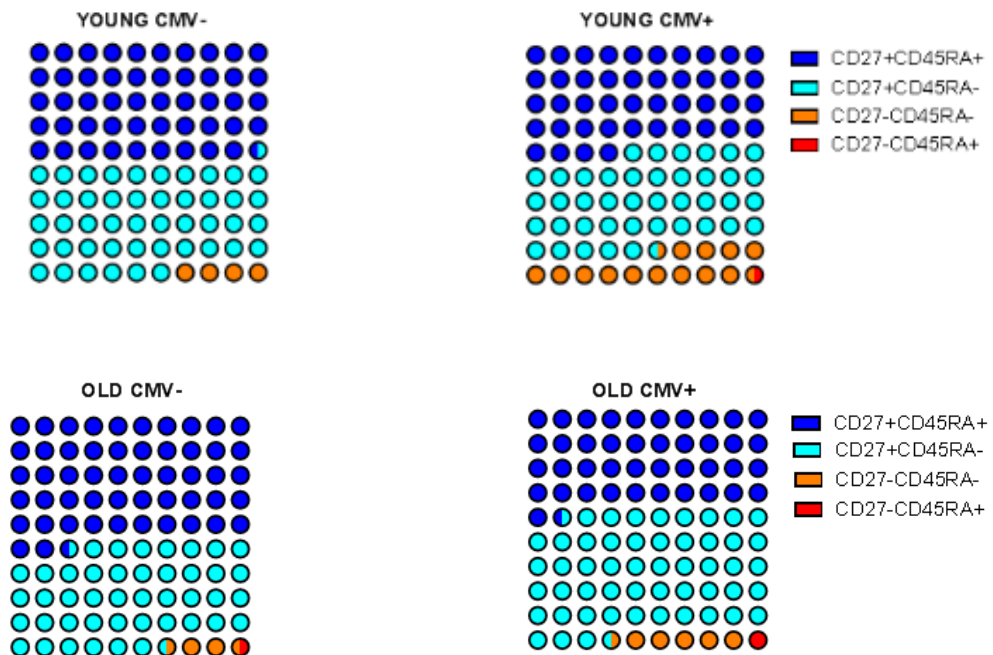


Fig. 4.68. In alto le diverse sottopopolazioni dei CD4 nei 4 gruppi esaminati.

Nel compartimento CD8 come già visto nell'analisi singola delle sottopopolazioni le modifiche durante l'invecchiamento e durante l'infezione da CMV sono più importanti (Fig. 4.69).

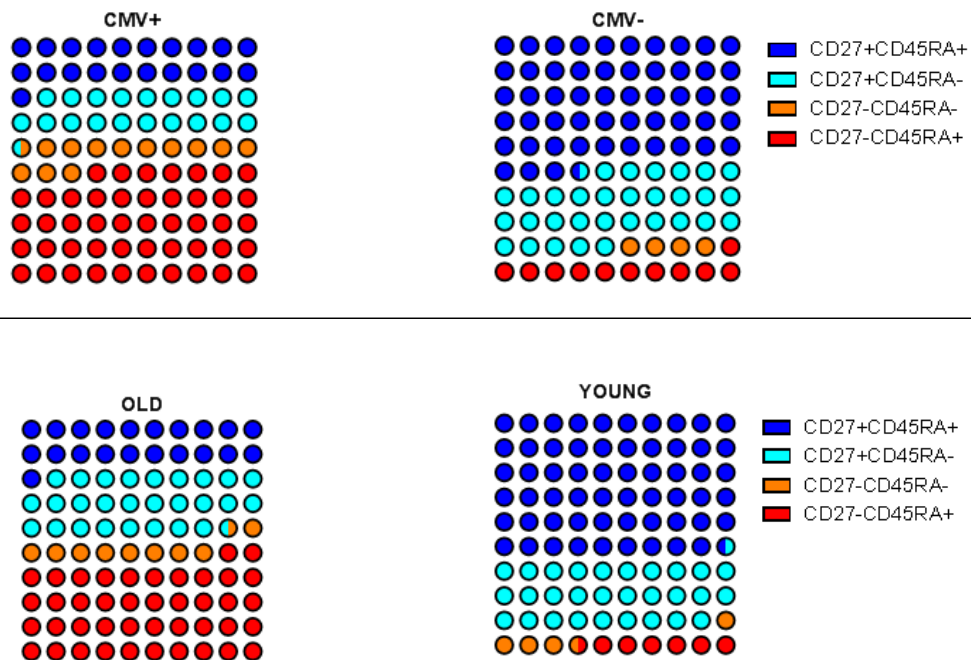


Fig. 4.69. Il compartimento dei CD8 in relazione al sierostato (in alto) ed età (in basso).

Nei 4 gruppi (OLD+ ed OLD-, YOUNG+ e YOUNG-) mostrati nella Fig. 4.70 sono rappresentati le sottopopolazioni dei CD8.

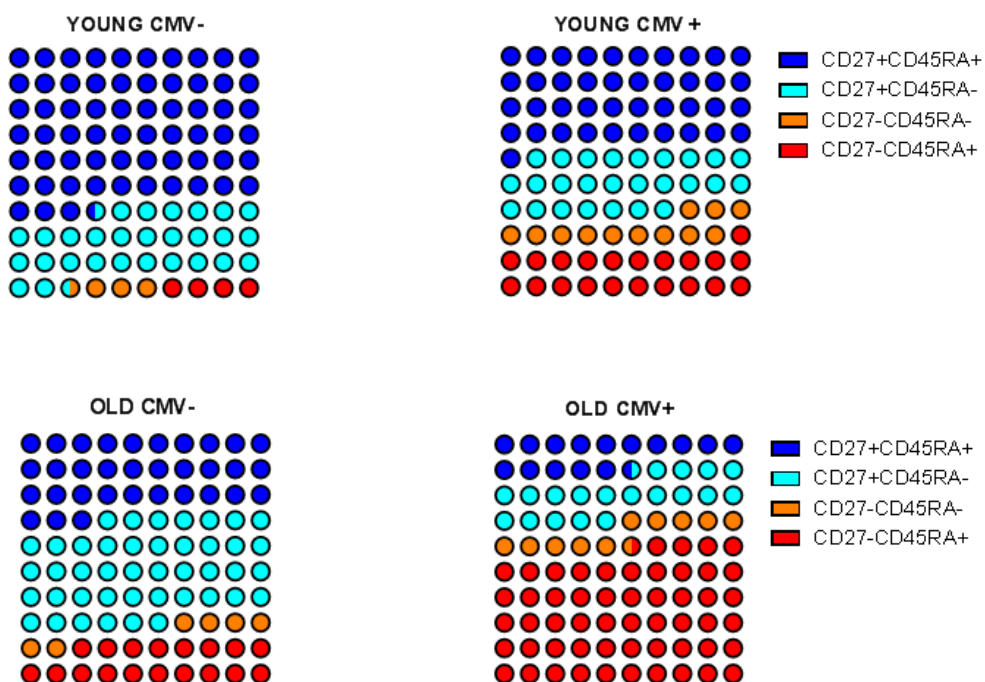


Fig. 4.70. Modifiche nel compartimento dei CD8 nei 4 gruppi.

4.2.5. Espressione del CD127

4.2.5.1. CD4

I CD4 CD27-CD127+ non sembra subiscano modifiche età correlate, infatti la percentuale della mediana va da 5.2 nei giovani a 5.7 negli anziani (Fig. 4.71), mentre questa popolazione è molto abbondante nei CMV+ fino ad arrivare a 8.7% vs. 4.1% nei CMV- ($p < 0.001$).

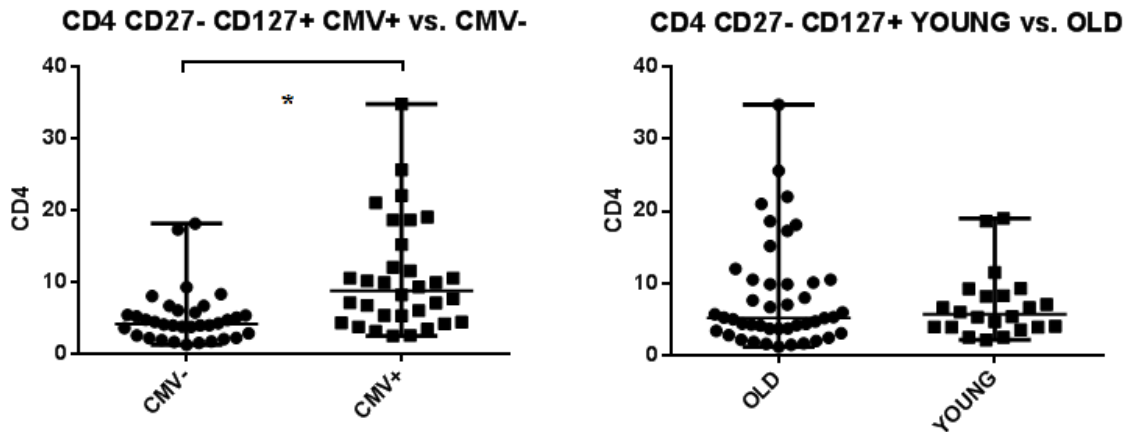


Fig. 4.71. Percentuale delle CD4 CD127+ CD27- nei donatori in relazione al sierostato.

Quando scorporiamo i gruppi (Fig. 4.72), si nota sempre un aumento di questa popolazione nei CMV+ sia giovani (9.2% vs. 4.7% giovani negativi, $p = 0.01$) che negli anziani (anziani positivi 7.6% vs. 3.7% anziani negativi, $p = 0.0012$).

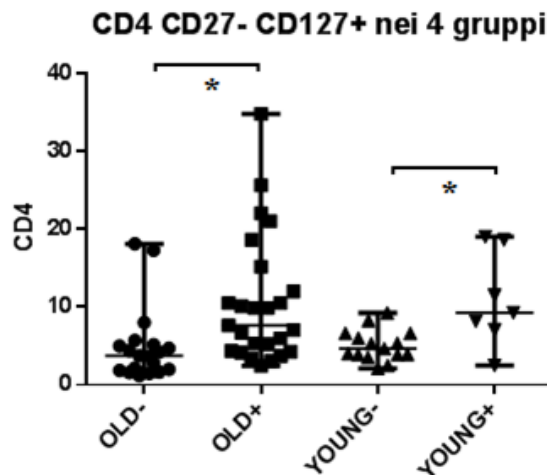


Fig. 4.72. Percentuale delle CD4 CD127+ CD27- nei 4 gruppi.

I CD4+CD27+CD127+ diminuiscono durante l'infezione da CMV (Fig. 4.73), si va da una mediana di 92.85% nei CMV- a 92.85% nei CMV+ ($p < 0.0001$), mentre vi è una lieve diminuzione correlata all'avanzare dell'età (young 91.3 vs. old 89.95, $p = ns$).

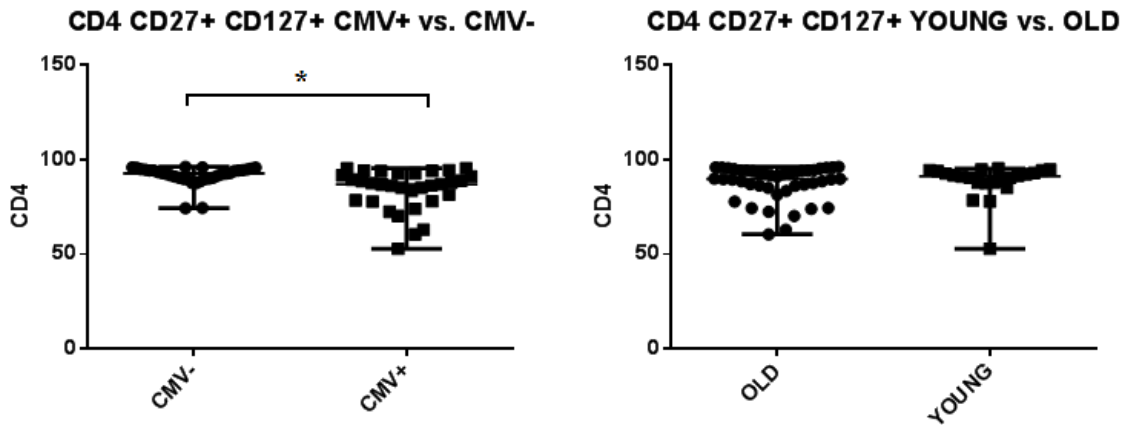


Fig. 4.73. Percentuale delle CD4 CD127+ CD27+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Per quanto riguarda la percentuale dei CD4 CD27+CD127+ nei 4 gruppi esaminati, non sembra subire modificazione età correlate, mentre l'infezione da CMV causa in entrambi i gruppi, una diminuzione di questa popolazione sia nei giovani che negli anziani, rispettivamente old+ 87.2% vs. old- 93.5%, ($p=0.0019$), e young+ 85.2/ vs. 92.4% young- ($p=0.01$)(Fig. 4.74).

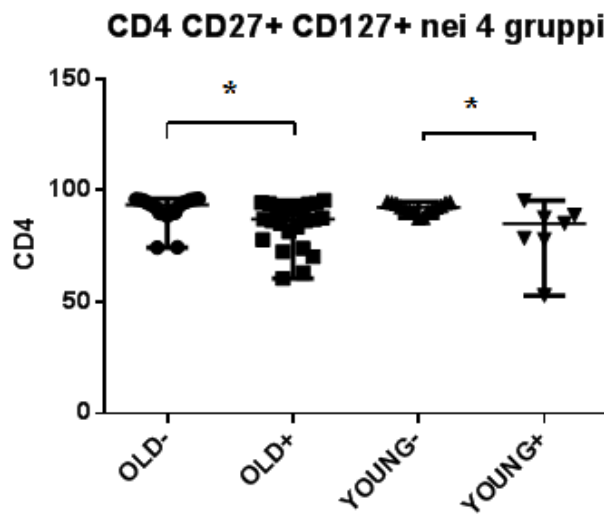


Fig. 4.74. Percentuale delle CD4 CD127+ CD27+ nei 4 gruppi.

4.2.5.2. CD8

I CD8+CD27-CD127+ (Fig. 4.75) aumentano significativamente negli anziani rispetto ai giovani (18.9% vs. 4.5%, $p<0.0001$), ed aumentano anche durante l'infezione da CMV (CMV+ 24.7% vs. 7.7% CMV-, $p<0.0001$).

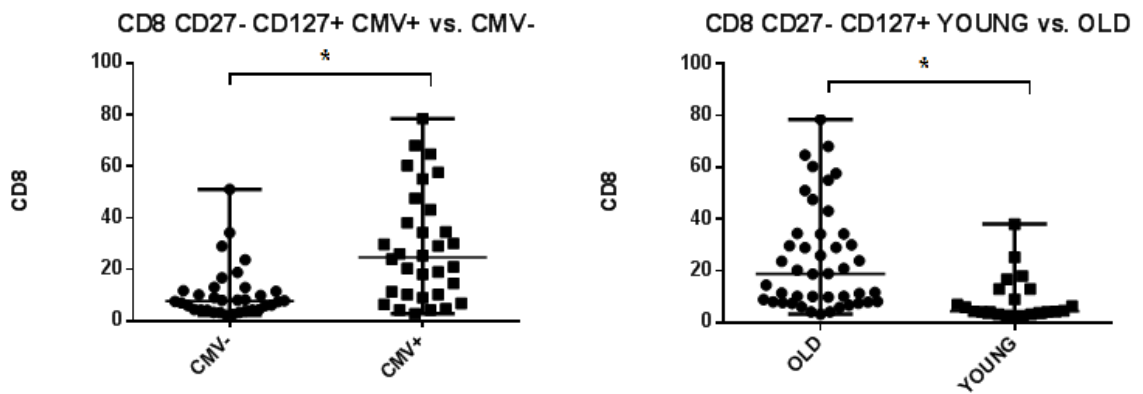


Fig. 4.75. Percentuale delle CD8 CD127+ CD27- nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i 4 gruppi (Fig. 4.76), si nota un aumento di questa popolazione correlata all'età sia nei CMV- (old- 8.3% vs. young- 4.3%, $p=0.007$), che nei CMV+ (old+ 29.1% vs. old- 6.4%, $p=0.01$), inoltre un ulteriore aumento si ha durante l'infezione da CMV, infatti si passa da 8.3% degli anziani negativi a 29.1% degli anziani positivi ($p=0.0005$).

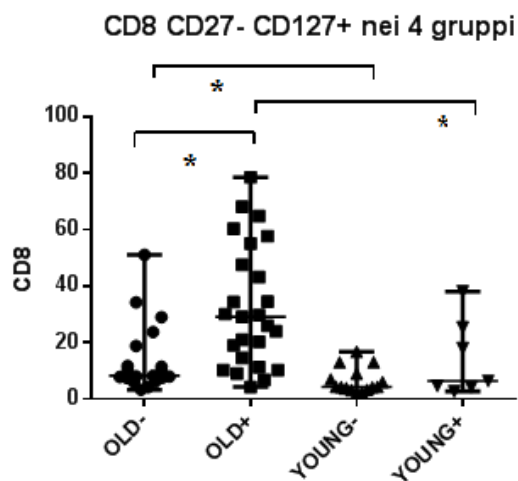


Fig. 4.76. Percentuale delle CD8 CD127+ CD27- nei 4 gruppi.

I CD8 doppi positivi, CD27+CD127+, (Fig. 4.77) diminuiscono con l'aumentare dell'età dal 82.1% dei giovani a al 43.6% degli anziani ($p<0.0001$). Lo stesso avviene durante l'infezione da CMV, infatti si va dal 77.1% dei CMV- al 41.5% dei CMV+ ($p<0.0001$)

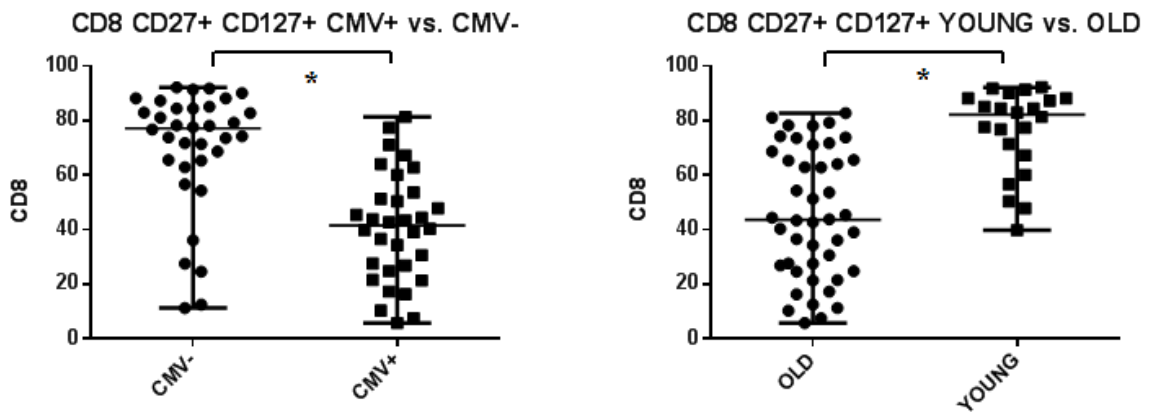


Fig. 4.77. Percentuale delle CD8 CD127+ CD27+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi (Fig. 4.78), si nota una diminuzione età correlata sia nei CMV + (old 36.5% vs. 60% young, $p=0.003$), sia nei CMV- (old 68.6% vs. 85% young, $p<0.0001$), ed un'ulteriore diminuzione durante l'infezione da CMV (old+ 36.5% vs. 68.6% old-, $p=0.0007$; young+ 60% vs. 85% young-, $p=0.0010$).

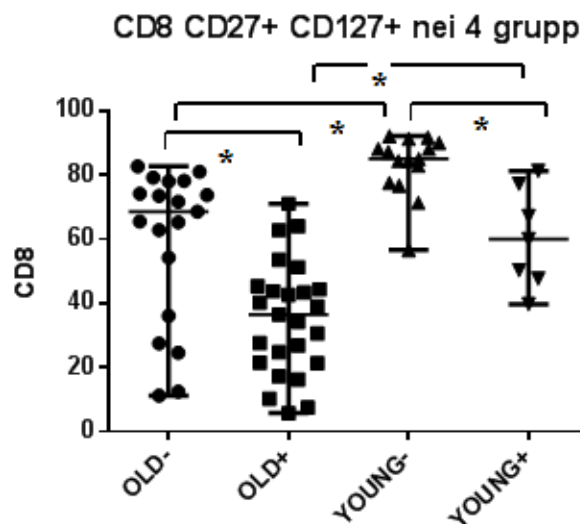


Fig. 4.78. Percentuale delle CD8 CD127+ CD27+ nei 4 gruppi.

4.2.6. Espressione del CD11a e del CD26

4.2.4.1. CD4

Analizzando le diverse sottopopolazioni CD11a e CD26, si nota un aumento dei CD11a-CD26+ (Fig. 4.79) sia nei donatori CMV+ (9.3% vs. 4.8% CMV-, $p=0.0038$) che con l'aumentare dell'età (old 8.3% vs. young 4.5%, $p=0.02$).

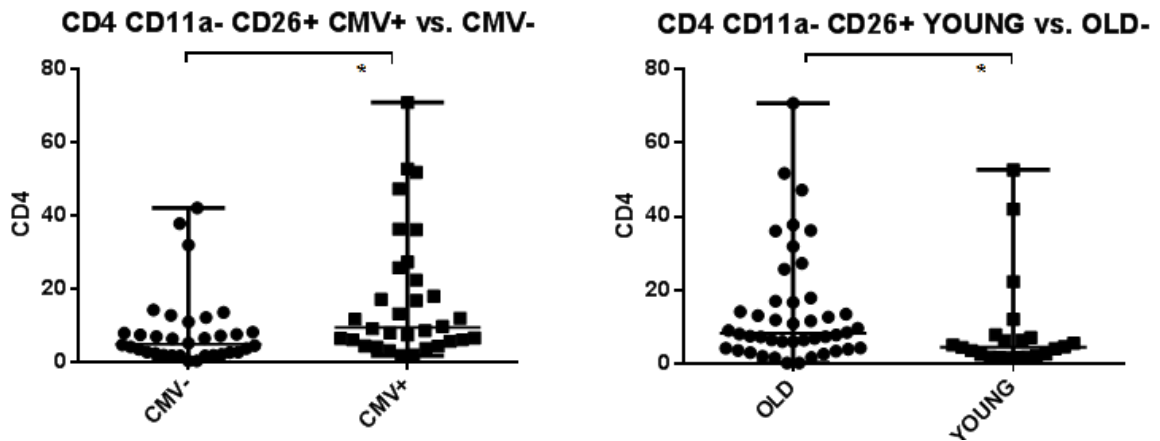


Fig. 4.79. Percentuale delle CD4 CD11a- CD26+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

La Fig. 4.80 mostra i risultati nei 4 gruppi, e sebbene vi sia complessivamente un aumento età correlato e durante l'infezione da CMV, l'unico valore significativo è la differenza tra gli old+ 11.6% vs. 6.9% old-, $p=0.01$.

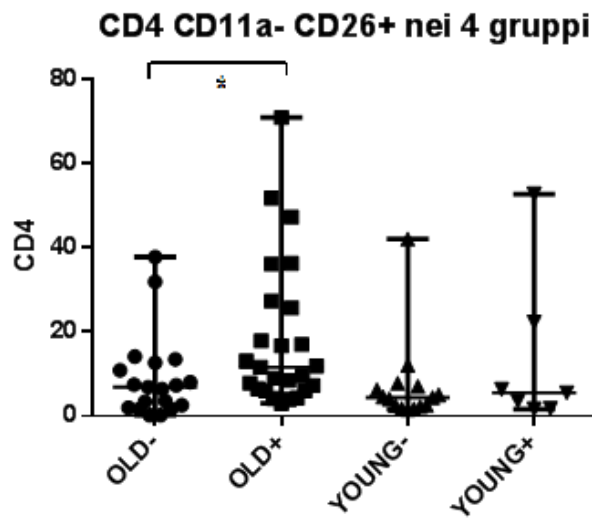


Fig. 4.80. Percentuale delle CD4 CD11a- CD26+ nei 4 gruppi.

Come emerge dalle Fig. 4.81, non vi sono grosse differenze in termini di popolazione doppia positiva nel gruppo CMV+ vs. CMV- e né negli young vs. old. Il risultato non cambia scorporando i gruppi (Fig. 4.82)

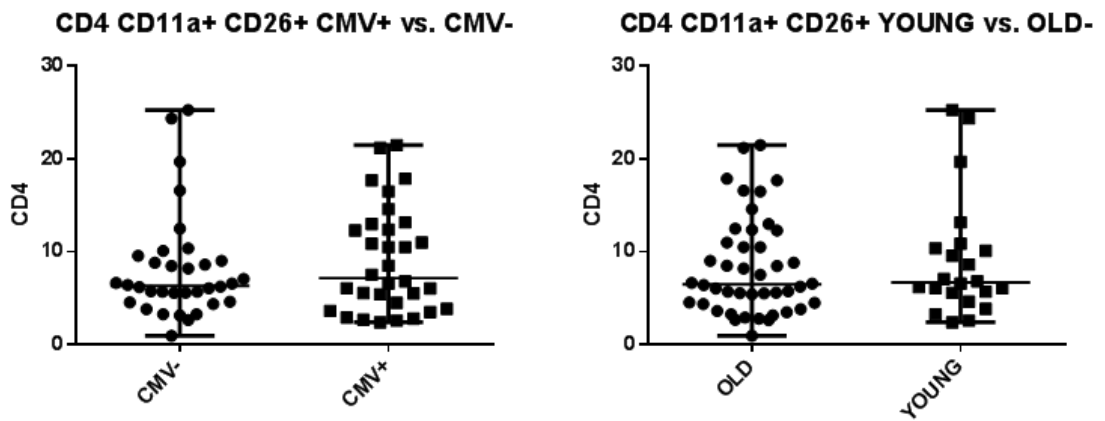


Fig. 4.81. Percentuale delle CD4 CD11a+ CD26+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

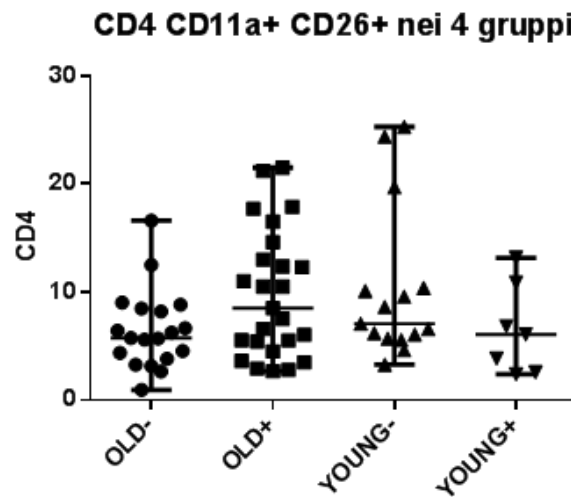


Fig. 4.82. Percentuale delle CD4 CD11a+ CD26+ nei 4 gruppi.

Nella popolazione CD4 CD11a+CD26-, non sono emerse differenze significative nell'analisi per sierostato e per età (Fig. 4.83).

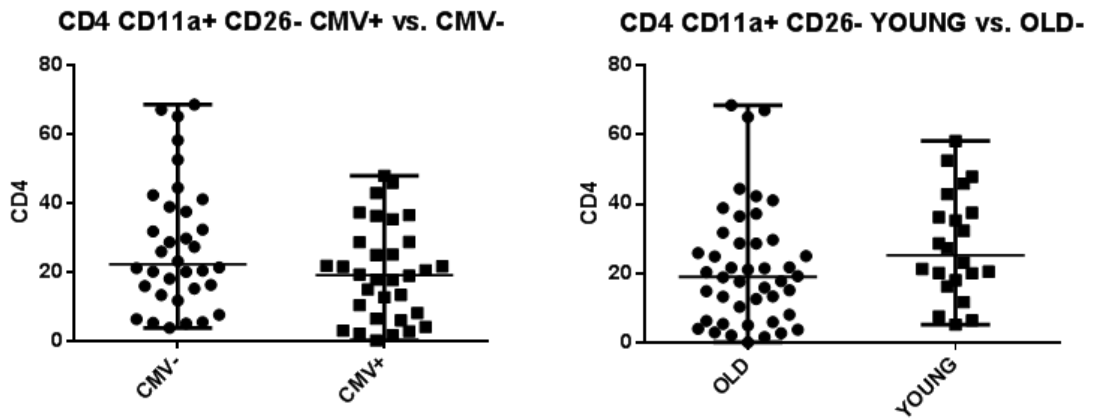


Fig. 4.83. Percentuale delle CD4 CD11a+ CD26- nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi (Fig. 4.84) si nota una diminuzione di questa popolazione nei soggetti anziani CMV+ (17.6% vs. 25.9% anziani CMV-, $p=0.02$), si nota anche una diminuzione età correlata solo nei soggetti CMV+ (old+ 17.6% vs. 36.2 young+, $p=0.008$).

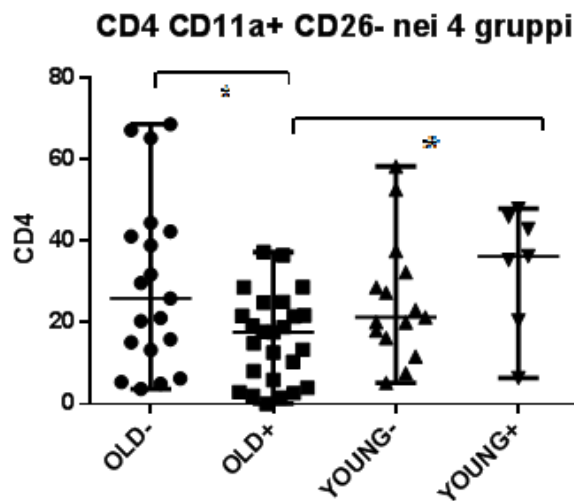


Fig. 4.84. Percentuale delle CD4 CD11a+ CD26- nei 4 gruppi.

Nella popolazione doppia negativa, CD11a-CD26-, non emergono differenze sia se dividiamo i gruppi in base al sierostato o/e l'età (risultati non mostrati).

4.2.4.2. CD8

Nella popolazione dei CD8, I CD11a-CD26+ non mostrano grosse variazioni in relazione al sierostato e all'età (dati non mostrati), mentre se scorporiamo i gruppi, si nota globalmente un aumento età correlato nei CMV- (old 20% vs. 4.8%, $p=0.04$) (Fig. 4.85)

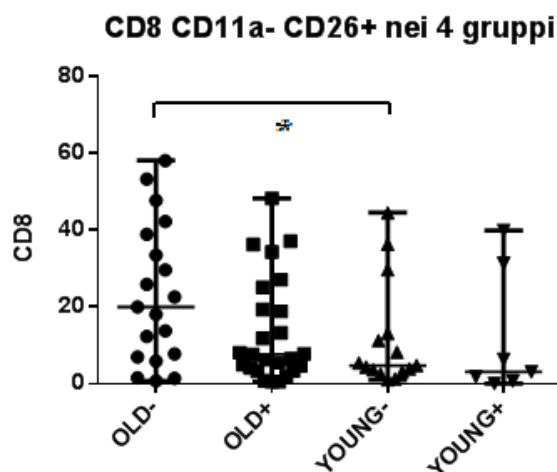


Fig. 4.85. Percentuale delle CD8 CD11a- CD26+ nei 4 gruppi.

La popolazione CD11a+CD26+, non mostra variazioni significativo in base al sierostato e all'età. Scorporando i gruppi (Fig. 4.86) si nota una diminuzione di questa popolazione durante l'infezione del CMV nei giovani (young- 11.9% vs. 6.03% young+, p=0.01).

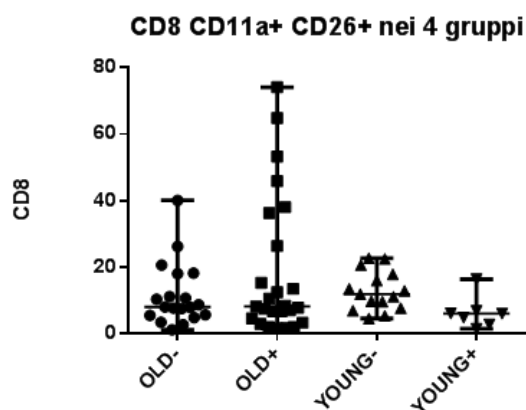


Fig. 4.86. Percentuale delle CD8 CD11a+ CD26+ nei 4 gruppi.

L'analisi della popolazione CD11a+CD26- (Fig. 4.87), ha mostrato che vi è aumento nei donatori con infezione da CMV (53.9% vs. 33.6% CMV-, p=0.0039), ed anche età correlato (giovani 32.9% vs. 50.5% anziani, p=0.01)

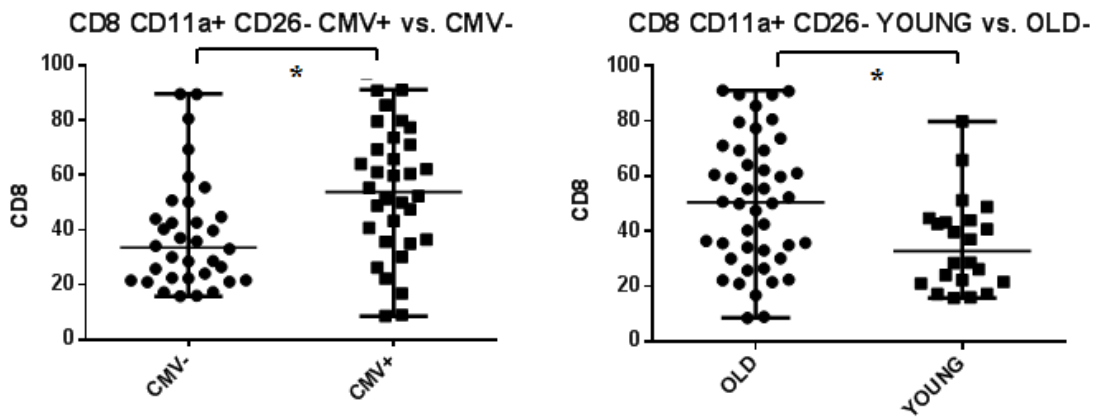


Fig. 4.87. Percentuale delle CD8 CD11a+ CD26- nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi la percentuale della mediana della popolazione CD11a+CD26- (Fig. 4.88) aumenta con l'aumentare dell'età dal 24.1% dei giovani negativi al 40.4% negli anziani negativi ($p=0.0099$). Durante l'infezione da CMV vi è un aumento significativo di questa popolazione nei giovani positivi, che va dal 24.1% dei negativi al 48.9% dei giovani positivi ($p=0.002$).

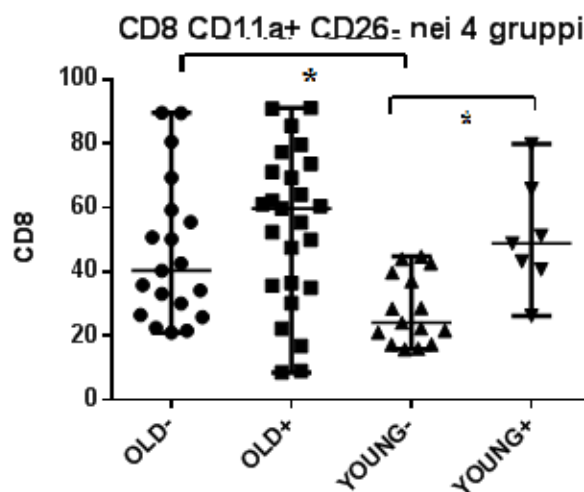


Fig.4.88. Percentuale delle CD8 CD11a+ CD26- nei 4 gruppi.

Analizzando all'interno dei CD8 i doppi negativi, emerge che questa popolazione (Fig. 4.89) diminuisce durante l'infezione da CMV (12.8% vs. 30.8% CMV-, $p=0.0092$) e diminuisce anche durante l'invecchiamento (giovani 44.05% vs. 12.9% anziani, $p<0.0001$).

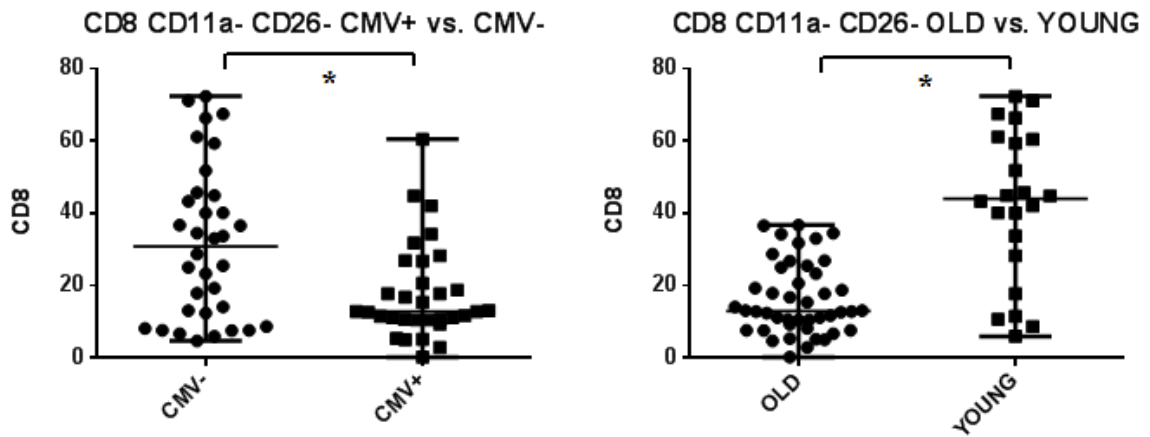


Fig. 4.89. Percentuale delle CD8 CD11a- CD26- nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i 4 gruppi (Fig. 4.90) emerge che la popolazione doppia negativa decresce con l'aumento dell'età (dal 45.7% dei giovani al 17.09% degli anziani, $p < 0.0001$) e questa differenza resta significativa anche nei soggetti giovani ed anziani con infezione da CMV (rispettivamente 28.2% vs 12.6%, $p = 0.02$).

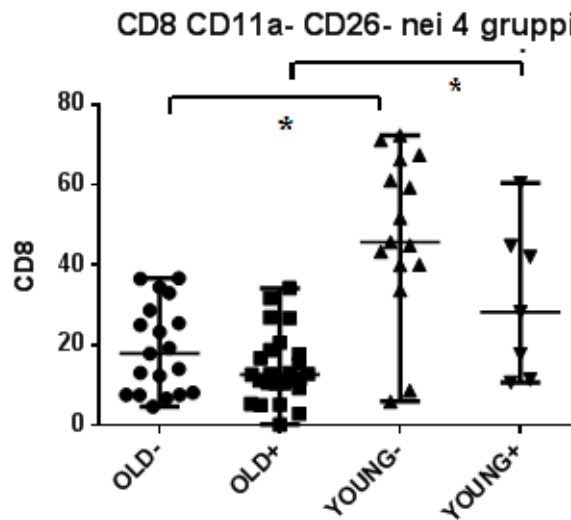


Fig. 4.90. Percentuale delle CD8 CD11a- CD26- nei 4 gruppi.

4.2.7. Linfociti T TCR gd

Abbiamo valutato la percentuale dei T gd nella popolazione CD3 (Fig. 4.91), ed è emerso che diminuiscono all'aumentare dell'età infatti questi rappresentano il 5.2% dei CD3 circa nei giovani e il 2.5% negli anziani ($p = 0.001$). Durante l'infezione da CMV sembra che vi sia una tendenza a una diminuzione della percentuale (dal 4.04% vs. 3.3%, $p = ns$).

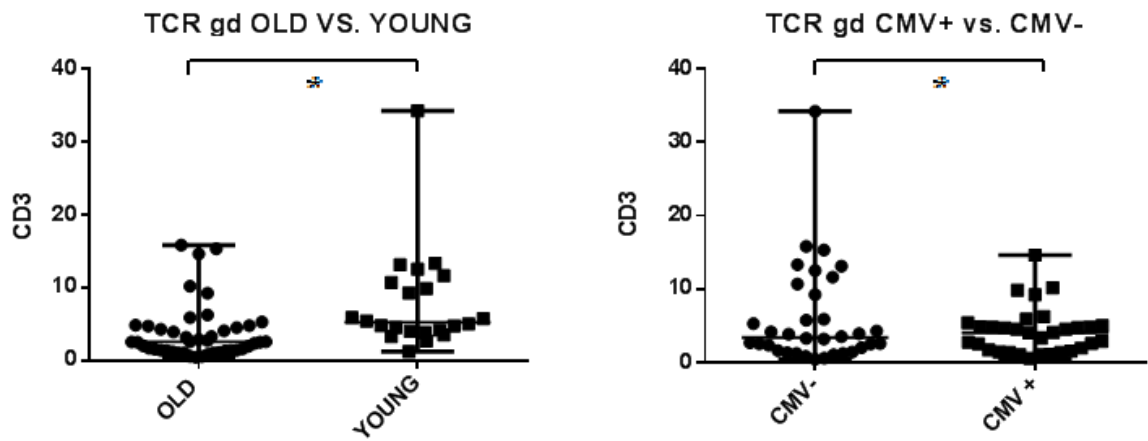


Fig. 4.91. Percentuale delle TCR gd nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i 4 gruppi emerge (Fig. 4.92) una diminuzione età correlata sia nei CMV- (young- 5.8% vs. 2.3% old-, $p=0.0018$), che nei CMV+ (young+ 4.7% vs. 2.7 old+, $p=0.04$)

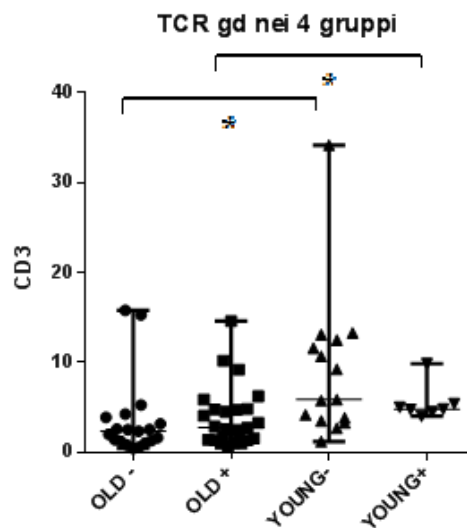


Fig. 4.92. Percentuale delle TCR gd nei 4 gruppi.

La Fig. 4.93, mostra un esempio citofluorimetrico della popolazione TCR Vd2 in un soggetto CMV+ ed un soggetto CMV-.

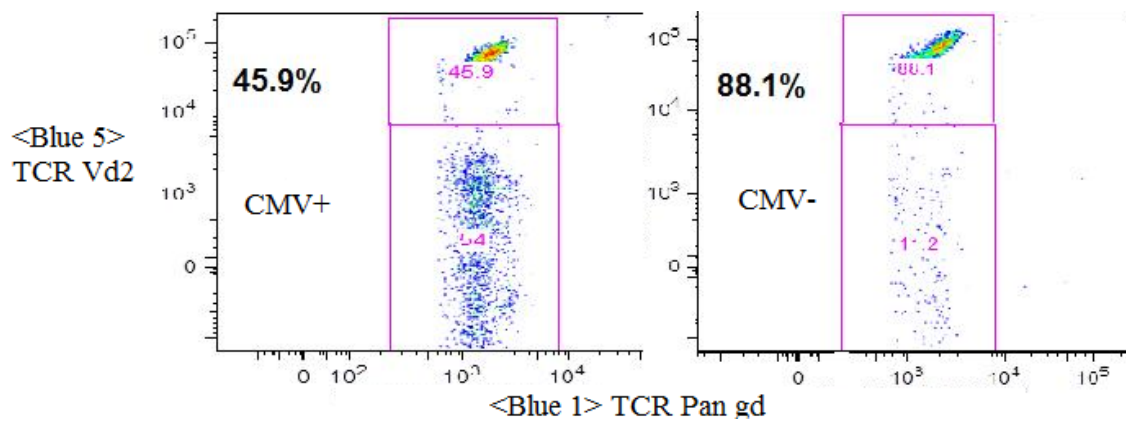


Fig. 4.93. Percentuale dei TCR Vd2 in un soggetto CMV+ ed un soggetto CMV-.

All'interno dei TCR gd abbiamo analizzato la popolazione CD8 dim (Fig. 4.94) in base al sierostato e all'età. Questa popolazione diminuisce all'aumentare dell'età passando da 9.7% dei giovani al 16.7% degli anziani ($p=0.02$), ed aumenta durante l'infezione da CMV (CMV+ 18.7% vs. 10.2 CMV-, $p=0.0064$).

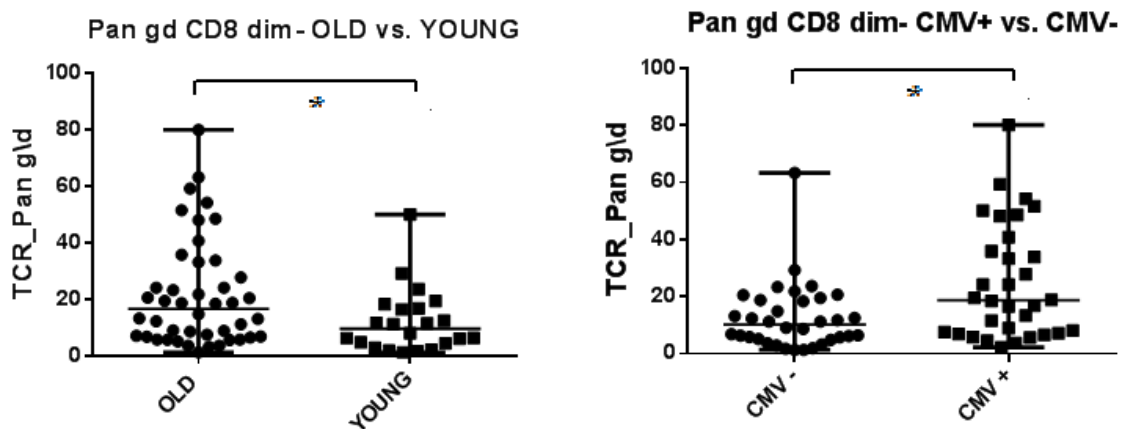


Fig. 4.94. Percentuale delle TCR gd CD8 dim nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi, si nota un aumento dei TCR gd CD8 dim con l'avanzare dell'età sia nei CMV- (young 6.4% vs. 11.3%, $p=ns$) che nei CMV+ (young 11.6% vs. old 24.2%, $p=ns$). Si nota (Fig. 4.95) anche una aumento durante l'infezione da CMV sebbene con differenze significative ($p=0.02$) solo tra gli anziani+ 24.2% vs. 11.3% anziani-.

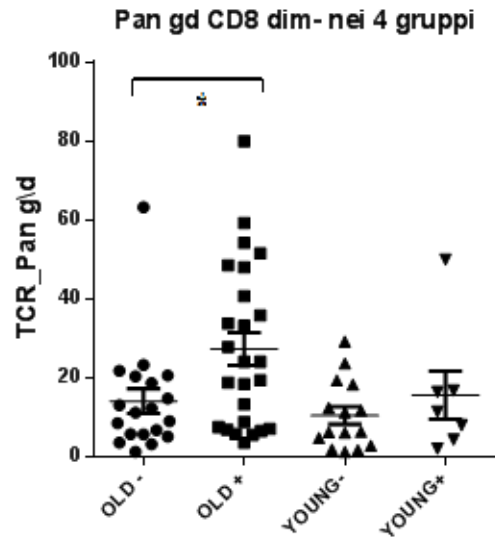


Fig. 4.95. Percentuale delle TCR gd CD8 dim nei 4 gruppi.

4.2.7.1. Vd2+ e Vd2-

Nella Fig. 4.96 è illustrata la diversa percentuale dei Vd2+ e Vd2- in relazione al sierostato e all'età. Nei soggetti CMV+ vi è un aumento della percentuale dei Vd2-, si va dal 19% dei CMV- al 45% dei CMV+ ($p=0.009$). Anche negli anziani vi è un aumento di questa popolazione (young 17% vs. 45.5%, $p=0.0007$).

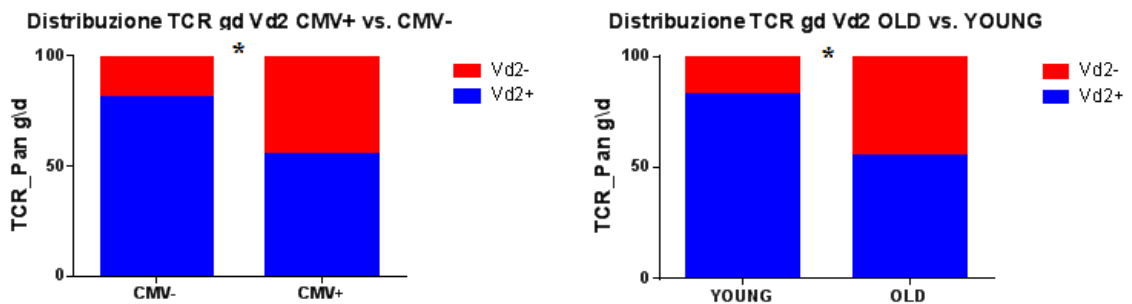


Fig. 4.96. Distribuzione dei TCR gd Vd2 in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi (Fig. 4.97), emerge un aumento delle Vd2- con l'avanzare dell'età, infatti si va dal 10% nei giovani negativi al 30% negli anziani negativi ($p=0.01$), ma non significativa tra i giovani e gli anziani positivi (rispettivamente 23% vs. 49.6%, $p=ns$). Questa popolazione aumenta durante l'infezione da CMV, sebbene solo nei giovani in modo significativo (10.4% vs. 23.2%, $p=0.02$).

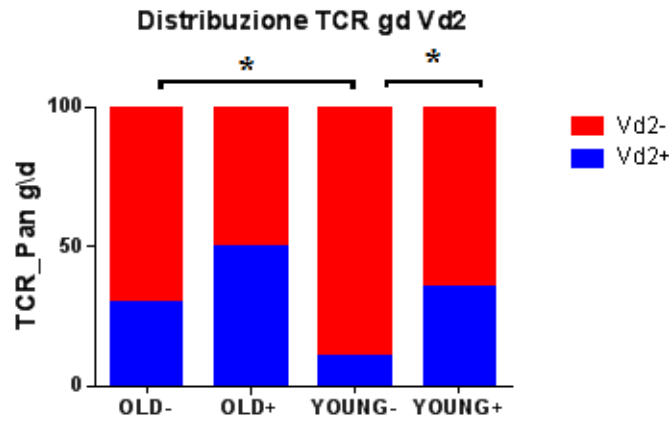


Fig. 4.97. Distribuzione dei TCR gd Vd2 nei 4 gruppi.

4.2.7.1.1. Espressione del CD16

Abbiamo valutato l'espressione del CD16 all'interno delle popolazioni Vd2+ e Vd2-. Nella popolazione Vd2+, non vi sono differenze basate sul sierostato (CMV+ 5.04% vs. 4.8% CMV-, $p=ns$), né sull'età (young 6.8% vs. 4.3% old, $p=ns$). Nessuna differenza è stata osservata scorporando i gruppi (dati non mostrati).

Nella popolazione Vd2-, l'espressione del CD16 varia in relazione al sierostato e all'età (Fig. 4.98). Nei soggetti CMV+ vi è una percentuale dell'8.1% mentre nei CMV- 1.4% ($p<0.0001$); nei giovani si va dal 1.6% al 4.6% degli anziani ($p=0.0077$).

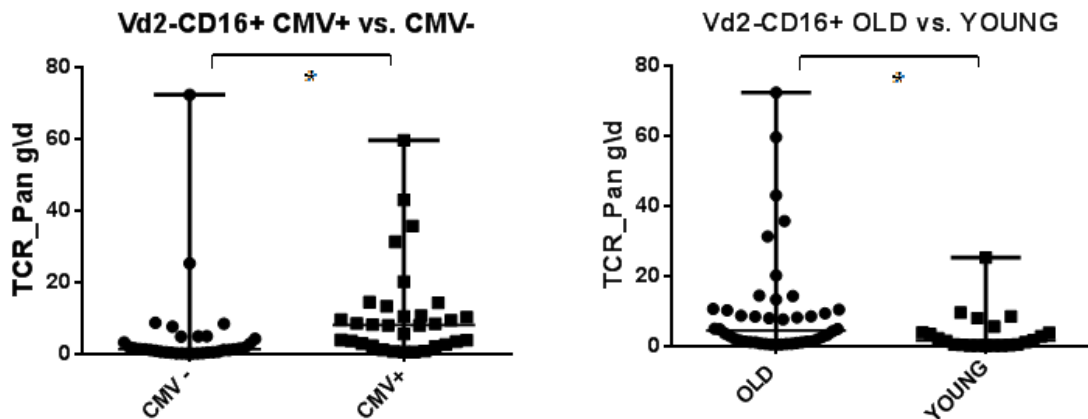


Fig. 4.98. Percentuale dei Vd2-CD16+ nei donatori in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i 4 gruppi (Fig. 4.99) emerge un aumento di questa popolazioni durante l'infezione da CMV sia negli anziani (CMV- 1.6% vs. 8.5% CMV+, $p=0.01$), che nei giovani (CMV+ 0.5% vs. 3.9% CMV-, $p=0.0051$). Vi è anche un aumento età correlato nei CMV- (0.5% giovani vs. 1.6% anziani, $p=0.01$) che negli CMV+ sebbene in quest'ultimo gruppo con una p non significativa.

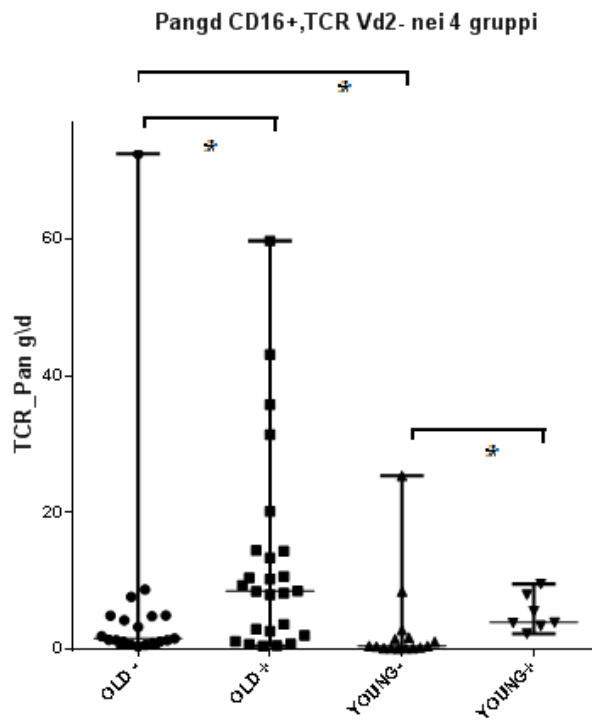


Fig. 4.99. Percentuale dei Vd2-CD16+ nei 4 gruppi.

4.2.7.1.2. Espressione del CD27 e del CD45RA

Inoltre abbiamo analizzato l'espressione del CD27 e del CD45RA su entrambe le popolazioni Vd2+ e Vd2-.

Nei linfociti T gd i Vd2+ (Fig. 4.100) con fenotipo Naive, CD27+CD45RA+, non vi sono differenze significative tra i due gruppi (CMV+ 2.7% vs. 3.3% CMV-, p=ns). Nei TCM, invece si nota un aumento nei soggetti con infezione da CMV+(68.2% vs. 38.2% CMV-, p=0.0002), nei TEM anche (CMV+ 34.4% vs. 20.2%, p=0.06), e un aumento dei TEMRA (6.3% vs. 1.8%, p=0.0094).

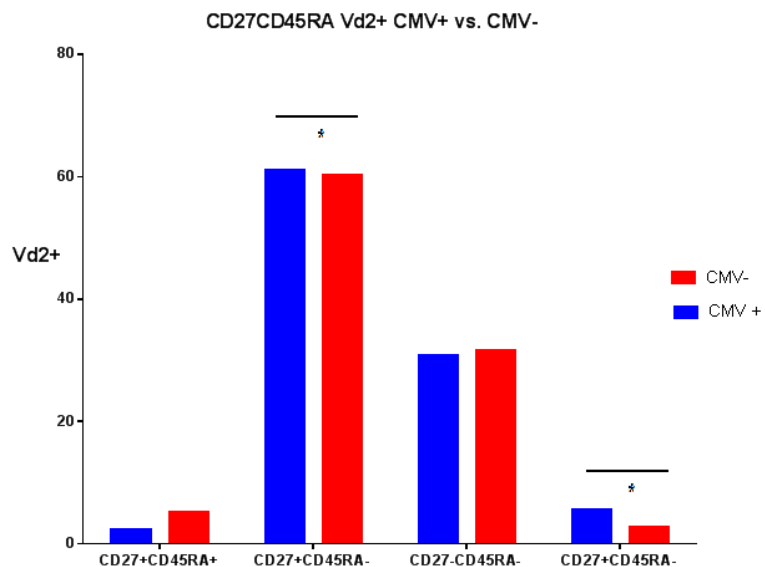


Fig. 4.100. Sottopopolazioni Vd2+ in base al sierostato.

L'analisi delle sottopopolazioni in base all'età (Fig. 4.101), mostra un aumento delle naïve negli anziani rispetto ai giovani (rispettivamente 5.1% vs. 2.6%, $p=0.006$), ed un aumento delle TEMRA (rispettivamente 4.8% vs. 1.6%, $p=0.009$). Le TCM e le TEM non hanno mostrato differenze significative.

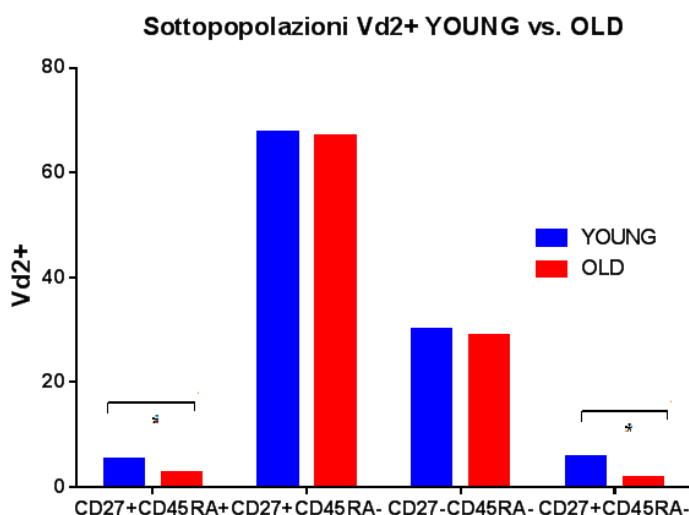


Fig. 4.101. Sottopopolazioni Vd2+ in base all'età.

Scorpendo i gruppi, come nella fig. 4.102 si nota un aumento delle Vd2+ naïve negli anziani + vs. giovani + (4.5% vs. 0.3%, $p=0.0001$), ma vi è una diminuzione nei giovani positivi vs. e giovani negativi (0.3% vs. 2.7%, $p=0.001$). Nelle TCM si osserva una diminuzione durante l'infezione da CMV nell'anziano (old- 58.3% vs. old+ 37.9%, $p=0.01$) e nel giovane (young- 72% vs. 40% young+, $p=0.03$). Nei TEM c'è un aumento età correlato solo durante l'infezione da CMV (y+ 1.2% vs. o+ 6.6%, $p=0.025$). Inoltre vi è un aumento significativo solo negli anziani positivi (6.6% vs. 1.8% anziani negativi, $p=0.009$).

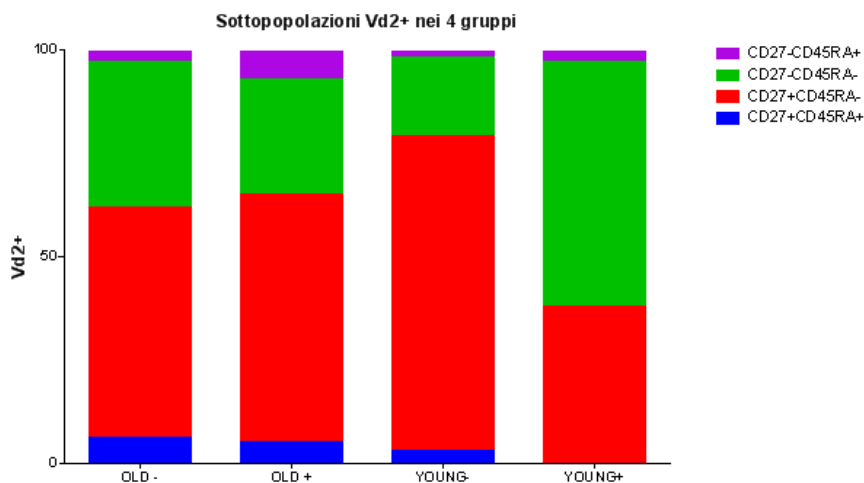


Fig. 4.102. Sottopopolazioni all'interno dei Vd2+ nei 4 gruppi.

L'analisi dei Vd2- per sierostato, ha mostrato nei soggetti con CMV+ una diminuzione dei naïve (22.5% vs. 33.9% CMV-, $p=0.01$), una diminuzione delle TCM (1.8% vs. 6.3% nei CMV-, $p=0.0094$), nessuna differenza nei TEM, ed un aumento delle TEMRA (50.05% vs. 11.98%, $p<0.0001$) (Fig. 4.103).

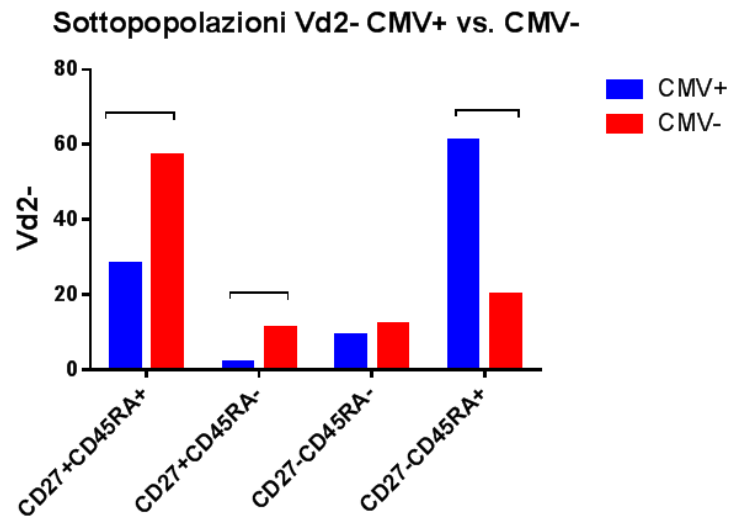


Fig. 4.103. Sottopopolazioni Vd2- in base al sierostato.

L'analisi per età (Fig. 4.104), ha mostrato una differenza significativa tra gli anziani e i giovani solo tra le cellule Vd2- con fenotipo TCM (old 4.8% vs. 1.6%, $p=0.0099$) e le cellule TEMRA (old 32.8% vs. 18.3%, $p=0.08$).

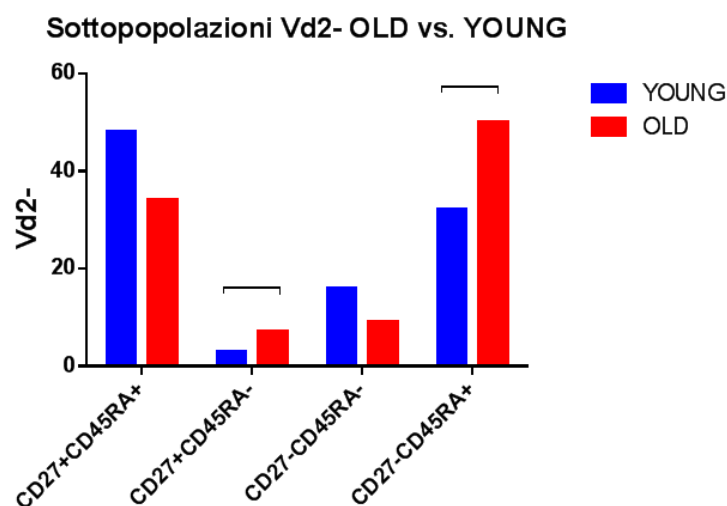


Fig. 4.104. Sottopopolazioni Vd2- in base all'età.

Scorporando i 4 gruppi (Fig. 4.105), nella popolazione naïve vi è una differenza significativa tra i giovani positivi ed i negativi (rispettivamente 16.7% vs. 34%, $p=0.04$). Nelle Vd2- TCM si nota una diminuzione nei soggetti CMV positivi sia giovani (35.6% vs. 14.3% giovani negativi,

p=0.0051) che anziani (32.9% vs. 13.3% anziani negativi, p=0.0004). Nelle cellule con fenotipi TEM non si notano modifiche durante l'infezione da CMV. Nelle VD2- con fenotipo TEMRA, si nota un aumento nei CMV+ sia giovani (63.5% vs. 8% CMV-, p=0.0038) che negli anziani (49.3% vs. 18% CMV-, p<0.001).

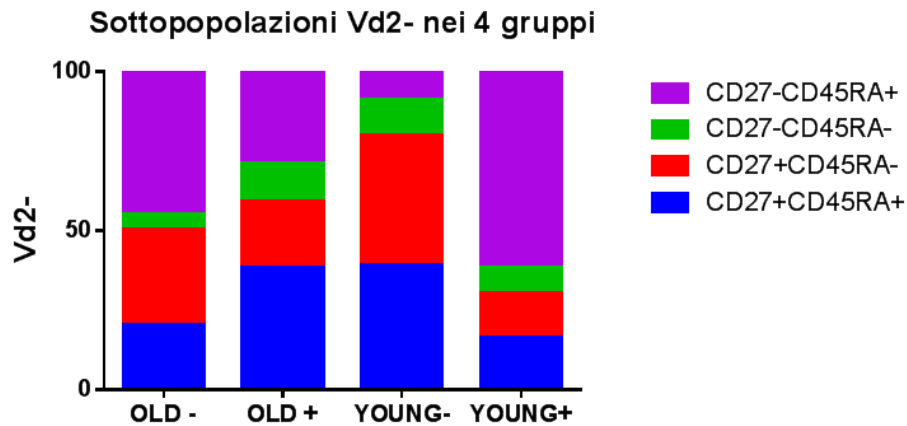


Fig. 4.105. Sottopopolazioni Vd2- nei 4 gruppi.

4.3 Parametri fisici

4.3.1 Pressione arteriosa (PA)

Tra le persone sieronegative 7 facevano uso di farmaci anti-ipertensivi, mentre tra le persone sieropositive 13 donatori (tutte persone anziane). Abbiamo visto se c'erano delle variazioni della PA sia sistolica che diastolica nei sieropositivi e nei sieronegativi, che nei giovani e negli anziani (Fig. 4.106). Per quanto riguarda l'età c'è una variazione significativa (p=0.0091) tra i giovani vs. gli anziani con una mediana che va rispettivamente da 124 mmHg a 137 mmHg. Sebbene nei CMV+ rispetto ai CMV- ci sia un trend in aumento (da 132 a 136 mmHg) non vi è significatività.

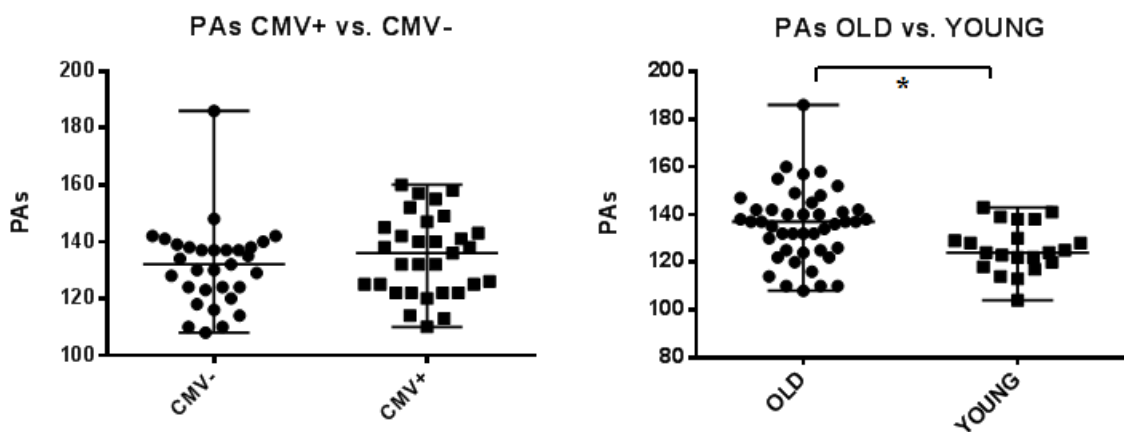


Fig. 4.106. PAs in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i 4 gruppi l'unica differenza significativa ($p=0.02$) si ha tra i giovani positivi e gli anziani positivi, con rispettivamente una mediana che va da 122 a 138 mmHg (Fig. 4.107).

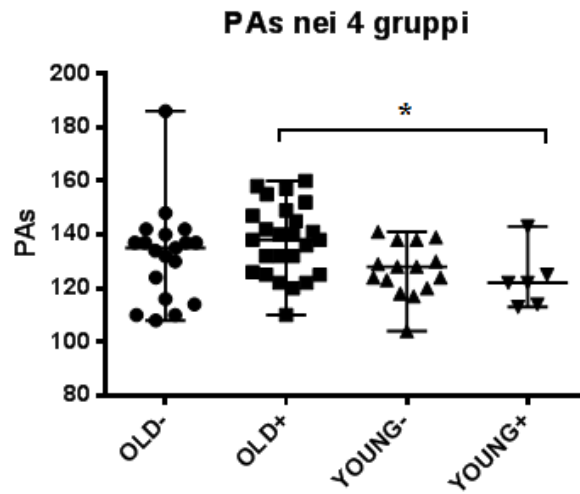


Fig. 4.107. PAs nei 4 gruppi.

La PA diastolica (PAs), mostra nei donatori con infezione da CMV dei valori più elevati rispetto ai CMV- (Fig. 4.108), sebbene con un p non significativa (mediana 80% vs. 75%), lo stesso avviene negli anziani rispetto ai giovani (mediana 78.5% vs. 75%).

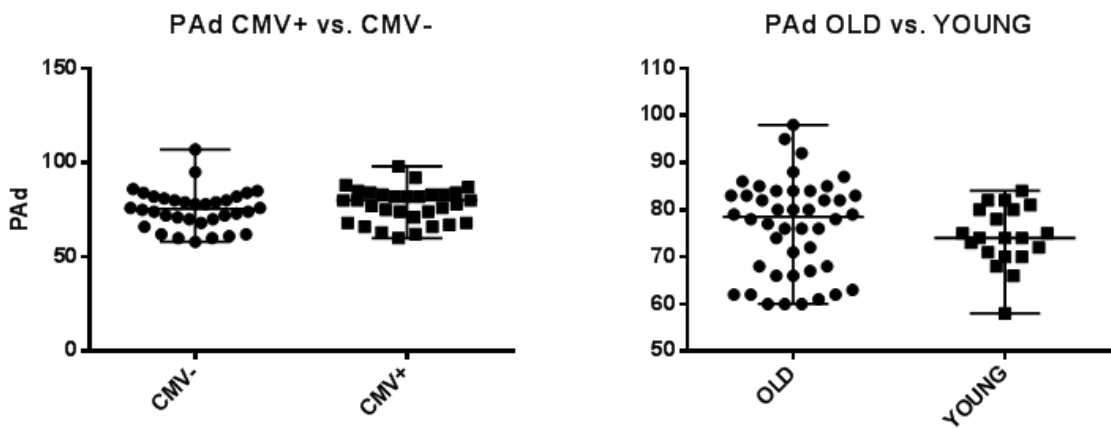


Fig. 4.108. PAd in relazione al sierostato e all'età.

Scorporando i gruppi (Fig. 4.109) si nota una tendenza all'aumento della PAd negli anziani positivi con 80 mmHg vs. 76 degli anziani negativi, e dei giovani positivi 74.5 vs. 74 dei giovani negativi, sebbene con una p non significativa.

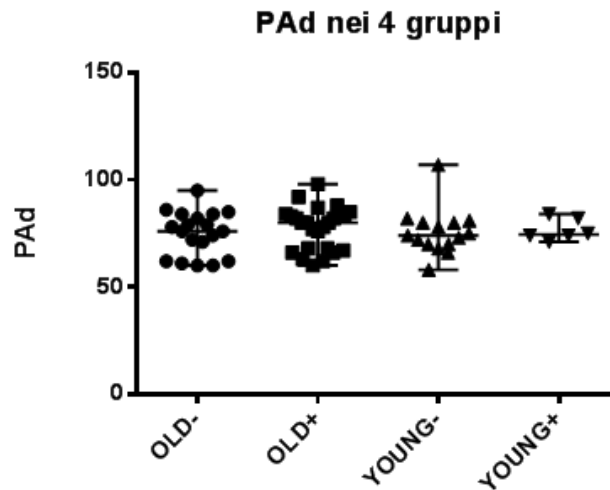


Fig. 4.109. PAd nei 4 gruppi esaminati.

4.3.2 Body Mass Index (BMI)

Tra i sieronegativi 2 persone facevano utilizzo di ipocolesterolemizzanti e 6 nei sieropositivi (tutti anziani). Abbiamo valutato il BMI nei soggetti sieropositivi che è risultato essere più elevato rispetto ai sieronegativi, con una mediana rispettivamente di 25.68 vs. 23.08 ($p=0.037$) (Fig. 4.110), mentre sebbene negli anziani sembra essere più elevato rispetto ai giovani (25.1 vs. 22.9), non vi è una differenza significativa.

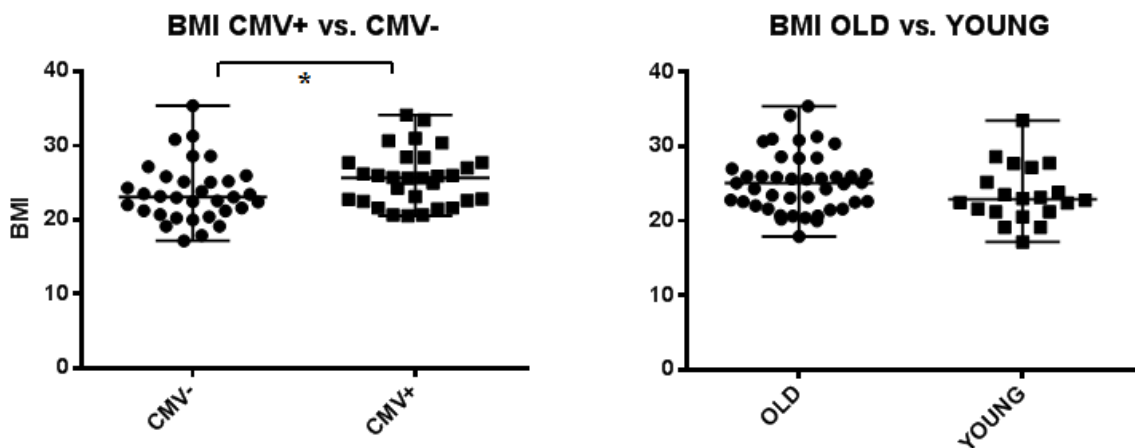


Fig. 4.110. Il BMI in relazione al sierostato e all'età.

L'analisi dei 4 gruppi non mostra differenze significative (Fig. 4.111), sebbene si noti un aumento negli anziani positivi vs. anziani negativi (25.68 vs. 23.45), e nei giovani positivi vs. negativi (22.45 vs. 25.44).

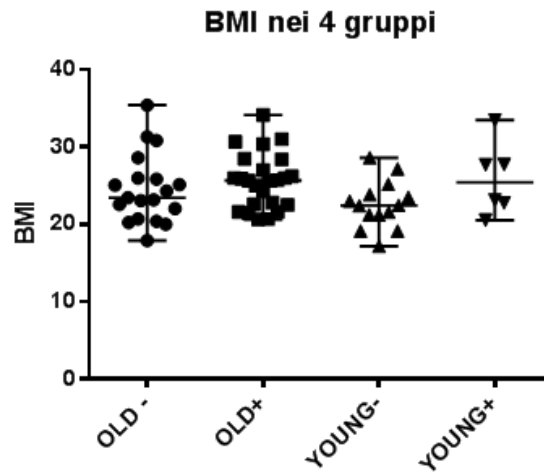


Fig. 4.111. BMI nei 4 gruppi esaminati.

4.4. Correlazioni tra parametri fisici e popolazioni cellulari

4.4.1 Età e sottopopolazioni linfocitarie

Come si nota dalla Fig. 4.112, nel compartimento CD4 non si osservano modifiche significative con l'avanzare dell'età, mentre si osservano nella popolazione CD27-CD45RA+.

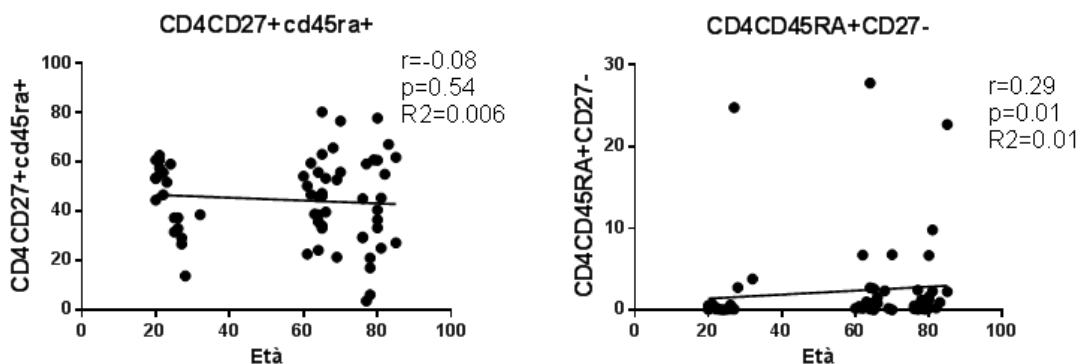


Fig. 4.112. Modifiche età correlate nel compartimento CD4.

Nel compartimento CD8 invece si osserva un aumento delle cellule con fenotipo TEMRA ed una diminuzione delle cellule con fenotipo naïve, anche esse definiamo le naïve in modo più completo (Fig. 4.113).

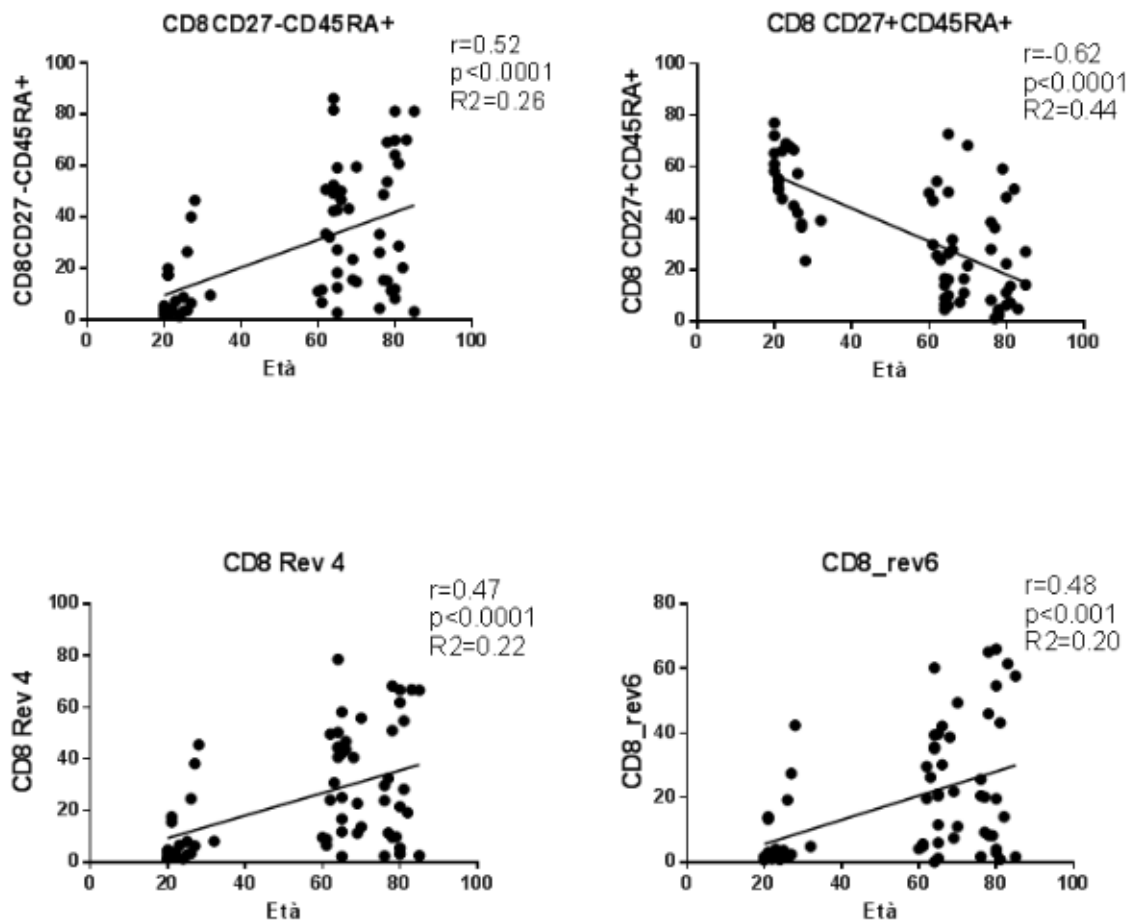


Fig. 4.113. Modifiche età correlate nel compartimento CD8.

All'interno dei linfociti T gd si può notare una diminuzione dei Vd2+ età correlata. Mentre all'interno del compartimento Vd2- (Fig. 4.114), si nota un aumento età correlato dell'espressione del CD16, ed un aumento della popolazione TEMRA (Fig. 4.115).

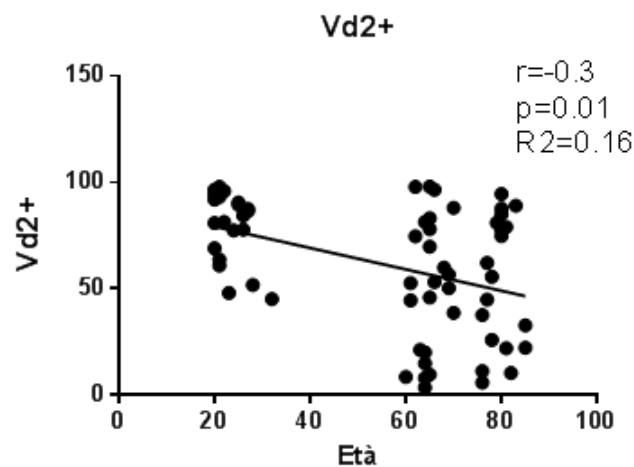


Fig. 4.114. Modifiche età correlate nel compartimento TCR gd.

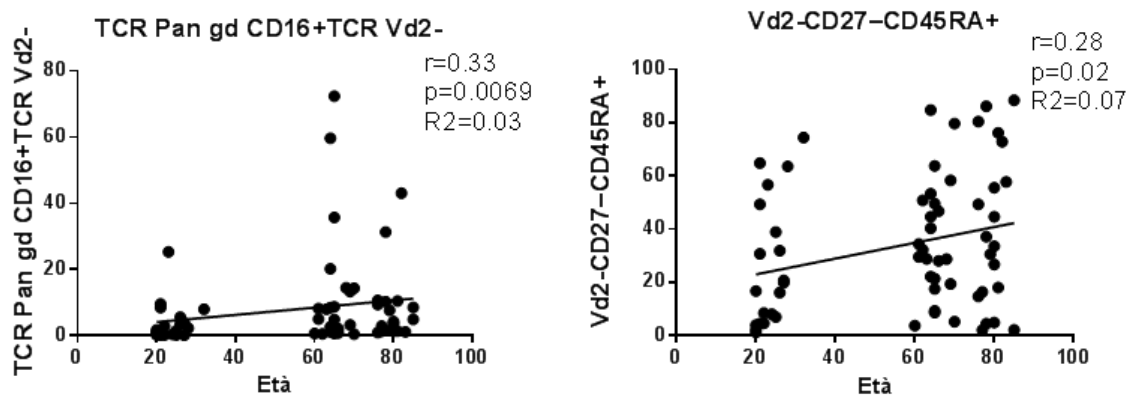


Fig. 4.115. Modifiche età correlate nel compartimento TCR Vd2-.

Se analizziamo per sierostato cosa avviene durante l'invecchiamento emergono delle modifiche simili (Fig. 4.116).

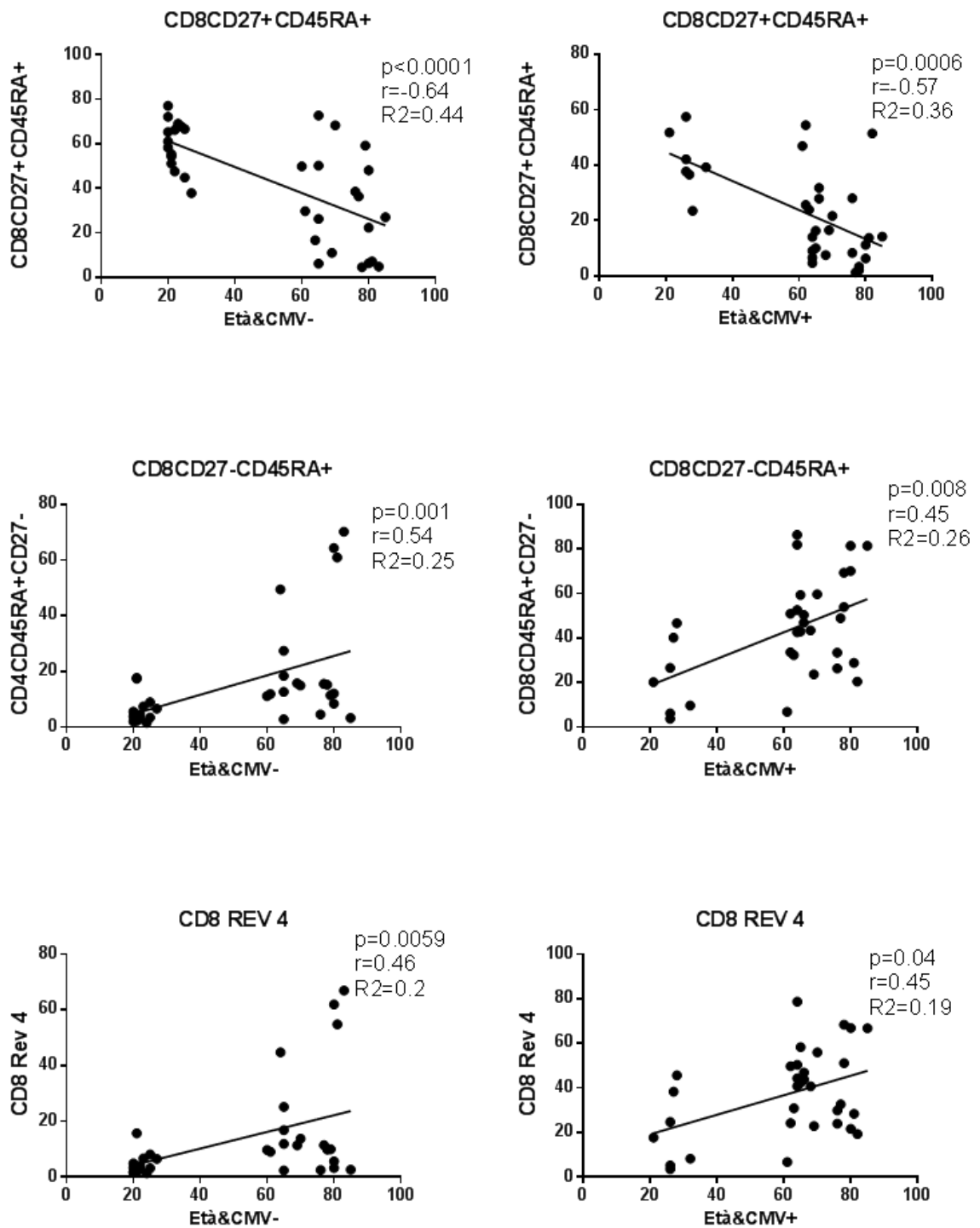


Fig. 4.116. Modifiche età dipendenti in relazione al sierostato.

4.4.2 Pressione arteriosa sistolica (PAs) e sottopopolazioni linfocitarie

Come si nota dalla Fig. 4.117 sembra esserci un aumento della pressione sistolica correlato all'aumento delle popolazioni revertant sia nel compartimento CD4 che CD8.

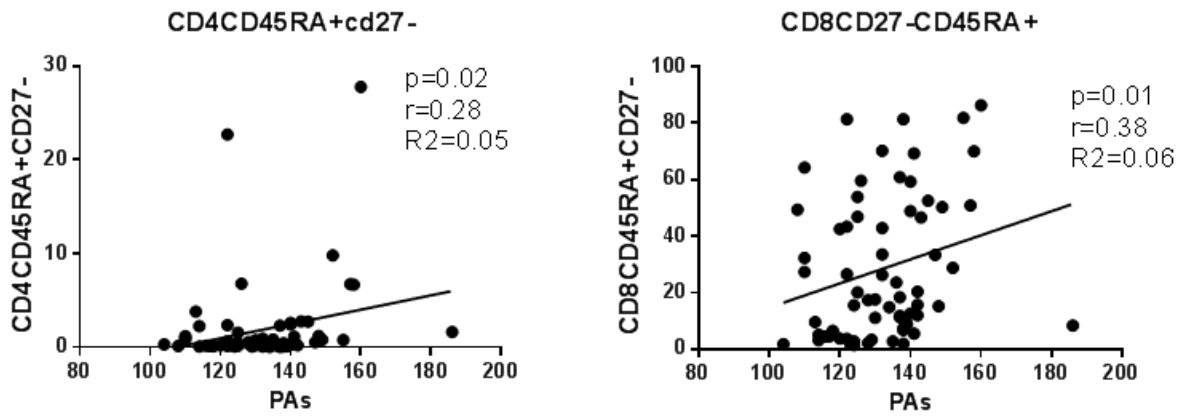


Fig. 4.117. Modifiche PAs correlate delle sottopopolazioni cellulari.

4.4.3 Body Mass Index (BMI) e sottopopolazioni linfocitarie.

Non ci sono state correlazioni significative con le sottopopolazioni linfocitarie.

5. Conclusioni

In questa tesi si è valutato l'impatto dell'infezione cronica da CMV sul sistema immunitario di individui sani al sotto dei 35 anni e di anziani sani sopra i 65 anni.

Il CMV è un β herpes virus, ubiquitario, è il più grande tra i virus erpetici dell'uomo con 235 kb, con 213 ORF (open reading frames), di questi 151 codificano per proteine immunogeniche per i CD4 ed i CD8 (Crough et al., 2009).

La sieroprevalenza aumenta con l'età e va dal 30% nei paesi occidentali al 90% nei paesi in via di sviluppo (Hecker et al., 2004).

L'infezione da CMV se contratta durante la gravidanza e trasmessa al feto può arrecare al bambino danni permanenti anche gravi, come cecità, sordità; mentre è responsabile di una serie di patologie in adolescenti ed adulti, che vanno da un'infezione asintomatica, alla sindrome mononucleosica in soggetti sani, alla malattia disseminata nell'ospite immunocompromesso (Kasper et al., 2008).

Il CMV possiede diversi meccanismi che lo rendono in grado di evadere la risposta immune, e ciò porta alla persistenza del virus all'interno dell'organismo ospite indipendentemente dalla risposta antivirale dell'individuo (Brunner et al., 2011). È stato visto che il CMV resta latente all'interno dei progenitori mieloidi e nei monociti (Mendelson et al., 1996), e da ultimi studi anche nelle cellule epiteliali delle ghiandole salivari e del rene (Mocarski et al., 2007). Durante la latenza del CMV, vi è una continua produzione di proteine virali, che portano una stimolazione antigenica cronica, che getta le basi per l'immunosenescenza.

Gli studi longitudinali OCTO e NONA (Wikby et al., 2005) hanno identificato la presenza della sieropositività al CMV all'interno dell'immune risk phenotype (IRP), un cluster di parametri immunologici associati ad aumento della mortalità a 2 e 4 anni. Fanno parte dell'IRP oltre alla sieropositività per CMV, anche l'accumulo di CD8+CD28- e CD8+CD27-, l'invertito rapporto CD4/CD8, caratteristiche comuni all'infezione da CMV e all'immunosenescenza.

Durante l'infezione da CMV vi è un'espansione di linfociti CD8 CMV specifici, questa popolazione può arrivare fino al 10% dei linfociti circolanti, e potrebbe essere il link tra IRP e CMV (Pawelec et al., 2006).

Per indurre e mantenere una così grande popolazione di linfociti CMV specifici, è necessaria una stimolazione cronica da parte dell'antigene, ciò suggerisce che il CMV cerca di riattivarsi in modo continuo ed in modo continuo il sistema immunitario recluta nuovi linfociti T per bloccare la replicazione (van Leeuwen et al., 2002).

La risposta immuno mediata è il meccanismo predominante con cui la replicazione del CMV viene controllata ed i protagonisti sembrano essere i CD4, i CD8 e i linfociti T gd (Crough et al., 2009).

Studi su modelli murini (MCMV) hanno mostrato che la deplezione dei linfociti porta una riattivazione ed una disseminazione dell'infezione e il trasferimento di linfociti CD8 CMV specifici conferisce protezione, ed anche altri studi hanno mostrato che i linfociti CD8 sono i più importanti nel controllo nella risposta al MCMV (Mutter et al., 1988; Polic et al., 1998). Sebbene vi siano meno evidenze sul ruolo dei CD4 nell'infezione da CMV, anche loro sono importanti per il controllo dell'infezione. Nell'infezione murina da CMV, la deplezione selettiva dei CD4 causa un aumento delle riattivazioni (Polic et al., 1998). Inoltre è stato dimostrato che i CD4 contribuiscono a controllare l'infezione primaria da MCMV che hanno una deplezione di CD8 prima dell'infezione (Jonjic et al., 1990).

Dai nostri risultati è emerso che durante l'infezione da CMV vi sono alterazioni sia nel compartimento dei CD8 che dei CD4, sebbene nel compartimento CD4 le modifiche siano meno marcate rispetto a quelle dei CD8.

Globalmente abbiamo osservato una diminuzione della percentuale dei CD3 età correlata nei soggetti CMV negativi, ma non nei soggetti CMV+, anzi in questi ultimi vi è un aumento di questa percentuale. I CD8 si comportano allo stesso modo, diminuiscono con l'avanzare dell'età, ed aumentano durante l'infezione da CMV (Miles et al., 2008; Chidrawar et al., 2009). Per quanto riguarda la percentuale dei CD4 invece vi è un aumento correlato all'età, mentre nei soggetti CMV positivi questa percentuale diminuisce soprattutto negli anziani, contrariamente ad altri studi (Saule et al., 2006; Bisset et al., 2004).

L'aumento dei CD8 ha portato all'inversione del rapporto CD4/CD8 nel 23.07% dei soggetti con infezione da CMV, mentre nei soggetti senza infezione non vi è alterazione del rapporto (Hadrup et al., 2006; Chidrawar et al., 2009).

Quando i CD4 ed i CD8 naïve incontrano l'antigene, inizia il loro processo di attivazione e differenziazione. L'analisi mediante i markers CD27, CD45RA, CCR7, CD28, CD62L, CD95 ci ha permesso di distinguere le TN, le TEMRA, le TEM e le TCM.

Lo studio dei CD4 naïve non ha mostrato modifiche significative legate all'età, né durante l'infezione da CMV; i linfociti CD8 invece diminuiscono significativamente sia con l'avanzare dell'età sia durante l'infezione da CMV, dato sovrapponibile a quello di Weinberger e collaboratori, che afferma che nelle persone al di sopra dei 60 aa vi è un declino drammatico delle cellule T naïve sia CD4 che CD8. La prima tappa che contribuisce alla diminuzione dei linfociti T naïve è l'involutione del timo, che è una tappa indipendente dall'esposizione ai patogeni, in seguito l'esposizione cronica ad antigeni di virus latenti può portare un accumulo, con l'aumentare dell'età, di cloni di cellule T di memoria (Karrer et al., 2003).

Le cellule T central memory, non subiscono modifiche significative nel compartimento dei CD4, mentre nel compartimento CD8, non subiscono modifiche età correlate, ma diminuiscono durante l'infezione da CMV (Weinberger et al., 2007).

Le cellule T effector memory aumentano in modo significativo sia nel compartimento dei CD8

che dei CD4 durante l'infezione da CMV. Tra le effector memory, quelle con un fenotipo TEMRA, quindi CD27-CD45RA+, aumentano sia nel compartimento CD4 che nel compartimento CD8 sia con l'aumentare dell'età che durante l'infezione da CMV. Le TEMRA sono caratterizzate dalla riespressione del CD45RA e dalla perdita del CCR7 e delle molecole costimolatorie CD27 e CD28. Le TEMRA sono cellule resistenti all'apoptosi (Einsele et al., 1998), altamente citotossiche (producono perforina e granzymes) e potrebbero rappresentare cellule all'ultimo stadio differenziativo, che non possono ulteriormente dividersi (Hadrup et al., 2006). Queste cellule producono citochine pro-infiammatorie come IFN-g e TNF- α , contribuendo al background pro-infiammatorio che si osserva negli anziani detto inflamm-aging (Franceschi et al., 2000). Queste cellule, dette esauste, aumentano sia con l'avanzare dell'età che durante le infezioni persistenti come il CMV, l'HIV e l'artrite reumatoide (Effros et al., 1996; van de Berg et al., 2010).

L'accumulo dei linfociti T di memoria negli individui anziani può essere spiegato dal ridotto output timico delle naive, dalle frequenti attivazioni dei linfociti T e dal fatto che le TEM e le TEMRA sono più resistenti all'apoptosi (Ortiz-Suarez et al., 2002; Harari et al., 2006). Inoltre le TCM e le TN delle persone anziane è stato visto essere più sensibili all'apoptosi rispetto a quelle dei giovani, ciò contribuisce ulteriormente alla loro diminuzione (Gupta et al., 2008)

Ad ogni modo Derhovanessian et al. (2010) hanno mostrato che un gruppo di pz longevi con un 30% in meno di rischio di mortalità appariva più resistente all'infezione da CMV e dopo l'infezione da CMV erano meno suscettibili ai cambiamenti immunologici CMV correlati, infatti questa popolazione non mostrava un accumulo di TEMRA.

Queste sottopopolazioni sono state ulteriormente studiate rispetto ad altri tre markers il CD26, il CD127 e il CD11a.

Il CD26 è un markers espresso sui linfociti attivati che ha funzioni costimolatorie (Hafler et al., 1989; Morimoto et al., 1998). La sua presenza sulla superficie dei CD4+ è correlata con la produzione di citochine TH1 ed elevata attività migratoria (Morimoto et al. 1998). La sua espressione è aumentata con l'aumentare dell'età sia nel compartimento CD4 ma maggiormente nel compartimento CD8 e l'infezione da CMV contribuisce all'espressione di questa molecola all'interno del compartimento naive. Il CD26 è espresso anche nel compartimento memory sia nei CD4+ e soprattutto CD8+. Queste cellule CD8+CD26+ appartengono ad un fenotipo TEM precoce e la stimolazione mediante CD26 induce un aumento dell'espressione dei livelli di Granzyme B, TNF- α , IFN- γ e FasL, così come un aumento della capacità citotossica (Hatano et al., 2012). In letteratura non ci sono molti studi riguardanti l'espressione del CD26 durante l'invecchiamento, mentre per quanto riguarda il CMV, Ibegbu et al. 2009 hanno mostrato che il CD26 non è espresso durante le infezioni croniche come il CMV ed EBV ma è proprio di infezioni acute che si risolvono come quella influenzale.

Il CD127 è il recettore dell'IL-7, ha un ruolo essenziale nello sviluppo dei linfociti T e dati di

letteratura suggeriscono la sua presenza su cellule di memoria (Bachmann et al., 2006). Dal nostro studio l'espressione sia su i CD4 che sui CD8 associato alla negatività del CD27, quindi cellule CD4+ o CD8+ CD27-CD127+ è aumentata nei soggetti CMV positivi in entrambi i compartimenti, mentre solo l'espressione del CD127 sui CD8 risulta aumentata con l'invecchiamento. Alcuni studi hanno mostrato che il CD127 è espresso poco durante le infezioni acute, e l'espressione aumenta nel tempo, infatti alcuni suggeriscono che il CD127 potrebbe andare a identificare quelle cellule destinate a divenire di memoria (Kaech et al., 2003). Inoltre IL-7, prodotta dalle cellule epiteliali del timo e del midollo osseo sembra stimolare la sopravvivenza delle cellule con fenotipo TEMRA sia nei giovani che negli anziani (Kim et al., 2006).

L'espressione della proteina CD11a aumento sui linfociti T CD8 negli anziani rispetto ai giovani e questo aumento è ancora più cospicuo durante l'infezione da CMV. L'elevata espressione sembra delineare una popolazione di cellule di memoria, molto grandi e ricche di granuli contenenti perforina (Höflich et al., 1998). Studi precedenti hanno dimostrato che il legame di LFA-1 può costimolare i linfociti T per la produzione di IL2, per la proliferazione cellulare e per polarizzare la risposta verso Th1 (Perez et al., 2003).

Abbiamo analizzato anche il comportamento dei TCR gd. I linfociti T gd hanno un ruolo protettivo nei confronti delle infezioni batteriche e parassitarie (Takada et al., 1993; Hiseada et al. 1995) e virali. Dati derivanti da modelli murini suggeriscono che queste cellule hanno un ruolo importante nei confronti di infezioni virali come l'herpes virus simplex 1 e il MCMV (Sciammas et al., 1997; Ninomiya et al., 2000). Nei topi è stato dimostrato un aumento del titolo del MCMV quando vi è una deplezione dei T gd (Ninomiya et al., 2000). Rappresentano l'1-10% dei linfociti circolanti. La maggior parte sono CD4- e CD8- o Cd8dim, utilizzano o la catena d1 o d2 e nel sangue la proporzione di queste due popolazioni cambia con l'età. Infatti i Vd2+ rappresentano il 20% dei Tgd nel cordone ombelicale e il 70% nel sangue periferico degli adulti (Egan et al., 2000; Ferrarini et al., 2002). Entrambe le popolazioni Vd2+ e Vd2- diminuiscono con l'età (Gioachino et al., 1994), per un aumentata apoptosi più che per una diminuita produzione (Colonna-Romano et al., 2004) ed hanno una funzionalità ridotta. Durante l'infezione da CMV vi è un coinvolgimento dei Tgd Vd2- che aumentano nel sangue periferico ed aiutano a controllare l'infezione, infatti vi sono evidenze che l'espansione dei Vd2- coincide con la diminuzione della CMV viremia (Lafarge et al., 2001).

Anche nel nostro studio vi è una diminuzione delle percentuali T gd correlata all'età, e nei soggetti con infezione da CMV queste percentuali tendono a diminuire. I Tgd dei soggetti sieropositivi sono prevalentemente CD8dim rispetto ai sieronegativi, e l'accumulo di questa popolazione si ha soprattutto negli anziani positivi. Inoltre si nota un aumento della popolazione Vd2- nella popolazione CMV positiva che aumenta con l'aumentare dell'età, questo trend viene conservato anche nell'anziano negativo; mentre vi è una diminuzione della popolazione

Vd2+età correlata e CMV correlata.

Il CD16 è un recettore a bassa affinità di tipo III che lega il frammento cristallizzabile delle IgG è espresso su diverse cellule come i macrofagi, NK, granulociti ed i linfociti T gd. Il legame con il CD16 induce diverse funzioni biologiche come fagocitosi, citotossicità anticorpo mediata e il rilascio di citochine (Jefferis et al., 2002). Le Tgd CD16+ sono molto citotossiche (Angelini et al., 2004) e possono rilasciare citochine in risposta al legame con il CD16. I livelli di CD16 si sono rivelati più bassi nelle Vd2+ rispetto alle Vd2-, ed in entrambe le popolazioni i livelli sono più elevati durante l'infezione da CMV (Couzi et al., 2012).

Abbiamo valutato anche le sottopopolazione CD27 e CD45RA all'interno delle Vd2+ e delle Vd2-. Le maggior parte delle Vd2- risultano avere un fenotipo TEMRA durante l'infezione da CMV (Pitard et al., 2008), mentre sembrerebbero aumentare modestamente durante l'invecchiamento. I linfociti T gd sono molto abbondanti nel tratto gastrointestinale, che è il sito preferenziale di replicazione del CMV. Questo potrebbe essere un meccanismo locale per contenere la replicazione del virus, mediante il riconoscimento e l'eliminazione delle cellule infette. Le TEMRA vd2- nel sangue periferico potrebbero essere cellule che sono migrate da questi siti con lo scopo di raggiungere altri tessuti infetti. Queste cellule quindi condividono lo stesso fenotipo dei CD4 e dei CD8 durante l'infezione da CMV, ciò supporta l'idea che tutti questi subsets prendano parte alla risposta adattativa CMV correlata. Inoltre è stato visto che i pz trapiantati senza espansione dei Tgd sono soggetti a una malattia da CMV severa e l'espansione dei Tgd Vd2- invece uccide il virus in vitro (Halary et al., 2005), ciò a dimostrazione che i Vd2- sono una componente attiva della risposta antivirale.

La sieropositività per CMV è stata correlata anche a un aumentato rischio cardiovascolare, nei modelli murini infatti sono state trovate particelle virali all'interno delle placche aterosclerotiche, ed è stato visto che i topi CMV positivi presentavano un aumento della pressione arteriosa (Cheng et al., 2009). Sebbene nel nostro studio non sia stata trovata una differenza significativa della pressione arteriosa tra i soggetti positivi ed i soggetti negativi, la pressione arteriosa sembrerebbe aumentare all'aumentare delle cellule con fenotipo TEMRA.

Infatti l'infezione da CMV e l'accumulo di cellule T proinfiammatorie (CD45RA+CD28-CD27-), sono state associate con un aumentato rischio di malattia coronarica e deterioramento della funzione vascolare (Blankenberg et al., 2001; Spyridopoulos et al., 2009). L'infezione da CMV funge da trigger per la flogosi vascolare causata dal danno della parete dei vasi e dalla disfunzione delle cellule endoteliali (Fish et al., 1998) e porta un aumento della pressione arteriosa e di conseguenza dell'aterosclerosi (Cheng et al., 2009). Oltre all'aterosclerosi l'accumulo di queste cellule TEMRA, sembrerebbe coinvolta in una serie in una serie di patologie correlate all'età come la demenza, l'osteoporosi, il cancro (Sansoni et al., 2006).

Ulteriori studi sono necessari per individuare quali proteine del CMV sono responsabili di

queste modifiche del sistema immunitario, in questo modo individuare all'interno delle diverse proteine l'epitopo responsabile e valutare la possibilità dello sviluppo di un vaccino.

Bibliografia

Abbas AK, Litchman AH, Pober JS (2000) Caratteristiche generali delle risposte immunitarie. *Immunologia cellulare e molecolare*, 4th Edition.

Aggarwal S, Gupta S (1998) Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *J Immunol*, 160(4):1627-37.

Akbar AN, Fletcher JM (2005) Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Current Opinion in Immunology*, 17(5):480-485.

Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, et al. (1993) Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med*, 178(6):2231-5.

Angelini DF, Borsellino G, Poupot M, et al. (2004) FcγRIII discriminates between 2 subsets of Vγ9Vδ2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood*, 104:1801–1807.

Appay V, Dunbar PR, Callan M, et al. (2002) Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*, 8:379-85.

Arai K, Sunamura M, Wada Y, et al. (1999) Preventing effect of anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies on murine islet allograft rejection. *Int J Pancreatol*, 26: 23.

Askonas BA, Mullbacher A, Ashman RB (1982) Cytotoxic T-memory cells in virus infection and the specificity of helper T cells. *Immunology*, 45(1):79-84.

Azuma M, Phillips JH, Lanier LL (1993) CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol*, 150:1147-59.

Bachmann MF, Beerli RR, Agnellini P, et al. (2006) Long-lived memory CD8+ T cells are programmed by prolonged antigen exposure and low levels of cellular activation. *Eur J Immunol*, 36:842-854

Bécharde D, Scherpereel A, Hammad H, et al. (2001) Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*, 167(6):3099-106.

Berard M, Tough DF (2002) Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology*, 106(2):127-38.

Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, et al. (2004) Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *European Journal Of Haematology*, 72(3):203-212.

Blazquez M, Ortiz C, Aranda E, et al. (1997) NF- κ B activation by CD26 antigen is independent of dipeptidyl peptidase IV activity. *Protoplasm*, 197:26–33.

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. (2001) Cytomegalovirus infection with interleukin-6 response predicts cardiac mortality in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 103, 2915–2921.

Brezinschek RI, Lipsky PE, Galea P, et al. (1995) Phenotypic characterization of CD4 (+) T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity. *J Immunol*, 1995;154:3062–77.

Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, et al. (2001) Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science*, 292:934-7.

Brunner S, Herndler-Brandstetter D, Weinberger B, et al. (2011) Persistent viral infections and immune aging. *Ageing Res Rev*, 10(3):362-9. Review.

Butcher EC, Picker LJ (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272(5258):60-6.

Carrieri G, Marzi E, Olivieri F, et al. (2004) The G/C915 polymorphism of transforming growth factor beta1 is associated with human longevity: a study in Italian centenarians. *Ageing Cell*, 3(6):443-8.

Caruso C, Lio D, Cavallone L, et al. (2004) Aging, longevity, inflammation, and cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1028:1-13. Review.

Cheng J, Ke Q, Jin Z, et al. (2009) Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure. *PLoS Pathog*, 5.

Chidrawar S, Khan N, Wei W, et al. (2009) Cytomegalovirus-seropositivity has a profound

influence on the magnitude of major lymphoid subsets within healthy individuals. *Clin Exp Immunol*, 155(3):423-32.

Colonna-Romano G, Bulati A, Lio D, et al. (2004) Impairment of gamma/delta T lymphocytes in elderly: implications for immunosenescence. *Experimental Gerontology*, Vol 39: 1439–1446.

Couzi L, Pitard V, Netzer S, et al. (2009) Common features of gammadelta T cells and CD8 (+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis*, 200(9):1415-24.

Couzi L, Pitard V, Sicard X, et al. (2012) Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human $\gamma\delta$ T cells expressing CD16 (Fc γ RIIIa). *Blood*, 119(6):1418-27.

Crough T, Khanna R (2009) Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev*, 22(1): 76–98.

Dechanet J, Merville P, Lim A, et al (1999) Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest*, 103(10):1437-1449.

De Meester I, Vanham G, Kestens L, et al. (1994) Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26. *Eur J Immunol*, 24:566–70.

Diamond MS, Springer TA (1994) The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr. Biol*, 4: 506.

Derhovanessian E, Larbi A, Pawelec G, (2009) Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Immunol*, 21(4):440-5. Review.

Dutton RW, Bradley LM, Swain SL (1998) T cell memory. *Annu Rev Immunol*, 16:201-23.

Effros RB (2000) Costimulatory mechanisms in the elderly. *Vaccine*, 18(16):1661-5. Review.

Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, et al. (1996) Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS*, 10(8):F17-22.

Egan PJ, Carding SR (2000) Downregulation of the inflammatory response to bacterial infection by gammadelta T cells cytotoxic for activated macrophages. *J Exp Med*, 191:2145–2158.

Einsele H, Roosnek E, Rufer N, et al (2002) Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, 99(11):3916-22.

Fagnoni FF, Vescovini R, Mazzola M, et al. (1996) Expansion of cytotoxic CD8+ CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology*, 88(4):501-7.

Falcioni F, Shah H, Vidovic D, et al. (1996) Influence of CD26 and integrins on the antigen sensitivity of human memory T cells. *Hum Immunol*, 50:79–90.

Ferrarini M, Ferrero E, Dagna L, et al. (2002) Human $\gamma\delta$ T cells a non redundant system in the immune-surveillance against cancer. *Trends Immunol*, 23 (2002):14–18.

Fish KN, Soderberg-Naucler C, Mills LK, et al. (1998) Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J Virol*, 72,5661–5668.

Fleischer BA (1987) Novel pathway of human T cell activation via a 103 kD T cell activation antigen. *J Immunol*, 138(5):1346-50.

Franceschi C (2007) Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? *Nutr Rev*, 65(12 Pt 2):S173-6.

Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, et al. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, 908:244-54. Review.

Giachino C, Granziero L, Modena V, et al. (1994) Clonal expansions of V delta 1+and V delta 2+cells increase with age and limit the repertoire of human gamma delta T cells. *Eur J Immunol*, 24:1914–1918.

Gibson W (2008) Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325:187-204.

Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW (2001) CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol*, 54(3):249-64. Review.

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, et al (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285, 221-227.

Groh V, Steinle A, Bauer S, et al. (1998) Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*, 279(5357):1737-40.

Guerette B, Skuk D, Celestin F, et al. (1999) Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation. *J Immunol*, 159: 2522.

Haanen JBAG, Schumacher TNM (2007) Vaccine leads to memory loss. *Nature Medicine*, Vol 13: 248 - 250.

Halwani R, Doroudchi M, Yassine-Diab B, et al. (2006) Generation and maintenance of human memory cells during viral infection. *Springer Seminars in Immunopathology*, 28(3):197-208.

Hadrup SR, Strindhall J, Køllgaard T, et al. (2006) Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. *J Immunol*, 176(4): p. 2645-53.

Hafler DA, Chofflon M, Benjamin D, et al. (1989) T cell activation and CD3 phosphorylation correlates with Ta1 (CDw26) expression. *J Immunol*, 142:2590–6.

Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. (2005) Shared reactivity of Vd2(neg)gd T cells against cytomegalovirus infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med*, 201:1567-1578.

Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. (1997) Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med*, 186(9):1407-18.

Harari A, Rizzardi GP, Ellefsen K, et al. (2002) Analysis of HIV-1- and CMV-specific memory CD4 T-cell responses during primary and chronic infection. *Blood*, 100(4):1381-1387.

Harari A, Zimmerli SC, Pantaleo G (2004) Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol*, 65(5):500-6. Review.

Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G (2000) An essential role for the IL-7 receptor during intrathymic expansion of the positively selected neonatal Tcell repertoire. *J Immuno*, 165:2410.

Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, et al. (2012) CD26-mediated costimulation in human CD8

(+) T cells provokes effector function via proinflammatory cytokine production. *Immunology*, 2012 Oct 31.

Hecker M, Qiu D, Marquardt K, et al. (2004) Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sang*, 86(1):41-4.

Hermiston ML, Xu Z, Weiss A (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*, 21, 107-37.

Hisaeda H, Nagasawa H, Maeda K, et al. (1995) Gamma delta T cells play an important role in hsp65 expression and in acquiring protective immune responses against infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 1;155(1):244-51.

Höflich C, Döcke WD, Busch A, et al. (1998) CD45RA(bright)/CD11a(bright) CD8+ T cells: effector T cells. *Int Immunol*, 1998 Dec;10(12):1837-45.

Hogg N, Landis RC (1993) Adhesion molecules in cell interactions. *Curr Opin Immunol*, 5: 383.

Huppert FA, Pinto EM, Morgan K, et al. (2003) Survival in a population sample is predicted by proportions of lymphocyte subsets. *Mech Ageing Dev*, 124(4):449-51.

Huster KM, Busch V, Schiemann M, et al. (2004) Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(15):5610-5.

Hynes, RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11.

Ibegbu CC, Xu YX, Fillos D, et al. (2009) Differential expression of CD26 on virus-specific CD8(+) T cells during active, latent and resolved infection. *Immunology*, 126(3): 346–353.

Irmiere A, Gibson W (1983) Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*, 130(1):118-33.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 66:233.

Jefferis R, Lund J (2002) Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. *Immunol Lett*, 82, pp. 57–65.

Jenks SA, Miller J (2000) Inhibition of IL-4 responses after T cell priming in the context of LFA-1 costimulation is not reversed by restimulation in the presence of CD28 costimulation. *J Immunol*, 164:72.

Jonjic S, Pavic I, Lucin P, et al. (1990) Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8⁺ T lymphocytes. *J. Virol*, 64:5457-5464.

Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, et al. (2003) Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature Immunol*, 4, 1191–1198.

Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*, 2(4):251-62.

Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, et al. (2003) Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol*, 4:1191-1198.

Kaisho T (2007) Elucidating the mechanism behind immunity using dendritic cells. *Riken Research*, Vol. 1, Issue 8.

Karrer U, Siero S, Wagner M, et al. (2003) Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8⁺ T cells over time. *J Immunol*, 170(4):2022-9.

Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, and al. (2008) Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th edn. New York: McGraw-Hill.

Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, et al. (1999) Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med*, 190(12):1891-6.

Kern F, Faulhaber N, Frömmel C, et al. (2000) Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol*, 30(6):1676-82.

Khan N, Cobbold M, Keenan R, et al. (2002) 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*, 185:1025-34.

Kim HR, Hong MS, Dan JM, et al. (2006) Altered IL-7R α expression with aging and the potential implications of IL-7 therapy on CD8⁺ T-cell immune responses. *Blood*, 2006

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, 14(22):5579-88.

Krammer PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407(6805):789-95. Review.

Kruisbeek AM (1993) Development of alpha beta T cells. *Curr Opin Immunol*, 5(2):227-34. Review.

Lafarge X, Merville P, Cazin MC, et al. (2001) Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis*, 184:533-541.

Lafont V, Liautard J, Liautard JP, et al. (2001) Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol*, 166(12):7190-7199.

Lanier LL, Kipps TJ, Phillips JH (1985) Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3⁺ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J Exp Med*, 162(6):2089-2106.

Lanzavecchia A, Sallusto F (2005) Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*, 17(3):326-32. Review.

Lens SM, Tesselaar K, van Oers MH, et al. (1998) Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin Immunol*, 10(6):491-9.

Li D, Molldrem JJ, Ma Q (2009) LFA-1 regulates CD8⁺ T cell activation via T cell receptor-mediated and LFA-1-mediated Erk1/2 signal pathways. *J Biol Chem*, 284(31):21001-10.

Linsley PS, Ledbetter JA (1993) The Role of the CD28 Receptor During T Cell Responses to Antigen. *Annual Review of Immunology*, 11(1):191-212.

Martorell J, Rojo I, Vilella R, et al. (1990) CD27 induction on thymocytes. *J Immunol*, 145(5):1356-1363.

Mazzucchelli R, Durum SK (2007) Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*, 2007 Feb;7(2):144-54. Review.

McNeill L, Salmond RJ, Cooper JC, et al. (2007) The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses. *Immunity*, 27: 425-37.

Mendelson M, Monard S, Sissons P et al. (1996) Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol*, 77 (Pt 12):3099-102.

Miles DJ, Sanneh M, Holder B, et al. (2008) Cytomegalovirus infection induces T-cell differentiation without impairing antigen-specific responses in Gambian infants. *Immunology*, 124(3):388-400.

Mocarski ES, Shenk T, Pass RF (2007) Cytomegalovirus. *Fields Virol*, 5 2701-2772

Morimoto C, Schlossman SF (1998) The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol Rev*, 161:55–70.

Morimoto C, Torimoto Y, Levinson G et al. (1989) 1F7, a novel cell surface molecule involved in helper function of CD4 cells. *J Immunol*, 143:3430–5.

Moriwaki Y, Takahashi S, Tsutsumi Z, et al. (2004) Immunohistochemical demonstration of adenosine deaminase (ADA1) in human tissues. *Acta Histochem Cytochem*, 37: 173-182.

Moroni M, Esposito R, De Lalla (2003). *Malattie infettive*. Ed. Masson.

Morrison ME, Vijayasradhi S, Engelstein D, et al. (1993) A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J Exp Med*, 177:1135–43.

Mutter W, Reddehase MJ, Busch FW, et al. (1988) Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med*, 167:1645-1658.

Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, et al. (1992) A 39-kDa protein on activated helper T cells

binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(14):6550-4.

Ninomiya T, Takimoto H, Matsuzaki G, et al. (2000) Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. *Immunology*, 99:187-194.

Noriega V, Redmann V, Gardner T, et al. (2012) Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunol Res*, 54(1-3):140-51.

Paulsen M, Janssen O (2011) Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells. *Cell Commun Signal*, 9: 7.

Pawelec G (2002) Senescence: the cost of being young and healthy? *Eur Cytokine Netw*, 13(4):387-8.

Pawelec G, Adibzadeh M, Solana R, et al. (1997) The T cell in the ageing individual. *Mech Ageing Dev*, 93(1-3):35-45.

Pawelec G, Sansom D, Rehbein A, et al. (1996) Decreased proliferative capacity and increased susceptibility to activation-induced cell death in late-passage human CD4⁺ TCR2⁺ cultured T cell clones. *Exp. Gerontol*, pp. 655–658.

Pepperl S, Münster J, Mach M, et al. (2000) Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol*, 74(13):6132-46.

Perez OD, Mitchell, D, Jager GC, et al (2003) Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nat Immunol* 4, 1083–1092.

Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, et al. (2008) Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*, 112(4):1317-24.

Polic B, Hengel H, Krmpotic A, et al. (1998) Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med*, 188:1047-1054.

Pollack M, Leeuwenburgh C (2001) Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56(11):B475-82.

Potestio M, Pawelec G, Di Lorenzo G, et al. (1999) Age-related changes in the expression of CD95 (APO1/FAS) on blood lymphocytes. *Exp Gerontol*,34(5):659-73.

Ravetch JV, Perussia B (1989) Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils: cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med*,170: 481-497.

Sallusto F, Lenig D, Förster R, et al. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754):708-12.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 22:745-63.

Sarov I, Abady I (1975) The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology*, 66(2):464-73.

Saule P, Trauet J, Dutriez V, et al. (2006) Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4+ versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8+ compartment. *Mech Ageing Dev*, 127(3):274-281.

Schierling K, Buser C, Mertens T, et al. (2005) Human cytomegalovirus tegument protein ppUL35 is important for viral replication and particle formation. *J Virol*, 79(5):3084-96.

Schleiss MR (2008) Comparison of vaccine strategies against congenital CMV infection in the guinea pig model. *J Clin Virol*, 41:224-30.

Schwarz BA, Bhandoola A (2006) Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. *Immunol Rev*, 209:47-57. Review.

Sciammas R, Kodukula P, Tang Q, et al. (1997) T cell receptor-gamma/delta cells protect mice from herpes simplex virus type 1-induced lethal encephalitis. *J. Exp. Med*, 185:1969-1975.

Shaw AS, Dustin ML (1997) Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity*, 6: 361.

Sinclair J, Sissons P (2006) Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 87(Pt 7):1763-79.

Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. (2005) Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med*, 202(5):673-85.

Spyridopoulos I, Hoffmann J, Aicher A, et al. (2009) Accelerated telomere shortening in leukocyte sub-populations of patients with coronary heart disease: role of cytomegalovirus seropositivity. *Circulation*, 120:1364–1372.

Sprent J (1994) T and B memory cells. *Cell*, 76:315-332.

Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*, 21:139-76.

Steinle A, Groh V, Spies T (1998) Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95(21):12510-5.

Stemberger C, Neuenhahn M, Buchholz VR, et al. (2007) Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets. *Cell Mol Immunol*, 4(6):399-405.

Stewart CA, Vivier E, Colonna M (2006) Strategies of natural killer cell recognition and signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 298: 1-21.

Su H, Bidère N, Zheng L, et al. (2005) Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science*, 307(5714):1465-8.

Suzuki J, Isobe M, Izawa A, et al (1999) Differential Th1 and Th2 cell regulation of murine cardiac allograft acceptance by blocking cell adhesion of ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *Transpl Immunol*, 7: 65.

Tajra LC, Martin X, Margonari J, et al. (1999) In vivo effects of monoclonal antibodies against rat β_2 integrins on kidney ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*, 87: 32.

Takada H, Hiromatsu K, Matsuzaki G, et al. (1993) Peritoneal gamma delta T cells induced by

Escherichia coli infection in mice. Correlation between Thy-1 phenotype and host minor lymphocyte-stimulating phenotype. *J Immunol*, 15;151(4):2062-9.

Tamm C, Robertson JD, Sleeper E, et al. (2004) Differential regulation of the mitochondrial and death receptor pathways in neural stem cells. *Eur J Neurosci*, 19(10):2613-21.

Thomas ML (1989) The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol*, 7, 339-69.

Tomiya H, Matsuda T, Takiguchi M (2002) Differentiation of human CD8⁺ T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol*, 168:5538–5550.

Tomonori I, Ishii T, Ohnuma K, et al. (2001) CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc Natl Acad Sci USA*, 9;98(21):12138-43. Epub 2001 Oct 2.

Tough DF, Sprent J (1995) Life span of naïve and memory T cells. *Stem Cells*, 13(3):242-9. Review.

Turner JE, Aldred S, Witard OC, et al. (2010) Latent Cytomegalovirus infection amplifies CD8 T-lymphocyte mobilisation and egress in response to exercise. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(8):1362-70.

van Leeuwen EM, Koning JJ, Remmerswaal EB, et al. (2006) Differential usage of cellular niches by cytomegalovirus versus EBV- and influenza virus-specific CD8⁺ T cells. *J Immunol*, 177(8):4998-5005.

van de Berg PJ, Griffiths SJ, Yong SL, et al. (2010) Cytomegalovirus infection reduces telomere length of the circulating T cell pool. *J Immunol*, 1;184(7):3417-23.

Vanham G, Kestens L, De Meester I, et al. Decreased expression of the memory marker CD26 on both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes of HIV-infected subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993;6:749–57.

Waller EC, McKinney N, Hicks R, et al. (2007) Differential costimulation through CD137 (4-1BB) restores proliferation of human virus-specific "effector memory" (CD28(-) CD45RA(HI)) CD8(+) T cells. *Blood*, 110(13):4360-6.

Webster A (1991) Cytomegalovirus as a possible cofactor in HIV disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 4 Suppl 1:S47-52. Review.

Weinberger B, Lazuardi L, Weiskirchner I, et al. (2007) Healthy aging and latent infection with CMV lead to distinct changes in CD8+ and CD4+ T-cell subsets in the elderly. *Hum Immunol*, 68(2):86–90.

Weng NP, Levine BL, June CH, et al. (1995) Human naïve and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(24):11091-4.

Wikby A, Johansson B, Olsson J, et al. (2002) Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study. *Exp Gerontol*, 37(2-3):445-53.

Wulfing C, Sjaastad MD, Davis MM (1998) Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell interface and acts to sustain calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 6302.

Zamoyska R (2003) T-Cell Differentiation: Chromatin Remodelling in CD4/CD8 Regulation. *Current Biology*, Volume 13, Issue 5, R189-R191.

Zhang J, Cado D, Chen A, et al. (1998) Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*, 392(6673):296-300.

Ziegler SE, Morella KK, Anderson D, et al. (1995) Reconstitution of a functional interleukin (IL)-7 receptor demonstrates that the IL-2 receptor gamma chain is required for IL-7 signal transduction. *Eur. J Immunol*, 25:399.