

## HHV-6 modula la produzione di chemochine proinfiammatorie in colture primarie di cellule endoteliali

E. Garrafa, M. Grassi, S. Fiorentini

Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia

**Riassunto.** L'herpesvirus umano 6 (HHV-6) è l'agente eziologico dell'*exantema subitum* ed è stato associato a diverse patologie, tutte caratterizzate da una risposta infiammatoria mediata da chemochine. HHV-6 è un betaherpesvirus capace di infettare diversi tipi cellulari, tra cui le cellule endoteliali. Per valutare gli effetti biologici delle infezioni da HHV-6, abbiamo studiato la suscettibilità all'infezione di cellule endoteliali di diversa origine, HUVEC, aorta e microvascolari ed abbiamo valutato la produzione di MCP-1, IL-8 e RANTES delle cellule infette. Tramite PCR *in situ* abbiamo dimostrato che sequenze di HHV-6 erano presenti nel 20% delle HUVEC, nel 10% delle CE di provenienza aortica e nell'1% delle CE microvascolari in assenza di effetto citopatico. I nostri dati dimostrano che l'infezione da HHV-6 induce la produzione di MCP-1, IL-8 e di RANTES in maniera diversa a seconda dell'origine tissutale delle CE (HUVEC, aortiche o microvascolari). Inoltre abbiamo dimostrato che le CE microvascolari, nonostante la bassa suscettibilità all'infezione da HHV-6 (1%), sono maggiormente attive nel produrre RANTES. Questi risultati dimostrano che le CE rappresentano una potenziale riserva per il virus dell'HHV-6, e che le alterazioni riscontrate a livello della produzione chemochinica indotte dall'infezione possono contribuire allo sviluppo dei processi infiammatori cronici.

**Abstract.** Human herpesvirus 6 (HHV-6) is the etiological agent of exantem subitum and has been associated with several diseases, all characterized by inflammatory response triggered by chemokines. HHV-6 is a beta-herpesvirus capable of infecting several cell types from different origins. Endothelial cells (EC) are important targets for herpesvirus infection. To evaluate the biological effects of HHV-6 infection, HUVEC, adult heart microvascular and aortic EC were examined for in vitro susceptibility to HHV-6 and for alterations induced by viral infection on the production of monocyte chemoattractant protein (MCP-1), interleukin-8 (IL-8) and RANTES. Analysis by in situ PCR showed that HHV-6 sequences were present in 20% of HUVEC, 10% of aortic, and 1% of heart microvascular endothelial cells in the absence of cytopathic effects. Furthermore HHV-6 infection upregulated the production of MCP-1, IL-8 and RANTES with differences observed between aortic and microvascular endothelium. We also found that microvascular EC, despite their lower susceptibility to HHV-6 infection, showed the highest RANTES expression. These findings demonstrate that endothelial cells represent a potential reservoir for HHV-6 infection, and that the altered pattern of chemokine production can lead to attraction of immunocompetent cells and to the development of chronic inflammatory processes.

### Introduzione

Il virus erpetico umano di tipo 6 (HHV-6) è un virus linfotropico appartenente al genere *Roseolovirus* della sottofamiglia dei  $\beta$ herpesviridae con un tropismo preferenziale per i linfociti T CD4. HHV6 è in grado di infettare anche cellule di diversa origine (2) ed infatti è stato di recente scoperto che il recettore specifico per HHV6 è la molecola CD46, una proteina ubiquitariamente espressa sulla superficie delle cellule nucleate (19).

HHV-6 è l'agente eziologico dell'esantema subitum, una malattia benigna dell'infanzia caratterizzata da febbre e rash cutaneo (21). Dopo l'infezione primaria, HHV-6 persiste in uno stato latente nei monociti-macrofagi e nelle cellule mononucleate circolanti dei soggetti sani (12,17). Più del 90% dei donatori di sangue adulti albergano il DNA di HHV-6 nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) e mostrano markers periferici di pregressa infezione (7, 22).

Generalmente il virus non è associato a patologie

nei soggetti immunocompetenti, tuttavia rappresenta una delle cause maggiori di infezioni virali opportunistiche in soggetti immunocompromessi, quali i malati AIDS, dove il virus sembra avere un ruolo essenziale nella progressione della malattia (13) o in pazienti trapiantati, in cui l'infezione o la riattivazione di HHV-6 può portare al rigetto dell'organo trapiantato (15).

È stato ipotizzato un ruolo eziopatogenetico di HHV6 nello sviluppo di diverse malattie tra cui encefaliti, polmoniti, sclerosi multipla, sindrome da affaticamento cronico, microangiopatia trombotica, meningo-encefaliti, mononucleosi infettiva, linfadenopatia, persistente epatite fulminante, disordini autoimmuni, malattia di Rosai-Dorfman (2, 3, 4) anche se non è stato ancora dimostrato un rapporto diretto tra infezione e sviluppo delle malattie.

L'infezione acuta primaria da HHV-6 è caratterizzata da uno stadio viremico durante il quale il virus viene comunemente isolato dal sangue periferico. La disseminazione per via ematogena del virus può spiegare la diffusione del virus ai tessuti extralinfatici ed infatti il genoma virale è stato evidenziato in un ampio spettro di tessuti umani extra-linfatici quali polmone, sistema nervoso centrale (CNS) e pelle (8). Inoltre HHV-6 è in grado di infettare *in vitro* cellule di origine endoteliale (cellule delle vene del cordone ombelicale, HUVEC) suggerendo che l'endotelio possa rappresentare un serbatoio virale e che l'interazione tra le cellule endoteliali e monociti/linfociti possa svolgere un importante ruolo nella trasmissione e nella disseminazione dell'infezione (20). Recentemente Rotola et al (18) hanno inoltre dimostrato che HHV-6 ha un tropismo *in vivo* per l'endotelio aortico.

In questo lavoro abbiamo valutato la suscettibilità all'infezione da HHV6 di cellule endoteliali (CE) di diversa origine, abbiamo caratterizzato lo stato trascrizionale del virus all'interno delle cellule infettate e gli effetti biologici indotti dall'infezione virale. Poiché le chemochine sono il primo mezzo di attrazione dei leucociti circolanti nel sito danneggiato (14) e poiché le patologie associate ad HHV-6 sono caratterizzate da una risposta infiammatoria che è verosimilmente orchestrata da chemochine, abbiamo studiato le alterazioni indotte dall'infezione di HHV-6 sulla produzione di MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), interleuchina-8 (IL-8), e RANTES.

## Materiali e metodi

Le cellule endoteliali macro e microvascolari di aorta, auricolare, sono state ottenute da biopsie di pareti

aortiche e di auricole di 5 pazienti, con diagnosi di aneurisma aortico, con età media di 70 anni (range: 65-75), provenienti dal reparto di Cardiochirurgia dell'Ospedale Civile di Brescia.

Le cellule endoteliali del cordone ombelicale (HUVEC), sono state ottenute da 3 funicoli forniti dalla Sala Parto del Reparto di Ginecologia ed Ostetricia dell'Ospedale Civile di Brescia.

### *Allestimento di colture primarie di cellule endoteliali del cordone ombelicale umano (HUVEC)*

L'isolamento delle CE dalla vena del cordone ombelicale umano, è stato eseguito secondo la metodica descritta da Jaffe nel 1973 (11), opportunamente modificata (1).

### *Allestimento di colture primarie di cellule endoteliali di origine macro e microvascolare di cuore*

L'isolamento e la purificazione delle CE di origine micro e macrovascolare sono stati ottenuti seguendo il protocollo descritto da Alessandri et al. (1). Brevemente, le cellule vengono coltivate in terreno di coltura EBM (Clonetics, SanDiego,CA) supplementato da FCS al 10%, penicillina 100 U/ml, streptomicina 100 µg/ml, L-glutamina 2mM, eparina (Park-Davis, Milano, Italia) 100 µg/ml, idrocortisone 1 µg/ml, human epidermal growth factor (HEGF) 10 ng/ml (Clonetics) ed estratto di cervello bovino (Clonetics) 100 µg/ml.

Dopo 7-10 giorni di coltura le CE vengono separate dalle cellule contaminanti (per la maggior parte fibroblasti) utilizzando biglie magnetiche covalentemente legate ad un anticorpo monoclonale diretto contro il marker endoteliale CD31 (Dako, Carpenteria, CA).

La purezza della coltura è stata valutata mediante una reazione di immunofluorescenza ottenuta con anticorpi monoclonali (Sigma, St. Louis, MC) diretti contro l'antigene CD31 ed il fattore di von Willebrandt (vWF).

### *Infezione con HHV-6*

L'inoculo virale utilizzato per infettare le colture di CE è stato prodotto da una propagazione seriale del ceppo U1102 di HHV-6A in cellule JJhan. Al fine di liberare il virus dalle cellule, queste vengono sottoposte a 3 passaggi di gelo-scongelo e distribuite in aliquote pronte per l'utilizzo. Alcune aliquote dello stock virale sono state inattivate agli U.V, lasciando le preparazioni virali per 4 ore in una piastra di Petri aperta ad una distanza di 4 cm da una lampada UV di 30-W (philips, Eindhoven, netherlands). Il virus inattivato è stato quindi messo a contatto con cellule JJhan e l'assenza di replicazione virale è stata valutata sulla base della man-

canza di effetto citopatico e di trascritti virali specifici.

Il protocollo di infezione prevede che il monostrato di CE al 70-80% di confluenza venga lavato 3 volte con PBS 1X e successivamente incubato per 3 ore a 37°C con 1 ml di terreno di coltura incompleto a cui vengono aggiunti 25 ml di inoculo virale infetto o mock-infetto. Al termine dell'incubazione, che permette al virus di aderire alla membrana cellulare e di iniziare il processo di internalizzazione, viene aggiunto alla coltura di CE il volume di terreno completo necessario a ricoprire abbondantemente il monostrato cellulare.

#### *PCR in situ*

La PCR *in situ* è stata eseguita seguendo il protocollo messo a punto da Comar et al. (5)

#### *Estrazione del DNA*

Il DNA virale è stato estratto dalle CE appena isolate e da CE infettate per testare la presenza di alcuni geni di HHV-6.

Per ogni campione vengono raccolte all'incirca 300.000 cellule, lavate 2 volte con il PBS 1X e centrifugate a 800 g per 10'.

Il pellet viene quindi risospeso in 1 ml di tampone di digestione ed incubato a 50°C per 1 ora. In seguito viene aggiunto un ugual volume di fenolo/cloroformio/alcool, isoamilico 25:24:1 e si procede a centrifugare a 1700g per 10'. La fase superiore viene trasferita in una nuova provetta, a cui è aggiunto ? volume di ammonio acetato e 2 volumi di etanolo 100%. Una centrifugazione a 1700g per 2', ed il successivo lavaggio con etanolo al 70%, permettono di ottenere un pellet cellulare che viene quindi risospeso nel tampone TE. Il campione può quindi essere conservato a -20°C.

#### *Estrazione dell'RNA*

Il metodo utilizzato per estrarre l'RNA totale dalla cellula è quello dell'RNA Zol-B (Tel-Test, Inc., Friendswood, Texas), secondo istruzioni della casa produttrice. L'RNA ottenuto viene risospeso in H<sub>2</sub>O trattata con dietilpirocarbonato e quindi conservato a -80°C.

*Reazione di retrotrascrizione (RT) e di amplificazione*  
Per evidenziare la presenza del DNA virale, i vari campioni analizzati sono stati sottoposti ad una reazione polimerasica a catena (PCR). I primers utilizzati nella reazione di PCR sono specifici per i geni U94 ed U31 del genoma virale (U94s: 5'-CATCGCATACGTCTCCCAG-3', U94r: 5'-TCTCTAACGTGTCCGTGCC-3'; U31s: 5'-GATCCGACGCCTACAAACAC-3', U31r: 5'-CGGTGTTACACAGCATGAACTCTC-3').

Sui campioni in cui veniva evidenziata la presenza del genoma virale, tramite reazione di RT-PCR si è proceduto a valutare anche la presenza di trascritti tardivi (prodotto di trascrizione del gene U22), segnale di una replicazione virale attiva. La reazione di RT prevede l'aggiunta ai 5 µl di RNA del campione da testare di una miscela di 15 µl contenente 20 U MULV reverse transcriptase (Applied biosystem, Foster City, CA), 10 U di inibitore di RNasi, 0,5 µl dNTPs 25mM (Roche, Monza, Italia) e 1 µl di Random esameri 50 mM (Applied biosystem, Foster City, CA). La miscela viene incubata per 45' a 42°C, e poi a 99°C per 5'.

L'assenza di DNA contaminante nei campioni di RNA, è stata confermata da una reazione di PCR eseguita direttamente sull'RNA, utilizzando i primers per il gene di riferimento GAPDH.

Il protocollo della reazione di amplificazione sui retrotrascritti prevede un'iniziale fase di denaturazione a 94°C per 5', seguita da 35 cicli così composti: 94°C per 20", 55°C per 30", 72°C per 45"; seguono quindi 10' a 72°C.

Il prodotto di amplificazione lungo 497 bp viene caricato su un gel di agarosio al 2% e visualizzato mediante lampade ad UV.

Lo studio degli mRNA di HHV-6 viene condotto a partire dal c-DNA ottenuto dalla reazione di RT mediante reazioni di nested PCR, con l'utilizzo di primers specifici (Rotola et al., 1998) per il trascritto del gene U22.

#### *Analisi quantitativa delle chemochine*

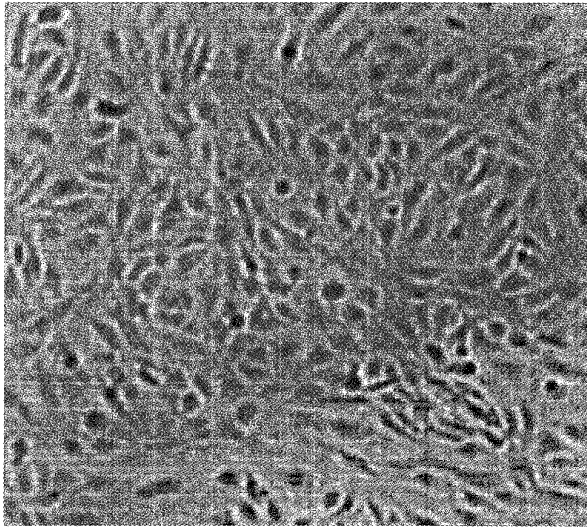
I sovranatanti delle colture di CE infette e mock-infette sono stati raccolti a vari tempi, aliquotati e conservati a -80°C prima dell'utilizzo. Ogni aliquota, scongelata una sola volta, è stata testata per la presenza di IL-8, MCP-1 e RANTES mediante kit ELISA (Biosource International, Camarillo, CA). Il procedimento seguito per quantificare le chemochine è quello fornito dalla casa produttrice.

## **Risultati**

#### *Caratteristiche morfologiche e fenotipiche di cellule endoteliali*

Tutte le CE isolate e coltivate per gli esperimenti di infezione con HHV-6 esibivano una morfologia tipica, caratterizzata dalla presenza di un nucleo prominente e due nucleoli in ogni cellula. Per tutti i passaggi in vitro necessari (5-7) allo svolgimento degli esperimenti le CE conservavano la stessa morfologia e un tempo di duplicazione pari a 32-48h e costituivano un monostrato omogeneo di cellule allungate in stretto contatto (Fig. 1).

Figura 1. Morfologia delle colture di cellule endoteliali.

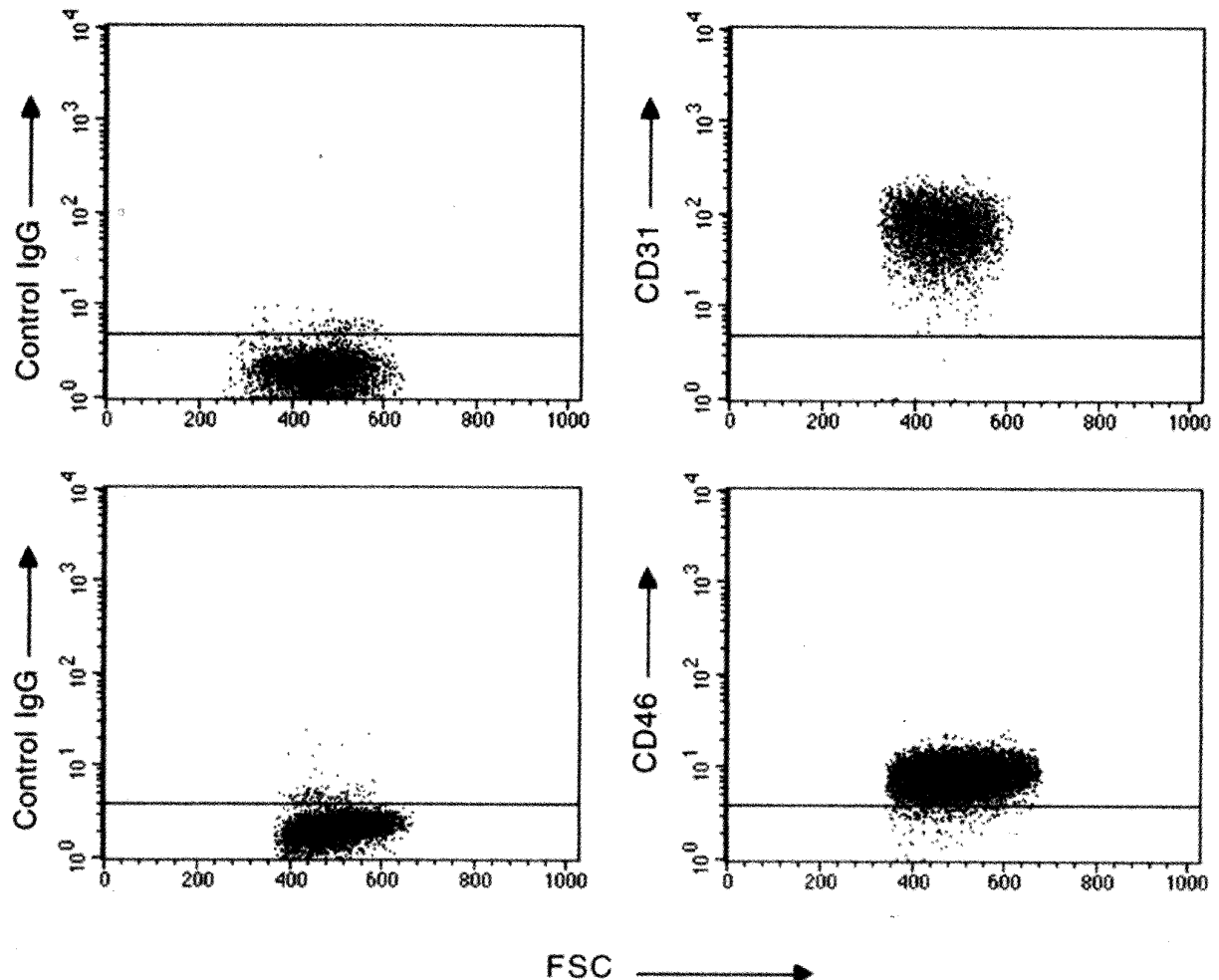


L'analisi mediante citofluorimetria mostrava che tutte le CE esprimevano sia il marcatore endoteliale specifico CD31 che il CD46, il recettore specifico per HHV-6 (Fig. 2).

#### Infezione di cellule endoteliali mediante HHV-6

Poiché le CE provenienti dal distretto aortico potrebbero essere naturalmente infettate dal virus HHV-6 (18), le colture endoteliali utilizzate per i successivi esperimenti sono state analizzate per l'eventuale presenza di sequenze genomiche di HHV-6 prima dell'infezione *in vitro*. Tutte le CE usate sono risultate negative per la presenza di DNA virale. Le colture endoteliali di HUVEC, di cellule microvascolari e aortiche sono state quindi infettate con HHV-6 e con virus inattivato. Le colture infettate esaminate al microscopio mostravano una morfologia del tutto simile a quella delle cellule non infette e a quelle infettate con il virus inattiva-

Figura 2. Analisi citofluorimetrica dell'espressione di CD31 e CD46.



to. Anche il tempo di duplicazione cellulare rimaneva inalterato, indicando che l'infezione da HHV6 non altera il ciclo cellulare delle CE (dati non mostrati).

Le cellule infettate sono state mantenute in coltura fino a 16 giorni. L'analisi in PCR ha evidenziato, ai diversi tempi sperimentali la presenza del DNA virale. Allo stesso tempo non è stato evidenziato alcun effetto citopatico. Lo studio mediante PCR *in situ* ha confermato che HHV-6 è in grado di infettare le cellule endoteliali e che le cellule di diversa origine tissutale dimostrano una diversa suscettibilità all'infezione. Un segnale specifico per HHV-6 è stato infatti ritrovato nel 20% delle HUVEC, nel 10% delle cellule endoteliali isolate dall'aorta e solo nell'1% da quelle derivate dall'auricola.

Per determinare se HHV6 avesse stabilito un'infezione latente o produttiva le cellule infettate sono state inoltre esaminate per la presenza di mRNA virali specifici tramite RT-PCR. I trascritti del gene tardivo U22 (10) sono stati ritrovati durante tutto il corso dell'infezione (dati non mostrati). Per verificare che non vi fosse stata contaminazione da DNA virale, sono stati eseguiti controlli negativi amplificando gli stessi campioni di RNA non retrotrascritto. Tutti i campioni di RNA, sottoposti alla reazione di amplificazione in assenza di una precedente retrotrascrizione, non hanno prodotto alcun amplificato.

#### *L'infezione da HHV6 modifica la produzione di chemochine da parte delle cellule endoteliali*

Le colture endoteliali infettate sono state inoltre monitorate a vari intervalli di tempo dall'inizio dell'infezione per la produzione delle chemochine MCP-1e IL-8 e RANTES. Per controllare l'eventuale induzione della produzione chemochinica da parte delle molecole contenute nell'inoculo virale, la produzione di IL-8 ed MCP-1 è stata quantificata anche nel sovrinatante delle colture endoteliali infettate con il virus inattivato. Nel corso dell'infezione si è osservato un incremento consistente della produzione di MCP-1, IL-8 e RANTES. In ogni tipo di coltura endoteliale infettata l'incremento della produzione chemochinica ha evidenziato un andamento caratteristico. Nelle CE dell'aorta la produzione di MCP-1 aumenta gradualmente a partire da un valore medio di 5,5 ng/ml a 4 giorni seguenti l'infezione, fino ad arrivare al 16° giorno ad un valore di 27 ng/ml, mentre nelle CE dell'auricola l'incremento di MCP-1 indotto dall'infezione mostra un andamento bifasico con 2 picchi al 4° ed al 16° giorno con una concentrazione di MCP-1 superiore in entrambi i casi di 10 ng/ml. Per quanto riguarda la produzione di IL-8 nelle CE dell'auricola si os-

serva un andamento simile a quello riscontrato per MCP-1, con 2 picchi al 4° ed al 16° giorno con rilascio di circa 18 ng/ml di IL-8 nel sovrinatante. I valori di IL-8 ritrovati nelle CE dell'aorta infetta si sono dimostrati di gran lunga più modesti di quelli riscontrati nell'auricola in quanto non superano i 10 ng/ml, pur dimostrando un lieve aumento col procedere dell'infezione (Tab. 1).

**Tabella 1. Produzione delle chemochine MCP-1 ed IL-8 da parte di CE infettate con HHV-6.**

Prod. di giorno p.i.	MCP-1 (ng/ml)		IL-8 (ng/ml)	
	aorta	auricola	aorta	auricola
4	5,5	10	10	18
8	10	5	5	10
12	27	10	10	18

Per quanto riguarda le colture endoteliali di HUVEC, la quantità di MCP-1 ed IL-8 rilasciata nel sovrinatante di coltura delle cellule infettate risultava simile alle colture di controllo (dati non mostrati).

Nelle colture infettate con HHV6 è stato anche osservato un incremento nel rilascio di RANTES. Questo incremento risultava evidente a partire da 24 ore dopo l'infezione nelle cellule microvascolari e a 48 ore in quelle fetali e di aorta, continuando per tutta la durata dell'esperimento (Tab. 3). Il picco della produzione di RANTES, pari a 750 pg/ml, è stato ritrovato nei sovrinatanti delle cellule endoteliali dei microvasi. Le cellule endoteliali di aorta secernevano approssimativamente la metà della chemochina rilasciata dai microvasi del cuore, raggiungendo una quantità massima di 340 pg/ml. Infine nelle colture di cellule endoteliali fetali, l'infezione da HHV6 induceva bassi livelli di produzione di RANTES con un picco di produzione massima a 72 ore dall'infezione pari a 45 pg/ml (Tab. 2). Le colture endoteliali infettate con il virus inattivato e quelle non infettate non rilasciavano nei sovrinatanti un livello di RANTES rilevabile (dati non mostrati).

**Tabella 2. Produzione di RANTES da parte di CE infettate da HHV-6.**

ore p.i.	Produzione di RANTES		
	microvasc	aorta	HUVEC
24	+	+/-	
48	++	+	+/-
72	+++	++	+

## Discussione

I risultati del nostro lavoro dimostrano che HHV-6 è in grado di infettare le cellule endoteliali umane in maniera produttiva e in assenza di effetto citopatico, condizione necessaria per la persistenza virale. Poiché l'infezione *in vitro* di HHV-6 non ha effetto citopatico e le cellule endoteliali possono essere cronicamente infettate anche *in vivo* (18), le nostre evidenze suggeriscono che i microvasi e i grandi vasi endoteliali possono funzionare come una riserva di virus *in vivo*. Mediante PCR in situ sono state evidenziate sequenze genomiche di HHV-6 all'interno delle cellule in circa il 20% delle HUVEC, mentre una frequenza più bassa di infezione si è riscontrata nelle CE di aorta e dell'auricola, con valori rispettivamente pari al 10 e al 1%. Le diverse percentuali non sono attribuibili ad una variabilità sperimentale poiché ogni campione è stato valutato in triplicato e per tutti gli esperimenti è stato utilizzato il medesimo inoculo virale. I diversi sistemi endoteliali sono caratterizzati da funzioni e fenotipi strutturali diversi che vengono influenzati dall'ambiente circostante in cui si trovano. È quindi plausibile che le CE di diversa origine possiedano una suscettibilità differente all'infezione da HHV-6. I risultati ottenuti sottolineano l'importanza di HHV-6 per la biologia cellulare delle CE dell'aorta e dei microvasi di cuore: entrambi i tipi cellulari vengono infettati, ma l'aorta risulta essere 10 volte più suscettibile rispetto ai microvasi di cuore. Questi risultati sono in accordo con l'ipotesi che HHV-6 giochi un ruolo patogenetico a livello di determinati tessuti del sistema cardiovascolare e con la recente scoperta che, in un paziente affetto da aneurisma aortico, la presenza del virus erpetico *in vivo* si rilevi esclusivamente a carico dell'endotelio aortico. Tali risultati lasciano ipotizzare che, anche *in vivo*, il virus HHV-6 possieda un tropismo differenziale tra il tessuto aortico e quello degli altri tessuti vascolari del cuore (18).

Nel nostro lavoro abbiamo inoltre verificato le possibili alterazioni di alcune attività funzionali che le CE infettate da HHV-6 possano manifestare in seguito al processo di infezione. Le CE svolgono un ruolo essenziale in alcuni meccanismi della risposta immune alle infezioni virali e batteriche, richiamando le cellule effettrici a livello del sito infiammatorio e permettendo a queste ultime di attraversare la barriera endoteliale per giungere al tessuto. Alla luce di tali considerazioni è stata valutata la capacità delle CE di produrre chemochine proinfiammatorie, quali IL-8, MCP-1 e RANTES. RANTES è considerato un importante chemotattico per monociti e linfociti e sembra avere un ruolo importante nell'indurre la chemotassi di linfociti memoria CD3<sup>+</sup> attraverso

le cellule endoteliali (16). Una elevata produzione di RANTES è stata inoltre associata a varie patologie infiammatorie umane caratterizzate da una risposta di tipo Th-1 (6). Anche IL-8 e MCP-1 sono chemochine legate allo sviluppo di patologie che comportano la formazione di stati infiammatori e promuovono l'attivazione leucocitaria e la migrazione cellulare. L'accumulo di chemochine proinfiammatorie e le risposte immuni locali potrebbero contribuire a danneggiare strutturalmente ed ad alterare la normale funzione svolta dalle CE quando esse siano un sito di replicazione attiva per HHV-6.

HHV-6 è, come il Cytomegalovirus, un virus che si trasmette principalmente mediante il contatto cellula-cellula (9), e può quindi trarre vantaggio dal danno endoteliale indotto dallo stato infiammatorio, avvantaggiandosene anche per replicare e diffondersi più efficientemente ad altri sistemi cellulari. Infatti, le cellule del sistema immunitario attratte dalle chemochine proinfiammatorie nel sito di infezione potrebbero essere infettate da HHV-6 in seguito al contatto con le CE infette e/o durante il processo di migrazione transendoteliale e diventare loro stesse portatrici del virus infettante, giocando in conclusione un ruolo chiave nella disseminazione virale.

Sia gli studi *in vitro* che quelli *in vivo* sottolineano quindi che l'endotelio dell'aorta rappresenta un bersaglio importante per l'infezione da virus erpetico umano di tipo 6. Sebbene la replicazione virale non induce un effetto citopatico, essa comporta comunque l'aumento del rilascio delle chemochine proinfiammatorie: l'accumulo di MCP-1 ed IL-8 contribuisce in modo decisivo allo sviluppo di processi infiammatori che conducono alla formazione di un danno vascolare, conseguenza ultima di alcune patologie a carico del tessuto cardiaco. Le evidenze sperimentali ottenute in questo studio suggeriscono una possibile via attraverso cui HHV-6 può indurre modificazioni alle CE dei microvasi e dell'aorta, rendendo comunque necessari ulteriori approfondimenti sul ruolo patogenetico di HHV-6 nelle malattie a carico del sistema vascolare e del tessuto cardiaco.

## Bibliografia

1. Alessandri G, Chirivi RGS, Castellani P, Nicolò G, Giavazzi R, Zardi L. Isolation and characterisation of tumor-derived capillary endothelial cells: role of oncofetal fibronectin. *Laboratory Investigation* 78, 127-128, 1998.
2. Campadelli-Fiume G, Mirandola P, Menotti L. Human herpesvirus 6: an emerging pathogen. *Emerging Infectious Disease* 3, 353-366, 1999.
3. Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, Schultz ER, Bennett JL, Gar-

- ber RL, Chang M et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1, 92 (16):7440-4, 1995.
4. Carrigan DR. Human herpesvirus-6 and bone marrow transplantation. *Blood* 1, 85 (1), 294-5, 1995.
  5. Comar M, Spano A, Canova S, Bogoni S, Marziliano N, Cernigoi E, Boniotto M, Amoroso A, Parodi S, Campello C, Crovella S. Direct in situ PCR allows rapid and sensitive detection of high risk human papillomavirus in cytologic specimens and formalin-fixed paraffin tissues by fluorescent labelling. *International Journal of Oncology* 18 (1): 181-185, 2001.
  6. Corsi MM, Leone G, Fulgenzi A, Wasserman K, Leone F, Ferrero Me. RANTES and MCP-1 chemokine plasma levels in chronic renal transplant dysfunction and chronic renal failure. *Clin Biochem* 32 (6), 455-60, 1999.
  7. Cuende JI, Ruiz J, Civiera MP, Prieto J. High prevalence of HHV-6 DNA in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals detected by nested-PCR. *J Med Virol* 43 (2), 115-8, 1994.
  8. Di Luca D, Mirandola P, Ravaioli T, Bigoni B, Cassai E. Distribution of HHV-6 variants in human tissues. *Infectious Agents Disease* 5 (4): 203-214, 1996.
  9. Fish KN, Soderberg-Naucler C, Mills LK, Stenglein S, Nelson JA. Human Cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *Journal of Virology* 72 (7), 5661-5668, 1998.
  10. French C, Menegazzi P, Nicholson L, Macaulay H, Di Luca D, Gompels UA. Novel, nonconsensus cellular splicing regulates expression of a gene encoding a chemokine-like protein that shows high variation and is specific for human herpesvirus 6. *Virology*, 262, 139-151, 1999.
  11. Jaffe EA, Nachman RL, Becjer CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from human umbilical veins: identification of morphologic and immunologic criteria. *Journal Clinical Investigation* 52: 2745-2756, 1973.
  12. Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Yamanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol*, 72, 1401-1408, 1991.
  13. Lusso P, Ensoli B, Markham PD, Ablashi DV, Salahuddin SZ, Tschachler E, Wong-Staal F, Gallo R. Productive dual infection of human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes by HIV-1 and HIV-6. *Nature*, 337, 370-373, 1989.
  14. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 12, 338 (7), 436-45, 1998. Review.
  15. Matsuda Y, Hara J, Miyoshi H, Osugi Y, Fujisaki H, Takai K, Ohta H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K, Okada S. Thrombotic microangiopathy associated with reactivation of human herpes-virus-6 following high-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in young children. *Bone Marrow Transplant* 24, 919-923, 1999.
  16. Roth SJ, Carr MW, Springer TA. C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T-lymphocytes. *Eur J Immunol* 25 (12), 3482-8, 1995.
  17. Rotola A, Ravaioli T, Gonelli A, Dewhurst S, Cassai E, Di Luca D. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in cultures. *Proceedings National Academy Science USA* 95, 13911-13916, 1998.
  18. Rotola A, Di Luca D, Cassai E, Ricotta D, Alessandri G, Turano A, Caruso A, Muneretto C. Human herpesvirus 6 infects and replicates in aortic endothelium. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (8), 3135-3136, 2000.
  19. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati LS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99: 817-827, 1999.
  20. Wu CA, Shanley JD. Chronic infection of human umbilical vein endothelial cells by human herpesvirus-6. *Journal of General Virology* 79, 1247-1256, 1998.
  21. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, Kurata T. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1: 1065-1067, 1988.
  22. Yanagi K, Harada S, Ban F, Ova A, Okebe N, Tobinai K. High prevalence of antibody to human herpesvirus-6 and decrease in titer with increase in age in Japan. *J Infect Dis* 161 (1), 153-4, 1990.