

LAVORO ORIGINALE

Analisi della cinetica di espressione della tristetraprolina e della HuR in cellule mononucleate di pazienti con artrite reumatoide dopo stimolazione con lipopolisaccaride*

Analysis of the kinetic of expression of tristetraprolin and HuR by rheumatoid arthritis patients peripheral blood mononuclear cells stimulated with lipopolysaccharide

M. Fabris¹, B. Tolusso², E. Gremese², P. Tomietto², G. Ferraccioli²

¹Cattedra di Reumatologia, DPMSC, Università degli Studi di Udine; ²Cattedra di Reumatologia, UCSC, Università Cattolica di Roma

SUMMARY

Objective. Given the role of TNF- α in Rheumatoid Arthritis (RA) we decided to define the characteristics of the TNF- α synthesis by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from active-aggressive RA patients giving a particular attention to the modulation of the expression of two fundamental proteins in TNF- α mRNA stability regulation, Tristetraprolin (TTP) and HuR.

Methods. 11 RA patients with active disease were enrolled in the study before their entry in 2 double blind protocols: Infliximab versus MTX and Etanercept versus MTX. 9 healthy blood donors were taken as controls. PBMCs obtained by Ficoll centrifugation and plastic adherence were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and TNF- α was measured in the supernatant during 8 hours by ELISA. At each time point the cells were harvested and analysed for TNF- α , TTP and HuR mRNA expression by semi-quantitative PCR.

Results. MNCs TNF- α secretion after LPS stimulation did not differ significantly between RA and control subjects, even if a tendency towards a more prompt response was observed in the patients. More importantly only the DMARDs responsive patients (DAS <3.7 at the 6th month, with a minimal reduction of 1.2 points) disclosed precociously (at the first month) a significant change in the profile of TNF- α secretion and maintained it until the 6th month. The "normalization" of the synthetic behaviour was accompanied by the resetting in the regulation of the expression of the TTP, that appeared significantly different in the patients before and after therapy.

Conclusions. Independently from the type of therapy, responsive patients demonstrate a rapid change in the cellular biology at the systemic level that might drive the resolution of the phlogistic process at the synovial level.

Reumatismo, 2004; 56(2):94-103

INTRODUZIONE

Il riconoscimento del TNF- α quale citochina chiave del processo infiammatorio cronico dell'Artrite Reumatoide (AR) ha condotto allo sviluppo e quindi all'introduzione in terapia di farmaci in grado di colpire in modo specifico la molecola del

TNF- α ottenendo un controllo efficace e precoce della malattia, documentato da un ridotto infiltrato sinoviale e dalla ridotta espressione di diversi marcatori di attivazione e proliferazione cellulare (1-7). Tuttavia sono ancora molto discordanti gli studi riguardanti le eventuali alterazioni nella modalità di regolazione della sintesi del TNF- α da parte di cellule ottenute da pazienti con AR (8-12). Inoltre non è ancora chiaro con quale meccanismo il blocco del TNF- α a livello sistemico possa influenzare l'andamento della malattia a livello sinoviale. Nel controllo della sintesi del TNF- α gioca sicuramente un ruolo preminente la regolazione post-trascrizionale (13), a partire dalla modulazio-

*Lavoro premiato al XXXIX Congresso SIR, Bari 2002

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. Gianfranco Ferraccioli,

Direttore Clinica di Reumatologia

UCSC - Università Cattolica di Roma, 00168 Roma, Italy

E-mail: gf.ferraccioli@rm.unicatt.it

ne della stabilità dell'mRNA subito prima della traduzione in proteina. A questo livello operano in modo concertato una serie di fattori in grado di legare particolari sequenze ricche in dimeri AU (AU rich elements o ARE) in 3' al messaggero inducendone da una parte la rapida deadenilazione e quindi degradazione (14-16), dall'altra un'emivita più lunga e forse l'immagazzinato in particolari depositi citoplasmatici (17, 18). L'equilibrio tra fattori stabilizzanti e destabilizzanti è alla base tanto della rapida secrezione in risposta a numerose noxae patogene, quanto dell'altrettanto rapido spegnimento della sintesi citochinica altrimenti dannosa per l'organismo. La tristetraprolina (TTP) è una mRNA binding protein che ha dimostrato di giocare un ruolo fondamentale nella modulazione della traduzione del TNF- α in quanto topi knock-out per essa dimostrano una produzione elevata di TNF- α anche in assenza di stimoli e la precoce insorgenza di una sindrome molto simile all'AR umana (15). Tra i fattori più importanti nel mantenimento della stabilità dell'mRNA del TNF- α di particolare importanza è la proteina HuR, appartenente alla famiglia ELAV (17). Nel presente lavoro abbiamo studiato la cinetica di sintesi del TNF- α indotta dall'LPS in cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico di pazienti AR e controlli sani, affiancando l'analisi della eventuale modulazione dell'espressione della TTP e della HuR e verificando gli eventuali cambiamenti indotti dalla terapia con MTX o biologici anti-TNF- α a distanza di 1, 3 e 6 mesi.

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

Nello studio sono stati arruolati consecutivamente 11 pazienti con Artrite Reumatoide diagnosticata secondo i criteri di classificazione redatti nel 1987 dall'American College of Rheumatology (19) e 9 controlli sani confrontabili con i pazienti per età e sesso, reclutati tra i donatori di sangue del servizio immunotrasfusionale dell'Azienda Ospedaliera di Udine. Sia i pazienti che i donatori hanno dato il loro consenso informato. Tutti i pazienti erano caratterizzati da un'artrite attiva, aggressiva (>6 articolazioni tumefatte e dolenti, velocità di eritrosedimentazione o VES > 28 mm/ora e una rigidità mattutina > di 45 minuti) e refrattaria per almeno 6 mesi alle comuni terapie con DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs), per tale motivo sono stati arruolati in due protocolli speri-

Tabella IA - Caratteristiche biochimico-cliniche basali dei pazienti.

N° pazienti	11
Età (media \pm ds)	57.8 \pm 7.4
Sesso (% femmine)	72.7%
Durata malattia (mediana con range)	2 (1-16)
Breve durata (<1 anno) n°	5
Lunga durata n°	6
DAS basale (media \pm ds)	5.5 \pm 1.1
PCR (mg/L) (media \pm ds)	35.7 \pm 29
FR (% positività)	63.6%
Cortisonici (5 mg/die)	72.7%
Legenda: ds = deviazione standard; DAS = disease activity score; PCR = proteina C reattiva; FR = fattore reumatoide.	

mentali volti a confrontare l'efficacia dei biologici anti-TNF- α da soli o in associazione con MTX in rapporto al solo MTX, considerato il farmaco ancora nel trattamento standard dell'AR (20). Lo studio è stato condotto in doppio cieco e solo al termine dei sei mesi di terapia è stato reso noto il ti-

Tabella IB - Follow-up dei pazienti.

Paz. n°	DAS basale	DAS 6° mese	Terapia	Risposta
1	4.79	2.96	Et	R
2	7.54	6.85*	Et	NR
3	4.75	2.72	Et+MTX	R
4	6.54	4.07	Et+MTX	NR
5	5.21	2.49	Inflix	R
6	5.87	1.58	Inflix	R
7	6.08	1.58	MTX	R
8	3.72	2.05	MTX	R
9	5.08	5.46	MTX	NR
10	6.81	4.63	MTX	NR
11	4.55	4.92	MTX	NR
Legenda: DAS = disease activity score; R = responsivo; NR = non responsivo; Et = Etanercept; Et+MTX = Etanercept in combinazione con MTX. *Paziente uscito dal protocollo dopo il 1° mese di terapia di cui si riporta il valore del DAS al momento dell'uscita.				

po di trattamento. L'inizio del trattamento è seguito ad un periodo di wash-out farmacologico di 1 mese, wash-out che non comprendeva i cortisonici (prednisone), di cui facevano uso (ed hanno continuato ad usare) 8 pazienti su 11 alla dose di 5 mg/die. Quindi i pazienti sono stati trattati come segue: 2 con iniezioni sottocutanee di Etanercept 25 mg 2 volte alla settimana, 5 con Metotrexate (MTX) 15-20 mg alla settimana, 2 con la combinazione Etanercept plus MTX, 2 con la combinazione Infliximab plus MTX secondo lo schema terapeutico del trial ATTRACT (21). I pazienti sono stati seguiti nel follow-up fino al sesto mese dall'inizio della terapia, registrando le variazioni delle variabili biochimico-cliniche riportate nella tabella IA. Ai mesi 1°, 3° e 6° è stato ripetuto il prelievo di sangue periferico per l'analisi in vitro della sintesi e del rilascio di TNF- α . L'attività di malattia è stata rappresentata mediante uno score complesso, (DAS= disease activity score) considerante numero di articolazioni dolenti e tumefatte, VES e benessere del paziente (22). In base a tale DAS è stato considerato responsivo alla terapia il paziente che entro il 6° mese aveva fatto registrare una riduzione del DAS =1.2 e aveva raggiunto un valore assoluto inferiore a 3.7 (Tab. IB).

Colture cellulari

Le cellule mononucleate del sangue periferico di pazienti e controlli sono state isolate mediante centrifugazione su gradiente di Ficoll (Ficoll-Paque, Amersham Pharmacia Biotech; 35 minuti a 1500 rpm) e quindi poste in coltura per 16 ore su piastre da 6 pozzetti (5x10⁶ per pozzetto) a 37°C, 5% CO₂ in RPMI addizionato di FCS inattivato al calore (55°C per 30 minuti) al 10% (Euroclone, Celbio) e 1% streptomina/penicillina. In seguito, mediante ripetuti lavaggi con PBS sono state eliminate le cellule non aderenti, mentre quelle rimaste adese sono state trattate con lipopolisaccaride (LPS da *Salmonella Tiphimurium* - L2262, Sigma) alla concentrazione di 100 ng/ml, recuperando il surnatante e le cellule stesse ai seguenti tempi: 30 minuti, 1, 2, 4, 8 ore. Il tempo zero è stato ottenuto incubando le cellule in RPMI più FCS senza LPS per 4 ore. La vitalità cellulare è stata testata mediante colorazione con trypan blue ed è risultata dell'86-87%. L'analisi citofluorimetrica delle cellule adese utilizzando il saggio SimultestTM (Anti-Leucocyte/CD45FITC e anti-Leu-M3/CD14PE della Becton and Dickinson) ha dato i seguenti risultati: monociti 44.8±2.1%, linfociti 38.2±1.65%, granulociti 12.9±3.8%. Quindi abbiamo studiato una po-

polazione cellulare arricchita in monociti e molto vicina a quella comunemente osservata a livello del tessuto sinoviale reumatoide (23).

Analisi della produzione citochinica mediante ELISA

La quantità di TNF- α rilasciato nel mezzo di coltura dalle cellule stimulate e non con LPS è stata valutata mediante kit ELISA (Biosource International, Nivelles, Belgium) seguendo le istruzioni riportate dal produttore. Il test ha una sensibilità pari a 11 pg/ml ed il coefficiente di variazione è risultato inferiore al 10%. I risultati sono stati riportati come pg/ml di TNF- α per milione di cellule inizialmente seminate. Ogni campione è stato saggiato in triplo ed è stata presa la media. Visto il tipo di stimolazione impiegata, possiamo ritenere il TNF- α quale prodotto praticamente esclusivo della popolazione monocitaria (24). In assenza di stimolo non è stato rilevato un significativo rilascio di TNF- α durante le 8 ore di osservazione (Fig. 1).

Analisi molecolari

Dalle cellule recuperate dalla piastra è stato estratto l'mRNA utilizzando la soluzione TRIzol (Gibco Life Technologies) secondo le istruzioni riportate.

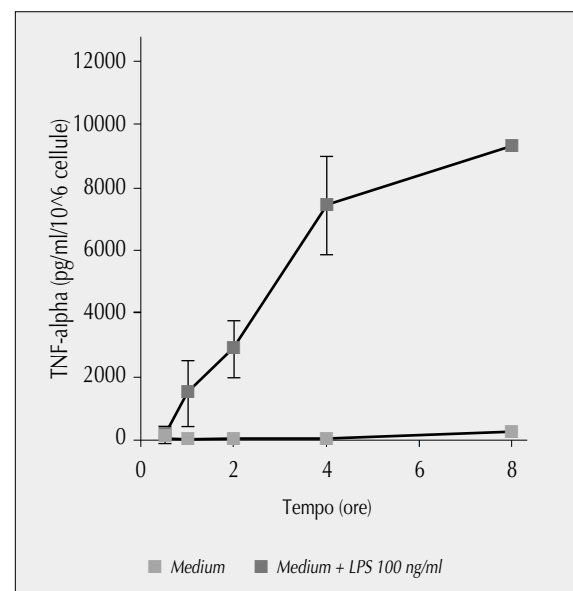


Figura 1 - Analisi della secrezione di TNF- α in presenza ed assenza di LPS sulle cellule di tre soggetti di controllo. Le cellule di 3 soggetti di controllo (2 femmine ed un maschio), sono state incubate in assenza ed in presenza di LPS nel medium di coltura e la secrezione di TNF- α nel surnatante è stata valutata mediante ELISA. Ogni punto rappresenta la media con l'indicazione della deviazione standard.

Tabella IIA - Lista dei primers e modalità di utilizzo.

Primer	Sequenza 5'-3'	Utilizzo
G1	AGTATGACAAACAGCCTCAAG	Sintesi competitore e poi sense PCR competitiva della GAPDH
G-del	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACCT-GAGCTTCCCCTTCAGCT	Sintesi competitore GAPDH
G2	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC	PCR competitiva GAPDH, antisense
TNF1*	TCTGGCCCAGGCAGTCAGATC	PCR TNF sense
TNF2	CCTTGGTCTGGTAGGAGACC	PCR TNF antisense
TTP1**	CCCTGATGAATATGCCAGC	PCR TTP, sense
TTP2	GGTTCATTGCCTCCCTTAA	PCR TTP, antisense
H1***	TCGCAGCTGTACCACTCGCCAG	PCR HuR, sense
H2	CCAAACATCTGCCAGAGGATC	PCR HuR, antisense

*TNF- α GenBank accession number: NM000594; **Tristetraprolina (TTP) GenBank accession number: NM003407
 ***HuR GenBank accession number: U38175

L'mRNA è stato controllato mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% e una prima quantizzazione è stata effettuata mediante analisi densitometrica della banda 28S. Su tale dato è stato retroscritto uno stesso quantitativo di mRNA utilizzando come primers una miscela di OligodT₁₆₋₁₈ e la SuperscriptRT (Gibco Life Technologies) in presenza di un inibitore della RNAsi. In seguito una più precisa quantizzazione del cDNA è stata accuratamente effettuata mediante PCR competitiva del gene di riferimento Glutaraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH - sequenza riportata nella GenBank al n° XM006959). Il competitore è stato sintetizzato mediante il metodo della "delezione" (25) costruendo un frammento di DNA a doppio filamento più corto del target di 40 paia di basi ed amplificabile con gli stessi primers del target. In tabella IIA sono riportate le sequenze dei primers utilizzati. Per testare l'efficienza e l'efficacia della reazione di competizione, diluizioni seriali del competitore (0, 25,

100, 250, 500 molecole/ μ l) sono state amplificate con una quantità costante di un cDNA di riferimento. Dopo elettroforesi su gel d'agarosio al 2.5% in TBE 0.5X, abbiamo posto in grafico logaritmico il rapporto tra l'assorbanza relativa alla banda del target e quella relativa alla banda del competitore versus il numero di molecole di competitore addizionate alla reazione, ottenendo una curva di cui abbiamo fatto la regressione lineare. La linearità è risultata particolarmente accentuata per valori del rapporto Assorbanza Target/Assorbanza Competitore vicini all'unità, così tutti i campioni di cDNA sono stati inizialmente testati e quindi diluiti opportunamente e ripetuti fino ad un'espressione di GAPDH all'incirca pari alla diluizione di competitore 100 molecole/ μ l. L'analisi densitometrica delle bande è stata fatta utilizzando il Phosphorimager Gel Doc 2000 della Biorad. Dopo la standardizzazione sulla base dell'espressione della GAPDH, siamo passati all'analisi dell'espressione molecolare di

Tabella IIB - Condizioni di amplificazione. *I primers e le condizioni di PCR sono riferite al metodo riportato da Suzuki et al. (25). bps: paia di basi.

Gene	Condizioni
PCR GAPDH (prodotto target 333 bps)	30'' a 94°C, 30'' a 56°C, 45'' a 72°C; 35 cicli
TNF- α (prodotto 285 bps)	30'' a 94°C, 30'' a 56°C, 45'' a 72°C; 35 cicli
TTP (prodotto 416 bps)*	45'' a 95°C, 45'' a 58°C, 1' a 72°C; 32 cicli
HuR (prodotto 226 bps)	30'' a 95°C, 30'' a 65°C, 2' a 72°C; 30 cicli

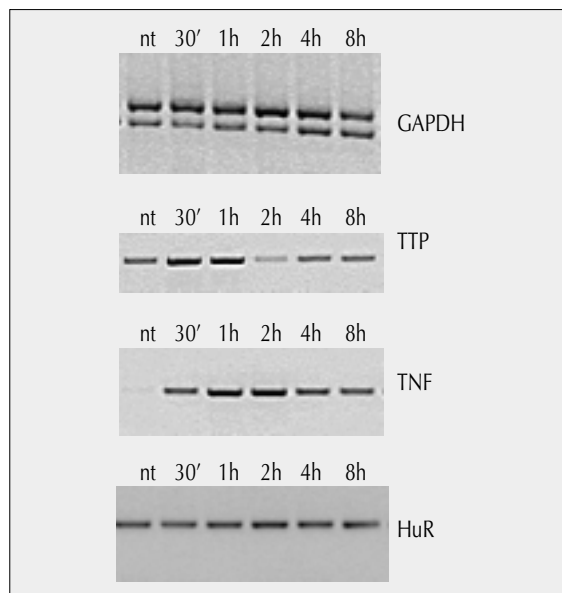


Figura 2 - Analisi dell'espressione di TNF- α , TTP e HuR: un caso esemplificativo. L'elettroforesi su gel d'agarosio al 2.5% rispettivamente per GAPDH, TNF- α , HuR e al 2% per la TTP mostra l'andamento dell'espressione molecolare dei 3 geni d'interesse dopo aver uniformato i campioni riferiti ad ogni tempo della cinetica per l'espressione della GAPDH. nt = cellule non trattate con LPS.

TNF, TTP (26) e HuR mediante PCR utilizzando i primers e le condizioni riportate in tab. IIA e B. In figura 2 ne è illustrato un esempio.

Analisi statistiche

Le analisi statistiche ed il calcolo dell'Area sotto la Curva (AUC) delle cinetiche di rilascio del TNF- α sono stati effettuati utilizzando il software Prism (Graph-Pad, S. Diego, CA 92121 - USA). I dati so-

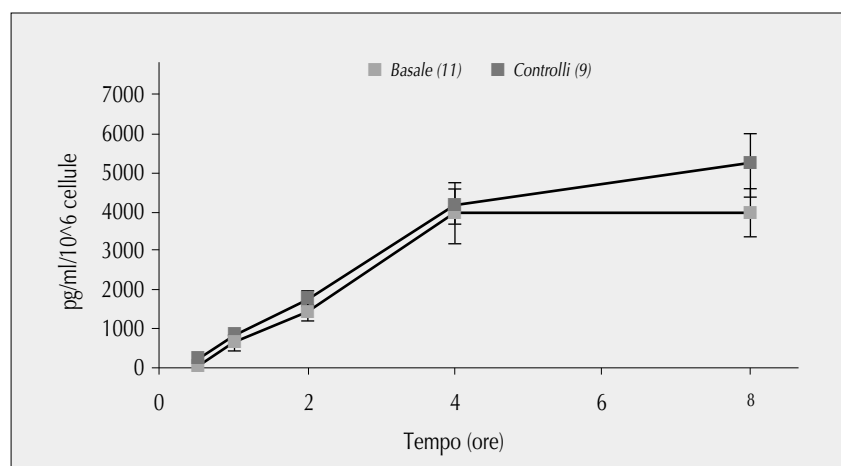
no espressi come media con l'indicazione dell'errore standard o come mediana con il range minimo-massimo se più opportuno. Il confronto tra gruppi è stato effettuato mediante test non-parametrici (Mann-Whitney). L'intervallo di confidenza è stato calcolato al 95% e si sono considerati significativi valori di $p < 0.05$.

RISULTATI

Come mostrato in tabella IA i pazienti all'entrata nei protocolli sperimentali di trattamento presentavano un'elevata attività di malattia, con un DAS medio di 5.5 ± 1.1 ed un livello plasmatico della proteina C reattiva (PCR) pari a 35.7 ± 29 mg/l. 8 pazienti su 11 prendevano cortisone alla dose di 5 g/die, il 63.6% dei pazienti è risultato positivo per la presenza di Fattore Reumatoide nel siero (< 20 UI/mL), con un titolo medio pari a 447.3 ± 382.6 (range min-max: 25-1090). 5 pazienti avevano una durata di malattia inferiore ad 1 anno.

La cinetica del rilascio cellulare di TNF- α in seguito a stimolo con LPS non ha messo in luce significative differenze tra pazienti e controlli (Fig. 3), tuttavia mentre nei controlli la cinetica è ancora crescente al termine del periodo osservazionale, nei pazienti ha già raggiunto il picco di produzione e assume un andamento decrescente. Quindi, se nell'arco delle 8 ore di osservazione non si rilevano differenze nel livello globale medio di TNF- α rilasciato nel mezzo di coltura (rappresentato dalla misura dell'Area sotto la Curva della cinetica) tra pazienti e controlli, il profilo delle curve appare diverso: il rapporto tra il livello di TNF- α secreto alle 4 ore e quello alle 8 ore ha un valore medio su-

Figura 3 - Cinetica di secrezione di TNF- α dopo stimolazione con LPS in cellule di pazienti e controlli. Le cellule sono state stimulate con LPS 100 ng/ml ed il surnatante recuperato ai tempi indicati in ascissa. Il livello di TNF- α è stato valutato mediante ELISA analizzando ogni campione in triplo e prendendone il valore medio. I profili delle cinetiche riportate in grafico sono stati ottenuti dalle medie (con indicazione dell'errore standard) dei livelli di citochina (in pg/ml per milione di cellule seminate) ottenuti a ciascun tempo per tutti i pazienti e controlli considerati nello studio.



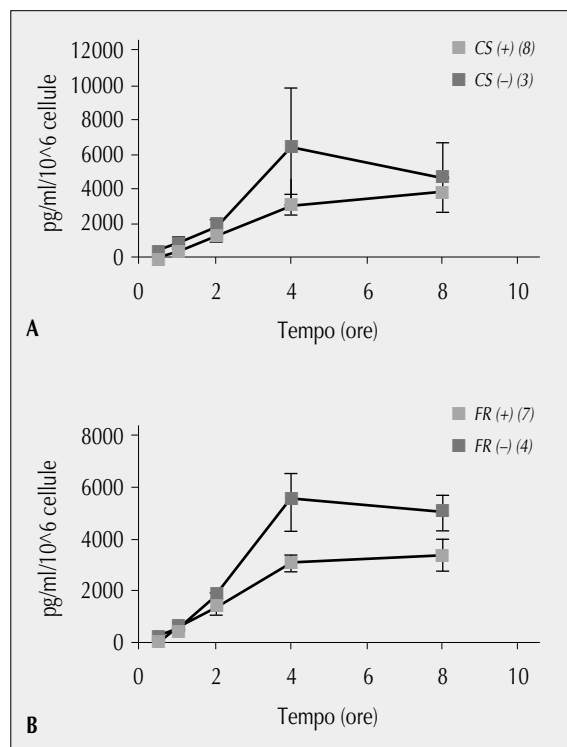


Figura 4 - Cinetica di secrezione di TNF- α dopo stimolazione con LPS nelle cellule dei pazienti distinti in: A) sotto trattamento (CS+) o meno (CS-) con cortisonici; B) FR positivi e FR negativi. Ogni punto delle curve rappresenta la media con l'indicazione dell'errore standard (ES).

periore a 1 nei pazienti (1 ± 0.3), inferiore a 1 nei controlli (0.8 ± 0.1). Distinguendo i pazienti sulla base dell'assunzione di cortisonici oppure separandoli in FR positivi e FR negativi, non si sono ri-

levate significative differenze né nell'AUC media, né nel profilo della cinetica (Fig. 4A e B). Ripetendo l'analisi della produzione di TNF- α nei pazienti dopo il 1° mese di terapia abbiamo osservato un netto cambiamento del profilo della cinetica che si presenta analoga a quella caratterizzante la popolazione di controllo (Fig. 5). Tale "normalizzazione" permane fino al 6° mese.

Tuttavia, analizzando globalmente i pazienti, né il rapporto TNF- α 4/8 ore, né il livello assoluto di TNF- α rilasciato nell'arco delle 8 ore (AUC), risultano significativamente diversi dai valori basali.

Sintesi di TNF- α e responsività alla terapia

Basalmente, prima della terapia, i pazienti rivelatisi in seguito responsivi al trattamento farmacologico (con una riduzione del DAS >1.2 e valore assoluto inferiore a 3.7 a 6 mesi), presentavano una cinetica quali-quantitativamente indistinguibile da quella riferita ai pazienti non responsivi. Tuttavia solo i pazienti responsivi (R) hanno omogeneamente dimostrato già dopo il 1° mese di trattamento una significativa inversione del profilo della cinetica, passando da un valore del rapporto TNF- α 4/8 ore di 1.1 ± 0.3 al basale ad un valore di 0.5 ± 0.3 al 1° mese ($p=0.026$) (Fig. 6). Tale inversione si mantiene inalterata fino al 6° mese (0.7 ± 0.1 , $p=0.0411$). Al contrario, nei pazienti non responsivi (NR) non c'è una significativa variazione dell'andamento della cinetica fino al 6° mese di osservazione. Uno dei pazienti NR è in realtà uscito dal protocollo dopo il 1° mese, per cui le considerazioni statistiche del basale versus 3° e 6° mese sono state effettuate per i soli 4 pazienti rimasti

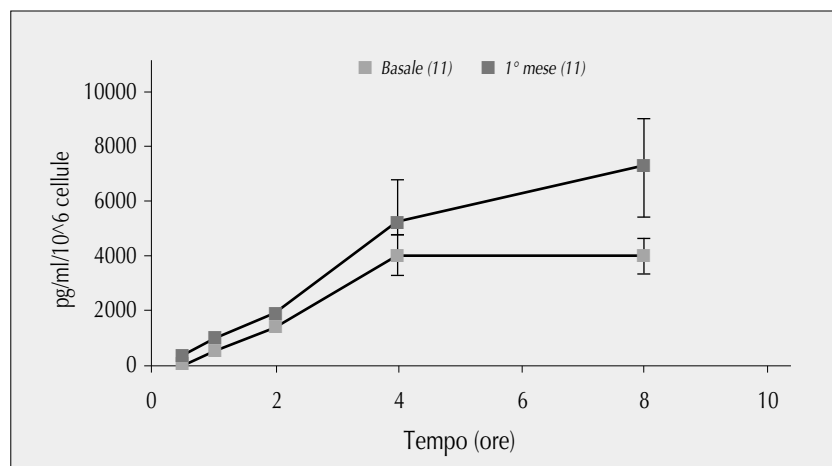
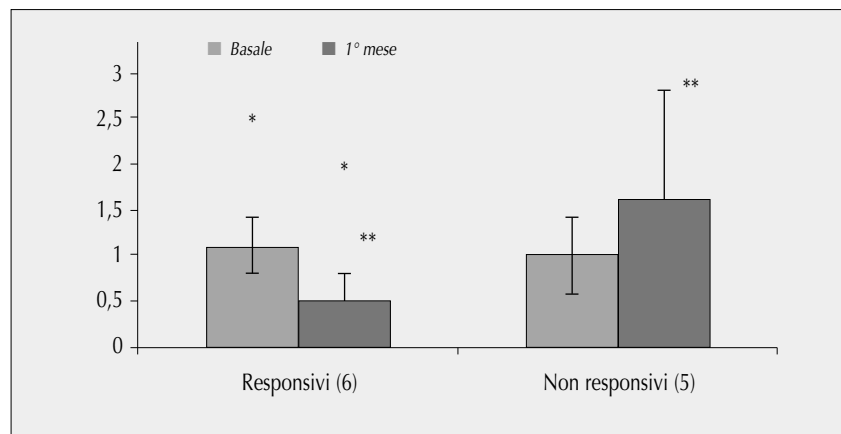


Figura 5 - Variazione del profilo della cinetica di rilascio del TNF- α da parte delle cellule dei pazienti prima (basale) e dopo il 1° mese di terapia. Ogni punto delle curve rappresenta la media con l'indicazione dell'ES.

Figura 6 - Variazione del rapporto TNF- α 4/8 ore tra basale e 1° mese in pazienti responsivi e non responsivi. Le colonne indicano il valore medio con l'ES. R basale (1.1 ± 0.3) versus R 1° mese (0.5 ± 0.3) * $p=0.026$; R 1° mese versus NR 1° mese (1.6 ± 1.2) ** $p=0.0043$.



in osservazione. In conclusione, già dopo il 1° mese di trattamento è possibile identificare i pazienti responsivi per la significativa inversione del profilo della cinetica di rilascio cellulare di TNF- α dopo LPS (0.5 ± 0.3 nei R versus 1.6 ± 1.2 nei NR; $p=0.0043$).

Analisi dell'espressione trascrizionale del TNF- α

L'analisi dei livelli e della modalità di induzione trascrizionale del TNF- α in seguito a stimolazione con LPS non ha portato a rilevare alcuna differenza né tra pazienti e controlli, né tra pazienti prima e dopo la terapia. In tutti i casi, l'induzione avviene nettamente tra i 30 e i 60 minuti, quindi l'espressione ritorna rapidamente ai valori iniziali entro le 4 ore (Fig. 7).

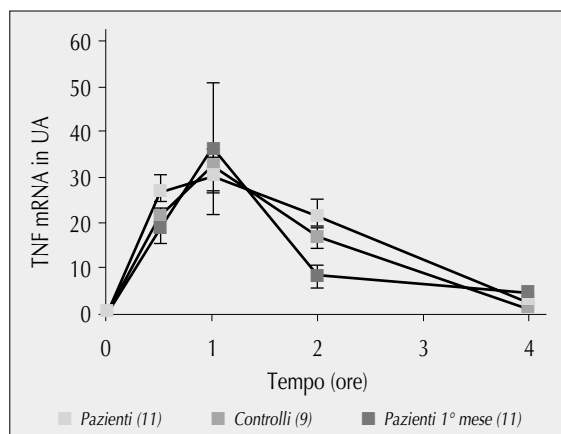


Figura 7 - Analisi dell'espressione molecolare del TNF- α . In ordinata è rappresentato il valore, in Unità Arbitrarie (UA), dell'espressione dell'mRNA del TNF- α . Ogni punto delle curve rappresenta la media (con ES) dei valori ottenuti nelle tre serie di soggetti indicati in legenda.

Modulazione dell'espressione dei fattori di regolazione post-trascrizionale dell'espressione del TNF- α

La stimolazione con LPS non ha dimostrato di indurre sostanziali modifiche nel livello di espressione basale (cellule non trattate) della HuR, che pertanto si comporta come un gene costitutivamente espresso dalla popolazione cellulare in esame (Fig. 8). Non abbiamo riscontrato nemmeno sostanziali differenze nei livelli di espressione tra pazienti e controlli, né tra pazienti al basale e dopo il 1° mese di terapia o ancora tra pazienti R e NR.

Al contrario, l'LPS si è dimostrato uno stimolo molto efficace nell'induzione rapida e netta dell'espressione della TTP tanto nei pazienti, quanto nei controlli, che raggiungono livelli compara-

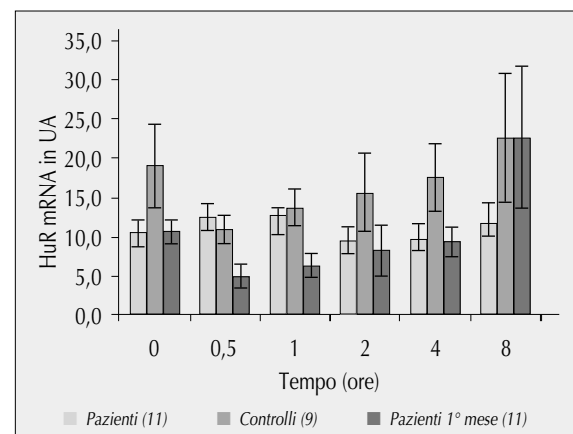


Figura 8 - Analisi dell'espressione molecolare della HuR. In ordinata è rappresentato il valore, in Unità Arbitrarie (UA), dell'espressione dell'mRNA della HuR. Ogni colonna rappresenta la media (con ES) dei valori ottenuti nelle tre serie di soggetti indicati in legenda.

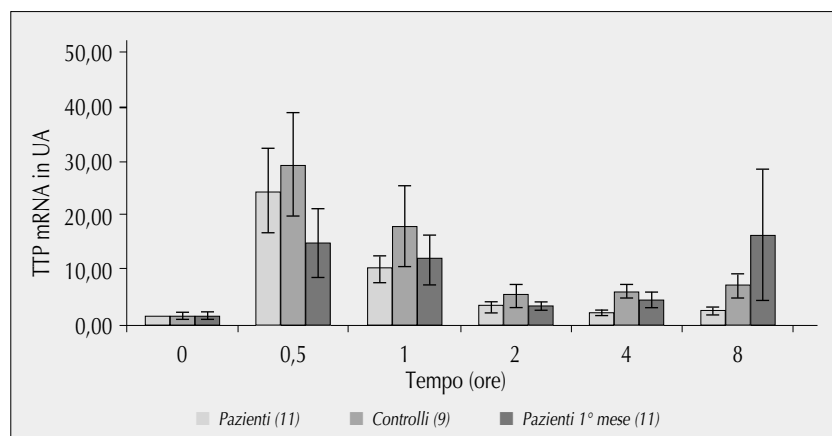


Figura 9 - Analisi dell'espressione molecolare della TTP: pazienti al basale versus controlli e versus pazienti al 1° mese. In ordinate è rappresentato il valore, in Unità Arbitrarie (UA), dell'espressione dell'mRNA della TTP. Ogni colonna rappresenta la media (con ES) dei valori ottenuti nelle tre serie di soggetti indicati in legenda. TTP 4 ore nei controlli 5.95 ± 3.75 UA versus 1.74 ± 1.66 UA nei pazienti al basale, $*p=0.0014$.

bili di espressione sia in termini assoluti che come incremento percentuale rispetto ai livelli misurati sulle cellule non stimolate (Fig. 9). Tuttavia è emersa una significativa differenza nei livelli di espressione alle 4 e 8 ore di incubazione con LPS: mentre nei pazienti la cinetica si esaurisce decrescendo progressivamente fino ai livelli basali, nei controlli permangono livelli circa 4 volte maggiori rispetto a quelli nelle cellule non stimolate. In particolare, controlli versus pazienti: 5.95 ± 3.75 unità arbitrarie (UA) versus 1.74 ± 1.66 UA alle 4 ore, $p=0.0014$ e 7.1 ± 6.5 UA versus 2.51 ± 0.89 UA alle 8 ore, $p=0.0632$.

Dopo il primo mese di terapia si assiste alla comparsa dell'induzione tardiva dell'espressione della TTP anche nei pazienti, più accentuata nei R rispetto ai NR, ma comunque presente in entrambi i casi. La comparsa dell'induzione tardiva non dipende dal tipo di terapia, c'è sia nei pazienti trattati con MTX che in quelli trattati con i biologici anti-TNF- α .

DISCUSSIONE

Il TNF- α è considerato da tempo una citochina chiave nel processo flogistico cronico dell'AR, tuttavia la revisione della più recente letteratura in merito alla regolazione della sintesi e del rilascio cellulare della citochina in pazienti con AR, non permette di trarre conclusioni definitive (8-12). Utilizzando un modello in vitro volto il più possibile a riprodurre condizioni "naturali" di stimolazione dell'immunità innata, quale può essere l'LPS su una popolazione monocito-linfocitaria molto simile a quella presente a livello sinoviale (23, 24), ci siamo proposti di contribuire alla definizione del

problema. Tuttavia l'analisi della cinetica della secrezione di TNF- α sotto stimolo con LPS non ci ha permesso di discriminare in modo netto tra i pazienti con artrite attiva, aggressiva e refrattaria alle comuni terapie con DMARDs ed i soggetti sani, né di identificare a priori i pazienti con una maggiore propensione a rispondere positivamente ai seguenti trattamenti terapeutici. La mancanza di significatività nella tendenza che tuttavia si rileva nei pazienti, ad una risposta più pronta dei controlli, indice di uno stato "preattivato" già indicato da alcuni autori (8), è da riferirsi sicuramente al limitato numero di soggetti considerati nello studio, ma anche e soprattutto all'elevata variabilità interindividuale nei livelli di TNF- α rilasciato tanto dalle cellule dei pazienti, quanto da quelle dei controlli. La secrezione di TNF- α misurata nel mezzo di coltura è il risultato di molteplici meccanismi di regolazione intracellulare a partire da quelli operanti a livello della trascrizione genica (27), fino a quelli responsabili della traduzione in proteina e delle successive modifiche post-trascrizionali (28), per concludere con il rilascio extracellulare del TNF- α per taglio enzimatico della porzione transmembrana (29). Come già descritto in precedenza in letteratura (27), anche nel nostro modello sperimentale lo step trascrizionale non sembra giocare un ruolo fondamentale nel determinare la sintesi finale della citochina. Più interessante è risultata invece la modulazione dell'espressione della TTP, la proteina chiave nella regolazione della stabilità dell'mRNA del TNF- α (14). Come precedentemente riportato da Carballo et al. (14), che ne avevano studiato la modulazione in colture primarie ottenute da midollo osseo murino, l'espressione della TTP viene rapidamente indotta dalla stimolazione con LPS sia nelle cellule dei pazienti,

che in quelle dei controlli, raggiungendo valori confrontabili sia in termini assoluti che come incremento percentuale rispetto alle cellule non trattate. Tuttavia nelle cellule dei controlli l'espressione si mantiene significativamente più elevata fino al termine del periodo osservazionale, come se un'ulteriore stimolo, indirettamente dipendente dal primario costituito dall'LPS, determinasse una seconda induzione dell'espressione genica. I dati della Carballo (14) indicano che lo stesso TNF- α sia in grado di indurre l'espressione della TTP. Così la mancanza nei pazienti di questo particolare profilo nella cinetica di espressione della TTP suggerisce un'alterazione non tanto nella via biochimica che conduce all'induzione trascrizionale subito a valle del recettore dell'LPS (30), quanto nel successivo probabile effetto autocrino esercitato dal TNF- α secreto su sé stesso al fine di spegnerne la sintesi, altrimenti dannosa per la cellula. Tale effetto a feed-back negativo sembrerebbe collegato alla modalità più o meno pronta, intensa e prolungata nel tempo con cui viene rilasciata la citochina, poiché la riacquisizione di una cinetica "normalizzata" di produzione di TNF- α dopo il 1° mese di trattamento è accompagnata dalla comparsa del secondo picco di induzione della TTP. Il netto cambiamento della cinetica di rilascio del TNF dopo il 1° mese di terapia, con particolare ri-

ferimento ai pazienti responsivi suggerisce che il resetting della modalità di risposta cellulare innata a livello sistemico possa condizionare l'esito degli eventi a livello locale, nella sinovia sede del danno flogistico-erosivo. Si può pertanto ipotizzare che i meccanismi alla base della precoce "normalizzazione" della risposta cellulare indotta con più frequenza dai biologici anti-TNF- α , ma anche dal solo MTX e prodromica di un più tardivo riscontro clinico, siano da imputare ad una ripresa del controllo post-trascrizionale della sintesi del TNF- α o meglio della capacità esercitata dalla stessa citochina di modulare a feed-back la stabilità del suo stesso messaggero attraverso l'induzione della proteina TTP. In tale contesto non sembra invece giocare un ruolo importante una delle maggiori antagoniste della TTP, la proteina HuR (17), la cui espressione, scarsamente influenzata dalla stimolazione con LPS ed ascrivibile perlopiù ad un gene costitutivo, non presenta differenze tra pazienti e controlli.

In conclusione indipendentemente dal tipo di farmaco utilizzato, la risposta terapeutica valutata a 6 mesi dall'inizio del trattamento, è preceduta dalla precoce "normalizzazione" del profilo della risposta cellulare innata a livello sistemico, dovuta almeno in parte, alla ripresa dei meccanismi autocrini di regolazione intracellulare della sintesi di TNF- α .

RIASSUNTO

Oggetto dello studio è stato l'analisi delle modalità di espressione, regolazione post-trascrizionale e secrezione del TNF- α indotta da lipopolisaccaride in cellule mononucleate del sangue periferico di pazienti con AR aggressiva arruolati in protocolli sperimentali comparanti agenti anti-TNF- α versus Methotrexate. Sebbene la cinetica di produzione del TNF- α non è risultata significativamente diversa tra pazienti (11) e controlli (9), la responsività valutata a 6 mesi dall'inizio della terapia si caratterizza precocemente (entro il 1° mese) per un resetting della risposta cellulare (netto cambiamento del profilo della cinetica di produzione del TNF- α e normalizzazione dell'espressione della Tristetraprolina, principale responsabile del controllo a feedback negativo della sintesi della citochina) a livello sistemico.

Parole chiave - TNF- α , artrite reumatoide, LPS, tristetraprolina, terapia anti-TNF.

Key words - TNF- α , rheumatoid arthritis, LPS, tristetraproline, anti-TNF therapy.

BIBLIOGRAFIA

1. Feldmann M, Brennan F, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol* 1996; 14: 397-440.
2. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1681-90.
3. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weaver AL, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 1997; 337: 141-7.
4. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, et al. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor Fc-fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving MTX. *N Engl J Med* 1999; 340: 253-9.
5. Lipsky PE, Van der Heijde DM, St Clair E., Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-tumor necrosis factor trial in Rheumatoid Arthritis with

- concomitant therapy study group. *N Engl J Med*, 2000; 343: 1594-602.
6. Tak PP, Taylor PC, Breedveld FC, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, et al. Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 41: 1258-65.
 7. Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor α and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1258-65.
 8. Triggiani M, Granata F, Oriente A, Gentile M, Petrali A, Balestrieri B, et al. Secretory phospholipase A2 induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur J Immunol* 2002; 32: 67-76.
 9. Swaak AJG, Van den Brink HG, Aarden LA. Cytokine production in whole blood cell cultures of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 693-95.
 10. Rodenburg RJ, Van den Hoogen FH, Van de Putte LB, Van Venroij WJ. Peripheral blood monocytes of rheumatoid arthritis patients do not express elevated TNF- α , IL1 β and IL8 mRNA levels. A comparison of monocyte isolation procedures. *J Immunol Methods* 1998; 221: 169-75.
 11. Verbruggen A, De Clerk LS, Bridts CH, Van Offel JF, Stevens WJ. Flow cytometrical determination of interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor- α in monocytes of rheumatoid arthritis patients: relation with parameters of osteoporosis. *Cytokine* 1999; 11:869-74.
 12. Leirisalo-Repo M, Paimela L, Jaatela M, Koskimies S, Repo H. Production of TNF by monocytes of patients with early RA is increased. *Scand J Rheumatol* 1995; 24: 366-71.
 13. Krakt M, Saklatvala J. Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* 2002; 20: 91-106.
 14. Carballo E, Lai WS, Blakeshear PJ. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor alpha production by tristetraprolin. *Science* 1998; 28: 1001-5.
 15. Carballo E, Gilkeson GS, Blakeshear PJ. Bone marrow transplantation reproduces the tristetraprolin-deficiency syndrome in recombination activating gene-2(-/-)mice: evidence that monocyte/macrophage progenitors may be responsible for TNF α overproduction. *J Clin Invest* 1997; 100: 986-95.
 16. Brooks SA, Connolly JE, Diegel RJ, Fava RA, Rigby WFC. Analysis of the function, expression and subcellular distribution of human tristetraprolin. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1362-70.
 17. Dean J, Wait R, Mahtani KR, Sully G, Clark AR, Saklatvala J. The 3' untranslated region of Tumor Necrosis Factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 721-730.
 18. Kedersha N, Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translability. *Biochemical Society Transactions* 2002; 30: 3-969.
 19. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of RA. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
 20. Ferraccioli G, Bartoli E. Xenobiotics or biological response modifiers? Methotrexate remains the anchor drug for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16:662-6.
 21. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, et al. Infliximab (chimeric anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomized phase III trial Attract study group. *Lancet* 1999; 354: 1932-9.
 22. van Gestel AM, Prevoe ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria in rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization (International League Against Rheumatism). *Arthritis Rheum* 1996; 39: 34-40.
 23. Andreakos ET, Foxwell BM, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2002; 13: 299-313.
 24. Tolusso B, Fabris M, Di Poi E, Assaloni R, Tomietto P, Ferraccioli GF. Response of mononuclear cells to lipopolysaccharide and CpG oligonucleotide stimulation: possible additive effect in rheumatoid inflammation. *Ann Rheum Dis* 2002; 62: 284-5.
 25. McCulloch RK, Choong CS, Hurley DM. An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 219-26.
 26. Suzuki T, Hashimoto S, Toyoda N, Nagai S, Yamazaki N, Dong HY, et al. Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE. *Blood* 2000; 96: 2584-91.
 27. Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA. Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor α by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1998; 273: 974-80.
 28. Rutault K, Hazzalin CA, Mahadevan LC. Combination of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate TNF α mRNA induction. Evidence for selective destabilization of TNF α transcripts. *J Biol Chem* 2001; 276: 6666-74.
 29. Mueller C, Corazza N, Trachsel-Loseth S, Eugster HP, Buhler-Jungo M, Brunner T, et al. Noncleavable Transmembrane mouse Tumor Necrosis Factor alpha mediates effects distinct from those of wild-type TNF-alpha in vitro and in vivo. *JBC* 1999; 274: 38112-8.
 30. Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun-N terminal kinase/ stress activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for LPS stimulation of TNF α translation: glucocorticoids inhibit TNF α translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6274-82.