

# CTLA4-Ig influenza e inibisce le attività proinfiammatorie di macrofagi sinoviali reumatoidi in monocultura\*

## *CTLA4-Ig interferes and downregulates the proinflammatory activities of rheumatoid synovial macrophages in monoculture*

R. Brizzolarà<sup>1</sup>, S. Soldano<sup>1</sup>, P. Montagna<sup>1</sup>, A. Sulli<sup>1</sup>, B. Seriolò<sup>1</sup>, B. Villaggio<sup>2</sup>, P.F. Triolo<sup>3</sup>, P. Clerico<sup>3</sup>, L. Felli<sup>4</sup>, L. Molfetta<sup>5</sup>, M. Cutolo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Ricerca e Clinica Reumatologica, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova;

<sup>2</sup>Unità di Clinica Nefrologica, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova;

<sup>3</sup>Unità di Artrite Reumatoide, Dipartimento di Chirurgia Ortopedica, Ospedale CTO, Torino;

<sup>4</sup>Dipartimento di Ortopedia, Università di Genova; <sup>5</sup>Unità Ortopedica, Ospedale San Martino, Genova

### SUMMARY

**Objective:** CTLA4-Ig, a biologic agent employed in rheumatoid arthritis (RA) treatment, downregulates the immune response and exerts anti-inflammatory effects acting on different cells including dendritic/T cells interaction and directly on osteoclasts. We investigated the anti-inflammatory effects of CTLA4-Ig in primary monocultures of RA synovial macrophages (SM).

**Methods** SM were obtained, from 8 RA patients (7 F, 1 M; DAS28>5.2) who underwent therapeutic arthroscopic synovectomy and were cultured in the absence and in the presence of CTLA4-Ig at the concentration of [500 µg/ml], the most reliable dose related to the previous pharmacological clinical and experimental experiences. Inflammatory cytokine (IL-6, TNFalpha, IL-1beta) expression was evaluated by immunocytochemistry (ICC with relative image analysis), western blot (WB), and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

**Results:** ICC analysis revealed that CTLA4-Ig treatment significantly downregulated cytokine expression ( $p<0.001$  for IL-6, TNFalpha and IL-1beta) when compared to untreated RA SM. WB and qRT-PCR confirmed partially the data.

**Conclusions:** CTLA4-Ig was found to exert a direct and significant anti-inflammatory effect on primary monocultures of RA SM, suggesting a therapeutic power in different phases of the disease activity.

\*Lavoro premiato al XLVII Congresso SIR, Rimini 2010.

Reumatismo, 2011; 63 (2): 80-85

### ■ INTRODUZIONE

L'attivazione della risposta linfocitaria T nell'immunopatogenesi dell'artrite reumatoide (AR) e delle malattie autoimmuni in generale, ha stimolato negli ultimi anni lo studio dei meccanismi immunologici di attivazione e costimolazione coinvolti in tali patologie, al fine di individuare possibili obiettivi terapeutici.

CTLA4-Ig (abatacept) è una molecola di fusione ottenuta dall'unione del dominio extracellulare della molecola umana

CTLA4 e della porzione Fc di un'immunoglobulina umana di classe G1 (IgG1), modificata e resa incapace di fissare il complemento. CTLA4-Ig si lega alle molecole B7 sulle cellule presentanti l'antigene (APC) (macrofagi e cellule dendritiche principalmente) con un'avidità di molto superiore rispetto a CD28, presente sulle cellule T, interferendo con l'interazione tra CD28 e B7 (1-3).

La costimolazione di cellule T naïve tramite il legame di CD28 alle molecole B7.1/B7.2 rappresenta il più importante segnale

Indirizzo per la corrispondenza:  
Prof. Maurizio Cutolo  
Laboratorio di Ricerca  
e Clinica Reumatologica  
Dipartimento di Medicina Interna  
Università degli Studi di Genova  
Viale Benedetto XV  
16132 Genova  
E-mail: mcutolo@unige.it

secondario che porta alla proliferazione e differenziamento dei linfociti T. A seguito della loro attivazione, le cellule T aumentano l'espressione di CTLA4, un recettore inibitorio con affinità di legame per B7.1/B7.2 di molto superiore rispetto a CD28, interferendo con l'attivazione linfocitaria (4). È stato ipotizzato che la modulazione terapeutica delle vie di costimolazione, come B7.1/B7.2:CD28, possa interferire con l'attivazione della risposta immune, riducendo alcune manifestazioni pro-infiammatorie legate al reclutamento da parte dei linfociti T di altre cellule come linfociti B, macrofagi o linfociti T CD8+. Per questo motivo, CTLA4-Ig è stato impiegato come principio attivo farmacologico nella terapia biologica delle malattie autoimmuni quali l'AR, caratterizzata da un'alterata e prolungata attivazione della risposta immunitaria (5). Il trattamento con CTLA4-Ig si pone quindi come obiettivo la modulazione dell'attività dei linfociti T, bloccando la via di costimolazione CD28:B7.

Numerosi studi randomizzati, controllati in doppio cieco con placebo, hanno dimostrato che il trattamento biologico con CTLA4-Ig è in grado di migliorare i sintomi clinici in pazienti affetti da AR, refrattari ad altre terapie convenzionali (6), con percentuali di risposta simili a quelle riportate per il trattamento biologico con antagonisti del TNFalfa (7, 8).

Si può ipotizzare che il blocco dei recettori B7.1/B7.2 tramite CTLA4-Ig potrebbe altresì esercitare effetti diretti sulle APC, in particolare sui macrofagi che, come noto, giocano un ruolo fondamentale in diverse fasi della sinovite che si accompagna all'AR.

Studi *in vitro* che abbiamo condotto in precedenza hanno dimostrato la presenza della molecola B7.2 sulla superficie di macrofagi sinoviali (MS) ottenuti da pazienti affetti da AR attiva e inoltre hanno evidenziato i possibili effetti anti-infiammatori di CTLA4-Ig in co-culture di MS AR e cellule T attivate (9). Pertanto, in questo lavoro ci proponiamo di valutare i MS come possibili cellule target per il trattamento con CTLA4-Ig, in assenza della popolazione linfocitaria T, analizzando gli effetti

di CTLA4-Ig sulla produzione di citochine pro-infiammatorie quali IL-6, TNFalfa e IL-1beta da parte degli stessi MS.

## ■ MATERIALI E METODI

### *Culture cellulari primarie e trattamento farmacologico*

Le sinovie da cui sono stati estratti i macrofagi per le colture primarie sono state ottenute da 8 pazienti (7F, 1M; durata di malattia 4±6 anni, Disease Activity Score su 28 articolazioni (DAS28) >5.2) che soddisfecero i criteri revisionati nel 1987 dall'American College di Reumatologia per adulti affetti da AR e che erano stati sottoposti a sinoviectomia artroscopica terapeutica o chirurgica ricostruttiva del ginocchio. Il Comitato Etico dell'Università di Genova ha approvato lo studio e tutti i soggetti hanno firmato il consenso informato.

I campioni di tessuto sinoviale sono stati sminuzzati meccanicamente e digeriti in collagenasi (0.75 mg/ml; tipo IV da *Clostridium histolyticum*; Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Il prodotto di digestione è stato filtrato attraverso un colino a setaccio (dimensione pori: 58 Å) per selezionare le cellule sinoviali, le quali sono state successivamente seminate in parte in piastre multipozzetto (International PBI S.p.a. Milano, Italia; 10<sup>5</sup> cellule/pozzetto), utilizzate per l'allestimento di preparati citologici su vetrino, e in parte in piastre petri (International PBI S.p.a. Milano, Italia; 3×10<sup>6</sup> cellule/pozzetto), utilizzate per l'estrazione proteica e dell'RNA. Il terreno di coltura (RPMI-1640, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) era addizionato con il 10% di siero fetale bovino (contenente <0.5 EU/ml endotossina), 2 mmol/l di L-glutammina, 100 µg/ml di streptomina, e 100 U/ml di penicillina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La vitalità delle cellule (risultata del 95%) è stata testata mediante il test di esclusione che utilizza trypan blu.

Dopo un'incubazione di 1 ora, le cellule non aderenti sono state rimosse, mentre le cellule aderenti o semi-aderenti rappre-

sentate da MS AR sono state incubate per 24 ore in terreno addizionato con CTLA4-Ig alla concentrazione di [500 µg/ml], la concentrazione più significativa usata in base ai risultati ottenuti in precedenti studi farmacologici clinici e sperimentali (9). Il fenotipo dei macrofagi è stato confermato tramite colorazione immunocitochimica con anticorpo HAM56 (Dako, Carpinteria, CA, USA), specifico per cellule macrofagiche umane. MS AR non trattate sono state utilizzate come controlli (cnt) e tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

#### **Immunocitochimica (ICC)**

I MS AR adesi sui vetrini sono stati pre-incubati per 5 minuti in una soluzione al 3% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in acqua distillata per bloccare le perossidasi endogene e successivamente sono stati trattati con anticorpi primari anti-IL6, anti-TNFalfa e anti-IL-1beta (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Diluizione 1:100). Gli anticorpi legati alle proteine di interesse sono stati individuati tramite incubazioni con un anticorpo secondario universale biotinilato e a seguire con un complesso streptavidina-perossidasi (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA); come substrato cromogeno per la reazione enzimatica è stata utilizzata la diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). L'analisi immunocitochimica dei preparati è stata eseguita tramite il sistema di analisi d'immagine Leica Q-Win (Leica, Cambridge, UK), che ha permesso di valutare in modo semiquantitativo i risultati ottenuti.

#### **Western blot (WB)**

Per ottenere gli estratti proteici i MS AR sono stati lisati utilizzando il kit NucleoSpin RNA/protein (Macherey-Nagel, Duren, Germania). Le proteine ottenute sono state successivamente separate tramite elettroforesi in SDS-PAGE gel al 10%, trasferite su membrana di nitrocellulosa Hybond-C (GeHealthcare, Milano, Italia) e incubate con anticorpi primari di coniglio anti-IL-6 (1:500) e di capra anti-TNFalfa (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluiti in PBS 1x allo 0.1% di triton-X e al 5% di latte in polvere ipolipemico.

Successivamente le membrane sono state incubate con anticorpi secondari, specifici per anticorpi di coniglio (per IL-6, diluizione 1:5000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e per anticorpi di capra (per TNFalfa, diluizione 1:65000; Sigma, Milano, Italia).

Infine, le bande proteiche sono state visualizzate attraverso un sistema di amplificazione in chemiluminescenza (Immobilon-P, Millipore, CA, USA).

#### **Real-Time PCR quantitativa (qRT-PCR)**

I MS AR sono stati lisati con il kit NucleoSpin RNA/protein (Macherey-Nagel, Duren, Germania) per ottenere estratti di RNA totale, a partire dai quali è stato sintetizzato DNA complementare (cDNA), utilizzando la reazione dell'enzima transcriptasi inversa SuperScript II (Invitrogen, Paisley, UK), nella quantità di 1 µg di RNA totale in 20 µl di reazione. Per la successiva reazione di qRT-PCR è stato utilizzato il kit "Real MasterMix SYBER Green" (Eppendorf S.r.l. Milano, Italia) e un termociclatore Realplex Eppendorf. I primer per l'espressione genica della beta-actina (gene housekeeping), di IL-6, TNFalfa e IL-1beta sono stati forniti dalla Primer Design (Primer Design, UK).

La quantificazione dei geni studiati è stata ottenuta utilizzando il metodo comparativo del 2<sup>-ΔΔCT</sup>; i valori ottenuti corrispondono al numero di volte che il gene target è espresso (fold increasing) rispetto al calibratore (MS non trattate), assunto come valore unitario per definizione (10).

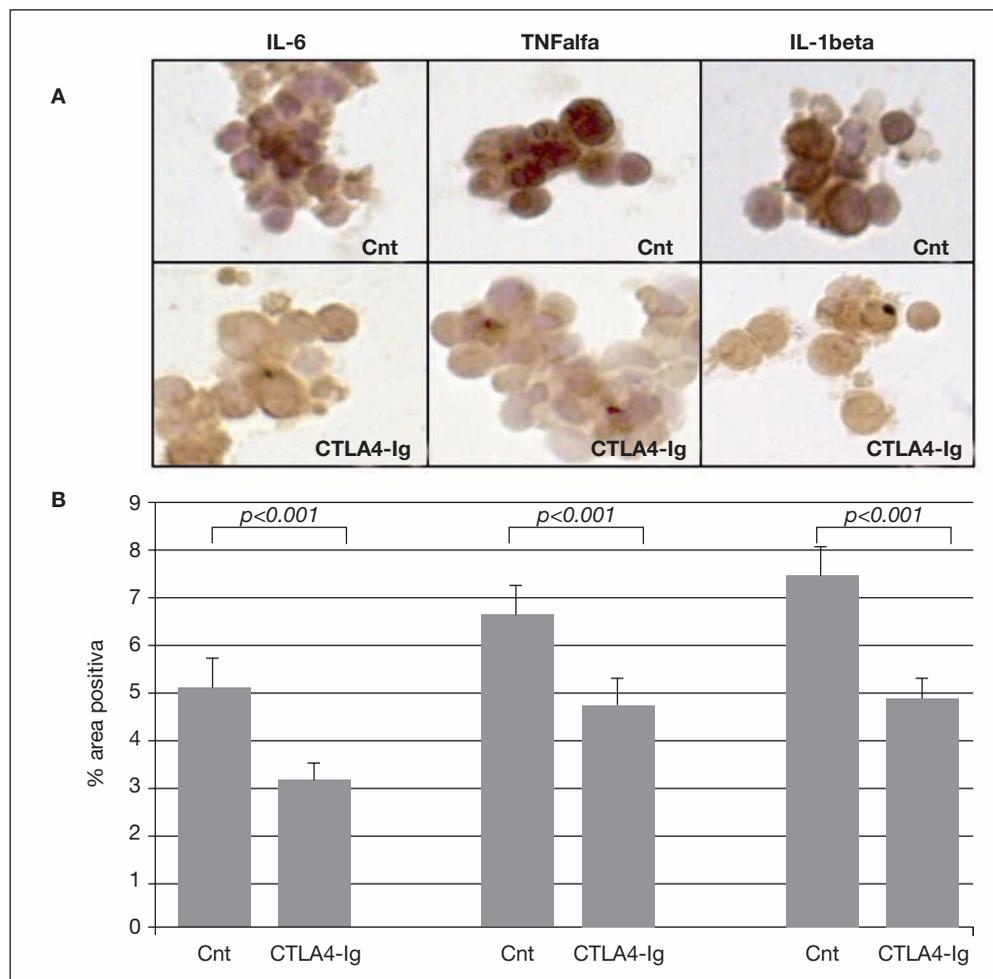
#### **Analisi statistica**

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata tramite il test non parametrico T Wilcoxon e valori di *P*<0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

## ■ RISULTATI

#### **ICC e WB**

L'analisi d'immagine sui preparati citologici (ICC) ha evidenziato che il trattamento con CTLA4-Ig [500 µg/ml] nelle monoculture di MS AR ha indotto un decremento



**Figura 1** - Valutazione in ICC dell'espressione di IL-6, TNFalfa e IL-1beta in colture di macrofagi sinoviali AR non trattati (Cnt) e trattati con CTLA4Ig [500 µg/ml] (A) e rispettiva analisi d'immagine (Sistema Q-Win Leica) (B).

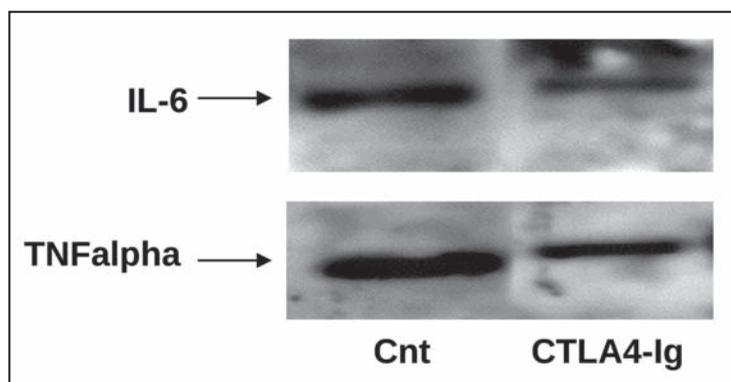
statisticamente significativo della sintesi delle citochine indagate ( $p < 0.001$  per IL-6, TNFalfa e IL-1beta) (Fig. 1) rispetto ai MS AR non trattati

L'analisi mediante WB dell'espressione proteica di IL-6 e TNFalfa ha confermato questo andamento, mostrando un lieve decremento nella sintesi delle citochine infiammatorie prodotte dai MS AR trattati con CTLA4-Ig [500 µg/ml], rispetto alle cellule non trattate (Fig. 2).

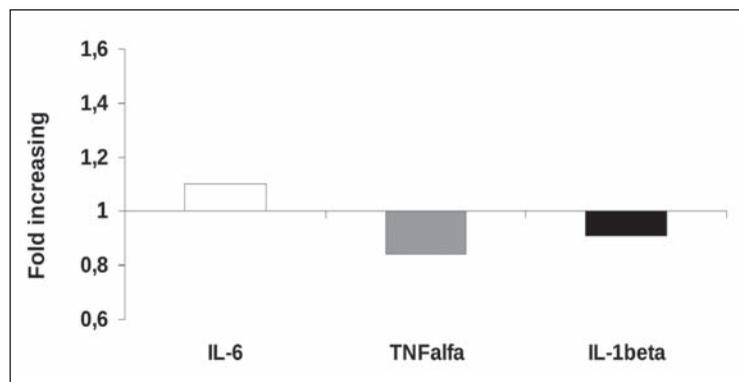
#### qRT-PCR

L'analisi tramite qRT-PCR ha mostrato come il trattamento con CTLA4-Ig [500 µg/ml] abbia indotto una diminuzione non significativa dell'espressione genica delle citochine TNFalfa e IL-1beta, mentre i livelli di espressione di IL-6 sono rimasti pressoché invariati rispetto a quelli dei MS

AR non trattati. I dati sono stati rappresentati come variazione dei livelli di espressione per IL-6, TNFalfa e IL-1beta rispetto al calibratore (MS AR non trattati) (Fig. 3).



**Figura 2** - Valutazione tramite WB di IL-6 e TNFalfa in colture di macrofagi sinoviali AR non trattati (Cnt) e trattati con CTLA4-Ig [500 µg/ml].



**Figura 3** - Valutazione attraverso qRT-PCR dell'espressione genica di IL-6, TNFalfa e IL-1beta in colture di macrofagi sinoviali AR trattati con CTLA4-Ig [500 µg/ml]. I valori ottenuti corrispondono al numero di volte che il gene target è espresso (fold increasing) rispetto al calibratore assunto come valore 1 per definizione.

## ■ DISCUSSIONE

Il ruolo biologico delle citochine e di altre proteine coinvolte nella risposta immunitaria, in particolare nella AR a livello sinoviale, assume non solo un significato patogenetico ma anche terapeutico. Nell'AR in particolare, mediatori pro-infiammatori quali IL-6 e TNFalfa sono molto espressi a livello sinoviale e sono considerati validi bersagli per le nuove terapie biologiche. Allo stesso modo, proteine coinvolte nell'induzione e nell'amplificazione della risposta immunitaria AR, come per es. le molecole costimolatorie (B7.1/B7.2) possono essere considerate tra le principali, rappresentano potenziali bersagli utili per nuovi trattamenti farmacologici (11).

In condizioni fisiologiche l'attivazione linfocitaria T è regolata da un processo di autospegnimento, mediato dalla comparsa di CTLA4 sulle cellule T stesse, che impedisce l'interazione CD28/B7 e trasduce sui linfociti T un segnale negativo. Oltre a questo meccanismo competitivo, recenti studi indicano che CTLA4 può svolgere la sua azione attraverso segnali "opposti, bidirezionali" direttamente sulle cellule che esprimono il suo ligando (per es. cellule dendritiche e macrofagi), influenzandone le funzioni (12-14).

I macrofagi sono considerati tra le principali cellule produttrici di citochine infiammatorie nel tessuto sinoviale di pazienti affetti da AR, e possono anche differenziarsi in osteoclasti, implicati nei processi infiammatori di rimodellamento ed erosione ossea con conseguente danno articolare (15). Recentemente è stato dimostrato che

CTLA4-Ig inibisce direttamente RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor k B Ligand), così come inibisce *in vitro* in modo dose-dipendente il processo di osteoclastogenesi indotto da TNFalfa, ancora una volta senza la concomitante presenza dei linfociti T (16).

In questo lavoro si suggerisce il concetto secondo il quale la molecola CTLA4-Ig, attraverso l'interazione con le molecole B7 su MS AR, possa indurre una riduzione della produzione delle citochine pro-infiammatorie IL-6, TNFalfa e IL-1beta. Infatti gli esperimenti riportati in questo studio si basano esclusivamente su MS AR, a livello dei quali è stato osservato un effetto modulatore in senso negativo sulla produzione di citochine infiammatorie, probabilmente dovuto a un "segnale bidirezionale" indotto da CTLA4-Ig. Infine è stato osservato come CTLA4-Ig abbia determinato una diminuzione non significativa dell'espressione di TNFalfa e IL-1beta, mentre per IL-6 non sono emerse differenze rispetto ai MS AR non trattati.

Questo potrebbe essere dovuto al fatto che l'azione down-regolatoria di CTLA4-Ig sull'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie studiate sia precedente rispetto a quella osservata sulla sintesi proteica. Pertanto, un significativo effetto modulatore in senso negativo sull'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie potrebbe essere visibile a tempistiche più brevi rispetto a quella utilizzata nel presente studio considerando che, in generale, l'effetto di uno stimolo (es. Abatacept) sull'espressione genica di determinate molecole avviene più precocemente rispetto all'effetto dello stesso sulla loro sintesi proteica.

In conclusione, il nostro studio *in vitro* dimostra che CTLA4-Ig inibisce significativamente la produzione di citochine pro-infiammatorie quali IL-6, TNFalfa e IL-1beta anche direttamente a livello macrofagico, sottolineando ancora una volta il ruolo fondamentale che i MS ricoprono nelle varie fasi dell'AR e supportando gli effetti terapeutici di CTLA4-Ig sull'infiammazione acuta e cronica già evidenziata in vari studi clinici.

Dunque, un ampio spettro di cellule bersaglio per la proteina di fusione CTLA4-Ig si è ormai delineato e ciò potrebbe spiegare gli effetti benefici del suo impiego nel controllare i segni e i sintomi dell'AR, anche in fasi avanzate di malattia.

#### Ringraziamenti

Ringraziamo vivamente la Bristol-Myers Squibb S.r.l. per il supporto economico apportato allo svolgimento del progetto di ricerca e il Dipartimento di Medicina Interna dove è stato effettuato lo studio.

#### RIASSUNTO

*Studi recenti evidenziano che CTLA4-Ig svolge un'azione anti-infiammatoria agendo sia sull'interazione di diverse popolazioni cellulari (cellule presentanti l'antigene/cellule T) sia direttamente su singole cellule tra cui gli osteoclasti. In questo studio sono stati valutati gli effetti di CTLA4-Ig su singole colture di MS AR (in assenza di linfociti T). La produzione di IL-6, TNFalfa e IL-1beta (valutata in ICC, WB e qRT-PCR) ha subito una diminuzione significativa in seguito al trattamento con CTLA4-Ig [500 µg/ml] rispetto ai MS AR non trattati. In conclusione, i macrofagi sinoviali AR appaiono essere ulteriori cellule bersaglio immuno-infiammatorie sensibili al trattamento con CTLA4-Ig.*

**Parole chiave:** artrite reumatoide, macrofagi sinoviali, molecole di costimolazione, CTLA4-Ig.

**Key words:** rheumatoid arthritis, synovial macrophages, costimulatory molecules, CTLA4-Ig.

#### BIBLIOGRAFIA

- Marti L, Golmia R, Golmia AP, Paes AT, Guillen DD, Moreira-Filho Ca, et al. Alterations in cytokine profile and dendritic cells subsets in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients before and after biological therapy. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1173: 334-42.
- Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell co-stimulatory pathways in autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: S3.
- Trikudanathan S, Sayegh MH. The evolution of the immunobiology of co-stimulatory pathways: clinical implications. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: S12-21.
- Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 202.
- Malmstrom V, Trollmo C, Klareskog L. Modulating co-stimulation: a rational strategy in the treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 2005; 7 (Suppl. 2): S15-S20.
- Moreland LW, Alten R, Van den Bosch F, Appelboom T, Leon M, Emery P, et al. Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1470-9.
- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2007; 370: 1861-74.
- Graca L. CTLA4IG and the therapeutic potential of T cell co-stimulation blockade. *Acta Reumatol Port* 2008; 33: 267-76.
- Cutolo M, Soldano S, Montagna P, Sulli A, Serio B, Villaggio B, et al. CTLA4-Ig interacts with cultured synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients and downregulates cytokine production. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R176.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 2001; 25: 402-8.
- McInnes IB, O'Dell JR. State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1898-906.
- Alegre ML, Fallarino F. Mechanisms of CTLA4-Ig in tolerance induction. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 149-60.
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 1206-12.
- Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, et al. CTLA4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3: 1097-101.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-08.
- Axmann R, Herman S, Zaiss M, Franz S, Polzer K, Zwerina J, et al. CTLA4 directly inhibits osteoclast formation. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1603-09.