

Poster P.11.88

METABOLIC REPROGRAMMING OF T REGULATORY CELLS AS THERAPEUTIC TOOL TO DAMPEN THE IMMUNO-INFLAMMATORY RESPONSE ASSOCIATED TO ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS AFFECTED BY FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA

Bonacina F.*^[2], Martini E.^[1], Cremonesi M.^[1], Kallikourdis M.^[1], Norata G.D.^[2]

^[1]IRCCS Humanitas Research Foundation ~ Rozzano ~ Italy, ^[2]Department of Excellence of Pharmacological and Biomolecular sciences, University of Milan ~ Milan ~ Italy

Familial Hypercholesterolaemia (FH) is a rare dominantly inherited condition due to mutations in the LDL Receptor (LDLR) gene and less frequently in apoB, PCSK9, STAP1 or LDLRAP1 genes. These mutations lead to impaired LDL clearance and increased plasma cholesterol levels that not only trigger LDL deposition in the skin and arteries, leading to extensive xanthomas formation and marked premature and progressive atherosclerotic disease, but also an immunoinflammatory response that contributes to atherosclerosis progression. Of note, even when LDL-C levels drop after intensive lipid lowering therapies, a latent inflammatory response may explain the residual CV risk observed in FH patients. Given the existing gap in the proper management of inflammation in these patients, this project aims at exploring a tailored immunotherapy of FH.

We have initially characterized lymphocyte T cells distribution in FH patients and age and sex matched controls by flow cytometry showing that FH patients present increased levels of Tregulatory cells (CD3/CD4/CD25high/CD127low/FOXP3+). Functional experiments, however, showed that Treg cells isolated from FH patients present a reduced ability in suppressing conventional Tcells proliferation compared to Treg cells from age and sex matched controls, thus pointing to a decreased immunosuppressive function of Treg and paving the road for testing strategies to increase Treg activity in FH patients. Indeed, decreasing the immuno-inflammatory response associated to the atherosclerotic plaque would dampen disease progression. Therefore, to gain tissue migration selectivity chemokine's signature was evaluated in the plaque of LDLR KO mice, the experimental model of FH. mRNA expression in WT and KO reveals that CX3CL1 is selectively expressed in the aorta of KO mice but not in other districts, suggesting that the ectopic expression of its matching CX3CR1 would drive Treg to the atherosclerotic plaque. Transduced CX3CR1 or ctrl WT Treg were injected in atherosclerotic KO mice. 24h after, CX3CR1-Treg were mainly detected in the aorta, while migration was limited and similar to that of ctrl-Treg in other districts, suggesting that the CX3CL1/CX3CR1 axis would represent a strategy to vehiculate Treg to the plaque. To evaluate the effect of engineered Treg on atherosclerosis progression, CX3CR1-Treg were adoptively transferred in LDLR KO mice after 4 additional weeks of WTD. Although levels of cholesterol were unchanged, treatment with CX3CR1-Treg significantly reduces plaque progression and lipid deposition, while ameliorates stability by increasing collagen and smooth muscle cells content.

Aim of the 2019 Telethon project is to explore whether metabolic reprogramming of FH Treg would reinstate their functions; this approach, together with genetic engineering with CX3CR1 expression, will be tested as a strategy to restore local immunosuppression in the atherosclerotic plaque thus limiting disease progression.

RIPROGRAMMAZIONE METABOLICA DI CELLULE T REGOLATORIE COME TRATTAMENTO DELLA RISPOSTA IMMUNO-INFIAMMATORIA ASSOCIATA ALL'ATEROSCLEROSI IN PAZIENTI AFFETTI DA IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

L'ipercolesterolemia familiare (FH) è dovuta a mutazioni nel gene LDLR e meno frequentemente nei

geni apoB, PCSK9 o LDLRAP1. Queste mutazioni portano alla compromissione dell'eliminazione delle LDL e all'aumento dei livelli plasmatici di colesterolo che non solo innescano la deposizione di LDL nelle arterie, portando a severa aterosclerosi, ma anche ad una eccessiva risposta immuno-infiammatoria che contribuisce alla progressione della malattia. Da notare che, anche quando i livelli di colesterolo scendono dopo terapia, la presenza di una risposta infiammatoria latente può spiegare il rischio cardiovascolare residuo osservato nei pazienti FH. Considerata la scarsa gestione dell'infiammazione in questi pazienti, questo progetto mira ad esplorare l'immunoterapia nell'FH.

I pazienti FH presentano livelli aumentati di cellule Tregolatorie circolanti rispetto a controlli di pari età e sesso. Esperimenti funzionali, tuttavia, dimostrano una ridotta capacità di sopprimere la proliferazione dei linfociti T convenzionali rispetto alle cellule Treg isolate dai controlli, indicando quindi una ridotta funzione immunosoppressiva che potrebbe contribuire all'infiammazione osservata in pazienti FH. Pertanto, ridurre la risposta immuno-infiammatoria associata alla placca aterosclerotica potrebbe rappresentare una strategia per limitare la malattia. Per indirizzare le Treg nella placca aterosclerotica è stata valutata l'espressione di una serie di citochine nella placca aterosclerotica dei topi LDLRKO, il modello sperimentale di FH. CX3CL1 è risultata selettivamente espressa nell'aorta di topi KO ma non in altri distretti, suggerendo che l'espressione ectopica del suo recettore, CX3CR1, consenta la selettiva localizzazione delle Treg nella placca. Treg over-esprimenti CX3CR1 rispetto a cellule controllo sono state iniettate in topi KO. 24 ore dopo l'iniezione, le Treg-CX3CR1+ sono state rilevate principalmente nell'aorta, mentre la migrazione era limitata e simile a quella delle Treg controllo in altri distretti, suggerendo che l'asse CX3CL1/CX3CR1 rappresenti una strategia per veicolare le Treg nella placca. Per valutare l'effetto sulla progressione dell'aterosclerosi, le Treg-CX3CR1+ sono state trasferite LDLRKO e dopo 4 settimane valutato il decorso della malattia. Sebbene i livelli di colesterolo siano rimasti invariati, il trattamento con le Treg-CX3CR1+ riduce significativamente la dimensione della placca e la deposizione di lipidi, mentre migliora la stabilità aumentando il contenuto di collagene e cellule muscolari lisce.

Scopo del progetto Telethon 2019 è testare la riprogrammazione metabolica e genetica delle Treg dei pazienti FH come strategia per indurre un'immunosoppressione locale nella placca aterosclerotica limitando così la progressione della malattia.

1. Geovanini GR, Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clin Sci (Lond)*. 2018 Jun 21;132(12):1243-1252. doi:10.1042/CS20180306. Print 2018 Jun 29.
2. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *European heart journal*. 2013;34:3478-3490a. doi: 10.1093/eurheartj/eh273
3. Yvan-Charvet L, Bonacina F, Guinamard RR, Norata GD. Immunometabolic function of cholesterol in cardiovascular disease and beyond. *Cardiovasc Res*. 2019 Jul 1;115(9):1393-1407. doi: 10.1093/cvr/cvz127.
4. Amanda C. Foks, Andrew H. Lichtman, Johan Kuiper. Treating Atherosclerosis with Regulatory T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Feb; 35(2): 280–287.
5. Galgani M, De Rosa V, La Cava A, Matarese G. Role of Metabolism in the Immunobiology of Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2016 Oct 1;197(7):2567-75. doi: 10.4049/jimmunol.1600242.

Ipercolesterolemia Familiare

Coordinator: Giuseppe Danilo Norata

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

Telethon Project (nr):

GGP19146

Disease Name:

Familial Hypercholesterolaemia

Keywords:

Hypercholesterolemia, Tregulatory cells, cell therapy