- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.217.116.183 Thu, 25 Apr 2024, 20:06:44

RECENTI PROGRESSI IN MEDICINA
Vol. 99, N. 5, Maggio 2008
Pagg. 271-278

RAGE: una nuova via pro-infiammatoria per le polmoniti interstiziali?

Ilaria Campo[1], Patrizia Morbini[2], Ernesto Pozzi[1], Maurizio Luisetti[1]

Riassunto. Le polmoniti interstiziali rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie respiratorie a causa nota o sconosciuta, nelle quali il danno alveolare viene seguito da fenomeni difensivi e riparativi a carattere sia pro-infiammatorio sia anti-infiammatorio. Si ipotizza che fattori comuni possano orchestrare questi eventi e RAGE (Receptor for Advanced Glucation End products) è uno dei possibili candidati. Vengono discusse le implicazioni legate alla via patogenetica ad esso collegata, in diverse patologie interstiziali.

Parole chiave. Diabete mellito, fibrosi polmonare idiopatica, malattia di Alzheimer, migrazione cellulare, patologie infiammatorie croniche, prodotti di glicazione avanzata, recettore RAGE, sarcoidosi, trasduzione del segnale.

Summary. *RAGE: a novel pro-inflammatory pathway for chronic respiratory disorders?*

Interstitial pneumonites represent a heterogeneous group of respiratory disorders with known causes or idiopathic, in which alveolar injury is followed by defense and repair mechanisms either with pro- and anti-inflammatory properties. It is hypotesized that common factors would orchestrate such events, and RAGE is one of possible such candidates. Implications connected to RAGE pathway in varying interstitial pneumonites are discussed.

Key words. Advanced glycation end-products, Alzheimer disease, cells migration, diabetes, idiopathic pulmonary fibrosis, inflammatory response, RAGE receptor, sarcoidosis, signal transduction.

Introduzione

Il termine di polmoniti interstiziali ha sostituito nella pratica clinica quello relativamente obsoleto di fibrosi polmonari, per definire un vasto ed eterogeneo gruppo di condizioni, sia a causa nota sia idiopatiche, caratterizzate, nel caso di mancata risoluzione, da un sovvertimento della architettura polmonare, con presenza di gradi variabili di infiammazione e fibrosi[1]. Una disamina analitica di tali condizioni va oltre le finalità di questo lavoro, nel cui contesto è sufficiente affermare che se le cause di danno polmonare sono moltissime, per limitarci solo a quelle conosciute, è altresì vero che le risposte protettive dei meccanismi di difesa polmonari sono relativamente stereotipate e conducono ad intricate interazioni fra fattori pro-infiammatori ed anti-infiammatori. Per questi motivi ci siamo interessati a RAGE (recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata), supponendo che risposte stereotipate possono derivare dal fatto di essere orchestrate in modo unitario.

RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products)

Il recettore RAGE è un una molecola di superficie appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline. RAGE si distingue da altri recettori per il carattere multi-ligando che gli consente di interagire con molecole diverse implicate nell'omeostasi, nello sviluppo e nell'infiammazione[2]. In particolare, sono stati identificati come ligandi di RAGE: i prodotti finali della glicazione avanzata (AGE), le S100-calgranuline, il peptide β-amiloide (Aβ) le anfoterine. Il legame di RAGE ai suoi ligandi non accelera la loro clearance o degradazione, al contrario dà inizio ad un periodo di sostenuta attivazione cellulare, mediata da un meccanismo di trasduzione del segnale recettore-dipendente, che può infine sfociare in attivazione cellulare cronica e danno tessutale[3].

Il gene RAGE nell'uomo si estende per 3080 bp ed è localizzato sul cromosoma 6, all'interno della classe III di HLA, in prossimità della zona di giunzione con la classe II.

[1]Clinica Malattie Apparato Respiratorio, Laboratorio di Biochimica e Genetica; [2]Istituto di Anatomia ed Istologia Polmonare, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università, Pavia.

Pervenuto il 20 dicembre 2007.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.217.116.183 Thu, 25 Apr 2024, 20:06:44

È noto che il gene RAGE viene trascritto a bassi livelli in numerosi di tipi cellulari quali: linfociti, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, fagociti mononucleati, neuroni, miociti cardiaci, epatociti, cellule dei gangli bipolari della retina. Tuttavia, in presenza dei suoi ligandi, la stimolazione cellulare mediata da RAGE determina un'aumentata espressione del recettore stesso; si viene così a delineare un "feedback loop" positivo, in cui l'interazione ligando-recettore incrementa l'espressione del recettore stesso a livello di membrana, amplificando in tal modo l'attivazione cellulare indotta da RAGE [4]. Questa situazione è l'opposto di quel che avviene con altri recettori, ad esempio il recettore per le LDL, dove aumentati livelli di ligando determinano una diminuzione di espressione del recettore[5].

Dal punto di vista clinico, l'attività di RAGE è stata associata a condizioni patologiche caratterizzate da infiammazione persistente, come diabete, Alzheimer e aterosclerosi[2] e, più recentemente, a malattie autoimmuni[6].

Struttura del recettore

RAGE è composto da tre domini. Il dominio N-terminale extracellulare, costituito da 332 aa, include tre regioni di tipo immunoglobulinico: una regione variabile V seguita da due regioni costanti C chiamate C e C'. Sebbene le regioni C e C' non leghino direttamente il ligando, esse hanno un ruolo fondamentale nello stabilizzare la regione V, al fine di mediare la sua interazione con il ligando. Vi sono poi un dominio idrofobico transmembrana di 21 aa ed una coda citosolica di 43 aa. La coda citosolica manca di motivi segnale (ad es. siti di fosforilazione, domini chinasici), ma è critica per l'attivazione cellulare RAGE-dipendente[3,7].

Esistono anche due isoforme circolanti di RAGE, le quali comprendono solo la porzione extracellulare che riconosce i ligandi e derivano o da splicing alternativo dell'mRNA (esRAGE)[8], oppure da clivaggio proteolitico dei domini C-terminali (sRAGE)[4]. Esperimenti condotti sull'uomo e su modelli animali hanno dimostrato che nel plasma sono già presenti quantità picomolari di queste isoforme, che sono in grado di antagonizzare l'effetto del recettore di membrana. Infatti è stato dimostrato che in presenza di eccesso di sRAGE, i ligandi si associano all'isoforma solubile e l'attivazione cellulare è abrogata, poiché il recettore di superficie rimane libero.

RAGE, pertanto, agisce come recettore di superficie coinvolto nella trasduzione del segnale; infatti tramite la sua porzione extracellulare media il legame dei ligandi alla membrana cellulare, mentre, grazie alla coda citosolica, è in grado di innescare un meccanismo di attivazione cellulare specifico.

RAGE ed infiammazione

Il ruolo di RAGE e dei suoi ligandi nel sostenere **la risposta infiammatoria** è stato ampiamente documentato [9,10] ed il danno tessutale mediato da RAGE e dai suoi ligandi è stato implicato in patologie infiammatorie croniche a carico di una moltitudine di organi diversi.

RAGE funge da recettore per polipeptidi appartenenti alla famiglia delle S100/calgranuline. Si tratta di proteine strettamente correlate, rilasciate da cellule attivate che mediano i processi infiammatori; tali cellule includono leucociti polimorfonucleati, fagociti mononucleati e linfociti. Il primo membro di questa famiglia ad essere identificato come ligando di RAGE è un polipeptide di 12kDa chiamato S100A12. Il legame di RAGE a S100A12 media l'attivazione delle cellule endoteliali, dei macrofagi e dei linfociti.

▶ Una caratteristica fondamentale delle S100/calgranuline è il loro accumulo ai siti di infiammazione cronica. Tuttavia i meccanismi mediante cui questi polipeptidi modulano il corso dei processi infiammatori non sono stati ancora ben chiariti.

Una peculiarità dei membri di questa famiglia è la mancanza di peptidi segnali, per cui hanno prontamente accesso allo spazio extracellulare e possono mediare tutta una serie di fenomeni infiammatori. La teoria più accreditata è che le S100/calgranuline rilasciate nello spazio extracellulare contribuiscano alla patogenesi della risposta infiammatoria mediante l'interazione con le cellule esprimenti RAGE sulla superficie. Inoltre queste molecole possono intervenire nei meccanismi di amplificazione della risposta infiammatoria, in quanto sono in grado di incrementare la produzione e la secrezione di molecole di adesione pro-infiammatorie, citochine e metalloproteinasi responsabili della distruzione dei tessuti. È stato ipotizzato[11] che il richiamo dei leucociti polimorfonucleati ai siti di infiammazione, in parte dovuto alla presenza delle S100/calgranuline che interagiscono con il recettore, inneschi i processi che portano alla formazione degli AGE ed in particolare degli addotti carbossimetil-lisina-proteina (CML-proteina). La continua generazione degli AGE può determinare una sostenuta espressione di mediatori pro-infiammatori, creando in tal modo un circolo vizioso di continuo richiamo e attivazione cellulare ai siti di infiammazione. Se i meccanismi di riparo dei tessuti non riescono ad arrestare questi segnali pro-infiammatori, la sostenuta attivazione cellulare mediata da RAGE può determinare lesione tessutale.

Dunque l'interazione di RAGE con le S100/Calgranuline gioca un ruolo fondamentale nella cascata di eventi che portano al fenomeno infiammatorio; inoltre l'accumulo delle S100/calgranuline ai loci infiammatori, mediato da RAGE, propaga la risposta dell'ospite perpetuando il reclutamento e l'attivazione degli effettori cellulari.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.217.116.183 Thu, 25 Apr 2024, 20:06:44

RAGE e diabete mellito

La biologia di RAGE e dei suoi ligandi è stata studiata in modo molto esteso nel diabete e nelle sue complicanze. Esistono diversi studi che confermano il ruolo prioritario svolto da RAGE nel diabete e nell'aterosclerosi[12]. **In particolare è stato dimostrato che le placche aterosclerotiche dei pazienti diabetici, rispetto ai soggetti non diabetici, presentano un'aumentata espressione di RAGE. Inoltre l'intensità di espressione di RAGE correla con i livelli di emoglobina glicata[13].**

RAGE è stato inizialmente descritto come recettore di superficie specifico per gli AGE, i prodotti della glicazione delle proteine o dei lipidi. Il reclutamento degli AGE mediato da RAGE, sulla superficie delle cellule endoteliali e dei fagociti mononucleati, è responsabile di una serie di effetti che includono riduzione dell'attività enzimatica, degradazione di proteine, danno agli acidi nucleici, induzione di quadri citotossici e determina perturbazioni cellulari che hanno importanti conseguenze per l'omeostasi vascolare. Quando le proteine glicate si legano a RAGE, i macrofagi sono stimolati a produrre citochine pro-infiammatorie (TNF, IL-1β, IL-6), fattori di crescita PDGF (platelet-derived growth factor) e IGF-IA (insulin-like growth factor-IA).

Sebbene gli AGE costituiscano un gruppo piuttosto eterogeneo di composti, gli addotti CML-proteina (carbossi-metil-lisina-proteina) sono gli AGE presenti in modo predominante e fungono da ligandi specifici di RAGE[14,15]; inoltre è stato dimostrato che tali ligandi sono aumentati a livello delle lesioni aterosclerotiche, specialmente nei pazienti diabetici[16].

▶ **Gli studi sulla biologia degli AGE hanno anche messo in luce l'esistenza di una stretta correlazione con lo stress ossidativo.** In particolare è stato sottolineato che in situazioni in cui il potenziale ossidoriduttivo è alterato in modo da favorire stress ossidativi, come per esempio nei siti infiammatori, la produzione degli AGE ed in particolare degli addotti CML-proteine è sostanzialmente aumentata [3,17,18]. Dunque lo stato di iperglicemia e di stress ossidativo, associato al diabete, può amplificare la produzione di specie biochimiche che si accumulano all'interno dei tessuti e stimolano l'attivazione cellulare.

L'interazione RAGE-ligando determina l'innesco di un meccanismo infiammatorio cronico, che contribuisce alla patogenesi delle complicazioni diabetiche. In tal modo vengono reclutati mediatori dell'infiammazione e molecole effettrici (ad esempio si nota un'espressione sostenuta di TNF, IL-1, IL-6 e metalloproteasi) che accelerano lo sviluppo di un danno tessutale. Queste considerazioni sono di fondamentale importanza, poiché suggeriscono l'idea che il blocco di RAGE possa costituire un valido approccio per contenere le complicanze del diabete.

RAGE e Alzheimer

Nell'Alzheimer, i depositi intracellulari ed extracellulari di proteine filamentose sono correlati con le disfunzioni neuronali che portano a demenza. Il peptide β-amiloide (Aβ) è il principale componente dei depositi extracellulari, a livello cerebrale, nei pazienti affetti da Alzheimer. Esso induce stress ossidativo che determina citotossicità e promuove l'attivazione della microglia, ma per esercitare questi effetti ha bisogno di legarsi a recettori specifici sulla superficie cellulare. È stato dimostrato che RAGE svolge anche la funzione di recettore per Aβ mediando da un lato la sua interazione con le cellule endoteliali e con i neuroni e dall'altro con la microglia. Tuttavia mentre i neuroni, dopo essere stati incubati con Aβ per periodi prolungati, vanno incontro a stress ossidativo ed apoptosi RAGE-dipendente, la microglia mostra una sostenuta attivazione cellulare a cui segue la produzione di citochine e mediatori della chemotassi[4,19].

L'interazione tra RAGE e Aβ a livello dei neuroni e della microglia nel sistema nervoso centrale è dunque correlata a sostenuta infiammazione, tossicità neuronale e morte cellulare. Inoltre, nell'Alzheimer l'espressione di RAGE aumenta a livello di neuroni, microglia e vasi sanguigni[20,21]. Considerando la correlazione tra la percentuale di microglia che esprime RAGE e le placche di Aβ è stato suggerito che un'elevata espressione di RAGE sulla microglia attivata può essere associata al progredire della malattia.

È importante notare che RAGE lega Aβ a livelli nanomolari (50-150 nM) e che a questi livelli le cellule esprimenti RAGE sulla membrana sono suscettibili agli effetti di Aβ.

È stato ipotizzato che basse concentrazioni di Aβ nelle prime fasi dell'Alzheimer rendano più rilevante il meccanismo recettore-dipendente. Quando i livelli di Aβ si innalzano con l'evolversi della patologia, la citotossicità non specifica, recettore-indipendente, diventa la modalità prevalente di perturbazione cellulare[22].

RAGE e tumori

Durante lo sviluppo embrionale, RAGE è espresso ad alti livelli nel sistema nervoso centrale. Qui le anfoterine (appartenenti alla famiglia delle proteine "High Mobility Group Box 1", HMGB-1), legandosi a RAGE, promuoverebbero la crescita del neurite. Tale effetto RAGE-dipendente suggerisce quindi una possibile funzione del recettore nelle interazioni cellula-matrice, durante l'embriogenesi del sistema nervoso.

Bisogna anche considerare il fatto che la presenza di RAGE in prossimità del neurite dove può reclutare anfoterina, suggerisce un ruolo potenziale del recettore nel mediare la migrazione cellulare.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.217.116.183 Thu, 25 Apr 2024, 20:06:44

A questo proposito è stato dimostrato che, in seguito all'interazione RAGE-anfoterina, viene innescato il pathway di trasduzione del segnale che porta all'attivazione delle due "piccole GTPasi" Cdc42 e Rac, le quali sono in grado di mediare il cambiamento di forma del citoscheletro e quindi risultano essere implicate nella migrazione cellulare. Cellule epiteliali trasformate (HEK293), trasfettate con il gene RAGE, hanno permesso di evidenziare che RAGE stimola l'adesione cellulare al collagene ed induce lo "spreading" cellulare[23]. Partendo da queste considerazioni, i ricercatori hanno iniziato a studiare la funzione di RAGE nella migrazione e nell'invasività delle cellule tumorali[4,24]. Per studiare la tumorigenesi e lo sviluppo di metastasi sono stati allestiti modelli murini sperimentali (rat C6 glioma cells e Lewis Lung model) ed in entrambi i casi le cellule tumorali esprimono sia RAGE che anfoterina[25]. Il principale effetto dell'interazione tra RAGE e anfoterina sembra essere la migrazione cellulare. Questi studi hanno anche evidenziato che il blocco di RAGE (mediante anticorpi anti-RAGE o sRAGE) correla con la formazione di tumori di piccole dimensioni e ben circoscritti. Al contrario, i tumori che sovra-esprimono RAGE crescono rapidamente ed invadono i tessuti circostanti molto efficacemente[26].

La potenziale implicazione di RAGE nella biologia dei tumori è tuttavia oggetto di risultati contrastanti: studi su cellule di neuroblastoma e melanoma hanno mostrato che in questi tumori il legame di anfoterina a RAGE inibisce la migrazione transendoteliale delle cellule neoplastiche e la formazione di metastasi[27].

Anche i risultati degli studi in *vivo* non sono univoci: mediante studi di immunoblotting è stata dimostrata la presenza di alti livelli di RAGE in molti tipi tumorali (carcinoma mammario, tumore di colon, rene, stomaco), rispetto alla controparte tessutale normale[25]. Inoltre, nei carcinomi gastrico[28], colorettale[29] e della prostata[30] la sovraregolazione di RAGE è strettamente associata all'invasività tumorale. Al contrario, nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) è stato dimostrato che l'espressione di RAGE è fortemente ridotta rispetto al tessuto polmonare normale e che il livello di RAGE correla inversamente con lo stadio della neoplasia. Linee cellulari di carcinoma polmonare in cui è stata indotta sovraespressione di RAGE mostrano un ridotto potenziale proliferativo[31].

La ragione di questo effetto diametralmente opposto di RAGE in diversi tipi tumorali è ancora oggetto di studio, e potrebbe in parte dipendere dal quadro di espressione della variante di "splicing" secretoria di RAGE (esRAGE) nei diversi tipi cellulari. Recentemente uno studio condotto su pazienti con carcinoma NSCLC ha dimostrato che l'espressione di esRAGE, in grado di antagonizzare gli effetti mediati dal recettore di membrana, era ridotta o assente nel 75% dei soggetti e la sua assenza correlava con una prognosi peggiore[32].

RAGE e malattie respiratorie

Il polmone è stato identificato inizialmente come l'organo in cui RAGE è prodotto a livello maggiore[7].

L'identificazione delle cellule responsabili della produzione di RAGE nel polmone è tuttora controversa, in parte a causa delle diverse specie investigate (ratto, bovino, topo, uomo) ed in parte a causa delle diverse metodiche di analisi impiegate. Per quanto riguarda l'uomo, l'espressione di RAGE è stata identificata immunoistochimicamente nei pneumociti di tipo II e nei macrofagi, nel polmone sano[33]. Tuttavia, in pazienti con danno polmonare acuto gli elevati livelli di RAGE nel fluido endoalveolare hanno portato Uchida e collaboratori[34] a ipotizzare che RAGE sia espresso preferenzialmente nei pneumociti di tipo I.

■ Il nostro gruppo ha recentemente documentato con tecniche di immunoistochimica che, in condizioni normali, RAGE è espresso a bassi livelli in: epiteli bronchiolari, pneumociti di tipo II, endotelio e macrofagi. In condizioni patologiche associate ad infiammazione e danno polmonare (polmonite post-ostruttiva, malattie granulomatose, fibrosi polmonare, malattie correlate al fumo di sigaretta) si assiste invece ad un aumento nell'espressione di RAGE[35] (figura 1).

Per quanto riguarda **la bronchite cronica da fumo**, è stato osservato che, mentre nel polmone normale RAGE e addotti CML-proteine sono espressi debolmente a livello degli epiteli ciliati bronchiali e bronchiolari, nei fumatori aumentano marcatamente sia il numero di cellule immunoreattive per RAGE e addotti CML-proteine sia l'intensità di espressione. Dato che il fumo di sigaretta è associato a danno ossidativo nelle cellule delle vie respiratorie, è possibile che a livello di epiteli bronchiali/bronchiolari esso guidi la produzione di AGE (con successiva attivazione di RAGE) e la sintesi di citochine. Ulteriori studi sono però necessari per chiarire l'associazione di RAGE con il fumo di sigaretta.

▶ Il ruolo potenziale di RAGE e dei suoi ligandi nella **fibrosi polmonare** sembra particolarmente interessante. Nel nostro studio[35] abbiamo dimostrato che, in soggetti con fibrosi polmonare idiopatica associata ad un quaro istopatologico di UIP (Usual Interstitial Pneumonia), RAGE e addotti CML-proteine appaiono intensamente espressi a livello dei pneumociti reattivi, nell'epitelio bronchiolare e nell'endotelio. Gli addotti CML-proteine e in minor misura RAGE sono presenti anche nel fluido alveolare. Inoltre è stata osservata reattività per RAGE e addotti CML-proteine nei foci fibroblastici, che sono considerate le lesioni "attive" della UIP sia a livello di cellule epiteliali che di fibroblasti. Uno studio precedente[36] aveva già documentato la presenza di AGE nei macrofagi e negli epiteli iperplastici di polmoni con UIP ma non nei controlli sani. Gli autori suggerivano pertanto che l'attivazione dei macrofagi, mediata dagli AGE attraverso il legame con specifici recettori, potesse svolgere un ruolo importante nel processo fibrogenico.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.217.116.183 Thu, 25 Apr 2024, 20:06:44

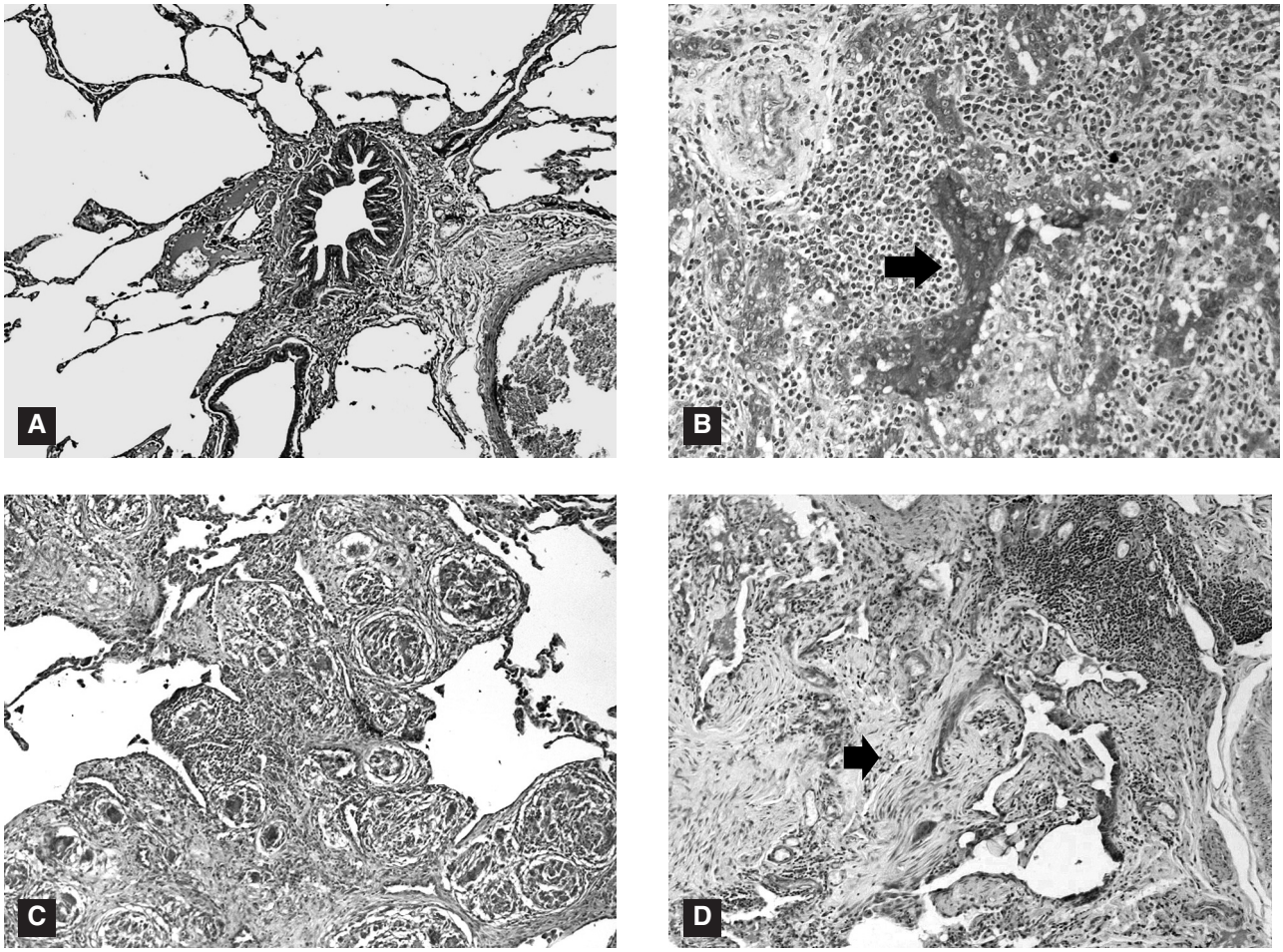

Figura 1. A, polmone normale: modesta espressione di RAGE a livello degli epiteli bronchiali. B, flogosi polmonare post-ostruttiva: la freccia evidenzia l'intensa espressione di RAGE a livello degli epiteli alveolari iperplastici in stretto contatto con gli infiltrati infiammatori. C, sarcoidosi polmonare: espressione di RAGE negli istiociti epitelioidi e nelle cellule giganti che formano i granulomi. D, fibrosi polmonare idiopatica/polmonite interstiziale usuale: RAGE risulta espresso sia negli epiteli alveolari iperplastici, sia nelle cellule connettivali dei foci fibroblastici, evidenziati dalla freccia.

Infatti, l'attivazione di RAGE stimola i macrofagi a produrre citochine e fattori di crescita, come TNF, IL-1 e PDGF e mediatori dello stress ossidativo. Il nostro studio conferma queste ipotesi, dimostrando che nella fibrosi polmonare AGE e RAGE sono co-espressi non solo nelle cellule infiammatorie ma anche nelle cellule epiteliali reattive e nei fibroblasti; inoltre dimostra che i ligandi di RAGE appartenenti alla famiglia delle S100/calgranuline sono presenti contemporaneamente in diverse popolazioni di cellule infiammatorie e non.

Come conseguenza di un anomalo stress ossidativo, chiaramente documentato nel polmone con UIP, si assiste dunque alla produzione di AGE ed al loro legame con RAGE. Questo può essere considerato come un potenziale meccanismo di attivazione cellulare che guida il danno tessutale e la fibrogenesi. In accordo con questa ipotesi, NFkB, che viene prodotto in seguito all'attivazione cellulare mediata da RAGE, possiede un sito di legame specifico a livello del promotore del TGF-β, il quale è considerato un mediatore chiave nella fibrosi polmonare (figura 2 a pagina seguente). Inoltre, secondo recenti teorie, il TGF-β svolge un ruolo prioritario nel processo di transizione epitelio mesenchimale (EMT), mediante il quale i pneumociti di tipo II, proprio in seguito a stimolazione con TGF-β, sarebbero indotti a differenziarsi in miofibrolasti, assumendone le caratteristiche fenotipiche e portando alla comparsa dei foci fibroblastici.

L'importanza di RAGE nella fibrosi polmonare è stata ulteriormente confermata da un recente studio condotto su modello murino di fibrosi indotta da bleomicina[37]. In questo studio viene paragonata la risposta infiammatoria iniziale e quella fibrotica tardiva in topi RAGE-deficitari (RAGE -/-) e topi wild-type (C57BL/6). La somministrazione di bleomicina ai topi wild-type causa una polmonite iniziale che evolve in fibrosi.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.217.116.183 Thu, 25 Apr 2024, 20:06:44

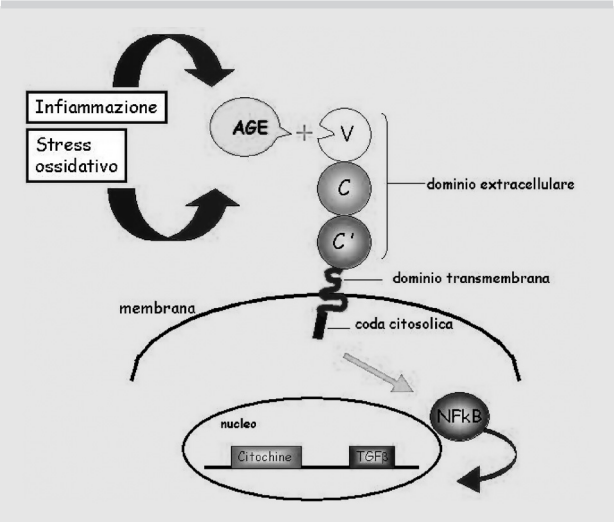

Figura 2. Come conseguenza dello stress ossidativo associato ad infiammazione polmonare, si ha produzione di AGE ed il loro legame a RAGE. Questo può essere considerato un potenziale meccanismo fibrogenetico. Infatti, in seguito all'attivazione cellulare mediata da RAGE, NFkB trasloca nel nucleo dove si può legare al gene del TGF-β, inducendone la trascrizione. Inoltre molte citochine indotte dall'attivazione cellulare mediata da RAGE possiedono un ruolo pro-fibrotico nei polmoni.

Al contrario, i topi RAGE -/- sviluppano una risposta infiammatoria iniziale simile, ma sembrano essere protetti dall'effetto fibrotico tardivo indotto dalla bleomicina. L'effetto protettivo osservato nei topi RAGE -/- è accompagnato da livelli polmonari ridotti di TGF-β e PDGF. La somministrazione di bleomicina induce anche la produzione di HMGB-1 da parte delle cellule infiammatorie accumulate negli spazi alveolari. Gli autori dimostrano che nei topi wild-type la presenza di HMGB-1 è in grado di indurre EMT nelle cellule epiteliali alveolari di tipo II, mentre questo non avviene nei topi RAGE -/-. Inoltre, la somministrazione di bleomicina induce la sintesi di citochine pro-infiammatorie (TGF-β e PDGF) solo nei topi wild-type.

▶ L'espressione di RAGE è stata osservata anche nei pneumociti e negli epiteli alveolari associati ad infiltrati infiammatori ed in particolare nella **sarcoidosi**. Questo risultato è stato ulteriormente approfondito in un lavoro successivo del nostro gruppo[38], in cui l'espressione di RAGE è stata documentata negli istiociti epiteliodi e nelle cellule multinucleate giganti che costituiscono i granulomi sarcoidi. La presenza di RAGE si associa a quella dei suoi ligandi, i quali risultano essere co-espressi nel granuloma. In particolare è stata osservata un'associazione tra il grado di espressione di RAGE e quello di S100A12, che porterebbe a suggerire un ruolo predominante di tale ligando nel mediare gli effetti dell'attivazione cellulare, indotta da RAGE nella sarcoidosi. Questo risultato sembra particolarmente interessante se inserito nel contesto infiammatorio che sottende alla formazione del granuloma, in quanto è noto che S100A12 ed S100B, via RAGE, sono in grado di indurre l'attivazione di cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, monociti e linfociti T, determinando la sintesi di citochine pro-infiammatorie e molecole di adesione[9]. Inoltre l'interazione di RAGE con le S100/calgranuline determina l'attivazione di NF-kB, la quale è essenziale per l'espressione di geni che intervengono nella risposta infiammatoria, come VCAM-1 e ICAM-1. Il rilascio di S100/calgranuline nei siti di infiammazione provoca anche l'attivazione dei fagociti mononucleati, determinando un'aumentata produzione di IL-1β e TNF, e la proliferazione dei linfociti con sintesi di IL-2[26].

L'analisi dell'espressione di RAGE nella sarcoidosi ha evidenziato che l'intensità di espressione di RAGE varia in modo interindividuale. È stata pertanto avanzata l'ipotesi che la predisposizione genetica potesse essere responsabile di questa variabilità. In particolare ci siamo interessati allo studio della mutazione puntiforme -374 T/A (rs1800624), che per la sua posizione all'interno del promotore di RAGE poteva essere coinvolta nella regolazione della trascrizione genica. In effetti, i nostri esperimenti, condotti mediante immunocitochimica e real-time PCR su cellule mononucleate di sangue periferico, sembrano indicare una possibile associazione tra il genotipo omozigote TT e livelli più alti di trascritto, sebbene lo studio immunoistochimico sui campioni bioptici indichi che probabilmente il polimorfismo in questione non è il principale fattore regolatore dell'espressione genica.

Va a questo proposito ricordato che a tutt'oggi gli studi genetici condotti per provare una forte associazione tra la regione HLA e la sarcoidosi hanno prodotto risultati spesso contrastanti.

L'eccezione può essere rappresentata da un lavoro pubblicato da Schurmann e collaboratori [39] in cui è stato effettuato uno studio di segregazione e di linkage genomico, mediante analisi di microsatelliti su 55 famiglie, con 122 soggetti affetti da sarcoidosi. I risultati di questo lavoro suggeriscono un forte linkage per un marcatore nelle vicinanze del cluster di geni HLA di classe II, più precisamente situato al confine tra la classe II e la classe III. Poiché la regione genomica interessata è la stessa in cui mappa RAGE, abbiamo esteso le nostre indagini al ruolo di RAGE come possibile fattore di rischio per la sarcoidosi ed in effetti abbiamo osservato che la frequenza dell'allele -374 T è significativamente maggiore nei pazienti affetti da sarcoidosi (70%) rispetto ai controlli sani (56%). Dunque la presenza dell'allele -374 T, potenzialmente correlabile ad una sovra-espressione di RAGE, potrebbe rappresentare un meccanismo intrinseco per perpetuare la risposta infiammatoria a livello del granuloma, nella sarcoidosi.

Considerazioni conclusive

Alla luce di questi studi, è possibile affermare che la via infiammatoria correlata a RAGE ed ai suoi ligandi non è peculiare di una singola patologia respiratoria; piuttosto può essere vista come una meccanismo non-specifico di infiammazione del tessuto polmonare. Le possibili implicazioni terapeutiche di queste osservazioni, per quanto agli albori, appaiono promettenti in via teorica.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.217.116.183 Thu, 25 Apr 2024, 20:06:44

È stato infatti dimostrato che l'inibizione di RAGE mediante somministrazione di anticorpi anti-RAGE o dell'isoforma solubile sRAGE, sopprime l'infiammazione in modelli sia acuti che cronici[40].

Inoltre, nei modelli murini, la somministrazione di sRAGE diminuisce l'infiltrazione da parte di cellule immuni/infiammatorie. Si aprono quindi nuove prospettive terapeutiche nel campo delle malattie respiratorie, individuando RAGE ed i suoi ligandi come target per contrastare il processo infiammatorio.

Bibliografia

1. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch III JP, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Annu Rev Med 2004; 55: 395-417.
2. Schmidt AM, Stern DM. Receptor for age (RAGE) is a gene within the major histocompatibility class III region: implications for host response mechanisms in homeostasis and chronic disease. Front Biosci 2001; 6: 1151-60.
3. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. Circ Res 1999; 84: 489-97.
4. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. Biochim Biophys Acta 2000; 1498: 99-111.
5. Herz J, Willnow TE. Lipoprotein and receptor interactions in vivo. Curr Opin Lipidol 1995; 6: 97-104.
6. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Makino H. Increased expression of receptor for advanced glycation end products by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2006; 54:
7. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. J Biol Chem 1992; 267: 14998-15004.
8. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, et aò. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. Biochem J 2003; 370: 1097-109.
9. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. Cell 1999; 97: 889-901.
10. Herold K, Moser B, Chen Y, Zeng S, Yan SF, Ramasamy R, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone awry in the primal response to stress. J Leukoc Biol 2007; 82: 204-12.
11. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. Circulation 2002; 105: 816-22.
12. Schmidt AM, Stern D. Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. Curr Atheroscler Rep 2000; 2: 430-6.
13. Cipollone F, Iezzi A, Fazia M, Zucchelli M, Pini B, Cuccurullo C, et al. The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. Circulation 2003; 108: 1070-7.
14. Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. Biochemistry 1995; 34: 10872-8.
15. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S,et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. J Biol Chem 1999; 274: 31740-9.
16. Naka Y, Bucciarelli LG, Wendt T, Lee LK, Rong LL, Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE axis: animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 1342-9.
17. Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. J Clin Invest 1999; 104: 103-13.
18. Nagai R, Unno Y, Hayashi MC, Masuda S, Hayase F, Kinae N, Horiuchi S. Peroxynitrite induces formation of N^{ε}-(carboxymethyl)lysine by the cleavage of amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose: novel pathways for protein modification by peroxynitrite. Diabetes 2002; 51: 2833-9.
19. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. Nature 1996; 22: 685-91.
20. Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, Duncan JA 3rd, Silverberg GD, Miller MC, et al. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol 2006; 112: 405-15.
21. Lue LF, Walker DG, Brachova L, Beach TG, Rogers J, Schmidt AM, Stern DM, Yan SD. Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. Exp Neurol 2001; 171: 29-45.
22. Yan SD, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Tourtellotte WW, et al. Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation end product interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 5296-301.
23. Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. Cell Tissue Res 2006; 323: 475-88.
24. Parkkinen J, Raulo E, Merenmies J, Nolo R, Kajander EO, Baumann M, Rauvala H. Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides. Enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation. J Biol Chem 1993; 268:19726-38.
25. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. Nature 2000; 405: 354-60.
26. Stern D, Du Yan S, Fang Yan S, Marie Schmidt A. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. Adv Drug Deliv Rev 2002; 54: 1615-25.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.217.116.183 Thu, 25 Apr 2024, 20:06:44

27. Huttunen HJ, Fages C, Kuja-Panula J, Ridley AJ, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. Cancer Res 2002; 62: 4805-811.
28. Kuniyasu H, Oue N, Wakikawa A, Shigeishi H, Matsutani N, Kuraoka K, et al. Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. J Pathol 2002; 196: 163-70.
29. Sasahira T, Akama Y, Fujii K, Kuniyasu H. Expression of receptor for advanced glycation end products and HMGB1/amphoterinin colorectal adenomas. Virchows Arch 2005; 446: 411-5.
30. Ishiguro H, Nakaigawa N, Miyoshi Y, Fujinami K, Kubota Y, Uemura H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin are overexpressed and associated with prostate cancer development. Prostate 2005; 64: 92-100.
31. Bartling B, Hofmann HS, Weigle B, Silber RE, Simm A. Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. Carcinogenesis 2005; 26: 293-301.
32. Kobayashi S, Kubo H, Suzuki T, Ishizawa K, Yamada M, He M, et al. Endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in non-small cell lung carcinoma. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175: 184-9.
33. Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, Shinohara H, Sakurai S, Yonekura H, et al. Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. Mod Pathol 2005; 18: 1385-96.
34. Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, Kojima K, Hata Y, Makita K, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173: 1008-15.
35. Morbini P, Villa C, Campo I, Zorzetto M, Inghilleri S, Luisetti M. The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease? Mod Pathol 2006; 19: 1437-45.
36. Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, Fukayama M, Nagai R, Horiuchi S, Ouchi Y. Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. J Clin Pathol 1998; 51: 515-9.
37. He M, Kubo H, Ishizawa K, Hegab AE, Yamamoto Y, Yamamoto H, Yamaya M. The role of the receptor for advanced glycation end-products in lung fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007; 293 L1427-L1436
38. Campo I, Morbini P, Zorzetto M, Tinelli C, Brunetta E, Villa C, et al. Expression of receptor for advanced glycation end products in sarcoid granulomas. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175: 498-506.
39. Schürmann M, Lympany PA, Reichel P, Müller-Myhsok B, Wurm K, Schlaak M, et al. Familial sarcoidosis is linked to the major histocompatibility complex region. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162: 861-4.
40. Hudson BI, Bucciarelli LG, Wendt T, Sakaguchi T, Lalla E, Qu W, et al. Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders. Arch Biochem Biophys 2003; 419:80-8.

Indirizzo per la corrispondenza:
Dott. Maurizio Luisetti
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo
Clinica Malattie Apparato Respiratorio
Università di Pavia
Piazza Golgi, 19
27100 Pavia