

Dottoranda: Elisabetta Catalani

Università degli Studi della Tuscia di Viterbo

Dipartimento di Scienze Ambientali

Dottorato di Ricerca in GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE, XX ciclo

Titolo della tesi sperimentale: “ISCHEMIA RETINICA: STUDI MORFOLOGICI E FUNZIONALI”

Settore disciplinare BIO/09

Coordinatore: Prof. Giorgio Pranterà

Tutore: Prof. Giovanni Casini

Abstract

L'ischemia è la principale causa di morte neuronale in retine colpite da patologie. I tipi di recettori di neurotrasmettitori e di neuropeptidi espressi dai neuroni retinici potrebbero determinare la risposta di questi stessi al danno ischemico. Un nuovo modello di ischemia retinica nel topo è stato utilizzato per studiare la risposta all'ischemia da parte di retine con un'alterata espressione dei recettori della somatostatina (SRIF). In questo studio sono state utilizzate retine knock out (KO) per il recettore sst1 della SRIF, nelle quali il recettore sst2 è sovra-espresso e più funzionale, e retine sst2 KO. L'analisi TUNEL effettuata su retine ischemiche ha mostrato una marcata riduzione della morte cellulare in retine sst1 KO rispetto a retine wild-type (WT) mentre nessuna differenza è stata osservata in retine sst2 KO. Anche l'espressione dell'mRNA relativo alla caspasi-3 risulta minore nelle retine sst1 KO rispetto al WT. L'analisi immunoistochimica ha mostrato che differenti popolazioni cellulari rispondono diversamente all'insulto ischemico e che la marcatura relativa ad alcuni marker immunoistochimici persiste maggiormente nelle retine sst1 KO che nel WT o nelle retine sst2 KO. In particolare, le cellule bipolari dei bastoncelli mostrano una particolare resistenza al danno ischemico nelle retine sst1 KO, mentre la loro sopravvivenza diminuisce notevolmente nelle retine sst2 KO. Inoltre, in accordo con le osservazioni circa il ruolo che l'eccito-tossicità da glutammato esercita nell'indurre morte neurale in condizioni di ischemia, il rilascio di glutammato aumenta notevolmente in condizioni ischemiche, ma esso aumenta in misura nettamente inferiore in retine sst1 KO. Queste osservazioni dimostrano che la sovra-espressione dei recettori sst2 protegge la retina dall'ischemia e supportano l'idea dell'uso di analoghi dei recettori sst2 come agenti terapeutici in malattie retiniche come ad esempio il

glaucoma o la retinopatia diabetica. Sulla base di queste evidenze, abbiamo verificato l'ipotesi che la stimolazione dei recettori sst2 con ligandi esogeni potesse garantire maggiore protezione nei confronti dell'insulto ischemico. Retine WT ed sst1 KO, sono state incubate in vitro per 1h in una soluzione ischemica contenente 10^{-5} M di SRIF o di octreotide (un agonista dei recettori sst₂) o di SOM230 (un analogo della SRIF). Come ci si aspettava, in assenza di trattamento farmacologico la morte cellulare risulta ridotta in retine ischemiche sst1 KO rispetto a retine ischemiche WT. Inoltre, la SRIF, l'octreotide o la SOM230, in retine ischemiche WT, riducono la morte cellulare. Sorprendentemente, però, nelle retine sst1 KO, questi trattamenti fanno aumentare la morte cellulare invece di conferire maggiore protezione ai neuroni retinici come era atteso. I nostri dati indicano che, sebbene i recettori sst2 attivati conferiscano protezione alle retine ischemiche, esistono dei limiti a tali effetti che possono essere anche dannosi. Questi limiti possono essere dovuti alla desensitizzazione dei recettori o a modulazione delle vie di trasduzione. I recettori sst2, come gli altri recettori della SRIF, sono recettori accoppiati a proteine G, quindi sono state studiate molecole che regolano l'attività di proteine G in retine ischemiche WT ed sst1 KO. In particolare, è stata studiata l'espressione dell'mRNA di proteine GRK (G protein-coupled receptor kinases) ed RGS (regulators of G protein signaling) in retine WT o sst1 KO normali ed ischemiche dopo trattamento farmacologico. Le retine WT esprimono i sottotipi GRK1 e GRK2, RGS1, RGS2, RGS5 ed RGS9. In seguito ad ischemia le proteine GRK1 ed RGS1 mostrano un significativo aumento della loro espressione, quindi l'espressione di queste due molecole è stata studiata in retine ischemiche trattate con octreotide. L'espressione dell'mRNA per le proteine GRK1 ed RGS1 in retine ischemiche WT trattate con octreotide risulta significativamente inferiore rispetto a quella osservata in retine ischemiche WT non trattate. In retine ischemiche sst1 KO trattate con octreotide è stata osservata una diminuzione dell'espressione dell'mRNA per le proteine GRK1 simile a quella osservata nel WT sebbene i livelli di espressione dell'mRNA per le proteine RGS1 rimanga pressochè invariata rispetto alle retine ischemiche sst1 KO non trattate. La persistenza di livelli elevati di espressione di fattori regolatori in retine sst1 KO trattate con octreotide potrebbe inibire la risposta dei recettori sst2 e potrebbe essere responsabile, almeno in parte, degli effetti dannosi dell'octreotide osservati in retine ischemiche sst1 KO.

L'ipossia è la causa primaria dell'ischemia retinica ed inoltre provoca una risposta neoangiogenetica responsabile di serie patologie retiniche. Dati recenti indicano che la

neoangiogenesi è contrastata dalla SRIF attraverso i suoi recettori sst2. Utilizzando un modello in vivo di ipossia nel topo, abbiamo verificato l'ipotesi che l'adenilato-ciclastasi (AC) sia coinvolta nelle azioni anti-angiogeniche della SRIF. L'ipossia induce l'aumento dei livelli di AC nelle retine WT ed in quelle in cui manca il recettore sst2, ma non nelle retine che sovra-esprimono i recettori sst2. L'ipossia modifica anche l'espressione delle isoforme dell'AC ma in differenti misure a seconda dell'espressione dei recettori sst2. Tra le nove isoforme dell'AC, l'espressione dell'mRNA dell'isoforma AC VII aumenta significativamente nelle retine WT e nelle retine sst2 KO ma non nelle retine sst1 KO. Questi dati suggeriscono un coinvolgimento del sistema AC/cAMP nella mediazione sia della neoangiogenesi retinica dovuta ad ipossia che dell'azione protettiva della SRIF. Inoltre, l'isoforma AC VII sembra essere coinvolta in questi importanti effetti.

In conclusione questi studi contribuiscono ad ampliare le conoscenze sugli effetti esercitati dalla SRIF in malattie della retina e supportano l'uso farmacologico della SRIF o di suoi analoghi nel trattamento di patologie retiniche.

PhD student: Elisabetta Catalani

Department of Environmental Sciences, University of Tuscia, Viterbo, Italy

PhD in “GENETICS AND CELL BIOLOGY”, cycle XX

Title of experimental thesis: **“RETINAL ISCHEMIA: MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL APPROACHES”**

Disciplinary sector BIO/09

Coordinator: Prof. Giorgio Pranterà

Tutor: Prof. Giovanni Casini

Abstract

Ischemia is a primary cause of neuronal death in retinal diseases. The repertoire of expressed transmitter receptors would determine the neuron's responses to ischemic damage, and peptidergic receptors may be involved. With a new in vitro model of the ischemic mouse retina, we investigated whether an altered expression of somatostatin receptors could modulate retinal responses to ischemia. We used retinas of somatostatin receptor 1 (sst1) knock out (KO) mice, where sst2 are over-expressed and over-functional, and of sst2 KO mice. TUNEL analysis of ischemic retinas showed a marked reduction of cell death in sst1 KO retinas, while there were no differences between wild-type (WT) and sst2 KO retinas. In addition, caspase-3 mRNA expression was also reduced in sst1 KO as compared to WT retinas. An immunohistochemical analysis demonstrated that different cell populations responded differently to the ischemic insult, and that the persistence of some immunohistochemical markers was greater in sst1 KO than in WT or in sst2 KO retinas. In particular, rod bipolar cell survival was markedly improved in sst1 KO retinas, while it was dramatically decreased in sst2 KO retinas. Furthermore, consistent with a role of glutamate excitotoxicity in ischemia-induced neuronal death, retinal glutamate release was observed to increase under ischemic conditions, but this increase was significantly reduced in sst1 KO retinas. These observations demonstrate that an increased presence of functional sst2 protects against retinal ischemia, thus implementing the background for the use of sst2 analogs in therapies of retinal diseases such as glaucoma or diabetic retinopathy. On the basis of this evidence, we tested the hypothesis that stimulation of over-expressed sst2 with exogenous ligands may guarantee greater protection against ischemia. Isolated retinas from both WT and sst1 KO mice were incubated in vitro for 1h in an ischemic solution and were treated with 10^{-7}

⁵ M SRIF, octreotide (a sst₂ agonist) or SOM230 (a SRIF analog). As expected, in the absence of pharmacological treatments, cell death was reduced in sst₁ KO ischemic vs WT ischemic retinas. In addition, SRIF, octreotide or SOM230 reduced cell death in ischemic WT retinas. Surprisingly, instead of inducing larger rescue of retinal neurons, these treatments in ischemic sst₁ KO retinas resulted in significant increase of cell death throughout the retina. Our data indicate that, although sst₂ activation is beneficial against retinal ischemia, a limit exists to this action, and the effects may turn detrimental. This limit may be due to receptor desensitization or changes in the transduction pathways. Sst₂, as the other SRIF receptors, are G protein coupled receptors, therefore we investigated the molecules that regulate the activity of G proteins in WT and in sst₁ KO ischemic retinas. In particular, we investigated the mRNA expression of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and that of regulators of G protein signaling (RGSs). WT mouse retinas express GRK1 and GRK2, RGS1, RGS2, RGS5 and RGS9 subtypes. GRK1 and RGS1 mRNAs show a significant increase of their expression after ischemic insult, therefore we investigated the expression of subtypes in ischemic retinas following octreotide administration. WT ischemic retinas treated with octreotide showed a significant reduction of both GRK1 and RGS1 mRNA expression. In octreotide-treated, ischemic sst₁ KO retinas, a similar reduction of GRK1 mRNA was observed, however, RGS1 mRNA expression remained unchanged with respect to untreated sst₁ KO ischemic retinas. The persistence of high expression levels of regulatory factors in octreotide-treated sst₁ KO retinas may inhibit sst₂ responses and be responsible, at least in part, of the detrimental effects of octreotide observed in sst₁ KO ischemic retinas.

Hypoxia is the primary cause of retinal ischemia and it also causes a neoangiogenic response which is responsible of serious retinal illness. Recent data indicate that retinal neoangiogenesis is contrasted by SRIF through its sst₂ receptor. Using an in vivo mouse model of hypoxia-induced retinopathy, we investigated the possibility that inhibition of adenylyl cyclase (AC) is involved in SRIF anti-angiogenic actions. Hypoxia increased AC responsiveness in wild type (WT) retinas and in retinas lacking sst₂, but not in sst₂-over-expressing retinas. Hypoxia also altered AC isoform expression, but with different patterns depending on sst₂ expression level. Among the nine AC isoforms, AC VII isoform mRNA and protein resulted the most affected. Indeed, in hypoxia AC VII expression was significantly enhanced in WT retinas and it was further increased in sst₂-lacking retinas, but not in sst₁ KO retinas. These data suggest an involvement of AC/cAMP in mediating both

hypoxia-evoked retinal neoangiogenesis and SRIF protective actions. In addition, the AC VII isoform is a candidate to a main role in these mechanisms.

In conclusion, these studies contribute to the knowledge of the effects exerted by SRIF in retinal disease and support the pharmacological use of SRIF, or SRIF analogues, in the treatment of retinal pathologies.

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
DI VITERBO**

Dipartimento di Scienze Ambientali

**Dottorato di Ricerca in GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE
XX ciclo**

TITOLO DELLA TESI SPERIMENTALE

ISCHEMIA RETINICA: STUDI MORFOLOGICI E FUNZIONALI

Settore disciplinare BIO/09

Coordinatore: Prof. Giorgio Pranterà

Tutore: Prof. Giovanni Casini

Dottoranda: Elisabetta Catalani

Breve presentazione della tesi

Lo scopo di questo progetto di ricerca è quello di contribuire, tramite studi di tipo morfologico e funzionale, a nuovi approcci terapeutici per la cura di danni a carico del sistema nervoso centrale derivanti da malattie o traumi. Molte malattie della retina (come ad esempio la retinopatia diabetica ed il glaucoma) hanno come via finale comune l'instaurarsi di una condizione ischemica. L'ischemia provoca morte neuronale che sembra avvenire maggiormente per apoptosi. L'apoptosi in seguito ad ischemia sembra essere dovuta principalmente alla perdita dell'omeostasi del glutammato. Nel lavoro sperimentale di questa tesi è stato messo a punto un nuovo modello in vitro di ischemia retinica nel topo. Questo modello è stato utilizzato per indagare l'espressione di marker apoptotici, per caratterizzare il danno subito dalle varie popolazioni neuronali e per quantificare il livello di glutammato rilasciato in seguito ad ischemia. In particolare, è stata studiata la risposta all'insulto ischemico da parte di retine knock out (KO) per il sottotipo recettoriale 1 (sst1) o per il sottotipo recettoriale 2 (sst2) della somatostatina (SRIF). La nostra attenzione è stata rivolta al sistema somatostatinergico poiché è noto dalla letteratura che la SRIF nella retina svolge importanti azioni fisiologiche. Quindi, il modello in vitro di ischemia da noi messo a punto è stato utilizzato per verificare le conseguenze dell'insulto ischemico su retine sst1 ed sst2 KO. Studi precedenti hanno dimostrato che in retine sst1 KO è presente una sovra-espressione dei recettori sst2, mentre in retine sst2 KO è presente sovra-espressione dei recettori sst1.

In questa tesi verrà dimostrato che retine che sovra-esprimono i recettori sst2 (come nel caso delle retine sst1 KO) mostrano una riduzione del danno associato all'ischemia rispetto alle retine wild type (WT) o a quelle sst2 KO. Inoltre, nello stesso modello ischemico, verrà dimostrato che la protezione nei confronti dell'insulto ischemico in presenza di sovra-espressione dei recettori sst2 è modulata da agonisti o antagonisti degli stessi recettori sst2, probabilmente attraverso molecole regolatrici della cascata di segnalazione che coinvolge proteine G.

La via di trasduzione della SRIF nella retina di mammifero non è stata ancora ben caratterizzata, tuttavia la SRIF nella retina di topo sembra inibire l'attività dell'adenilato ciclasi (AC). Inoltre, numerose linee di ricerca forniscono indicazioni circa il ruolo anti-angiogenico esercitato dalla SRIF e dai suoi analoghi. L'inibizione dell'AC può essere

implicata nell'azione anti-angiogenica della SRIF, che sembra agire attraverso il recettore sst2.

Tabella delle abbreviazioni

AC	adenilato ciclasi
CaBP5	calcium binding protein 5
ChAT	choline acetyltransferase
CT	threshold cycle
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
FSK	forskolina
GAT-1	trasportatore-1 dell'acido γ -aminobutirrico
GCL	strato delle cellule ganglionari
GRK	G-protein coupled receptors protein kinases
HPLC ESI-MS	high performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry
IAA	acido iodacetico
INL	strato nucleare interno
IPL	strato plessiforme interno
KO	knock out
MW	molecular weight
NFL	strato di fibre nervose
NK3	recettore neurochinina 3
NO	ossido nitrico
OD	densità ottica
ONL	strato nucleare esterno
OPL	strato plessiforme esterno
PB	tampone fosfato
PBS	tampone fosfato, soluzione salina
PKC	proteina chinasi C
PND	giorno di vita post-natale
POS	segmento esterno dei fotorecettori
RGS	regulators of G-protein signaling
RT-PCR	reverse transcription–polymerase chain reaction
SEM	errore standard della media
SRIF	somatostatina o somatotropin release inhibiting factor
sst (1-5)	sottotipo recettoriale della somatostatina (1-5)
TH	tirosina idrossilasi
TUNEL	terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR (1-3)	vascular endothelial growth factor receptor (1-3)
WT	wild type

CAPITOLO 1

L'ischemia retinica

1.1 La retina: cenni morfologici

La relativa semplicità strutturale fa della retina un modello sperimentale molto utilizzato nello studio del sistema nervoso centrale. La retina è facilmente accessibile, la sua struttura è omogenea ed in essa si distinguono diversi strati dove è facile riconoscere le diverse popolazioni cellulari (Fig. 1.1). La retina di mammifero è composta da cinque tipi neuronali principali: i fotorecettori, le cellule bipolari, le cellule orizzontali, le cellule amacrine e le cellule ganglionari. Infine, le cellule interplexiformi, una variante di cellule amacrine, sono il sesto tipo di cellule neuronali presenti nella retina. La trasduzione dello stimolo luminoso avviene ad opera di pigmenti fotosensibili localizzati nei segmenti esterni dei fotorecettori, i quali sono direttamente a contatto con l'epitelio pigmentato. I corpi cellulari dei fotorecettori sono situati nello strato nucleare esterno (ONL). Nello strato della retina immediatamente a contatto con i fotorecettori, strato plessiforme esterno (OPL), sono presenti le connessioni sinaptiche tra i processi dei fotorecettori e quelli delle cellule bipolari ed orizzontali situate nello strato nucleare interno (INL), dove sono presenti anche le cellule amacrine. Le cellule orizzontali mediano interazioni laterali attraverso le loro sinapsi nell'OPL, mentre le bipolari trasportano l'informazione visiva lungo la via verticale in direzione dello strato plessiforme interno (IPL), dove si trovano le connessioni tra i processi nervosi delle cellule bipolari, delle cellule amacrine e delle cellule ganglionari. Le cellule amacrine regolano il passaggio dell'informazione visiva attraverso l'IPL. Le cellule ganglionari si trovano nello strato delle cellule ganglionari (GCL) ed i loro assoni si uniscono a formare le fibre del nervo ottico, il quale esce dalla retina e termina nelle stazioni visive primarie nel cervello. Infine, le cellule interplexiformi arborizzano sia nell'IPL che nell'OPL. Nella retina sono espressi, insieme ai neurotrasmettitori classici, anche numerosi neuropeptidi. Negli ultimi anni, l'espressione di neuropeptidi nella retina è stata oggetto di molteplici studi che hanno messo in luce la loro importante funzione fisiologica (Bagnoli et al., 2003). Tra i neuropeptidi, la somatostatina (somatotropin release-inhibiting factor, SRIF) suscita notevole interesse. Essa ed i suoi sottotipi recettoriali (ssr_1 - ssr_5) sono ampiamente espressi nella retina (Bagnoli et al., 2003; Brecha, 2003; Thermos, 2003; Casini et al., 2005).

La localizzazione della SRIF nella retina e le funzioni che in essa svolge saranno oggetto del capitolo 2 di questa tesi. Particolare attenzione sarà rivolta all'azione neuroprotettiva che la SRIF esercita in varie condizioni patologiche retiniche (Forloni et al., 1997; Rauca et al., 1999), come ad esempio nell'ischemia retinica (Celiker and Ilhan, 2002; Mastrodimou et al., 2005).

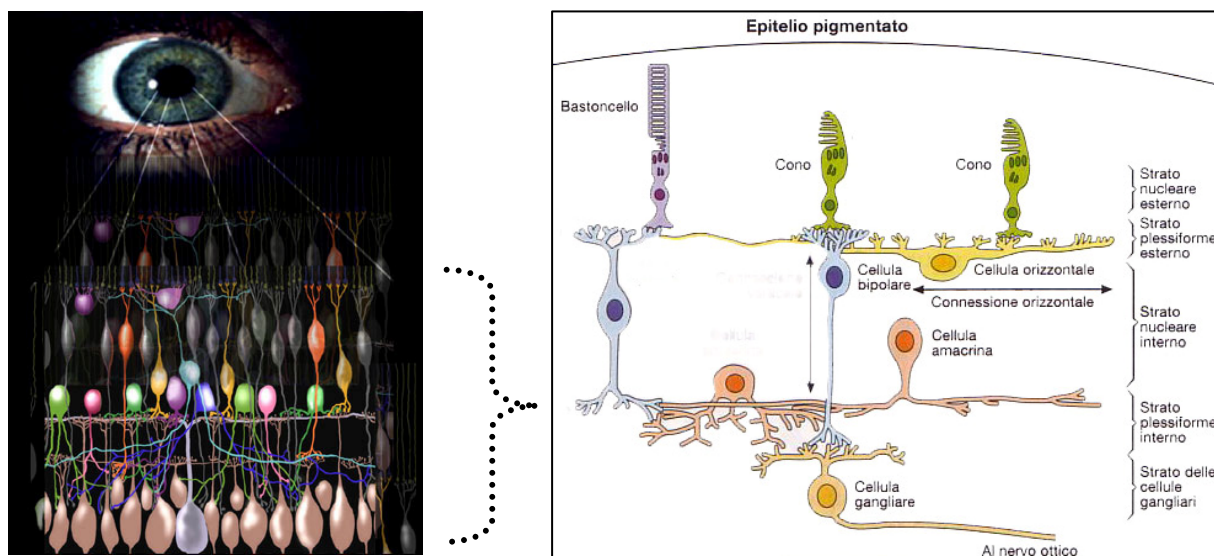


Figura 1.1 Organizzazione strutturale della retina. Tratta dal sito internet <http://webvision.med.utah.edu/>

1.2 Ischemia retinica

L'ischemia è il risultato di una condizione in cui l'inadeguato afflusso di sangue ad un tessuto comporta la diminuzione di ossigeno e di altri elementi nutritivi tale da compromettere il metabolismo cellulare (Osborne et al., 2004). Il diminuito afflusso di sangue porta inoltre alla riduzione della rimozione dei prodotti residui derivanti dal metabolismo cellulare. L'instaurarsi di tale condizione per un certo lasso di tempo può portare a lesioni nel tessuto interessato che possono essere anche molto gravi. Il deficit funzionale può essere temporaneo o permanente a seconda del grado del danno stesso. L'ischemia è un fenomeno sempre accompagnato da anossia (completa mancanza di ossigeno) o da ipossia (riduzione di

ossigeno). La retina è un tessuto che può essere interessato da ischemia, infatti una diminuzione del flusso sanguigno o di trasporto dell'ossigeno nel sangue può essere la causa di danni retinici e neuro-oftalmologici. Molte patologie retiniche hanno come via finale comune l'instaurarsi di una condizione ischemica che diviene la causa primaria di morte cellulare (Quigley et al., 1985; Quigley et al., 1995; Levin and Louhab, 1996; Osborne et al., 1999e, 2004; Barber, 2003). La complessa anatomia del sistema circolatorio retinico gioca un ruolo importante nel fenomeno ischemico (Osborne et al., 2004). Pur essendo dotata di un proprio sistema circolatorio, la retina assorbe una parte del nutrimento per diffusione dalla sottostante coroide, una sottile membrana fornita di moltissimi vasi sanguigni (Fig. 1.2). I capillari della coroide alimentano l'ONL ed anche parte dell'OPL. Gli strati retinici interni sono invece alimentati da ramificazioni dell'arteria centrale retinica che origina direttamente dall'arteria oftalmica nella regione del foramen ottico. Allontanandosi dal disco ottico, le arterie retiniche si dividono irregolarmente in due. I principali vasi si estendono superficialmente sullo strato di fibre nervose (NFL) appena al di sotto della membrana limitante interna e si diramano in arteriole che si suddividono a loro volta allo stesso livello. In questo modo la retina è completamente vascolarizzata ad eccezione dell'estrema periferia e della macula. In particolare, i principali vasi retinici formano due reti di capillari: la rete capillare superficiale che si estende nell'NFL e quella più profonda che si estende al confine tra l'INL e l'OPL. Inoltre, le principali arterie retiniche sono a fondo chiuso e quindi l'occlusione di una di queste arterie compromette l'intera regione da essa irrorata causando ischemia. Ad esempio, l'occlusione dell'arteria centrale retinica provoca ischemia in tutti gli strati interni mentre quelli più esterni non risultano danneggiati (l'ischemia degli strati esterni è causata principalmente da disfunzioni riguardanti i capillari coroidei). Tuttavia, è possibile che si verifichi ischemia completa in tutti gli strati retinici nel caso in cui si verifichi l'occlusione dell'arteria oftalmica (Osborne et al., 2004).

L'ischemia è un fenomeno piuttosto complesso, di seguito verranno descritti i principali fattori in esso coinvolti.

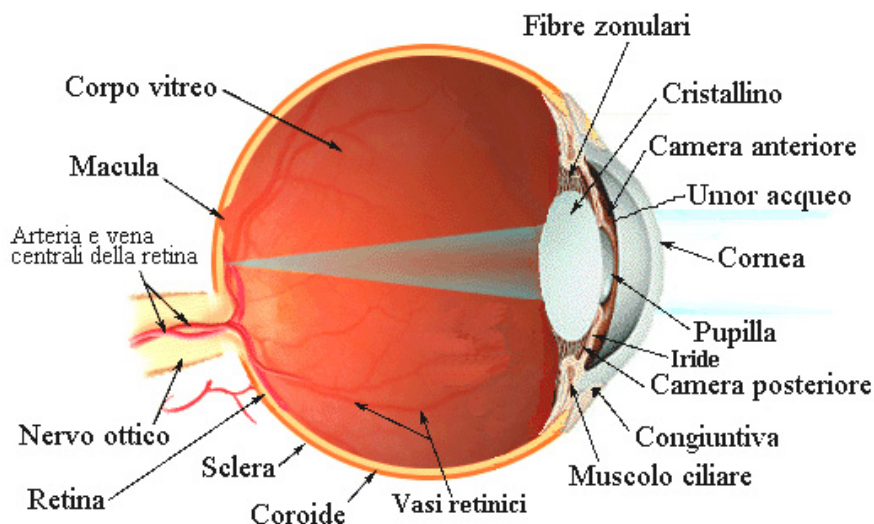


Figura 1.2 L'occhio ed il suo sistema circolatorio. Tratta dal sito internet <http://webvision.med.utah.edu/>

1.2.1 Ischemia e neoangiogenesi

In risposta all'ischemia nella retina si osservano cambiamenti morfologici e funzionali irreversibili e talvolta molto gravi. Un effetto macroscopico che si osserva è la “neoangiogenesi” ossia la formazione di neovasi (Hofman et al., 2001; Ritter et al., 2006). Nell'occhio, l'assenza di vasi in alcuni compartimenti (ad esempio la cornea, la lente e la porzione più esterna della retina) è una caratteristica anatomica che deve essere conservata per il corretto funzionamento di questi distretti. Per questo motivo, l'insorgenza di nuovi vasi in questi compartimenti provoca danni che spesso risultano irreversibili. Nell'occhio i tessuti maggiormente colpiti da neoangiogenesi sono la retina, la coroide e la cornea. La neoangiogenesi dell'occhio è una delle principali cause di cecità in molte patologie, come ad esempio la retinopatia diabetica, la degenerazione maculare senile o la cheratite infettiva, ma si verifica anche in seguito a traumi ed infiammazioni dell'occhio (vedi per referenze Kvanta, 2006; Zhang et al., 2007). Generalmente, in condizioni fisiologiche durante lo sviluppo embrionale e durante il rimodellamento vascolare postnatale, i fenomeni che portano alla formazione di nuovi vasi sono di due tipi. Il primo tipo viene detto “vasculogenesi” e si riferisce alla formazione di vasi ex-novo, l'altro invece viene detto “angiogenesi” e si riferisce alla formazione di nuovi vasi da quelli già esistenti, responsabile quindi del rimodellamento

della rete di capillari già esistente. Questi due processi differiscono per alcuni aspetti ma dipendono entrambi dall'attivazione di recettori del VEGF, che verrà trattato estesamente più avanti (Asahara et al., 1997; Djonov et al., 2000; Djonov et al., 2003; Patan, 2004). L'angiogenesi è un processo complesso, caratterizzato da più stadi. L'input iniziale è la vasodilatazione di vasi già esistenti che si verifica in risposta all'aumento della trascrizione del VEGF (Kimura et al., 2000). La vasodilatazione è accompagnata dall'aumento della permeabilità vascolare ed il conseguente flusso nell'area circostante di proteine plasmatiche, fibrina, fattori di crescita e fattori infiammatori (Conway et al., 2001). Questi ultimi, insieme ai fattori di crescita, contribuiscono all'attivazione di enzimi che degradano la matrice extracellulare, fenomeno che comporta il successivo rilascio di fattori angiogenici, ad esempio il VEGF (Loughman et al., 1996; Amano et al., 1998; Gale et al., 1999; Lee et al., 2001; Jin et al., 2002), il basic fibroblast growth factor (bFGF; Hanneken et al., 1991), l'insulin-like growth factor (IGF-1; Meyer-Schwickerath et al., 1993; Mousa et al., 1999) e l'epithelial growth factor (EGF; Patel et al., 1994). I fattori angiogenici promuovono l'attivazione delle cellule endoteliali che migrano dai vasi esistenti e vanno a formarne altri. Ogni stadio dell'angiogenesi è finemente regolato dall'azione di molecole che agiscono come fattori angiogenici o come inibitori angiogenici (vedi per referenze Kvanta, 2006; Zhang et al., 2007). In condizioni normali i vasi sono quiescenti e l'azione degli inibitori è dominante. In condizioni patologiche, come durante ipossia o altri fenomeni infiammatori, i fattori angiogenici si attivano e danno inizio alla cascata di segnalazione che porta alla formazione di nuovi vasi. Nella retina il sistema vascolare in condizioni normali è un sistema omeostatico, mantenuto tale dall'equilibrio che si instaura tra quantità di ossigeno disponibile per le cellule e quello che viene consumato, e tra i fattori che stimolano l'angiogenesi e quelli che la inibiscono (vedi per referenze Kvanta, 2006; Zhang et al., 2007). Tuttavia quando intervengono fenomeni che disturbano tale equilibrio (ad esempio ipossia o ischemia) si innesca la cascata di eventi che porta alla proliferazione di nuovi vasi. Generalmente la neoangiogenesi retinica interessa la porzione più interna della retina ma in alcuni casi può riguardare anche la cavità del vitreo. Nei nuovi vasi è presente una grande quantità di componenti cellulari che contribuisce a rendere la parete dei vasi stessi inadatta al contenimento, essa risulta quindi fragile e soggetta ad emorragie, edemi ed essudati. Il risultato di questi eventi è molto spesso la diminuzione dell'acuità visiva e nelle patologie più

gravi la perdita parziale o totale della vista sebbene il danno che deriva dalla neoangiogenesi dipenda dalla zona retinica interessata e dall'entità del fenomeno stesso.

1.2.1.1 Il VEGF ed il suo ruolo biologico

Come già accennato in precedenza, il VEGF è uno dei maggiori fattori angiogenetici conosciuti. Inoltre, studi recenti indicano il suo coinvolgimento nell'angiogenesi retinica patologica. Sebbene siano stati effettuati numerosi studi nel tentativo di caratterizzare il VEGF, nella retina la sua modalità d'azione e di rilascio rimane ancora da chiarire. Di seguito saranno illustrate le principali caratteristiche e le principali azioni biologiche del VEGF e dei suoi recettori VEGFR (Fig. 1.3).

Il VEGF (o VEGF-A) appartiene ad una famiglia di glicoproteine che comprende anche il VEGF-B, il VEGF-C, il VEGF-D, ed il "placental growth factor". Tuttavia, solamente il VEGF ed il placental growth factor mostrano proprietà angiogeniche (Ferrara et al., 1992; Klagsbrun and D'Amore 1996; Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Veikkola and Alitalo, 1999; Josko et al., 2000; Veikkola et al., 2000; Shibuya, 2001; Zachary and Glick, 2001; Witmer et al., 2003; Ferrara, 2004; Kvanth, 2006; Yla-Herttuala et al., 2007, Zhang and Ma, 2007). Splicing alternativi dell'mRNA per il VEGF umano generano quattro isoforme di VEGF (Ferrara et al., 1991) ma il VEGF₁₆₅ sembra essere l'isoforma più abbondante nella maggior parte dei tessuti incluso il sistema nervoso. Nel sistema nervoso centrale, l'espressione del VEGF e dei recettori VEGFR è stata osservata in poche regioni del cervello, in particolare nel plesso coroideo, nelle cellule dei granuli cerebellari, ed in altre regioni densamente vascolarizzate del sistema nervoso centrale (vedi per referenze Zachary, 2005). Inoltre, in condizioni di ipossia l'espressione del VEGF è stata osservata nelle cellule gliali retiniche, nelle cellule dell'astroglia e negli astrociti presenti nel midollo spinale.

Il VEGF esercita la sua funzione biologica attraverso il legame a due tipi di recettori di membrana tirosin-chinasici: il recettore 1 (VEGFR-1 o flt-1) ed il recettore-2 (VEGFR-2 o flk-1) che sono espressi prevalentemente dalle cellule endoteliali dei vasi (de Vries et al., 1992; Terman et al., 1992; Zachary and Glick, 2001). In particolare il VEGFR-2 sembra essere il maggiore mediatore dell'angiogenesi e della vasopermeabilità (Neufeld et al., 1999; Ferrara, 2001). Un terzo recettore, il VEGFR3, che non si lega al VEGF-A, è espresso principalmente nell'endotelio linfatico.

Il VEGF è un potente fattore angiogenico la cui espressione è regolata da molti fattori. Particolare importanza riveste la regolazione effettuata dall'ipossia per le gravi implicazioni che ne derivano. I livelli di VEGF sono finemente regolati dalla tensione dell'ossigeno presente nei tessuti, infatti in condizioni di ipossia si osserva il rapido aumento di VEGF contemporaneamente all'incremento della trascrizione e della stabilizzazione del relativo mRNA (Shweiki et al., 1992; Levy et al., 1996; Storkebaum et al., 2004). Viceversa, in condizioni di ossigenazione normale, la produzione di VEGF viene limitata in modo da bloccare la formazione non necessaria di nuovi vasi. Sebbene il VEGF sia considerato uno dei più importanti fattori di crescita endoteliali (Alon et al., 1995; Dvorak et al., 1995; Benjamin et al., 1997; Gerber et al., 1998), recentemente è stato osservato che esso esercita anche effetti diretti sui neuroni (per referenze vedi Storkebaum et al., 2004; Zachary, 2005). Infatti, il VEGF sembra esercitare un'azione neurotrofica e/o neuroprotettiva su molti tipi di neuroni, tra i quali quelli del sistema nervoso autonomo, quelli sensoriali, i neuroni ippocampali e della corteccia. In particolare, il VEGF agisce in questi casi attraverso i recettori VEGFR-2 e protegge i neuroni nei confronti dell'eccito-tossicità da glutammato ed in condizioni di ipossia. Recentemente il VEGF, grazie al suo potenziale ruolo neuroprotettivo e neurotrofico è stato studiato in malattie neurodegenerative come ad esempio il morbo di Alzheimer o in quello di Parkinson (vedi per referenze Storkebaum et al., 2004). In particolare, riguardo al morbo di Parkinson è stato osservato che il VEGF può esercitare un ruolo neuroprotettivo nei confronti della degenerazione dei neuroni dopaminergici della substantia nigra (Yasuhara et al., 2004).

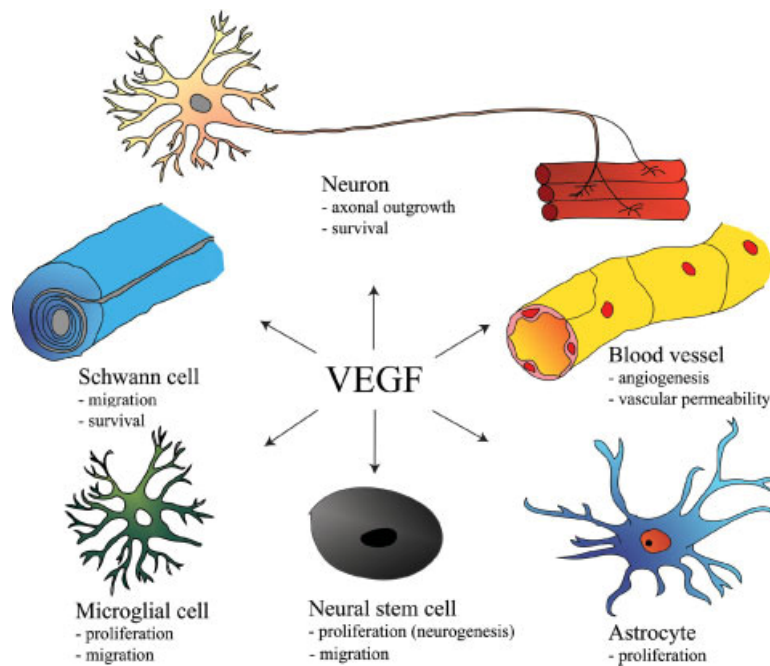


Figura 1.3 Azioni biologiche esercitate dal VEGF. Immagine tratta da *Storkebaum et al., 2004. BioEssays, 26:943–954.*

Il VEGF è stato ampiamente studiato anche nelle patologie dell'occhio, in particolare della retina. Sebbene nei fluidi dell'occhio in condizioni normali i livelli di VEGF siano molto bassi, quasi non misurabili (Aiello et al., 1994; Ogata et al., 2002), in condizioni patologiche (come ad esempio nella retinopatia diabetica o nella degenerazione senile della macula) i suoi livelli subiscono un sensibile aumento (Adamis et al., 1994; Malecaze et al., 1994; Ozaki et al., 1999). In molte patologie retiniche il fattore scatenante il fenomeno di neovascolarizzazione è la condizione ipossica e/o ischemica (Michaelson, 1948; Ashton, 1953; Shimizu et al., 1981), e ciò suggerisce che il VEGF possa essere un potente mediatore della neovascolarizzazione retinica. Infatti, in pazienti affetti da retinopatia ischemica (Adamis et al., 1994; Aiello et al., 1994; Malecaze et al., 1994), ma anche in modelli animali (Miller et al., 1994; Pierce et al., 1995), sono stati osservati consistenti aumenti di VEGF nella retina e nel vitreo. Nella retina l'aumento del livello di VEGF durante ipossia si osserva nelle cellule endoteliali, nei periciti e nelle cellule di Müller (vedi per referenze Kvant, 2006). Inoltre, studi recenti (Dal Monte et al., 2007) mostrano che in retine ipossiche i livelli di VEGF aumentano soprattutto nell'OPL, nel GCL e nei vasi sanguigni. Inoltre, è stato osservato che il recettore VEGFR-1 aumenta sia nei vasi che in tutti gli strati retinici mentre il

recettore VEGFR-2 sembra subire un incremento in particolar modo nei vasi (Dal Monte et al., 2007). Questi dati confermano quanto osservato in studi precedenti in cui è stato dimostrato che antagonisti del VEGF tendono a far diminuire significativamente la neovascolarizzazione retinica o dell'iride (Aiello et al., 1995; Adamis et al., 1996; Robinson et al., 1996). Tuttavia, sebbene questi studi mostrino chiaramente che il VEGF è un potente fattore angiogenico riguardo soprattutto all'angiogenesi retinica, in alcune particolari patologie esso da solo non è in grado di indurre neovascolarizzazione (Lutty et al., 1996; Ozaki et al., 1997). Probabilmente il VEGF agisce come fattore angiogenico ma in concomitanza all'azione di altri fattori (Campochiaro et al., 2000).

Non è ancora completamente chiaro come l'ipossia possa agire sul controllo dell'espressione del VEGF nella retina. Tuttavia, il decremento della tensione dell'ossigeno porta alla cascata di segnalazione che attiva fattori di trascrizione che stimolano la trascrizione di vari geni, tra i quali il VEGF (Forsythe et al., 1996; Gerber et al., 1997; Ozaki et al., 1999).

1.2.2 Ischemia retinica ed apoptosi

La morte cellulare può avvenire per apoptosi o per necrosi (Geske and Gerschenson, 2001; Kiechle and Zhang, 2002). A differenza della necrosi, la morte cellulare per apoptosi è un processo finemente regolato. Nelle cellule apoptotiche avvengono cambiamenti sia a livello nel nucleo sia a livello ultrastrutturale. Nel nucleo si osserva ad esempio condensazione della cromatina, frammentazione del DNA e del nucleo stesso. A livello ultrastrutturale si osserva invece la rottura del citoscheletro, la frammentazione della cellula e la formazione dei cosiddetti corpi apoptotici (Saraste, 1999; Saraste and Pulkki, 2000; Ameisen, 2002). I corpi apoptotici vengono rapidamente eliminati dai fagociti senza formazione di infiammazioni (Kitanaka and Kuchino, 1999; Reed, 2000; Zimmerman et al., 2002). La necrosi invece differisce dall'apoptosi sia per quanto riguarda le caratteristiche biochimiche che per quelle morfologiche. La necrosi è causata principalmente da perturbazioni ambientali piuttosto che da fattori intrinseci alla cellula stessa (Kitanaka and Kuchino, 1999). La morte per necrosi avviene per il rigonfiamento della cellula a cui segue la rottura delle membrane tra cui quelle mitocondriali (Manjo and Joris, 1995; Kanduc et al., 2002). Le cellule in necrosi riversano il loro contenuto citoplasmatico nell'area ad esse circostante e quindi possono scatenare, a differenza di quelle apoptotiche, una reazione infiammatoria nell'area interessata.

Il fenomeno di apoptosi può essere implicato in varie patologie neurodegenerative (Friedlander and Yuan, 1998; Friedlander, 2003), come ad esempio il morbo di Alzheimer (Yuan and Yanker, 2000), la corea di Huntington (Ona et al., 1999; Li et al., 2000), la sclerosi laterale amiotrofica (Martin, 1999; Rowland and Shneider, 2001), l'epilessia (Troy and Salvesen, 2002). Inoltre si verifica apoptosi in malattie del sistema cardiocircolatorio (Bennett, 2002; Catherine et al., 2002), in tumori (Lee et al., 2000; Kanauchi et al., 2002; Mizutani et al., 2002), in malattie di tipo infiammatorio (Iwata et al., 2003) ed in seguito a trapianti. Infine, l'apoptosi è una delle principali cause di morte neuronale in molte patologie retiniche come ad esempio la retinite pigmentosa, il distacco della retina, il glaucoma, la degenerazione maculare senile ed in condizioni patologiche come ad esempio l'ischemia (Nickells et al., 1996; Levin et al., 1997; Rosenbaum et al., 1997a, b; 1998).

L'apoptosi è un processo finemente regolato (Fig 1.4). Tra le molteplici vie implicate, particolare importanza rivestono una serie di proteine citosoliche, le caspasi (Thornberry and Lazebnik, 1998; Afford and Randhawa, 2000; Shi, 2002; Zimmerman et al., 2002). Le caspasi sono una famiglia di proteasi molte delle quali agiscono come molecole iniziatrici o effettrici del processo di apoptosi (Liou et al., 2003; Rupinder et al., 2007). Quelle che danno inizio al processo di apoptosi (caspasi 2, 8, 9, 10) attivano anche altre caspasi (caspasi 3, 6, 7) che sono invece responsabili dell'innescare di tutti quei processi che portano alla morte cellulare. Si conoscono quattordici tipi di caspasi (vedi per referenze Rupinder et al., 2007) ma solamente alcune di esse sono state ampiamente caratterizzate, tuttavia tutte sembrano essere coinvolte nel processo di apoptosi. Inoltre, in tutte le cascate di segnalazione che portano ad apoptosi sembrano essere coinvolte caspasi. Come altri tipi di enzimi, le caspasi vengono sintetizzate nella cellula come precursori inattivi e sebbene differiscano tra loro per il peso molecolare, sono tutte costituite da quattro domini distinti (Nicholson and Thornberry, 1997). Numerosi esperimenti indicano che anche nelle cellule neuronali l'attivazione delle caspasi è fondamentale nel processo che porta all'apoptosi (vedi per referenze Katai et al., 1999) anche in seguito ad ischemia (Chen et al., 1998; Namura et al., 1998; Ni et al., 1998). L'attivazione della caspasi-1 è stata per la prima volta documentata proprio riguardo all'ischemia cerebrale (Schulz et al., 1999). Successivamente è stata osservata l'attivazione delle caspasi-3, 8, 9, 11 (Rabuffetti et al., 2000; Benchoua et al., 2001). Inoltre, molti studi hanno dimostrato l'implicazione delle caspasi nell'ischemia-riperfusione di alcuni organi tra i quali il fegato (Kim et al., 2003), il rene (Gur et al., 1998), l'intestino (Wu et al., 2003) ed i muscoli (Iwata

et al., 2003). Anche nella retina è stato osservato che l'apoptosi è un fenomeno che interviene in varie patologie ed anche in seguito ad ischemia (Rosenbaum et al., 1997a,b; Kuroiwa et al., 1998, 1999; Joo et al., 1999; Katai et al., 1999; Naomichi and Nagashisa, 1999). In particolare, è stato osservato che differenti tipi di caspasi vengono espresse in differenti tipi di neuroni colpiti dallo stesso tipo di insulto. Durante il fenomeno di ischemia-riperfusione, ad esempio, è stato osservato che la morte neuronale per apoptosi è dovuta principalmente a due tipi di caspasi: la caspasi-1 e la caspasi-3 (Yakovlev et al., 1997; Hara et al., 1997; Naomichi and Nagashisa, 1999; Katai and Yoshimura 1999). Tuttavia, questi due tipi di caspasi vengono espresse in proporzione diversa a seconda della popolazione neuronale considerata. In particolare, i fotorecettori in apoptosi esprimono maggiormente la caspasi-1 mentre le cellule dell'INL esprimono maggiormente la caspasi-3. Inoltre è stato osservato che le cellule amacrine, che si trovano anch'esse nell'INL, esprimono anche la caspasi-2. Una differente espressione di diverse caspasi è stata osservata anche nell'ischemia cerebrale (vedi per referenze Singh et al., 2001).

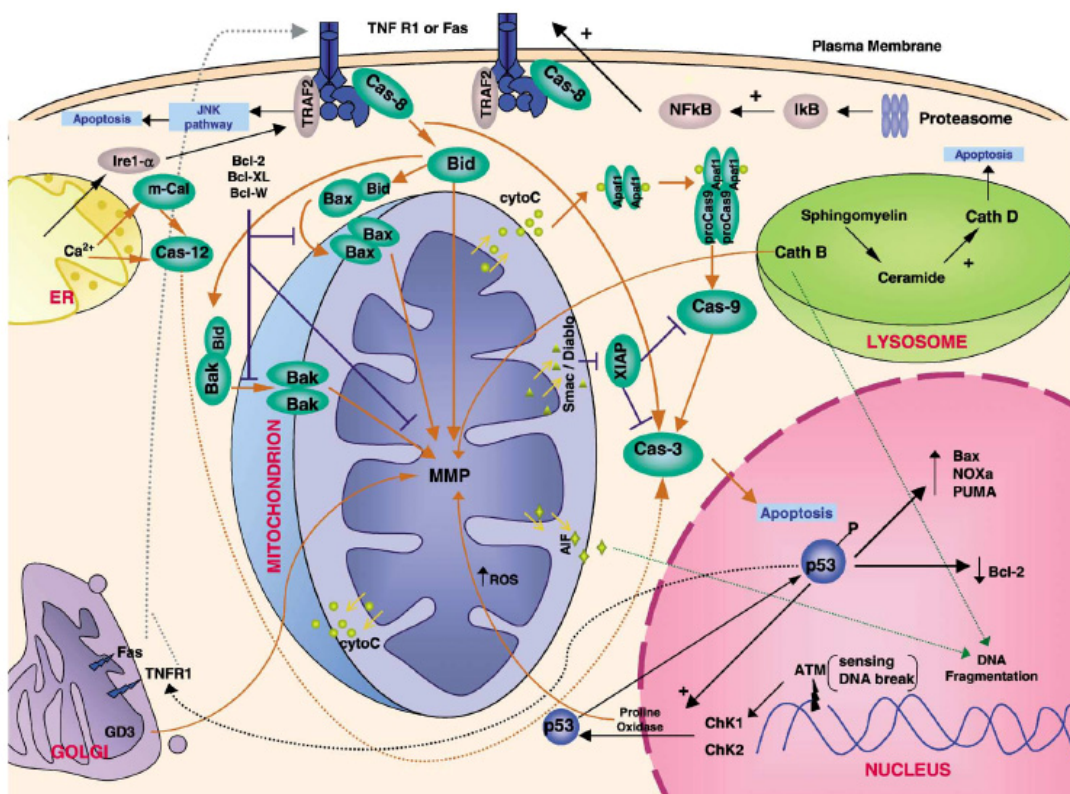


Figura 1.4 Principali vie di segnalazione dell'apoptosi nelle cellule di mammifero e caspasi coinvolte. Tratta da Liou et al. 2003 *Progress in Neurobiology* 69:103–142.

1.2.3 Ruolo degli aminoacidi eccitatori nella degenerazione neuronale di natura ischemica

Il glutammato è ben conosciuto per i suoi effetti eccito-tossici nel sistema nervoso centrale (Choi, 1988, 1992; Michaelis, 1998; Nicholls et al., 1999; Duchen, 2000; Sattler and Tymianski, 2001). Il glutammato esercita sui neuroni un'azione eccitatoria che può divenire tossica quando produce un'eccessiva depolarizzazione che porta la cellula ad apoptosi. La sovra-attivazione dei recettori del glutammato viene considerata come la causa principale dell'effetto neurotossico osservato in varie condizioni patologiche come ad esempio l'anossia, l'ipossia, l'ischemia, o in patologie come l'epilessia, malattie neurodegenerative, la retinopatia diabetica, il distacco della retina ed il glaucoma (el Asrar et al., 1992; Lombardi et al., 1994; Matini et al., 1997; Nishizawa, 1999; McNamara, 1999; Price, 1999; Sherry and Townes-Anderson, 2000; Smith, 2002; Barber, 2003; Lipton, 2003). I primi studi che descrivono l'azione tossica esercitata dal glutammato furono eseguiti proprio sulla retina da Lucas e Newhouse nel 1957 (Lucas and Newhouse, 1957). Successivamente fu usato il termine "eccito-tossicità" per indicare la degenerazione neuronale che consegue ad una attivazione eccessiva dei recettori ionotropici per gli aminoacidi eccitatori (Choi, 1987; Peterson et al., 1989; Eimerl and Schramm, 1991). Il recettore NMDA svolge un ruolo di primaria importanza nell'induzione del danno eccito-tossico poiché è in grado di promuovere un massivo influsso di ioni Ca^{2+} all'interno della cellula nervosa (Sauer, 1993; Graham et al., 1995). In condizioni fisiologiche, l'attivazione del recettore NMDA è transitoria e l'aumento della concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} viene tamponata da una serie di meccanismi che regolano l'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare. Tali sistemi tuttavia possono essere compromessi in condizioni patologiche, ad esempio in corso d'ischemia, e questo comporta un aumento massivo e protratto della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} successivamente all'attivazione dei recettori NMDA. Il Ca^{2+} libero, presente nel citoplasma, attiva una varietà di enzimi definiti calcio-dipendenti, quali le fosfatasi, le proteasi neutre, la xantina ossidasi e le chinasi, in particolare la proteina chinasi C (PKC) che sono responsabili della degenerazione neuronale. In particolare, l'attivazione della fosfolipasi A2 induce la formazione di acido arachidonico che, metabolizzato attraverso le vie della lipo- e dell'epo-ossigenasi, induce la formazione di radicali liberi all'interno della cellula nervosa. L'attivazione eccessiva delle proteasi neutre da parte del Ca^{2+} intracellulare determina la progressiva disintegrazione morfo-funzionale del citoscheletro. L'attivazione della PKC comporta invece una diffusa fosforilazione di substrati proteici intracellulari, comprese le subunità strutturali di alcuni

canali permeabili al Ca^{2+} che vengono così attivati, contribuendo all'aumento del flusso intracellulare degli ioni Ca^{2+} . Inoltre, numerosi studi indicano che l'eccessivo afflusso di ioni Ca^{2+} all'interno della cellula è in grado di innescare la cascata apoptotica (Lee et al., 1999; Vallazza-Deschamps et al., 2005; Bano et al., 2007). Tuttavia, l'esatto meccanismo attraverso il quale gli ioni Ca^{2+} esercitano la loro azione di mediatori dell'eccitotossicità non è ancora ben chiaro. Si può supporre che esso dipenda dal tipo di cascata di segnalazione in cui gli ioni Ca^{2+} sono coinvolti (Arundine and Tymianski, 2003).

Numerose ricerche sperimentali hanno suggerito che l'iperattività dei recettori per gli aminoacidi eccitatori svolga un ruolo importante nello sviluppo del danno neuronale di natura ischemica (Zeevalk and Nicklas, 1990; Iversen 1991; Boris-Moller and Wieloch, 1998; Osborne et al., 1999a–d). Infatti, una delle principali cause di morte cellulare in seguito ad ischemia sembra essere proprio la perdita dell'omeostasi del glutammato (Lipton, 1999; Won et al., 2002; Arundine and Tymianski, 2003; Camacho and Massieu, 2006). Recenti osservazioni suggeriscono che in corso di ischemia un marcato incremento del rilascio di acido glutammico, in presenza di glicina, spermina e spermidina (queste ultime sintetizzate in eccesso durante l'insulto ischemico), attivi il recettore NMDA promuovendo un'azione tossica a carico delle cellule nervose (Olney et al., 1987; el Asrar et al., 1992; Izumi et al., 2003). L'attivazione dei recettori NMDA è facilitata dalla riduzione dei livelli di ATP (caratteristica durante l'ischemia) che determina un'incapacità da parte della cellula nervosa di mantenere il potenziale di riposo. La depolarizzazione che ne consegue determina la rimozione dell'azione inibitoria degli ioni Mg^{2+} che comporta un'attivazione massiva ed incontrollata del canale ionico associato ai recettori NMDA. In realtà sembra che l'attivazione massiccia dei recettori NMDA intervenga solamente nella fase acuta iniziale di ischemia (Zeevalk and Nicklas, 1991; Lam et al., 1997; Sucher et al., 1997; Zeevalk et al., 1998; Sun et al., 2001; Chen and Diamond, 2002). Infatti, nella fase più acuta gli antagonisti dei recettori NMDA aiutano a prevenire danni neuronali solo parzialmente (Zeevalk and Nicklas, 1991). Questo suggerisce che il glutammato agisce su diversi tipi di recettori (NMDA e non-NMDA) per esercitare il suo effetto di tossicità (Lees and Leong, 1993; Osborne and Herrera, 1994; Weber et al., 1995). Nella retina in condizioni non patologiche la morte cellulare indotta dal glutammato può avvenire attraverso vie che coinvolgono i recettori NMDA o non-NMDA (Chen et al., 1998; dos Santos et al., 2000). Infatti, nella retina antagonisti competitivi e non competitivi dei recettori NMDA attenuano la degenerazione neuronale indotta da ischemia (Osborne et

al., 1999a–d). Le popolazioni cellulari retiniche sembrano essere diversamente sensibili alla tossicità mediata dai recettori NMDA (Ullian et al., 2004). In particolare, le cellule ganglionari sembrano essere più resistenti delle cellule amacrine all'eccito-tossicità da glutammato. Questo suggerisce che vari meccanismi molecolari che intervengono lungo la via di segnalazione glutammatergica possono determinare la sensibilità all'eccesso di glutammato. Le basi dei meccanismi che provocano morte cellulare causata da tossicità da glutammato non sono ancora del tutto chiari. Il meccanismo chiave sembra ruotare intorno alla concentrazione del Ca^{2+} intracellulare ma ci sono studi che dimostrano che altri meccanismi sono calcio-indipendenti e dipendono invece dalla concentrazione extracellulare di sodio e cloro (Zeevalk et al., 1989; Chen et al., 1998).

1.2.4 Stress ossidativo e ruolo di alcuni mediatori di processi infiammatori nell'ischemia retinica

Lo stress ossidativo sembra contribuire in misura significativa alla risposta dei tessuti all'insulto ischemico. Lo stress ossidativo che accompagna il danno ischemico non è stato oggetto di studio di questa tesi. Tuttavia, di seguito verranno descritti brevemente i fenomeni associati al suddetto stress nel tentativo di fornire un panorama generale dei principali fattori che contribuiscono al danno ischemico.

Molte cascate generate da eccitotossicità da glutammato, deprivazione di glucosio e ossigeno portano alla formazione di radicali liberi (Pellegrini Giampietro et al., 1990) che possono agire da importanti mediatori nei danni causati dall'ischemia retinica (Bonne et al., 1998). Paradossalmente, questi radicali sembrano formarsi durante il fenomeno di riperfusione, quando i composti ridotti formati durante l'ischemia vengono ossidati dall'elevata quantità di ossigeno che arriva alle cellule (Gilgun Sherki et al., 2002). A supporto del fatto che lo stress ossidativo gioca un ruolo molto importante nell'ischemia-riperfusione retinica ci sono studi che mostrano che agenti antiossidanti esercitano effetti protettivi nei confronti di questo dannoso fenomeno (Szabo et al., 1991; Gupta and Marmor, 1993; Block and Schwarz, 1997; Kuriyama et al., 2001; Chidlow et al., 2002; Celebi et al., 2002; Komeima et al., 2006). I radicali liberi sono in grado di reagire praticamente con qualsiasi altro tipo di molecola (Flaherty et al., 1988; Southorn and Powis, 1988; Halliwell et al., 1990), il risultato è la produzione di metaboliti tossici che possono provocare incremento nella permeabilità vascolare, edema, infiammazione, incrementare la morte cellulare, interferire con le proteine

di membrana, ad esempio recettori, canali ionici ed enzimi (Esterbauer et al., 1991; Buko et al., 1999). La formazione di radicali liberi implica l'utilizzo di molti tipi di enzimi e di trasportatori. In fenomeni infiammatori, come quelli che si generano durante l'ischemia-riperfusion, la via della NADPH ossidasi sembra essere particolarmente importante per la formazione di radicali liberi (Kukreja et al., 1986). Lo stress ossidativo provoca inoltre il rilascio di prostaglandine e di ossido nitrico (NO) da parte dell'endotelio vascolare (Hardy et al., 2000). Prostaglandine ed NO partecipano alla regolazione del tono muscolare dei vasi retinici e quindi alla regolazione della pressione sanguigna. Questi fattori rilasciati in condizioni di stress provocano l'aumento del flusso sanguigno e quindi il rilascio di ossigeno nella retina. La forte ossidazione che ne consegue altera l'integrità dei vasi sanguigni che contribuisce al danno ischemico (Penn et al., 1994; Reynaud et al., 1994). Inoltre, nella retina l'ischemia indotta dalla perossidazione porta alla formazione di neovasi ed in questo meccanismo sembra siano coinvolti numerosi fattori di crescita, tra questi il già citato VEGF (Wiedemann et al., 1992; Stone et al., 1995; Dal Monte et al., 2007) la cui azione viene regolata anche dall'NO (Morbidegli et al., 1996; Ferrara and Smyth, 1997; Ziche and Morbidegli, 2000). L'NO è una potente molecola di segnalazione secreta dalle cellule endoteliali che agisce sulla muscolatura liscia dei vasi per il mantenimento del giusto livello di vasodilatazione e di flusso sanguigno (Yamamoto et al., 1993; Ostwald et al., 1995; Zagvazdin et al., 1996). Infatti, mentre una produzione limitata di NO assicura un'omeostasi fisiologica di tanti apparati e tessuti, una eccessiva produzione comporta inevitabilmente il danno tissutale e la morte cellulare. La sovra-espressione di NO è stata riscontrata in molte malattie neurodegenerative e sembra provocare apoptosi in seguito a processi infiammatori o ad ischemia (Beckman et al., 1990, 1996a,b; Kunz et al., 2007). Ad esempio, la formazione di NO è stimolata dal glutammato e dagli aminoacidi ad esso correlati, ad esempio l'NMDA, coinvolti nel fenomeno di eccito-tossicità. Nella retina sono presenti tutti i tipi di enzimi "ossido nitrico sintetasi" ed essi sembrano subire un notevole aumento di espressione in seguito ad ischemia (Hangai et al., 1996, 1999; Gwon et al., 1996; Kobayashi et al., 2000; Sennlaub et al., 2001; AbuEl-Asrar et al., 2001; Neufeld et al., 2002; Cheon et al., 2003) ma è difficile stabilire se il loro apporto sia o no benefico.

1.2.5 Modelli sperimentali di ischemia retinica

Numerosi modelli animali sono stati generati per lo studio dell'ischemia retinica, ed essi sono basati principalmente sulla riduzione del flusso sanguigno ottenuta aumentando la pressione oculare (Osborne et al., 2004). I modelli in vivo sono utili poiché consentono di riprodurre quanto più verosimilmente i danni prodotti dall'ischemia nell'uomo. Tuttavia, la vascolarizzazione retinica presenta una grande variabilità tra le specie e questo rappresenta un notevole limite nella sperimentazione in vivo. Tra i piccoli animali da laboratorio, il ratto sembra essere quello più utilizzato anche se il suo sistema vascolare differisce notevolmente da quello umano. Molti modelli sono stati generati anche in vitro, basati sulla riduzione della quantità di ossigeno e di glucosio disponibile (Neal et al., 1994; Osborne et al., 1997; Maynard et al., 1998; Quinones-Hinojosa et al., 1999; Tezel & Wax, 1999; Kuriyama et al., 2001; Luo et al., 2001; Napper et al., 2001; Endo et al., 2002; Tamada et al., 2002; Izumi et al., 2003; Bull & Barnett, 2004; Payet et al., 2004; Ueda et al., 2004; Kinukawa et al., 2005; Mastrodimou et al., 2005). I modelli in vitro consentono una più facile manipolazione della retina ed una più immediata variazione delle condizioni sperimentali. In questi modelli sperimentali spesso viene indotta ipossia a vari stadi fino alla completa sostituzione dell'ossigeno con N₂ oppure viene utilizzato il cianuro per bloccare la respirazione cellulare.

CAPITOLO 2

La SRIF

La SRIF appartiene ad una famiglia che comprende pochi neuropeptidi che originano da differenti processi post-traslazionali del precursore prepro-SRIF di 116 aminoacidi (Krantic, 2004). Sono conosciute solamente due isoforme biologicamente attive della SRIF: la SRIF-14 e la SRIF-28 (l'intera sequenza della SRIF-14 è contenuta nella porzione C-terminale della SRIF-28; Fig. 2.1). Entrambe le isoforme sono state ritrovate nel sistema nervoso sia centrale che periferico ma la SRIF-14 è l'isoforma predominante. Riguardo alla loro presenza in altri tessuti, la proporzione tra le due isoforme è variabile ma entrambe svolgono azioni fisiologiche del tutto simili. Mediante il suo legame a recettori accoppiati a proteine G, la SRIF agisce come neuromodulatore, neurotrasmettitore, come inibitore della proliferazione cellulare e di vari processi di secrezione (Yamada et al., 1992; Weckbecker et al., 1993; Gillies, 1997). Tra tutte le sue azioni fisiologiche, la più nota è la sua peculiare azione inibitoria sia sulla secrezione endocrina che su quella esocrina (Krantic et al., 2004). In particolare la SRIF inibisce la secrezione endocrina della ghiandola pituitaria (ormone della crescita, prolattina, tireotropina), del tratto gastrointestinale (colecistochinina, gastrina, neurotensina, secretina) e del pancreas (glucagone, insulina, polipeptide pancreatico). Nel sistema nervoso centrale, la SRIF agisce come neuromodulatore regolando il rilascio di molti neurotrasmettitori (serotonina, acetilcolina, glutammato, dopamina) e neuro-ormoni (ad esempio l'ormone rilasciante l'ormone della crescita). Riguardo invece all'azione inibitoria della secrezione esocrina, la SRIF inibisce la secrezione dell'amilasi da parte delle ghiandole salivari, dell'acido idrocloridrico e del pepsinogeno da parte della mucosa gastrointestinale, degli enzimi pancreatici e del bicarbonato da parte degli acini pancreatici ed infine della bile da parte del fegato. Inoltre, essa regola l'assorbimento dei nutrienti nell'intestino e la motilità gastrointestinale. La SRIF svolge anche una potente azione immunomodulatoria sull'attività di secrezione delle cellule del sistema immunitario, ad esempio regola la produzione di IgA, IgM, IgE da parte dei linfociti-B, modula la secrezione di interleuchina (IL)-2, IL-4, IL-10 e dell'interferone γ da parte dei linfociti T. Essa inibisce la produzione di istamina, di citochine di tipo infiammatorio (ad esempio IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α). Infine, la SRIF è coinvolta nell'inibizione della chemiotassi dei neutrofili, dell'attività delle "natural cell killer" e di quella fagocitica dei macrofagi. Grazie a queste importanti funzioni inibitorie di numerosi

processi secretori, la SRIF-14 è stata oggetto di studi riguardanti la sua possibile applicazione come agente terapeutico per il trattamento di alcune patologie, ad esempio il diabete, i disordini del tratto gastrointestinale, pancreatiti, alcuni tipi di tumori che portano all'ipersecrezione di gastrina, di insulina, di glucagone e del peptide intestinale vasoattivo. Tuttavia, questi tentativi non hanno ottenuto grande successo a causa della bassa emivita della SRIF, meno di 3 minuti (Patel et al., 1983). Notevoli passi avanti si sono ottenuti dopo la sintesi di molecole analoghe della SRIF (Coy et al., 1973; Rivier et al., 1976; Gottesman et al., 1982; Bauer et al., 1982; Lamberts et al., 1996). Alcuni tra i peptidi agonisti della SRIF di particolare interesse sono l'octreotide (o SMS 201-995) e la lanreotide, un peptide correlato all'octreotide, introdotti nella pratica clinica nel 1987 per il trattamento dell'adenoma della ghiandola pituitaria e dei tumori gastro-entero-pancreatici (Weckbecker et al., 2003). Di recente sintesi è invece il cicloesapeptide SOM230 che sembra essere un potente inibitore dell'ormone della crescita/IGF1 nel ratto, cane, scimmia e nell'uomo. Notevole interesse suscitano anche i peptidi antagonisti della SRIF come ad esempio il CYN-154806.

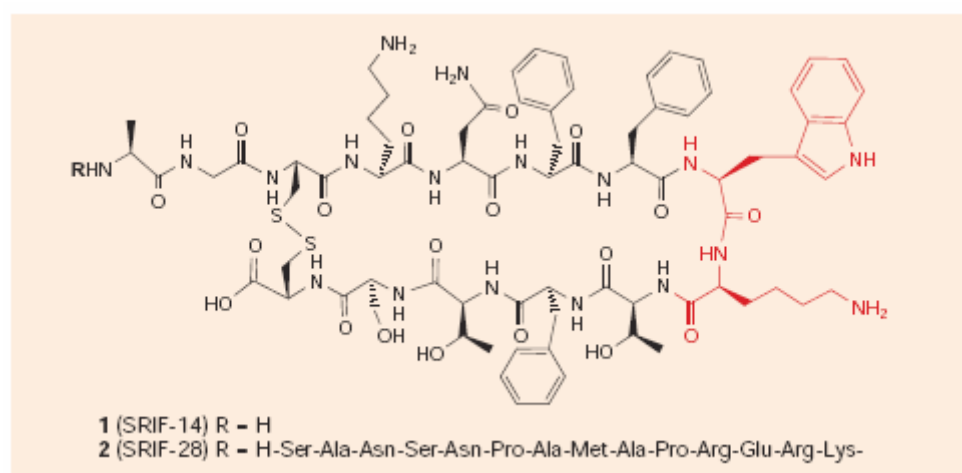


Figura 2.1 Struttura molecolare della SRIF-14 e della SRIF-28. Tratta da *Weckbecker et al., 2003. Nature Reviews, 2:999-1017.*

2.1 I recettori della SRIF (sst)

Le azioni biologiche esercitate dalla SRIF sono mediate da cinque tipi di recettori, sst1-sst5, che sono stati caratterizzati in più specie diverse. Essi sono codificati da cinque geni differenti che sono altamente conservati (Moller et al., 2003). Tutti i tipi di recettori della SRIF sono stati localizzati sia nel sistema nervoso centrale che nelle ghiandole endocrine ed esocrine. In particolare, l'espressione degli mRNA relativi a tutti i recettori della SRIF sono stati rilevati nel sistema nervoso centrale del ratto e del topo sebbene gli sst1 e gli sst2 siano quelli maggiormente espressi (Patel, 1999). Anche nel pancreas, nell'intestino e nello stomaco sono presenti i trascritti di tutti e cinque i recettori mentre in altri organi o tessuti la presenza di trascritti è molto più selettiva. Entrambe le isoforme di SRIF legano tutti i recettori, sebbene la SRIF-28 abbia come ligando preferenziale il recettore sst5.

I recettori della SRIF appartengono alla superfamiglia di recettori accoppiati alle proteine G con sette domini transmembrana. La cascata di segnalazione successiva all'attivazione delle proteine G avviene attraverso varie vie che comprendono l'attivazione di alcuni enzimi come ad esempio l'AC, la PTPasi (phosphotyrosyl phosphatase), le MAPK (mitogen-activated protein kinase) che sono regolati da cambiamenti dei livelli intracellulari di ioni calcio e potassio (Fig. 2.2; Patel, 1999; Hannon et al., 2002). Il tipo di via di segnalazione scelta dipende principalmente dalla distribuzione tessuto-specifica del ligando e dal tipo di recettore coinvolto oltre che dalle molecole di segnalazione presenti (Hannon et al., 2002). Il coinvolgimento selettivo dei vari recettori della SRIF in specifiche risposte fisiologiche è ancora oggetto di studio.

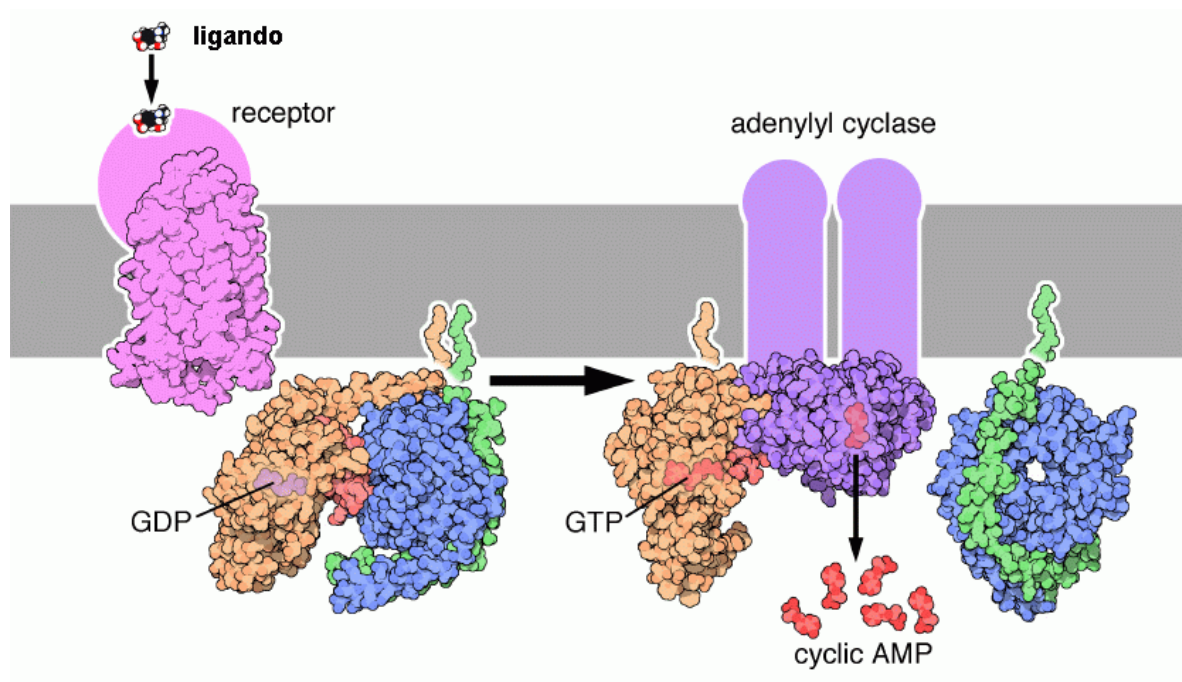


Figura 2.2 Cascata di segnalazione che coinvolge proteine G. Tratto dal sito internet *Protein data bank*: <http://www.rcsb.org/pdb/results/webResults.do>

2.2 Il sistema somatostatinerigico nella retina

La SRIF è un neuropeptide ampiamente diffuso in tutto il sistema nervoso centrale e periferico (Blake et al., 2004; Olias et al., 2004). Delle due isoforme biologicamente attive, la SRIF-14 è l'unica presente nella retina (Patel, 1999). Nella retina la SRIF è localizzata in cellule amacrine e/o amacrine spiazzate ed in cellule ganglionari (Fig. 2.3 A; Tornqvist et al., 1982; Spira et al., 1984; Sagar et al., 1985; Tornqvist and Ehinger, 1988; Larsen et al., 1990; Cristiani et al., 2002). In particolare nella retina di topo la popolazione di cellule amacrine che contengono SRIF è distribuita omogeneamente in tutte le zone retiniche mentre quella delle amacrine spiazzate è concentrata nella retina ventrale (Cristiani et al., 2002). I processi di tali cellule amacrine sono localizzati nell'IPL in tutte le zone retiniche. Nella retina di mammifero, la SRIF viene sintetizzata principalmente in cellule amacrine (vedi per referenze Thermos, 2003) ed agisce sui suoi recettori che hanno pattern diversi a seconda della specie considerata (Johnson et al., 1998; Helboe and Moller, 1999; Johnson et al., 1999; Fontanesi et al., 2000; Petrucci et al., 2001; Vasilaki et al., 2001; Cristiani et al., 2002). Nella retina sono stati ritrovati gli mRNA di tutti i cinque sottotipi recettoriali (Mori et al., 1997; Johnson et al.,

1999; Cristiani et al., 2000, 2002), sebbene l'abbondanza di ciascuno di essi vari tra le specie considerate. In particolare nel ratto e nel topo gli mRNA per gli sst2 e gli sst4 sono i più abbondanti (Mori et al., 1997; Cristiani et al., 2002). Studi di immunoistochimica hanno mostrato che i recettori della SRIF sono espressi da varie popolazioni retiniche. In particolare i recettori sst1 vengono espressi prevalentemente da cellule amacrine contenenti SRIF (Helboe and Moller, 1999; Cristiani et al., 2000; Dal Monte et al., 2003b; Thermos, 2003) e funzionano come autorecettori (Mastrodimou and Thermos, 2004; Thermos et al., 2006). Infatti, nella retina di ratto è stato osservato che la SRIF regola il suo stesso rilascio attraverso l'attivazione sui recettori sst1. Nella retina di topo i recettori sst1 vengono espressi da tutte le cellule che contengono SRIF (Dal Monte et al., 2003b). Nella retina di coniglio i recettori sst1 sono espressi anche da tutte le cellule amacrine dopaminergiche (Cristiani et al., 2000). Riguardo alle due isoforme dei recettori sst2, l'isoforma sst2_A è stata localizzata mediante immunoistochimica nella retina di ratto, coniglio e topo (Fig. 2.3 B; Johnson et al., 1998, 1999; Helboe and Moller, 1999; Fontanesi et al., 2000; Petrucci et al., 2001; Vasilaki et al., 2001; Cristiani et al., 2002). In quest'ultimo in particolare i recettori sst2_A sono stati osservati nelle cellule bipolari dei bastoncelli, nelle cellule orizzontali ed in cellule amacrine (Cristiani et al., 2002; Dal Monte et al., 2003a,b), incluse quelle glicinerghiche e quelle dopaminergiche contenenti tirosina idrossilasi (TH). Riguardo invece all'isoforma sst2_B nella retina di ratto essa sembra essere maggiormente presente nella membrana dei fotorecettori, e ciò indica che la SRIF esercita la sua azione sugli strati retinici esterni (Vasilaki et al., 2001). Nella retina umana sono stati identificati mediante immunoistochimica sia i recettori sst1 che gli sst2_A sia in popolazioni cellulari retiniche (van Hagen et al., 2000; Klisovic et al., 2001) che in cellule endoteliali di vasi sanguigni (Klisovic et al., 2001). La SRIF nella retina di ratto può modulare i livelli di dopamina attraverso l'attivazione dei recettori sst1 ed sst2 (Kouvidi et al., 2006). Inoltre la SRIF attivando i recettori sst2 può incrementare i livelli di NO (Vasilaki et al., 2002) e di cGMP (Mastrodimou et al., 2006). Nella retina di topo è stata osservata la presenza di mRNA relativo al recettore sst3 (Mori et al., 1997; van Hagen et al., 2000; Klisovic et al., 2001; Cristiani et al., 2002) ma non è stata mai osservata la sua localizzazione. Infine, in alcune cellule ganglionari di topo è stato osservato il recettore sst4 (Cristiani et al., 2002), mentre il recettore sst5 sarebbe espresso nella retina di ratto da cellule amacrine colinergiche e dopaminergiche contenenti SRIF (Ke and Zhong, 2007). Notevoli passi avanti nello studio

dei recettori della SRIF nella retina sono stati compiuti da quando sono stati generati topi *sst1* KO o *sst2* KO (Kreienkamp et al., 1999; Allen et al., 2003).

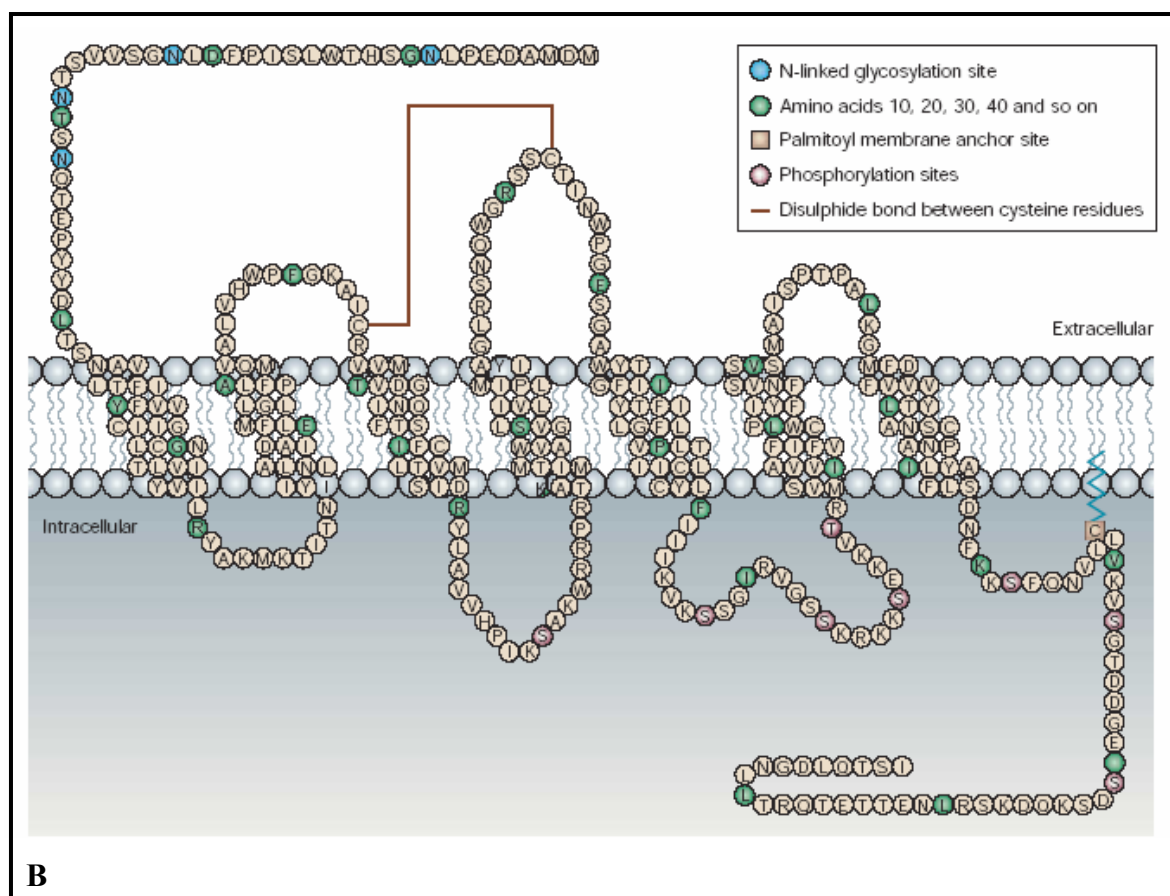
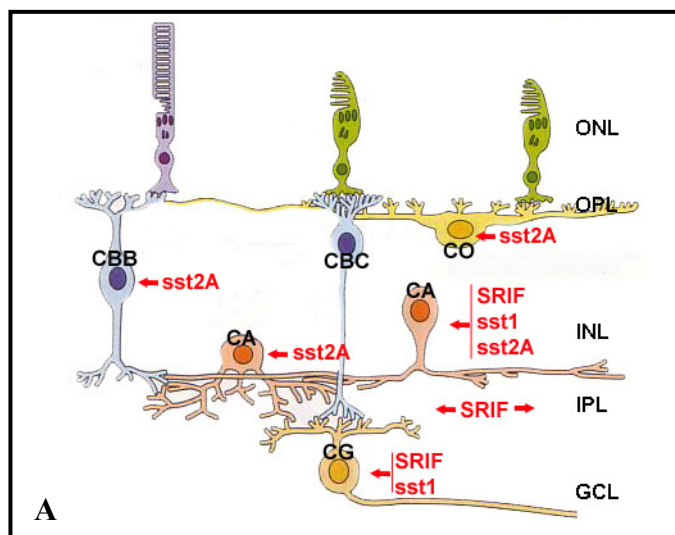


Figura 2.3 (A) Localizzazione della SRIF e dei recettori sst1 ed sst2_A nella retina di topo. CG: cellule ganglionari; CA: cellule amacrine; CBB: cellule bipolari dei bastoncelli; CBC: cellule bipolari dei coni; CO: cellule orizzontali. (B) Struttura dei recettori della SRIF: recettore sst2_A. Tratta da *Weckbecker et al., 2003. Nature Reviews, 2:999-1017.*

2.2.1 Retine KO per i recettori sst1 o per i recettori sst2 della SRIF

Negli ultimi anni, gli studi sui KO per i recettori della SRIF hanno fornito alcune importanti informazioni. Sono stati generati KO per ciascuno dei cinque recettori della SRIF ma i più studiati sono i KO per il recettore sst1 e quelli per il recettore sst2. Nelle retine di topi sst1 KO o sst2 KO, sono state osservate profonde alterazioni nell'espressione dei livelli di SRIF e dei suoi recettori (Fig. 2.4; Dal Monte et al., 2003b, 2007; Casini et al., 2004; Bigiani et al., 2004). In particolare, in tali retine non sono stati osservati cambiamenti nei livelli d'espressione dell'mRNA per la SRIF ma cambiamenti nel livello di peptide presente. Infatti, nelle retine sst1 KO è stato osservato un notevole incremento nel livello del peptide SRIF, mentre un notevole decremento è stato osservato nelle retine sst2 KO. Inoltre, nelle retine sst1 KO o sst2 KO, il recettore mancante viene compensato dalla sovra-espressione dell'altro. Più precisamente, nelle retine sst1 KO si osserva sovra-espressione del recettore sst2, mentre nelle retine sst2 KO si osserva sovra-espressione del recettore sst1. Recenti osservazioni indicano che la sovra-espressione di recettori sst2 in retine sst1 KO è correlata ad un incremento della funzione dei recettori sst2 stessi (Bigiani et al., 2004). Questo meccanismo di compensazione dei recettori della SRIF è stato osservato anche nelle retine KO per la SRIF (Casini et al., 2005; Mastrodimou et al., 2006). Queste osservazioni indicano che, nelle retine di topo sst1 KO, i livelli endogeni di SRIF dipendono dai livelli del recettore sst1 che agisce come un autorecettore. Inoltre, in queste retine il contemporaneo aumento dei recettori sst2 e della SRIF suggerisce che la SRIF può agire come modulatore dei recettori sst2 attraverso la sua azione sui recettori sst1. Nelle retine che sovra-esprimono i recettori sst2 l'espressione delle proteine Go α aumenta sensibilmente e proprio in queste retine la SRIF agisce inibendo l'attività dell'AC (Pavan et al., 2004). Le retine sst1 KO mostrano inoltre un incremento significativo dell'inibizione della SRIF, mediata dai recettori sst2, sia sulle correnti al potassio in singole cellule bipolari dei bastoncelli, sia della depolarizzazione indotta dal rilascio di glutammato su espianti di retina (Petrucchi et al., 2001; Bigiani et al., 2004). Queste osservazioni supportano l'idea che un'appropriato equilibrio nell'espressione della SRIF, dei recettori sst1 ed sst2 è di fondamentale importanza per il corretto

funzionamento della circuiteria retinica (Thermos et al., 2006). A livello morfologico, nelle retine *sst1* KO si osserva un ingrossamento dei terminali assonali delle cellule bipolari dei bastoncelli (Casini et al., 2004). A livello ultrastrutturale si osserva che in quei terminali il numero delle vescicole sinaptiche aumenta e ciò può determinare una diversa risposta funzionale delle cellule bipolari retiniche che li contengono. Quindi si può supporre che la SRIF eserciti un ruolo nel differenziamento dei terminali assonali delle cellule bipolari dei bastoncelli e che probabilmente influenzi anche la loro funzione.

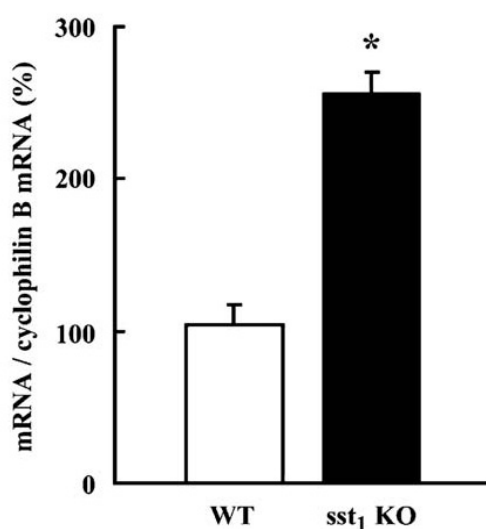


Figura 2.4 Espressione dei livelli di SRIF in retine *sst1* KO. Tratto da *Dal Monte et al., 2003. Neuropharmacology 45:1080–1092.*

2.3 Cascata di segnalazione della SRIF nella retina

Si conosce ancora poco della cascata di segnalazione della SRIF nella retina di mammifero. Il legame della SRIF ai suoi recettori induce l'attivazione di proteine G innescando una cascata di segnalazione che agisce attraverso più vie (Fig. 2.5; Weckbecker et al., 2003). In queste vie, come è stato già accennato in precedenza, sono coinvolti numerosi enzimi come ad esempio l'AC, la PTPasi e le proteine MAPK la cui attività viene modulata attraverso cambiamenti nei livelli intracellulari di ioni K^+ e Ca^{2+} . Il tipo di segnalazione che prevale in ciascuna cellula dipende dalla distribuzione tessuto-specifica del ligando, dal tipo di recettore per la SRIF e dagli elementi di segnalazione presenti (Patel, 1999; Hannon et al.,

2002). I recettori della SRIF innescano una specifica via di segnalazione attraverso l'attivazione di specifiche proteine G, in particolare proteine $G\alpha$ (Patel, 1999; Hannon et al., 2002; Rosskopf et al., 2003). L'interazione di specifiche proteine G e recettori SRIF dipende, come già accennato, dalla loro rispettiva distribuzione tessuto-specifica (Hannon et al., 2002; Rosskopf et al., 2003). Sebbene il panorama non sia del tutto chiaro, sembra che tutti i recettori della SRIF conosciuti nell'uomo possano inibire l'AC e quindi portare ad una diminuzione dei livelli di AMP ciclico (per referenze vedi Weckbecker et al., 2003). In molte cellule l'attivazione dei recettori della SRIF causa l'inibizione dei canali calcio, l'inibizione del rilascio del Ca^{2+} intracellulare o l'attivazione dei canali potassio e quindi la successiva iperpolarizzazione della membrana (Patel, 1999). Tuttavia, in alcuni sistemi l'attivazione dei recettori della SRIF può provocare incremento dell'attività di specifiche isoforme di fosfolipasi C e quindi provocare incremento dei livelli di inositolo trifosfato e di Ca^{2+} intracellulare (Murthy et al., 1996; Cheng et al., 2002; Rosskopf et al., 2003).

Gli studi condotti sulla retina hanno mostrato risultati contraddittori. Infatti, la SRIF non esercita alcun effetto sull'accumulo di cAMP nella retina di carpa, piccione e coniglio (Schorderet et al., 1981; Watling and Dowling 1983) ma essa induce accumulo di cAMP nella retina di pollo (Firth et al., 1998). Nella retina degli ovini la SRIF inibisce l'attività dell'AC (Colas et al., 1992), invece nella retina di ratto essa sembra attivare l'AC (Feigenspan and Bormann, 1994). Nel topo il legame della SRIF al suo specifico recettore sst2 sembra inibire l'attività dell'AC stimolata da forskolina (FSK), probabilmente attraverso proteine $G\alpha$. Anche il legame della SRIF al recettore sst1 sembra inibire l'attività dell'AC, ma solamente negli sst2 KO (Pavan et al., 2004). Queste osservazioni indicano che, nella retina di topo, l'interazione tra recettori sst1 ed sst2 può prevenire il loro effetto sull'attività dell'AC.

Il variegato pattern d'espressione dei recettori della SRIF ed i molteplici meccanismi di segnalazione attivati dalla SRIF stessa suggeriscono che questo peptide possa esercitare molteplici diverse azioni sui neuroni retinici ed in generale possa intervenire significativamente sulla fisiologia della retina.

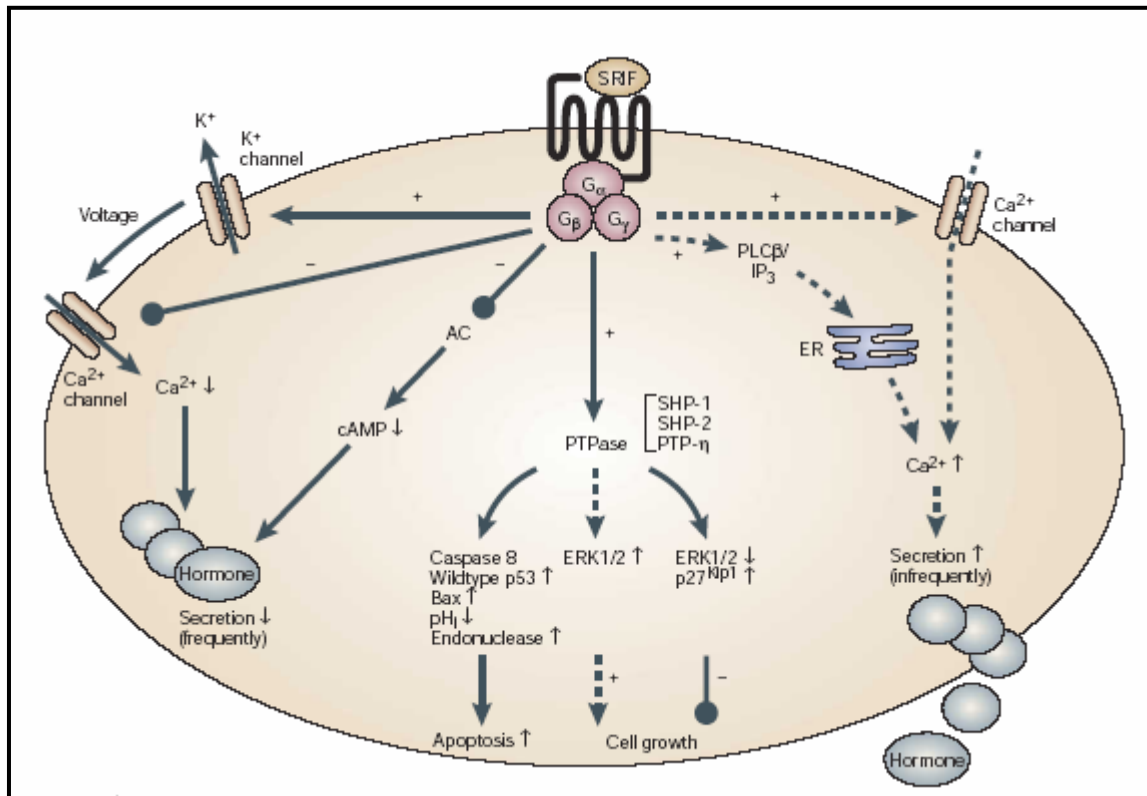


Figura 2.5 Cascata di segnalazione della SRIF. Tratta da *Weckbecker et al., 2003. Nature Reviews, 2:999-1017*

2.3.1 Modulazione della cascata di segnalazione: proteine GRK e RGS

Le vie di segnalazione che seguono all'attivazione del recettore vengono normalmente regolate attraverso vari meccanismi che comprendono anche l'utilizzo di molecole modulatorie. L'attivazione dei recettori accoppiati a proteine G da parte dei loro agonisti innesca un processo di feedback negativo conosciuto come desensitizzazione (Mètayè et al., 2005). Questo processo diminuisce la quantità di segnalazione della cellula. Infatti, durante la desensitizzazione viene indotta la fosforilazione dei recettori attraverso recettori chinasi accoppiati a proteine G (GRK) ed i recettori fosforilati causano la riduzione della sintesi di secondi messaggeri (Fig. 2.6A). Nei mammiferi si conoscono sette diverse isoforme di GRK che mostrano struttura e funzioni simili tra loro (per referenze vedi Penela et al., 2003; Mètayè et al., 2005; Ribas et al., 2007). A livello strutturale essi mostrano un dominio centrale catalitico, un dominio amino-terminale di 183-188 aminoacidi che include una regione omologa alle RGS (Regulator of G-protein Signaling) e la regione carbossi-terminale

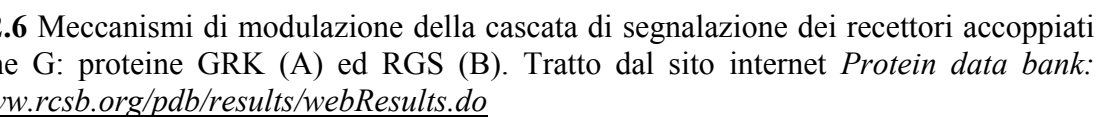
di lunghezza variabile. Sulla base della loro omologia di sequenza, i membri della famiglia delle GRK possono essere suddivisi in tre gruppi principali: la sottofamiglia delle rodopsina chinasi o sottofamiglia delle GRK visive (che comprende la GRK1 e GRK7); la sottofamiglia delle GRK2 e GRK3 ed infine la sottofamiglia delle GRK4 (che comprende la GRK4, GRK5 e GRK6). GRK2, GRK3, GRK5 e GRK6 sono espresse in numerosi tessuti mentre altre GRK mostrano un'espressione molto più selettiva. In particolare, le GRK1 vengono espresse prevalentemente nella retina e nella ghiandola pineale, le GRK7 nei coni ed infine le GRK4 nei testicoli. Tuttavia, anche se alcune GRK si localizzano in più tessuti, alcuni studi mostrano che le GRK2 sono prevalentemente espresse nelle cellule dell'endotelio vascolare, le GRK3 sono principalmente presenti nel miocardio ed infine le GRK5 sono principalmente localizzate nel miocardio e nelle cellule endoteliali. Le GRK vengono finemente regolate a livello della loro attività chinasi, della loro localizzazione subcellulare ed della loro espressione. Infatti, sembra che alterazioni della loro espressione siano associate a condizioni patologiche. Ad esempio alterazioni nell'espressione delle GRK2 e GRK5 sono state osservate nell'ipotiroidismo, nell'ischemia e nell'infarto del miocardio. Alterazione nell'espressione delle GRK2 e GRK6 sono state rilevate nell'artrite reumatoide ed infine variazioni nell'espressione delle GRK2 sono state osservate nell'ipertensione ed in modelli di ipertrofia cardiaca (Métayé et al., 2005).

A causa dell'importanza che queste molecole rivestono, mutazioni a loro carico possono provocare gravi sindromi. Mutazioni nel gene che codifica per la GRK1 sono state osservate in malattie associate a degenerazione della retina come ad esempio nella sindrome di Oguchi che è una rara forma di retinite pigmentosa. Tuttavia, le disfunzioni a carico delle GRK possono non essere la causa che produce una certa patologia ma il risultato della malattia stessa (per referenze vedi Métayé et al., 2005; Yang and Xia, 2006).

La rodopsina chinasi o GRK1 è stata la prima GRK scoperta, essa fosforila preferenzialmente la rodopsina attivata dalla luce (per referenze vedi Métayé et al., 2005), infatti essa viene espressa dai fotorecettori della retina dei mammiferi. L'altro membro appartenente alla sottofamiglia delle rodopsina chinasi, la GRK7, è stato recentemente clonato dai coni e bastoncelli della retina di mammifero (per referenze vedi Métayé et al., 2005). Nella retina umana la GRK7 viene espressa esclusivamente nel segmento esterno dei coni dove catalizza la fosforilazione luce-dipendente della rodopsina suggerendo che essa può agire come una opsina chinasi dei coni.

Un altro gruppo di proteine che possono agire nella desensitizzazione dei recettori accoppiati a proteine G sono le RGS. Le proteine RGS esercitano la loro azione modulatoria regolando il turn-over della subunità alfa delle proteine G (Fig. 2.6B; per referenze vedi Larminie et al., 2004). Esse infatti possono funzionare come proteine GAP (guanosine triphosphatase, GTPase, accelerating proteins). Le RGS nei mammiferi sono un gruppo di proteine che hanno in comune una regione altamente conservata di circa 120 aminoacidi denominata dominio RGS. Sulla base della loro sequenza le proteine RGS sono state suddivise in otto principali sottofamiglie: A (o RZ); B (o R4); C (o R7); D (o R12); E (o RA); F (o GEF); G (o GRK) ed infine H (o sortine nexin, SNX). Sono stati identificati almeno trentasette geni nell'uomo che codificano per proteine che contengono uno più domini RGS o RGS-simili (per referenze vedi Willars et al., 2006). La differenza esistente tra i domini delle varie RGS determina la loro specifica azione su specifiche proteine $G\alpha$. Inoltre, anche nelle regioni che non riguardano i domini RGS possono intervenire modificazioni che contribuiscono alla variabilità ed alla complessità di questa famiglia di proteine. Le proteine RGS vanno incontro a numerose modificazioni post-traslazionali di cui la più studiata è la fosforilazione, poichè le RGS sono substrati per numerose attività chinasiche. Ad esempio, le RGS vengono fosforilate dalla PKC, dalla proteina chinasi A (PKA) e dalla proteina chinasi G (PKG). Inoltre, un'unica RGS può essere substrato per più proteine chinasi ed avere quindi in ciascun caso un ruolo diverso. Nel sistema visivo la proteina RGS9 è stata identificata come la proteina con attività GAP che controlla l'attività GTPasica delle proteine $G\alpha$ (He et al., 1998). In particolare, la RGS9-1 nella retina può essere substrato per la PKA e mostrare attività GAP (Balasubramanian et al., 2001) ma può anche essere ridotta dalla luce e divenire mediatrice dell'adattamento alla luminosità. Questo esempio mostra che mentre la fosforilazione è una modificazione comune tra le RGS, l'effetto che si produce è diverso.

La capacità delle RGS di influenzare la segnalazione cellulare dipende strettamente dalla loro localizzazione sub-cellulare. Molte RGS si trovano sulla membrana plasmatica e ciò è essenziale per la loro interazione con altre proteine e soprattutto con le proteine G. Tuttavia, altre sono localizzate nel citosol o nel nucleo e ciò indica che esse possono svolgere altre funzioni oltre all'interazione con le proteine G. Studi recenti hanno mostrato il possibile coinvolgimento di geni per le RGS in alcune malattie del sistema nervoso centrale come ad esempio la schizofrenia, il morbo di Parkinson ed altri disturbi di natura ansiosa. Inoltre, ci sono studi che dimostrano che la regolazione dell'espressione di queste proteine è coinvolta



Ci sono evidenze che indicano che la SRIF possa regolare il rilascio di neurotrasmettitori come la dopamina, il glutammato, ed anche il suo stesso rilascio attraverso l'interazione con il recettore sst1 (Thermos et al., 2006). Sembra infatti che il recettore sst1 agisca come un autorecettore nel limitare il rilascio di SRIF. A supporto di queste osservazioni, studi condotti sulla retina di ratto indicano che l'attivazione dei recettori sst1 induce una forte diminuzione nel rilascio di SRIF (Mastrodimitou and Thermos, 2004; Thermos et al., 2006). Studi condotti in retine di topo sst1 KO o sst2 KO sostengono pienamente questi dati (Casini et al., 2004), infatti in retine sst1 KO si osserva aumento dei livelli di SRIF mentre in quelle sst2 KO si osserva una consistente diminuzione di SRIF (ricordiamo che in queste retine è presente sovra-espressione dei recettori sst1).

Il glutammato è il maggiore neurotrasmettitore di tipo eccitatorio della retina di mammifero ed è implicato nella neurotrasmissione lungo la via verticale che dai fotorecettori passa per le cellule bipolari ed arriva alle cellule ganglionari. Le cellule bipolari contengono elevate quantità di glutammato ed in particolare le cellule bipolari dei bastoncelli che contengono anche i recettori sst2_A della SRIF. Sulla base di queste osservazioni è stato ipotizzato che la SRIF possa svolgere un ruolo nella regolazione del rilascio di glutammato attraverso il legame ai recettori sst2_A (Dal Monte et al., 2003a). Anche in questo caso studi condotti su retine sst1 KO (dove i recettori sst2 sono sovra-espressi) hanno fornito importanti informazioni, infatti in queste retine è stata osservata una maggiore inibizione del rilascio di glutammato (Bigiani et al., 2004). Quindi, si può ragionevolmente sostenere che la SRIF apporta un notevole contributo nella regolazione della trasmissione glutamatergica lungo la via di segnalazione verticale. Si può dire inoltre che la SRIF attraverso la regolazione del rilascio di glutammato possa esercitare effetti neuroprotettivi nei confronti della eccitotossicità da glutammato che sembra caratterizzare molte patologie retiniche.

La SRIF può partecipare anche alla regolazione di altri importanti neurotrasmettitori nella retina, come ad esempio la glicina (Cristiani et al., 2002), il GABA (Vardi and Sterling, 1994; Cristiani et al., 2002; Ke and Zhong, 2007) e l'acetilcolina (Ke and Zhong, 2007). La SRIF nella retina sembra inoltre intervenire nel controllo del rilascio della dopamina, ad esempio nella retina di ratto è stato recentemente dimostrato che l'attivazione dei recettori sst1 o sst2 causa un aumento del rilascio di dopamina (Kouvidi et al., 2006). Dal momento che i livelli di dopamina nella retina sono in correlazione con l'intensità della luce, la SRIF attraverso il

controllo del rilascio di dopamina potrebbe svolgere un'importante funzione nell'adattamento alla luce.

2.5 La SRIF nelle patologie retiniche

Le molteplici azioni fisiologiche proposte per la SRIF hanno fatto sì che il sistema somatostatinergico sia attualmente al centro di numerosi progetti di ricerca (Weckbecker et al., 2003; Panteris and Karamanolis, 2005). Molecole sintetiche analoghe della SRIF stanno suscitando notevole interesse poiché esse possono agire da agonisti o da antagonisti della SRIF stessa (Weckbecker et al., 2003; Lewis et al., 2003; Olias et al., 2004; van der Hoek et al., 2004, 2005; Cervia et al., 2005a,b; Batista et al., 2006; Armani et al., 2007; Ludvigsen et al., 2007; Nolan et al., 2007; Zatelli et al., 2007). Tra i peptidi agonisti della SRIF l'octreotide e la lanreotide (Fig. 2.7; Weckbecker et al., 2003) mostrano un'alta affinità per il recettore sst2 ed un'affinità intermedia per i recettori sst3 ed sst5. La SOM230 invece lega con alta affinità i recettori sst1, sst2, sst3 ed sst5. Tra gli antagonisti della SRIF il CYN-154806 (Fig. 2.8) è in grado di bloccare i recettori sst2 e con minore affinità anche il recettore sst5. Recentemente, la SRIF o suoi analoghi sono stati proposti come agenti terapeutici anche in patologie che colpiscono la retina (Croxen et al., 2004; Sjolie and Moller, 2004; Casini et al., 2005; Missotten et al., 2005; Boehm, 2007; Pali et al., 2007). Recenti studi indicano che la SRIF o suoi analoghi possono esercitare effetti benefici nella retina affetta da retinopatia diabetica, inibendo la neovascolarizzazione sebbene i precisi meccanismi siano ancora non del tutto chiari (Casini et al., 2005; Boehm, 2007). Infatti la SRIF, che in condizioni normali è presente nell'umor vitreo, sembra essere di notevole importanza nel mantenimento del corretto equilibrio fisiologico della retina (Simo et al., 2002; Hernandez et al., 2005). Ci sono evidenze che indicano che analoghi della SRIF, come ad esempio l'octreotide, esercitano un effetto protettivo sulla retina in condizioni di ischemia-riperfusion (Celiker and Ilhan, 2002; Thermos et al., 2006). L'octreotide esercita la sua azione anti-angiogenica regolando la secrezione di fattori angiogenici come l'IGF-1 ed il VEGF (Danesi et al., 1997; Lawnicka et al., 2000; Garcia de la Torre et al., 2002; Wilkinson-Berka et al., 2006; Boehm, 2007). Ulteriori osservazioni indicano che agonisti del recettore sst2 attenuano la morte cellulare nella retina di ratto sottoposta ad ischemia chimica (Mastrodimitou et al., 2005). I meccanismi secondo i quali la SRIF o suoi analoghi possano esercitare tali effetti non sono ancora del tutto chiari ma probabilmente la SRIF può inibire l'angiogenesi retinica esercitando effetti

paracrini e autocrini, forse agendo sulle cellule retiniche o sui vasi sanguigni (Higgins et al., 2002; Garcia de la Torre et al., 2002; Baldysiak-Figiel et al., 2004; Dasgupta, 2004; Boehm, 2007).

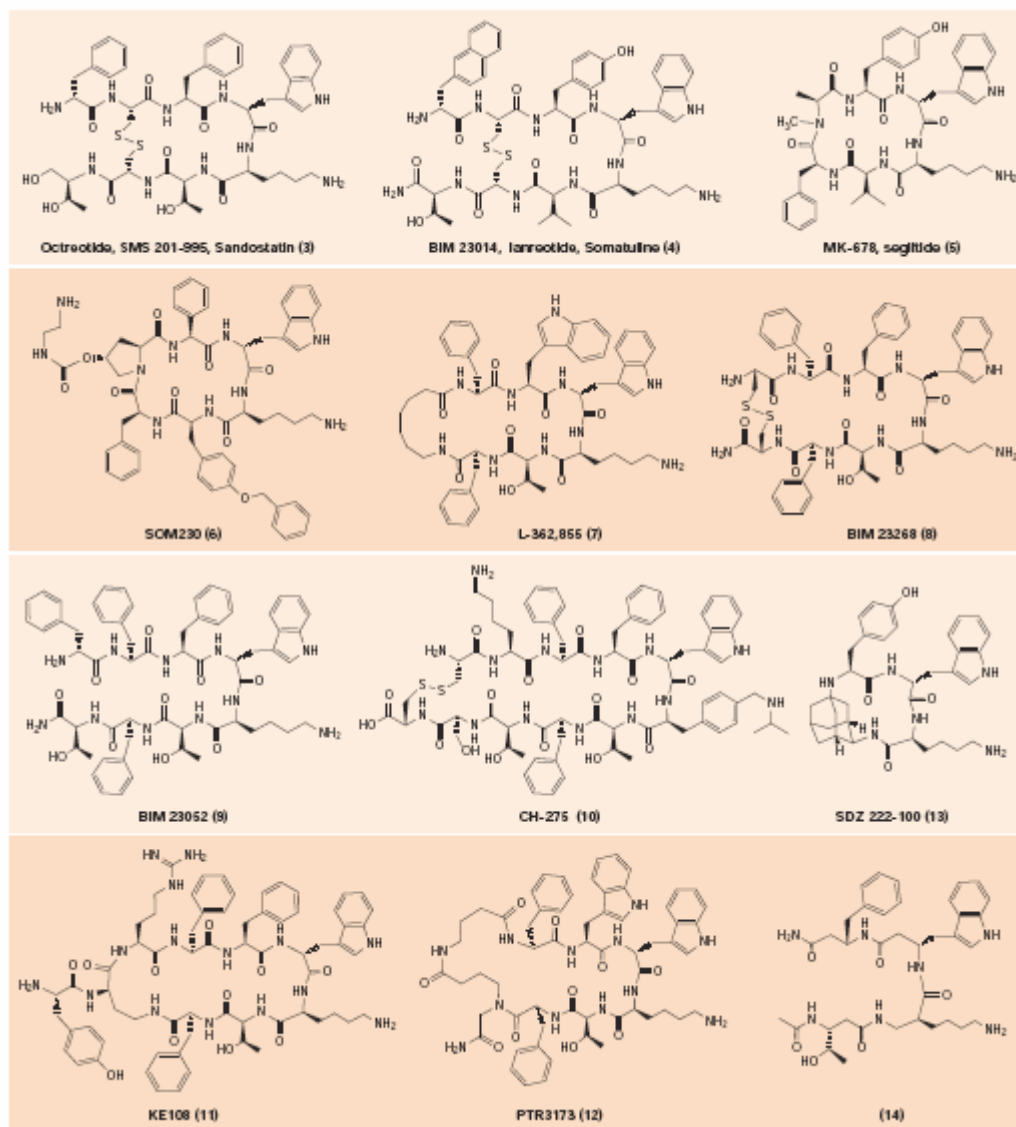


Figura 2.7 Strutture molecolari di peptidi analoghi della SRIF. Tratto da *Weckbecker et al., 2003. Nature Reviews, 2:999-1017.*

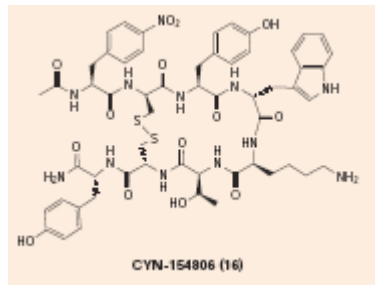


Figura 2.8 Struttura di un peptide antagonista della SRIF. Tratto da *Weckbecker et al.*, 2003. *Nature Reviews*, 2:999-1017.

SCOPO DELLA TESI

La sovra-espressione di recettori sst2 della SRIF, caratteristica delle retine sst1 KO, è accompagnata da un aumento della segnalazione attraverso recettori sst2. Ciò suggerisce la possibilità di usare retine con delezione del recettore sst1 per ottenere espressione di sst2 funzionali ad elevata densità. La nostra ipotesi è che la SRIF, agendo su recettori sst2, possa contrastare la morte neuronale indotta da ischemia. Inoltre, ulteriore ipotesi è che nelle retine WT ed sst1 KO, la modulazione dei recettori sst2 da parte di specifici agonisti o antagonisti possa modulare il rilascio di glutammato e la percentuale di morte cellulare. Se così fosse potremmo dimostrare il diretto coinvolgimento dei recettori sst2 nell'azione protettiva della SRIF nei confronti del danno ischemico. Tuttavia, per poter far luce sulla modalità di azione della SRIF in condizioni di ischemia, è necessario conoscere più in dettaglio la via di trasduzione del segnale che segue l'attivazione dei suoi recettori, in particolar modo del recettore sst2. I dati ottenuti con queste ricerche potrebbero risultare importanti nello sviluppo di nuove molecole a scopo terapeutico.

Scopi specifici

Scopo 1 Dimostrare che la sovra-espressione di recettori sst2 funzionali (come in retine sst1 KO) protegge contro la neurodegenerazione indotta da ischemia e che la neurodegenerazione è maggiore in retine sst2 KO.

Scopo 2 Identificare, con analisi morfologica e quantitativa, le popolazioni cellulari retiniche colpite da morte cellulare causata da ischemia e determinare il grado di protezione di ciascuna popolazione cellulare nelle retine che sovra-esprimono i recettori sst2.

Scopo 3 Dimostrare che sia il rilascio di glutammato che la protezione nei confronti dell'insulto ischemico è modulata da agonisti o antagonisti dei recettori sst2 della SRIF.

Scopo 4 Fornire informazioni riguardo alle vie di segnalazione coinvolte nel sistema somatostatinergico. In particolare, indagare l'espressione di proteine regolatrici dei recettori accoppiati a proteine G in relazione ai trattamenti farmacologici. Inoltre, studiare il sistema AC/cAMP che sembra essere coinvolto nell'azione anti-angiogenica della SRIF.

Tutti gli studi eseguiti mediante l'utilizzo di animali sono stati condotti nel rispetto della legge Italiana N°116/1992 e secondo la direttiva della Comunità Europea EEC/609/86. Inoltre, sono state adottate tutte le precauzioni possibili al fine di evitare sofferenza agli animali utilizzati.

CAPITOLO 3

Modulazione della risposta all'ischemia in retine con alterazione genetica dell'espressione di recettori della SRIF

Molte patologie retiniche sono caratterizzate da neoangiogenesi (Campochiaro, 2000) e da morte cellulare (Barber, 2003). La causa principale di morte cellulare in queste patologie è l'ischemia (Quigley et al., 1985, 1995; Levin and Louhab, 1996; Barber, 2003; Osborne et al., 1999e, 2004) ed il danno neuronale che ne consegue è causato principalmente dalla perdita dell'omeostasi del glutammato (Lipton, 1999; Won et al., 2002; Arundine and Tymianski, 2003; Camacho and Massieu, 2006). Le diverse popolazioni neuronali retiniche mostrano una diversa sensibilità all'ischemia ed all'eccitotossicità da glutammato, ciò può dipendere dal tipo e dalla quantità di recettori eccitatori o inibitori presenti (Osborne et al., 2004). Nel fenomeno ischemico la morte neuronale sembra avvenire principalmente per apoptosi (Choi, 1996; Springer, 2002), infatti la presenza di markers apoptotici è stata documentata in modelli di ischemia retinica transiente (Kaneda et al., 1999; Daugeliene et al., 2000; Singh et al., 2001). Numerosi modelli sono stati creati per lo studio dell'ischemia retinica. Alcuni di questi, molto utili poiché consentono di mimare le condizioni che causano ischemia nell'uomo, sono modelli in vivo (Osborne et al., 2004). Altri modelli sono stati sviluppati in vitro poiché consentono una maggiore manipolazione della retina e delle condizioni sperimentali (per referenze ed ulteriori dettagli vedi capitolo 1, paragrafo 1.2.5). I modelli animali più usati sono il ratto, il pollo, il coniglio o il maiale, mentre non si ha conoscenza circa l'utilizzo in vitro di retine ischemiche di topo. In questo capitolo verranno illustrati i risultati sperimentali ottenuti dallo sviluppo di un nuovo modello in vitro di ischemia retinica nel topo. Questo modello sperimentale è stato utilizzato per la valutazione del livello di morte cellulare in ciascuno strato della retina e per indagini riguardanti la presenza di marker apoptotici. L'entità dell'insulto ischemico è stata inoltre valutata su singole popolazione cellulari retiniche. Infine è stato messo in correlazione il danno ischemico con la quantità di glutammato rilasciato. Questo studio in seguito è stato esteso a retine sst1 KO o sst2 KO poiché la SRIF, o suoi analoghi, attraverso il legame al recettore sst2 può esercitare un ruolo protettivo nei confronti del danno ischemico (per referenze ed ulteriori dettagli vedi capitolo 2). Nei modelli sst1 KO ed sst2 KO è stata valutata l'entità del danno ischemico con l'ipotesi

che retine che mostrano sovra-espressione e maggiore funzionalità dei recettori sst2 (come le retine sst1 KO) possano mostrare una riduzione del danno associato all'ischemia, mentre retine in cui i recettori sst2 sono assenti (come nelle retine sst2 KO) possano mostrare una riduzione del danno.

3.1 Materiali e metodi

3.1.1 Modello animale

Topi WT (C57BL/6), sst1 KO o sst2 KO (Kreienkamp et al., 1999; Allen et al., 2003) di entrambe i sessi sono stati allevati in ambiente con atmosfera controllata ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$, $50\pm 5\%$ di umidità) e con cicli di 12 h buio/luce. In tutti gli esperimenti i topi sono stati anestetizzati con Avertina (1.2% di tribromoetano e 2.4% di amilene idrato in acqua distillata, 0.02 ml/gr peso corporeo; Sigma) e sacrificati per dislocazione cervicale. Successivamente le retine sono state rapidamente dissezionate in soluzione salina (PBS) e sottoposte a trattamento ischemico o incubate in condizioni di controllo. Le retine così trattate sono state utilizzate per la valutazione della percentuale di cellule apoptotiche mediante la tecnica TUNEL (terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling), per la misurazione dei livelli di mRNA per la caspasi-3 mediante la tecnica di RT-PCR o per la valutazione del danno a selezionate popolazioni cellulari mediante tecniche di immunistochimica. Le soluzioni di incubazione sono state processate con il metodo HPLC ESI-MS (high performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry) per determinare la quantità di glutammato rilasciato. Tutti gli esperimenti sono stati condotti alla stessa ora del giorno (9:00-11:00) per escludere l'influenza dei ritmi circadiani.

3.1.2 Trattamento ischemico

Le retine dissezionate sono state incubate a tempi diversi a 37°C in PBS saturato con N_2 gassoso contenente differenti concentrazioni di acido iodacetico (IAA; Sigma) in vials chiuse (trattamento ischemico) o in PBS saturato con aria contenente 6mM di glucosio in vials aperte (condizioni di controllo). Gli esperimenti sono stati effettuati cambiando le condizioni del trattamento ischemico in modo da ottenere un effetto minimo ed un effetto massimo. Per effetto minimo si intende una morte cellulare di circa il 20%, stimata mediante la tecnica TUNEL (come sarà illustrato nel paragrafo 3.1.4), in tutti gli strati nucleari retinici. Per effetto

massimo si intende invece una morte cellulare maggiore del 90% in almeno uno degli strati nucleari retinici. Il minimo ed il massimo effetto sono stati valutati utilizzando una concentrazione 250 mM di IAA a differenti tempi di incubazione. In particolare il minimo effetto è stato osservato dopo 1h di incubazione mentre l'effetto massimo è stato osservato dopo 6h di incubazione. Tuttavia, i dati sono stati raccolti anche dopo 3h di incubazione. Nel caso di incubazioni a 3h e 6h le soluzioni sono state cambiate allo scadere di ogni ora.

3.1.3 Preparazione delle sezioni retiniche

Successivamente al periodo di incubazione, le retine utilizzate per il TUNEL o per l'immunoistochimica sono state fissate in paraformaldeide al 4% in tampone fosfato (PB) 0,1M per 45–60 minuti a temperatura ambiente. Le retine fissate sono state poi conservate in saccarosio al 25% in PB 0,1M a 4°C per una notte. Le sezioni retiniche di 10 µm sono state ottenute tagliando le retine al criostato perpendicolarmente alla superficie a contatto con il vitreo. Queste sezioni sono state montate su vetrini gelatinati e conservate a -20°C. Tutte le retine sono state tagliate con lo stesso orientamento, dalla zona temporale a quella nasale. Sezioni consecutive sono state alternativamente posizionate su vetrini in modo tale che ciascun vetrino comprendesse sezioni raccolte ogni 50 µm di tessuto. Più precisamente da ciascuna retina sono state ottenute cinque serie, ciascuna di cinque vetrini, ognuno dei quali contenente cinque sezioni. Ciascun esperimento è stato effettuato utilizzando serie corrispondenti di vetrini. In particolare per il TUNEL sono state utilizzate due serie per ciascuna retina mentre per gli esperimenti di immunoistochimica sono state utilizzate le serie rimanenti.

3.1.4 Tecnica TUNEL ed analisi quantitativa

La valutazione della morte cellulare per apoptosi è stata effettuata utilizzando il kit “in situ cell death detection” (Roche Diagnostics) che sfrutta la tecnica TUNEL. Più precisamente, dopo aver permeabilizzato le sezioni con lo 0,1 % di Triton X-100 (Sigma) in PB 0.1M, queste sono state incubate per 1h a 37°C con una miscela ottenuta secondo le istruzioni del kit sopra menzionato. Successivamente i vetrini sono stati lavati in PB 0.1M e montati con coprioggetto utilizzando come mezzo montante una miscela di glicerolo in PB 0.1M contenente 0.5 µg/ml di DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole; Sigma). La marcatura TUNEL è stata valutata su sezioni scelte di ciascun vetrino utilizzato, ed analizzata per

calcolare un indice di morte cellulare in ognuno degli strati nucleari retinici. Le misurazioni sono state effettuate con un sistema di analisi di immagine computerizzato, utilizzando i software Axiovision 4 e KS-300 (Zeiss). Le immagini sono state acquisite con una fotocamera digitale (Axiocam MRC) collegata ad un microscopio a fluorescenza (Zeiss). Le immagini ottenute sono state ottimizzate per contrasto e luminosità utilizzando il software Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

L'analisi quantitativa è stata effettuata su un campo selezionato su ciascuna immagine, ampio circa 90 μm (Fig. 3.1). Nel GCL l'indice di morte cellulare è stato calcolato come la media tra il numero di cellule TUNEL-positive e quelle totali marcate con DAPI. Negli altri strati nucleari retinici (ONL ed INL) non essendo possibile contare il numero di cellule marcate, l'indice di morte cellulare è stato calcolato diversamente. In particolare, per ciascun campo retinico in analisi sono state visualizzate le corrispondenti immagini TUNEL e DAPI precedentemente acquisite. Su queste immagini, utilizzando il software KS-300, sono state calcolate le aree totali dell'ONL e dell'INL marcate con DAPI. Successivamente sulle corrispondenti immagini TUNEL sono state calcolate le aree TUNEL-positive degli stessi strati retinici. Quindi per ciascuno strato è stata confrontata l'area TUNEL-positiva con l'area totale marcata con il DAPI ed è stato così ottenuto un indice di morte cellulare.

3.1.5 Livelli di espressione della Caspasi-3, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) semiquantitativa

Studi precedenti indicano che nella retina, durante il processo di apoptosi che si innesca in condizioni ischemiche, viene attivata la caspasi-3 (Katai and Yoshimura, 1999; Tezel and Wax, 1999; Singh et al., 2001). Quindi, in retine WT ed sst1 KO sono stati valutati, mediante RT-PCR semiquantitativa, i livelli di espressione dell'mRNA per la caspasi-3. Dopo il trattamento ischemico, le retine utilizzate per l'RT-PCR semiquantitativa sono state immediatamente congelate a -80°C . L'mRNA totale è stato estratto dalle retine utilizzando il sistema "Micro-to-Midi Total RNA Purification System" (Invitrogen, Milano, Italy). Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 μg di RNA totale utilizzando il kit "first strand cDNA synthesis kit" (F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). I primer per la caspasi-3 (Eurobio, Les Ulis, France) sono stati disegnati per ibridare unicamente con le regioni corrispondenti nel topo (Zandy et al., 2005).

Sequenze:

“forward” - AGCAGCTTTGTGTGTGTGATTCTAA;

“reverse” - GTCTGACTGGAAAGCCGAAACT.

L'mRNA per la ciclofilina B, la cui espressione rimane inalterata anche dopo ischemia (Casson et al., 2004; Agardh et al., 2006), è stato utilizzato come standard interno. I primer per la ciclofilina B (Eurobio, Les Ulis, France) sono stati scelti in accordo alla sequenza presente nel topo (Cristiani et al., 2002). Per la reazione della PCR sono stati utilizzati 1 µg di cDNA in 25 µl di volume totale di buffer per PCR (Promega), contenente 1.5 mM di MgCl₂, 2.5 mM di dNTP, e 0.75 µM degli appropriati primer. Infine è stata aggiunta la Taq polimerasi (1.2 U; Promega). La reazione di amplificazione è stata effettuata in un termociclatore Bio-Rad per 35 cicli. Ciascun ciclo consiste in 30 secondi di denaturazione a 94°C, in 30 secondi di annealing a 60°C ed in 30 secondi di estensione dei filamenti a 72°C. L'amplificazione è stata portata a termine con un ultimo ciclo di estensione per 10 minuti a 72°C. Il prodotto dell'RT-PCR, 25 µl di campione, è stato poi esaminato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3% utilizzando il “Bio-Rad Sub-cell GT system” e marcato con “BMA GelStar” (Rockland, ME, USA). Successivamente, le bande su gel corrispondenti ai prodotti amplificati sono state analizzate mediante il “Gel Doc 2000 System” munito di software “Quantity One” (Bio-Rad). L'analisi semiquantitativa della caspasi-3 presente nel prodotto della PCR è stata effettuata misurando la densità ottica delle bande corrispondenti all'mRNA della caspasi-3 normalizzate rispetto alla densità ottica delle bande corrispondenti all'mRNA per la ciclofilina B.

3.1.6 Immunoistochimica

Gli anticorpi primari utilizzati in questo lavoro sono riassunti nella tabella 3.1. Essi sono stati scelti per marcare specifiche popolazioni neuronali tra cui i fotorecettori, alcune popolazioni di cellule bipolari e di cellule amacrine e le cellule ganglionari. I vetrini sono stati asciugati, lavati in PB 0.1M e successivamente incubati per tutta la notte a 4 °C con ciascuno degli anticorpi primari diluiti in PB 0.1M contenente 0.5% di Triton X-100. Successivamente i vetrini sono stati lavati in PB 0.1M ed incubati a temperatura ambiente per 1-2h, in una miscela contenente gli opportuni anticorpi secondari coniugati con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), diluiti 1:200 in PB 0.1M contenente 0.5% di Triton X-100. Infine, i vetrini sono stati montati con coprioggetto utilizzando come mezzo montante una miscela di PB 0.1M e glicerolo.

Antigene	Prodotto in	Localizzazione	Referenze	Diluizione
Cone arrestin	Rabbit	Cone photoreceptors	Dr. C.M. Craft (Zhu et al., 2002)	1:500
Calbindin (clone CB-955)	Mouse	Horizontal cells	Sigma (Katsetos et al., 1994)	1:2000
CaBP5	Rabbit	Bipolar cells	Dr. F. Haeseleer (Haeseleer et al., 2000)	1:500
MAb115A10	Mouse	ON-bipolar cells	Dr. S.C. Fujita (Onoda and Fujita, 1987)	1:3000
G γ 13	Rabbit	ON-bipolar cells	Dr. R.F. Margolskee (Huang et al., 2003)	1:1000
PKC (clone MC5)	Mouse	Rod bipolar cells	Sigma (Greferath et al., 1990)	1:200
GAT-1	Rabbit	Amacrine cells	Chemicon (Johnson et al., 1996)	1:200
ChAT (clone 1.B3.9B3)	Mouse	Amacrine cells	Chemicon (Eckenstein and Thoenen, 1982)	1:50
TH (clone 2/40/15)	Mouse	Amacrine cells	Chemicon (Rohrer et al., 1986)	1:400
SRIF (clone YC7)	Rat	Amacrine cells	Chemicon (Dun et al., 1994)	1:100
β -Tubulin III (clone SDL.3D10)	Mouse	Ganglion cells	Sigma (Banerjee et al., 1988)	1:400

Tabella 3.1 Elenco degli anticorpi utilizzati in immunoistochimica.

3.1.7 HPLC ESI-MS

La quantità di glutammato rilasciato in soluzione da parte di retine WT ed sst1 KO è stato misurato utilizzando il metodo HPLC ESI-MS. Le vials contenenti le soluzioni di controllo e quelle ischemiche, al termine del periodo di incubazione, sono state immediatamente congelate in azoto liquido e conservate a -80°C. Il livello di glutammato rilasciato è stato determinato secondo il protocollo di Li et al. (Li et al., 2005) apportando opportune modifiche. I campioni in esame sono stati liofilizzati e successivamente ricostituiti in 100 μ l di acetonitrile al 10% (Carlo Erba, Milano, Italia). Riguardo alla derivatizzazione chimica, i campioni sono stati incubati al buio per 30 minuti a 60°C in un bagnetto d'acqua

con 20 µl di KOH 10M e 500 µl di dansyl chloride 10^{-4} M (Sigma). La corsa in HPLC è stata effettuata utilizzando lo strumento “Beckman Model 126 Programming Solvent Module pump chromatograph” (Beckman Instruments, Brea, CA). La separazione cromatografica è stata eseguita con la colonna “Waters ODS2 Spherisorb 250 mm x 4.6 mm I.D. 5µm packed column” (Teknokroma, Barcelona, Spain) come fase stazionaria, preceduta da una “guard column of Spherisorb RPC18, 5 µm, 4mm x 4mm”. Come fase mobile è stata utilizzata acqua bidistillata 0.5% (v/v)/acido formico (fase mobile A) ed acetonitrile 0.5% (v/v)/acido formico (fase mobile B). L’analisi ESI-MS è stata effettuata utilizzando uno spettrometro di massa a trappola ionica (Esquire 3000 plus, Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Per l’analisi con Pneumatically-Assisted ESI, è stato utilizzato un voltaggio di Elettrospray pari a 4 kV, un Nebulizer 35 psi, Dry Gas 10 L/min. La temperatura del Dry Gas è stata settata a 300 °C. Gli spettri sono stati acquisiti al di sopra del range 50–1500 m/z (durata di scansione, un secondo).

3.1.8 Analisi statistica

L’analisi statistica dei dati provenienti dal TUNEL, dall’RT-PCR e dall’HPLC è stata effettuata utilizzando il test ANOVA ed il post-test Tukey. In alcuni casi la significatività è stata valutata utilizzando il test di Student. È stato inoltre utilizzato il software Graph Pad Prism (Graph Software, San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ è stato considerato un valore statisticamente significativo. In tutti i casi, i risultati sono sempre stati espressi come la media $\pm$ SEM.

3.1.9 Preparazione delle figure

Tutte le immagini TUNEL e quelle in immunofluorescenza sono state acquisite con l’obiettivo 40x plan-NEOFLUAR (Zeiss), la fotocamera AxioCam, utilizzando il software Zeiss Axiovision 4. Le immagini digitali sono state misurate ed ottimizzate per luminosità e contrasto utilizzando il software Adobe Photoshop. Le immagini finali sono state salvate ad un minimo di 300 dpi.

3.2 Risultati

3.2.1 Marcatura TUNEL

Retine WT, incubate 1h, 3h o 6h in condizioni di controllo, non mostrano alcuna marcatura TUNEL (Fig. 3.1F). La presenza di cellule apoptotiche risulta invece evidente in retine incubate in soluzione ischemica. Infatti, nuclei picnotici, tipici delle cellule apoptotiche, possono essere visibili nelle sezioni marcate con DAPI, già ad 1h di trattamento (Fig. 3.1A, sinistra). Nelle corrispondenti immagini marcate con TUNEL si può infatti osservare un certo grado di marcatura nell'ONL, nell'INL e nel GCL (Fig. 3.1A, centro). In particolare, nell'immagine a destra della figura 3.1A, che mostra una soglia della marcatura TUNEL, si può osservare che l'ONL è lo strato retinico con più marcatura. Una marcatura più sparsa può essere visibile nell'INL, mentre nel GCL solamente pochi corpi cellulari appaiono TUNEL-positivi. Dopo 3h di trattamento ischemico (Fig. 3.1B), nelle immagini che mostrano la marcatura con DAPI sono visibili molti più corpi picnotici. Una estesa marcatura TUNEL è presente sia nell'ONL che nell'INL, come è visibile nelle immagini corrispondenti. Nel GCL praticamente tutti i corpi cellulari sono TUNEL-positivi. Nelle retine trattate 6h (Fig. 3.1C) i nuclei picnotici, la marcatura DAPI e la marcatura TUNEL aumentano in maniera consistente sia nell'INL che nell'ONL.

L'analisi quantitativa effettuata utilizzando i dati ottenuti dalla marcatura TUNEL conferma che il trattamento ischemico di 1h produce il "minimo effetto". In particolare, la morte cellulare ammonta a circa il 35% nell'ONL, al 20% nell'INL ed al 30% nel GCL (Fig. 3.2A). Dopo 3h di trattamento la percentuale di morte cellulare aumenta significativamente in tutti gli strati nucleari con valori nel GCL intorno al 90% ("effetto massimo"). Tuttavia, sebbene la percentuale di morte cellulare appare aumentare in tutti gli strati retinici, un incremento significativo è presente solamente nell'ONL. La percentuale di morte cellulare del 90% viene superata dopo 6h di trattamento sia nell'ONL che nel GCL. I risultati di questa analisi quantitativa sono stati successivamente confrontati con quelli provenienti da retine ischemiche WT, sst1 KO ed sst2 KO. Come era già stato osservato per le retine WT, la marcatura TUNEL non è presente nelle retine sst1 o sst2 KO incubate 1h, 3h o 6h in condizioni di controllo (Fig. 3.1F). Le figure 3.1D ed 3.1E mostrano la marcatura DAPI, la marcatura TUNEL ed una soglia di quest'ultima, rispettivamente in retine sst1KO ed sst2 KO incubate 1h in condizioni ischemiche. Osservando queste immagini appare evidente che la marcatura TUNEL è sensibilmente ridotta nelle retine sst1 KO rispetto alle retine WT o sst2 KO. L'analisi quantitativa (Fig. 3.2) conferma queste osservazioni. Infatti, dopo 1h di ischemia, la percentuale di morte cellulare nell'ONL, INL e GCL è significativamente

inferiore nelle retine sst1 KO che nei corrispondenti strati delle retine WT o sst2 KO. In particolare, confrontando le retine WT con quelle sst1 KO, la morte cellulare nell'ONL diminuisce dal 35% al 17%, nell'INL dal 21% al 5% e nel GCL dal 28% al 9%. Non sono state osservate differenze tra retine WT ed sst2 KO. Tuttavia, dopo 3h di ischemia non si riscontrano differenze significative tra retine sst1 KO e WT o sst2 KO. In particolare la percentuale di morte cellulare nelle retine sst1 KO è divenuta simile a quella delle retine WT (inserto in Fig. 3.2B).

3.2.2 *Espressione della caspasi-3*

Gli esperimenti di RT-PCR hanno prodotto un'amplificazione a 136 bp che corrisponde al peso molecolare atteso per l'mRNA relativo alla caspasi-3. Le retine WT incubate 1h, 3h o 6h in condizioni di controllo (Fig. 3.3A-B) hanno mostrato livelli di espressione dell'mRNA per la caspasi-3 simili tra loro. Nelle retine WT ischemiche, invece, è stato osservato un notevole incremento dell'mRNA per la caspasi-3 dopo 1h di trattamento (circa il 30% più alto rispetto al controllo). Tuttavia dopo 3h di trattamento la banda relativa al peso molecolare della caspasi-3 diviene scarsamente visibile, per scomparire del tutto dopo 6h di trattamento. I livelli di mRNA per la ciclofilina-B, che viene usata come standard interno, rimangono del tutto simili nelle retine di controllo ed in quelle ischemiche, in accordo con la letteratura (Casson et al., 2004; Agardh et al., 2006). L'espressione dell'mRNA per la caspasi-3 è stata indagata anche in retine sst1 KO dopo 1h di ischemia con lo scopo di verificare se la parziale protezione dalla morte cellulare in queste retine, come osservato dalla sperimentazione TUNEL, è accompagnata da cambiamenti di altri marker apoptotici. I risultati hanno mostrato che sia nelle retine WT che sst1 KO le bande relative ai prodotti della RT-PCR sono localizzate a 136 pb (Fig. 3.3C). Come si può vedere dall'immagine, i livelli di mRNA per la caspasi-3 nelle retine sst1 KO rispetto alle retine WT appaiono ridotti di circa il 65% (Fig. 3.3D).

3.2.3 *Immunoistochimica*

Le marcature effettuate mediante immunoistochimica su retine WT incubate in condizioni di controllo non mostrano differenze rispetto a quelle realizzate su retine non trattate. Un alto grado di eterogeneità si osserva invece nella risposta di differenti popolazioni cellulari all'insulto ischemico (Tabella 3.2). I differenti marker immunoistochimica esaminati

possono essere raggruppati in quattro tipologie principali: i) marker la cui espressione rimane inalterata anche dopo 6h di trattamento ischemico; ii) marker che mostrano cambiamenti in risposta a trattamenti ischemici di 1h, 3h o 6h; iii) marker che mostrano una forte riduzione di espressione o scompaiono del tutto dopo 3h o 6h di trattamento; iv) marker la cui espressione è nulla già dopo 1h di trattamento.

Marker di tipo (i). I marker di tipo (i) comprendono l'arrestina dei coni, utilizzata come marker dei coni (Zhu et al., 2002) ed il trasportatore-1 dell'acido γ -aminobutirrico (GAT-1), che viene espresso dalla maggior parte delle cellule amacrine della retina di mammifero (Casini et al., 2006). La marcatura relativa all'arrestina dei coni persiste nelle retine di controllo ed ischemiche anche fino a 6h di trattamento. Infatti non si notano cambiamenti apprezzabili nel pattern d'espressione, nell'intensità della marcatura o nel numero dei coni marcati (Fig. 3.4A). Riguardo alla marcatura GAT-1 (Fig. 3.4B), essa appare del tutto simile nelle retine di controllo ed in quelle ischemiche. Tuttavia, una lieve diminuzione nell'intensità della marcatura GAT-1 è stata osservata nell'IPL in alcune retine ischemiche dopo 6h di trattamento.

Marker di tipo (ii). I marker di tipo (ii) comprendono la β -Tubulina III che viene espressa dalle cellule ganglionari (Cui et al., 2003), la TH (l'enzima necessario per la sintesi della dopamina) che è contenuta in una popolazione di cellule amacrine (Wulle and Schnitzer, 1989) ed infine la PKC contenuta nelle cellule bipolari dei bastoncelli (Greferath et al., 1990). Come si può osservare nella figura 3.4C, le cellule ganglionari ed i processi nell'IPL che risultano marcati dalla β -tubulina III sono visibili sia nelle retine di controllo che in quelle ischemiche. Infatti, il trattamento ischemico non influisce sulla marcatura presente nelle cellule ganglionari sebbene determini una consistente diminuzione nella densità delle fibre contenenti β -tubulina III nell'IPL.

La marcatura TH (Fig. 3.4D) nelle retine di controllo è visibile in corpi cellulari distribuiti in maniera sparsa ed in un consistente fascio di fibre varicose nell'IPL distale. Inoltre, processi immunoreattivi alla TH sono localizzati nella zona mediana dell'IPL e nell'INL diretti verso l'OPL (freccie in Fig. 3.4D). Nelle retine ischemiche dopo 1h o 3h di trattamento, sono ancora presenti corpi cellulari intensamente marcati dalla TH. Tuttavia, i processi nell'IPL distale hanno perso le loro varicosità, inoltre le fibre nella porzione mediana dell'IPL e quelle nell'INL/OPL non sono più visibili. Dopo 6h di trattamento ischemico i fasci di fibre

immuoreattive alla TH diminuiscono notevolmente anche se possono ancora essere osservati i corpi cellulari.

La PKC viene normalmente utilizzata come marker delle cellule bipolari dei bastoncelli (Fig. 3.4E). Dopo 1h di trattamento ischemico, la marcatura appare ridotta sia nell'intensità che nel numero di corpi cellulari marcati. Tuttavia, non c'è variazione nella densità degli assoni o delle terminazioni assonali nell'IPL. In questi tipi cellulari, una caratteristica che si osserva costantemente, nelle retine ischemiche dopo 1h di trattamento, è l'ingrossamento della parte distale degli assoni (freccie in Fig. 3.4E). Dopo 3h o 6h di trattamento ischemico, la marcatura PKC diminuisce ulteriormente sia nei dendriti che nei corpi cellulari e negli assoni, rimane invece visibile nei terminali assonali nell'IPL che risultano essere più grandi rispetto al controllo.

Marker di tipo (iii). I marker di tipo (iii) comprendono la proteina G γ 13 che viene espressa da cellule bipolari di tipo ON (Huang et al., 2003), e dalla SRIF che viene invece espressa da una popolazione sparsa di cellule amacrine (Brecha, 2003; Thermos, 2003; Casini et al., 2005).

Nelle retine di controllo numerose cellule bipolari di tipo ON vengono marcate dal G γ 13 (Fig. 3.4F). Dopo 1h di trattamento queste cellule appaiono ancora marcate nella porzione più distale mentre i loro assoni ed i terminali appaiono debolmente immunofluorescenti. Dopo 3h di trattamento è visibile solamente una banda nell'OPL marcata dal G γ 13, mentre dopo 6h la marcatura non è più presente.

Nelle retine di controllo le cellule amacrine contenenti SRIF (Fig. 3.4G) sono distribuite in maniera molto sparsa ed i processi SRIF-immunoreattivi sono maggiormente visibili nella porzione distale dell'IPL. Dopo 1h di trattamento i corpi cellulari SRIF-positivi non sono più visibili sebbene possano ancora essere osservate alcune fibre nell'IPL. Trattamenti ischemici prolungati annullano completamente la marcatura SRIF.

Marker di tipo (iv). Infine i marker di tipo (iv) includono la calbindina, una proteina calcio legante che viene utilizzata come marker di cellule orizzontali (Pochet et al., 1991), il MAb115A10 che è un marker delle cellule bipolari di tipo ON (Greferath et al., 1990), la CaBP5, un'altra proteina calcio legante che viene espressa da tre tipi di cellule bipolari (Ghosh et al., 2004), e la colina acetiltransferasi (ChAT) che è l'enzima utilizzato per la sintesi dell'acetilcolina ed è contenuta in due popolazioni di cellule amacrine distribuite in maniera simmetrica ed in cellule amacrine spiazzate (Haverkamp and Wassle, 2000). Nessuno di questi marker è visibile in retine ischemiche dopo 1h di trattamento (dati non mostrati).

Marker	Controllo	1h ischemia	3h ischemia	6h ischemia
Cone arrestin	+++	+++	+++	+++
GAT-1	+++	+++	+++	+++
β -Tubulin	+++	++	++	++
TH	+++	++	++	+
PKC	+++	++	+	+
G γ 13	+++	+/-	+/-	-
SRIF	+++	+/-	-	-
Calbindin	+++	-	-	-
MAb115A10	+++	-	-	-
CaBP5	+++	-	-	-
ChAT	+++	-	-	-

Tabella 3.2 Marker immunoistochimici in retine WT dopo 1h, 3h e 6h di trattamento ischemico.

Successivamente alla caratterizzazione immunoistochimica effettuata su retine WT sottoposte a trattamento ischemico, sono stati studiati gli effetti di tale trattamento su popolazioni neuronali appartenenti a retine sst1 KO ed sst2 KO. I risultati sono schematizzati nelle tabelle 3.3 e 3.4. Differenze apprezzabili si possono osservare nel pattern di espressione della TH e di tre differenti marker di cellule bipolari, più precisamente la PKC, il MAb115A10 e la CaBP5. TH e PKC appartengono al gruppo di marker di “tipo (ii)”, mentre il MAb115A10 e la CaBP5 appartengono al “tipo (iv)”.

Marker	Control	WT	sst ₁ KO	sst ₂ KO
Cone arrestin	+++	+++	+++	+++
GAT-1	+++	+++	+++	+++
β -Tubulin	+++	++	++	++
TH	+++	++	+++ *	+++ *
PKC	+++	++	+++ *	+ #
G γ 13	+++	+/-	+/-	+/-
SRIF	+++	+/-	+/-	+/-
Calbindin	+++	-	-	-
MAb115A10	+++	-	+/- *	-
CaBP5	+++	-	++ *	-
ChAT	+++	-	-	-

Tabella 3.3 Marker immunoistochimici dopo 1h di trattamento ischemico in retine WT, sst₁ KO ed sst₂ KO. I marker indicati in corsivo/grassetto sono quelli che mostrano differenze di espressione in retine WT ed sst₁ KO e/o sst₂ KO. * aumento rispetto ai WT; # diminuzione rispetto ai WT.

Marker	Control	WT	sst ₁ KO	sst ₂ KO
TH (3h)	+++	++	+++	+++
PKC (3h)	+++	+	++	+/-
CaBP5 (3h)	+++	-	+	-
TH (6h)	+++	+	+++	+++
PKC (6h)	+++	+/-	+	-
CaBP5 (6h)	+++	-	+/-	-

Tabella 3.4 Marker immunoistochimici dopo 3h o 6h di trattamento ischemico in retine WT, sst₁ KO ed sst₂ KO.

La figura 3.5 mostra che sia nelle retine sst1 KO che in quelle sst2 KO la marcatura TH viene preservata senza cambiamenti apprezzabili fino a 3h di trattamento ischemico (Tabella 3.3 e 3.4). Tuttavia, mentre nelle retine WT si può osservare una diminuzione dei processi varicosi marcati TH (Fig. 3.5A), nelle retine sst1 KO (Fig. 3.5B) ed sst2 KO (Fig. 3.5C) il pattern di espressione rimane del tutto simile al controllo. Questa condizione rimane inalterata fino a 6h di ischemia (Tabella 3.4). La figura 3.6 mostra invece in dettaglio il pattern di espressione della PKC. Rispetto alle retine WT (Fig. 3.6A), le retine sst1 KO appaiono meno sensibili al danno ischemico, sia dopo 1h che dopo 3h di trattamento ischemico (Fig. 3.6B). Inoltre, dopo 1h di ischemia le cellule bipolari dei bastoncelli di retine sst1 KO non mostrano gli ingrossamenti della porzione distale dell'assone che sono invece caratteristici delle retine WT. L'intensità della marcatura PKC, sia dopo 1h che 3h di ischemia, risulta molto più intensa nelle retine sst1 KO che in quelle WT. Nelle retine sst2 KO (Fig. 3.6C) in condizioni di controllo, il pattern di espressione della PKC è del tutto simile a quello delle retine WT o sst1 KO. Tuttavia, dopo 1h o 3h di ischemia la marcatura PKC nelle retine sst2 KO è scarsamente visibile e molto meno intensa rispetto sia al WT che all'sst1 KO. Dopo 6h di ischemia, le retine sst1 KO mostrano ancora immunoreattività alla PKC che invece non è più presente nelle retine WT o sst2 KO.

Riguardo al pattern d'espressione del MAb115A10, dopo 1h di ischemia nelle retine WT ed in quelle sst2 KO non si osserva più marcatura. Una debole marcatura è invece visibile nei dendriti di cellule bipolari che esprimono MAb115A10 nell'OPL di retine ischemiche sst1 KO (dati non mostrati). Non è stata osservata immunomarcatura nei corpi cellulari di cellule bipolari, negli assoni o nei terminali dell'IPL. Infine dopo 3h o 6h di trattamento ischemico la marcatura MAb115A10 scompare del tutto sia nel WT che nelle retine sst1 KO o sst2 KO. L'immunoreattività relativa alla CaBP5, dopo 1h o 3h di ischemia, risulta completamente assente nelle retine WT (Fig. 3.7A) ed sst2 KO (Fig. 3.7C). Sorprendentemente invece, nelle retine sst1 KO (Fig. 3.7B), un'intensa immunoreattività CaBP5 è visibile nei dendriti, nei corpi cellulari, negli assoni e nelle terminazioni assionali di numerose cellule bipolari. Questo panorama rimane inalterato dopo 3h di ischemia ed anche dopo 6h si può osservare una lieve marcatura.

Infine è stato indagato il pattern d'espressione dei recettori sst2_A per verificare se questi recettori sono ancora presenti nelle retine WT e/o sst1 KO dopo il trattamento ischemico. Nelle retine di controllo sia WT che sst1 KO il pattern d'espressione dei recettori sst2_A è in

linea con quello descritto in letteratura (Cristiani et al., 2002; Casini et al., 2004), infatti l'immunoreattività al recettore sst2_A è localizzata in cellule amacrine e cellule bipolari. Dopo 1h di ischemia la marcatura sst2_A è ancora presente nelle cellule amacrine ma appare notevolmente ridotta nelle cellule bipolari dei bastoncelli (dati non mostrati). Questa riduzione è meno pronunciata nelle retine ischemiche sst1 KO che in quelle WT.

3.2.4 Rilascio di glutammato

Il rilascio di glutammato misurato in retine WT incubate in condizioni di controllo è pari a 0.29 ± 0.04 µg/ml dopo 1h, 0.39 ± 0.03 µg/ml dopo 3h, e 0.43 ± 0.02 µg/ml dopo 6h. Non ci sono differenze significative tra questi valori che rientrano inoltre nei parametri misurati precedentemente nella retina di topo (Dal Monte et al., 2003a). Nelle retine ischemiche, dopo 1h di trattamento, si può osservare un incremento nel rilascio di glutammato di circa il doppio, ed un ulteriore aumento si può rilevare dopo 3h o 6h di trattamento (Fig. 3.8A). Nel tentativo di valutare se la minore sensibilità delle retine sst1 KO nei confronti dell'insulto ischemico sia accompagnata anche da un diverso livello di glutammato rilasciato, queste misurazioni sono state effettuate su retine WT ed sst1 KO in condizioni di controllo e dopo 1h e 3h di trattamento. In condizioni di controllo i livelli rilevati sono del tutto simili nelle retine WT ed sst1 KO sia dopo 1h che dopo 3h di trattamento. Invece, come si può osservare nella figura 3.8B, tra le retine ischemiche si può osservare una significativa differenza. Infatti, dopo 1h o 3h di trattamento ischemico, il rilascio di glutammato nelle retine sst1 KO risulta significativamente ridotto rispetto alle retine WT.

3.3 Discussione

Nel lavoro sperimentale illustrato in questo capitolo, è stata descritta la messa a punto di un nuovo modello in vitro di ischemia nella retina di topo. Questo modello e le sue possibili varianti possono risultare utili per lo studio della risposta da parte di retine normali e transgeniche all'insulto ischemico.

3.3.1 Apoptosi

La presenza della marcatura TUNEL e l'incremento del livello di espressione di mRNA per la caspasi-3 suggeriscono che le cellule nelle retine dopo 1h di trattamento ischemico muoiono per apoptosi. Infatti, è stato precedentemente osservato che nella retina l'apoptosi

viene in parte indotta dalla caspasi-3. Infatti, bloccando l'attivazione delle caspasi si può proteggere la retina dall'insulto ischemico (Katai and Yoshimura, 1999). Inoltre, è stato rilevato che le popolazioni cellulari principalmente colpite sono quelle localizzate nell'INL e nel GCL. Nello studio sopra descritto, abbiamo osservato che dopo 1h di trattamento ischemico si osserva un incremento del livello di mRNA per la caspasi-3 seguito da una successiva diminuzione. Questa situazione conferma i dati precedentemente osservati in retine di ratto sottoposte ad ischemia-riperfusione o alle quali viene applicata una alta pressione oculare, nelle quali si osserva un picco di espressione di caspasi-3 nei processi precoci di apoptosi (Yamamoto et al., 2006). In modelli in vitro dove è stata utilizzata la linea cellulare E1A.NR3, è stata osservata sia la marcatura TUNEL che l'attivazione della caspasi-3 (Tezel and Wax, 1999). In particolare, la marcatura TUNEL è stata osservata anche nella retina di ratto sottoposta ad ischemia (Mastrodimou et al., 2005). Negli esperimenti condotti da Mastrodimou, nelle retine è stata osservata la marcatura TUNEL e la quasi completa scomparsa della immunomarcatura relativa alla ChAT dopo 6h di incubazione in condizioni di controllo. Negli esperimenti da noi condotti nella retina di topo, successivamente a 6h di incubazione in PBS non è stata osservata alcuna marcatura TUNEL ed inoltre l'immunoreattività ad alcuni marker cellulari tra cui la ChAT è risultata quasi del tutto inalterata. Tuttavia, la ridotta sopravvivenza osservata nella retina di ratto rispetto a quella di topo può dipendere sia da differenze specie-specifiche che da differenze nella metodica dell'esperimento.

3.3.2 Marker immunoistochimici

Numerosi marker immunoistochimici sono stati utilizzati nel lavoro sperimentale di questa tesi nel tentativo di caratterizzare le retine di topo sottoposte ad ischemia in vitro. In studi precedenti (Mastrodimou et al., 2005) è stata indagata l'espressione della ChAT, della TH, della PKC e della bNOS (brain nitric oxide synthase) nella retina di ratto in vitro ed è stato visto che questi marker scompaiono dopo incubazione in condizioni ischemiche. Nel modello da noi messo a punto invece, di questi marker solamente la ChAT scompare in seguito ad ischemia, mentre la marcatura relativa alla TH e alla PKC si può osservare fino a tempi elevati di trattamento. Queste differenze tra i due modelli possono trovare spiegazione nel fatto che Mastrodimou et al. (Mastrodimou et al. 2005) nella soluzione ischemica utilizzano IAA ed anche NaCN che è un potente inibitore della respirazione cellulare. Nel

modello ischemico in vitro da noi messo a punto nella retina di topo abbiamo osservato che differenti marker immunoistochimici rispondono diversamente al trattamento ischemico. Osservazioni simili sono state riportate riguardo a marker di popolazioni di cellule amacrine in modelli di ischemia-riperfusione nella retina di ratto, sia a livello di espressione dell'mRNA che a livello di localizzazione immunoistochimica (Dijk and Kamphuis, 2004; Dijk et al., 2004). Inoltre, nel ratto, marker immunoistochimici di differenti popolazioni cellulari rispondono diversamente al trattamento ischemico anche in modelli di ischemia retinica sviluppati attraverso l'occlusione dell'arteria carotidea bilaterale (Yamamoto et al., 2006). La differente risposta all'ischemia di differenti popolazioni cellulari può dipendere dal tipo e dalla quantità di recettori per il glutammato presenti su tali cellule. Infatti, sebbene le cellule amacrine dopaminergiche siano sensibili al glutammato, la densità dei recettori AMPA del glutammato è più bassa nei neuroni contenenti TH che in altre cellule amacrine o ganglionari (Gabriel et al., 2002). Inoltre, sebbene la maggior parte dei neuroni retinici venga attivata da agonisti del glutammato a livello dei recettori ionotropici, le cellule bipolari di tipo ON (incluse le cellule bipolari dei bastoncelli e quelle che esprimono Gly13) non sono sensibili a tali agonisti. Infatti ci sono studi che mostrano che proprio su queste cellule c'è una scarsa presenza di recettori ionotropici del glutammato (Sun and Kalloniatis, 2006).

3.3.3 Rilascio di glutammato

I dati ottenuti in questo lavoro sperimentale confermano l'ipotesi che l'eccito-tossicità da glutammato è una delle principali cause di morte cellulare in seguito ad ischemia. Infatti, i livelli di glutammato nelle soluzioni ischemiche di incubazione delle retine aumentano all'aumentare dei tempi di trattamento. La correlazione tra caspasi-3 e glutammato è stata rilevata in studi precedenti in neuroni del sistema nervoso centrale. In particolare, l'apoptosi indotta dal glutammato nei neuroni dei granuli cerebrocorticali e cerebellari sembra essere mediata dall'attivazione della caspasi-3 (Du et al., 1997; Tenneti and Lipton, 2000).

3.3.4 Studi condotti su retine sst1KO e sst2 KO

Retine sst1 KO ed sst2 KO sono state studiate con l'ipotesi che la sovra-espressione dei recettori sst2 (come nelle retine sst1 KO) possa conferire un certo grado di protezione nei confronti dell'ischemia retinica e che l'assenza dei recettori sst2 (come nelle retine sst2 KO) possa viceversa peggiorare il danno. I risultati confermano l'ipotesi, infatti, le retine che

sovr-esprimono i recettori sst2 risultano maggiormente protette dal danno ischemico, tuttavia il peggioramento che ci si aspettava nelle retine dove il recettore sst2 è assente, non è stato osservato. Le retine sst2 KO mostrano una risposta all'ischemia piuttosto variegata. Infatti, sebbene la maggior parte delle popolazioni cellulari mostri un danno simile a quello osservato nelle retine WT, le cellule amacrine dopaminergiche risultano immuni al danno come quelle delle retine sst1 KO. Riguardo invece alle cellule bipolari dei bastoncelli, esse risultano danneggiate dall'ischemia ancor più di quelle delle retine WT. La parziale protezione che mostrano le retine che sovra-esprimono i recettori sst2 nei confronti dell'insulto ischemico è dovuta probabilmente alla riduzione della quantità di glutammato rilasciato, riduzione mediata dai recettori sst2. Infatti, i risultati mostrano una significativa riduzione di rilascio di glutammato nelle retine sst1 KO ischemiche rispetto alle retine WT. Tuttavia, sebbene dopo 1h di ischemia si osserva una marcata riduzione di morte cellulare nelle retine sst1 KO accompagnata da un minor rilascio di glutammato, questa condizione non si mantiene a tempi di trattamento più lunghi. Infatti, dopo 3h di ischemia, nelle retine sst1 KO i livelli di glutammato sono sempre inferiori a quelli delle retine WT ma il livello di morte cellulare è molto simile. Nel complesso le nostre osservazioni confermano l'ipotesi che la protezione dal danno ischemico nelle retine sst1 KO è dovuta alla maggiore espressione e funzionalità dei recettori sst2 (Dal Monte et al., 2003b; Bigiani et al., 2004; Pavan et al., 2004; Casini et al., 2005). Queste osservazioni sono confermate da studi precedenti che mostrano come i danni indotti da ischemia possano essere prevenuti somministrando agonisti dei recettori sst2 (Celiker and Ilhan, 2002; Mastrodimou et al., 2005). Tuttavia, i dati ottenuti dal modello sperimentale utilizzato nel lavoro illustrato in questo capitolo, indicano che i meccanismi di controllo della sopravvivenza neuronale che mettono in correlazione la funzione esercitata dai recettori sst2, il rilascio di glutammato e l'apoptosi, sono molto più complessi di quanto mostrato in studi precedenti.

3.3.5 Meccanismi di protezione dall'insulto ischemico nelle retine sst1 KO

Le popolazioni cellulari appartenenti a retine sst1 KO risultano maggiormente protette dal danno ischemico in base a due meccanismi principali. Il primo meccanismo ipotizzato prende in considerazione il livello di glutammato rilasciato durante l'ischemia che sembra essere responsabile della morte cellulare (Osborne et al., 2004). In condizioni ischemiche il rilascio di glutammato nelle retine sst1 KO è inferiore rispetto alle retine WT e di

conseguenza il danno neuronale che deriva dall'eccito-tossicità risulta ridotto. Studi precedenti mostrano che la SRIF nella retina, agendo sui recettori sst2, provoca un minor rilascio di glutammato (Dal Monte et al., 2003a). Questa sua azione risulta amplificata nelle retine sst1 KO dove è presente una maggiore quantità di recettori sst2 (Bigiani et al., 2004). Questo meccanismo può spiegare la sopravvivenza di un significativo numero di neuroni retinici in tutti gli strati cellulari delle retine sst1 KO, tuttavia, esso non spiega la mancata sopravvivenza di certe popolazioni cellulari (come ad esempio le cellule orizzontali e le cellule ganglionari). Queste popolazioni cellulari retiniche infatti, vengono attivate dagli agonisti del glutammato attraverso i recettori ionotropici (Sun and Kalloniatis, 2006). Infatti, la maggiore sopravvivenza cellulare è stata osservata mediante immunistochemica nelle cellule bipolari dei bastoncelli, che non rispondono agli agonisti dei recettori ionotropici del glutammato (Sun and Kalloniatis, 2006), e nelle cellule amacrine dopaminergiche, che mostrano una bassa concentrazione di recettori per il glutammato (Gabriel et al., 2002). Il secondo meccanismo ipotizzato implica l'azione positiva che può essere esercitata dalla SRIF direttamente sulle cellule che esprimono i recettori sst2. Nelle retine sst1 KO questa azione potrebbe essere più consistente rispetto alle retine WT o sst2 KO. Questo meccanismo potrebbe spiegare la maggiore sopravvivenza di quelle popolazioni cellulari che esprimono elevati livelli di recettori sst2 come le cellule bipolari dei bastoncelli e le cellule amacrine dopaminergiche (Cristiani et al., 2002). Inoltre, può spiegare anche il danno a carico delle cellule bipolari dei bastoncelli nelle retine sst2 KO che risulta anche maggiore rispetto a quello osservato in retine WT. Infatti, nelle retine sst2 KO l'effetto benefico esercitato dalla SRIF dovrebbe essere nullo. Tuttavia, questo meccanismo non spiega il fatto che altre popolazioni cellulari di retine sst1 KO che esprimono i recettori sst2 (come ad esempio le cellule orizzontali contenenti calbindina) mostrano un consistente danno in seguito ad ischemia (Cristiani et al., 2002). In conclusione ciò che si può ipotizzare è che la sopravvivenza cellulare nelle retine sst1 KO nei confronti dell'insulto ischemico possa dipendere da entrambi i meccanismi sopra proposti. Questa sopravvivenza è favorita in quelle cellule che sovra-esprimono i recettori sst2. Questi recettori mediano l'inibizione del rilascio di glutammato ed arginano quindi il danno provocato dall'eccito-tossicità che si verifica durante l'ischemia.

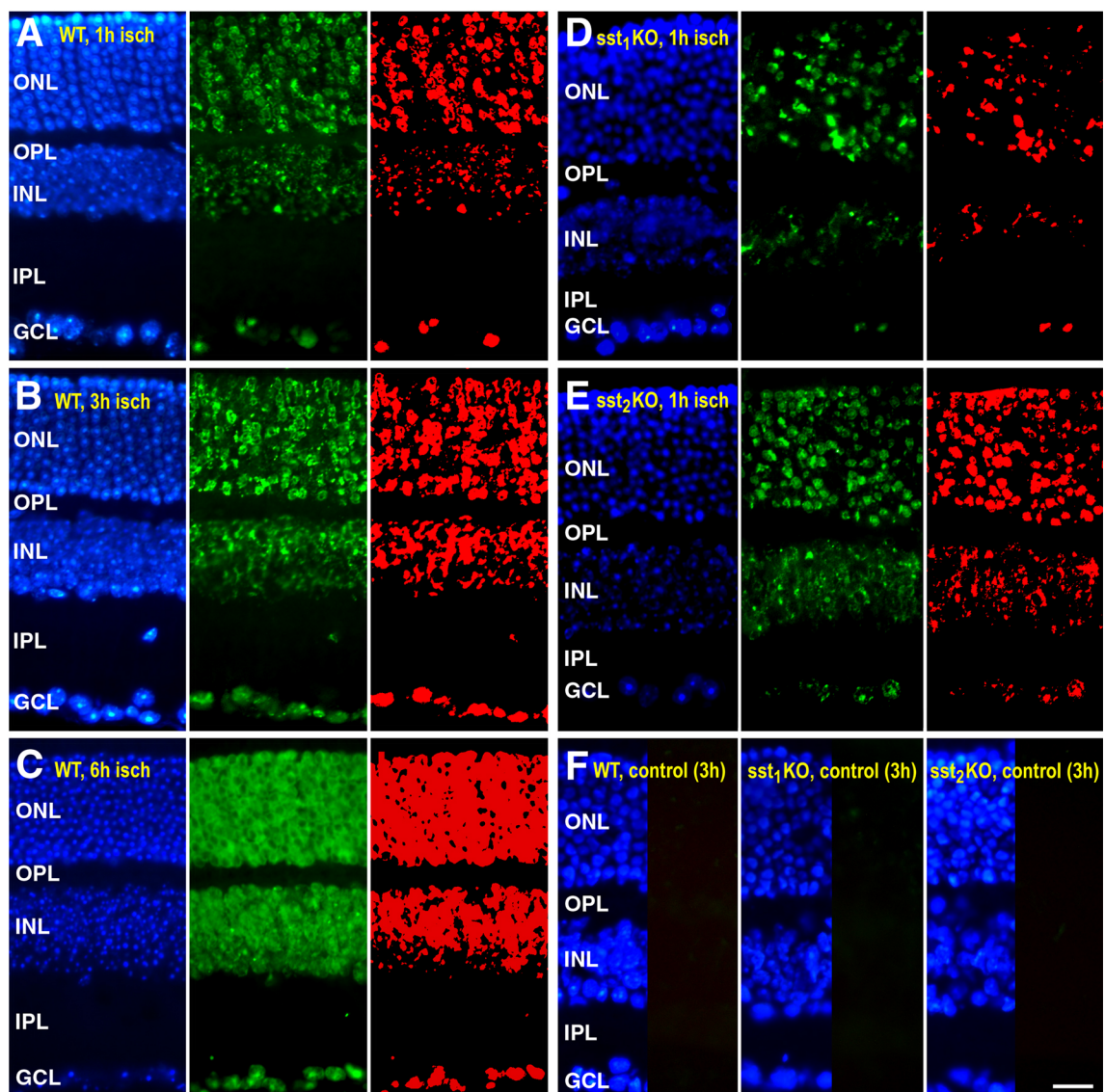


Figura 3.1 Marcatura TUNEL in retine ischemiche WT, *sst1* KO o *sst2* KO. Ogni pannello mostra la marcatura DAPI (immagine a sinistra), la marcatura TUNEL (immagine al centro) ed una soglia di marcatura TUNEL (immagine a destra). A, B e C mostrano retine ischemiche WT dopo 1h, 3h o 6h di incubazione. La quantità di marcatura TUNEL aumenta nell'ONL, INL e GCL all'aumentare dei tempi di incubazione. Il pannello D mostra un'immagine di retina *sst1* KO dopo 1h di ischemia dove si può osservare una riduzione della marcatura TUNEL in tutti gli strati nucleari rispetto alla retina ischemica WT (A). La marcatura TUNEL nelle retine ischemiche *sst2* KO dopo 1h di incubazione (E) è simile a quella del WT (A). Il pannello F mostra una sezione di retina marcata con DAPI (immagine a sinistra) e marcata con TUNEL (immagine a destra) di retine WT, *sst1* KO ed *sst2* KO incubate per 3h in condizioni di controllo. In queste immagini appare chiara l'assenza di marcatura TUNEL. Una situazione simile si può osservare dopo 1h o 6h di incubazione nelle stesse condizioni. Per abbreviazioni vedi "Tabella delle abbreviazioni". Barra di calibrazione: 20 μ m.

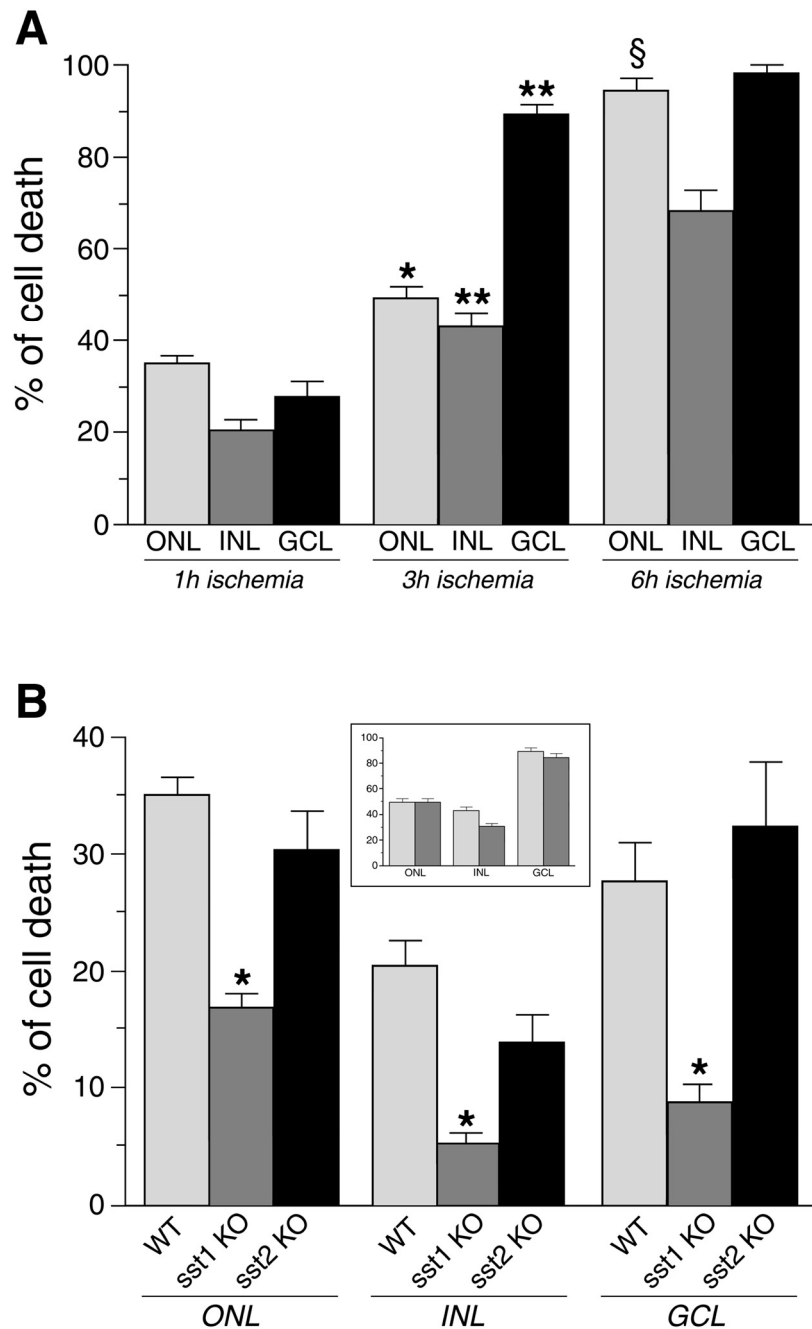


Figura 3.2 (A) Analisi quantitativa della marcatura TUNEL in retine WT dopo 1h, 3h o 6h di trattamento ischemico. * $P < 0.05$, e ** $P < 0.001$ vs. rispettivi valori di 1h; § $P < 0.001$ vs. rispettivi valori a 3h (ANOVA e post-test Tukey). (B) Percentuale di morte cellulare dopo 1h di trattamento ischemico in retine WT, sst1 KO ed sst2 KO. * $P < 0.001$ vs. WT (ANOVA e post test di Tukey). Insetto in (B): marcatura TUNEL dopo 3h di trattamento ischemico nelle retine WT (istogramma grigio chiaro) ed sst1 KO (istogramma grigio scuro). Gli istogrammi rappresentano la media $\pm$ SEM con “n” da 20 ad 80. Per abbreviazioni vedi “Tabella delle abbreviazioni”.

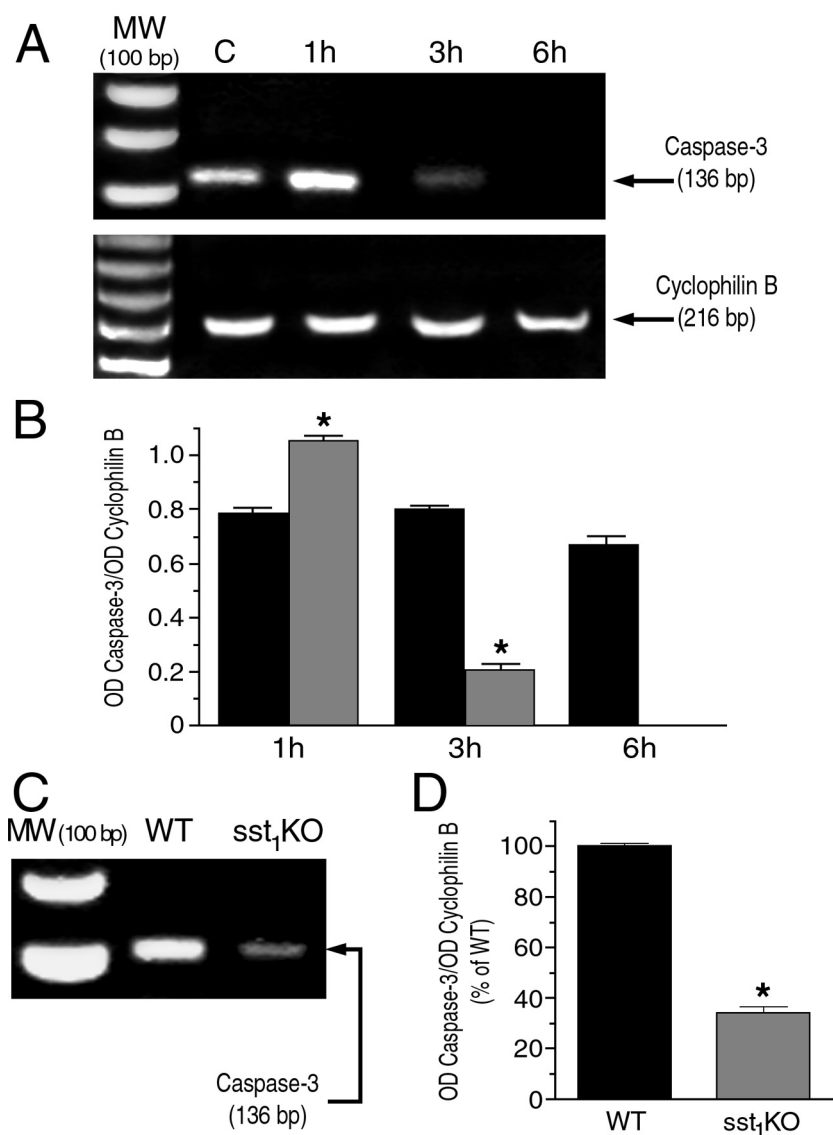


Figura 3.3 (A) Espressione dell'mRNA per la caspasi-3 in retine WT dopo 1h, 3h e 6h di trattamento ischemico valutata mediante RT-PCR semiquantitativa utilizzando l'mRNA della ciclofilina B come standard interno. La banda di controllo (indicata con "C" nel pannello A) proviene da retine incubate per 1h in condizioni di controllo ed è simile a quelle ottenute dopo 3h o 6h (n = 3, dati non mostrati). (B) I livelli di mRNA per la caspasi-3 nelle retine di controllo (istogrammi neri) appaiono simili a tutti i tempi di incubazione esaminati. Dopo 1h di trattamento ischemico essi appaiono significativamente più alti, mentre dopo 3h di trattamento appaiono significativamente più bassi (istogrammi grigi; $P < 0.001$, ANOVA e post test Tukey, n = 3 per ciascun istogramma). Dopo 6h di trattamento ischemico l'mRNA per la caspasi-3 non è più rilevabile. (C) Prodotti della RT-PCR corrispondenti all'mRNA per la caspasi-3 dopo 1h di trattamento in retine WT ed sst1 KO. (D) Il livello di espressione dell'mRNA per la caspasi-3 in retine ischemiche sst1 KO dopo 1h di trattamento appare significativamente più basso che nelle retine ischemiche WT. * $P < 0.0001$, paired Student's t-test, n=5 sia nei WT che negli sst1 KO. Per abbreviazioni vedi "Tabella delle abbreviazioni".

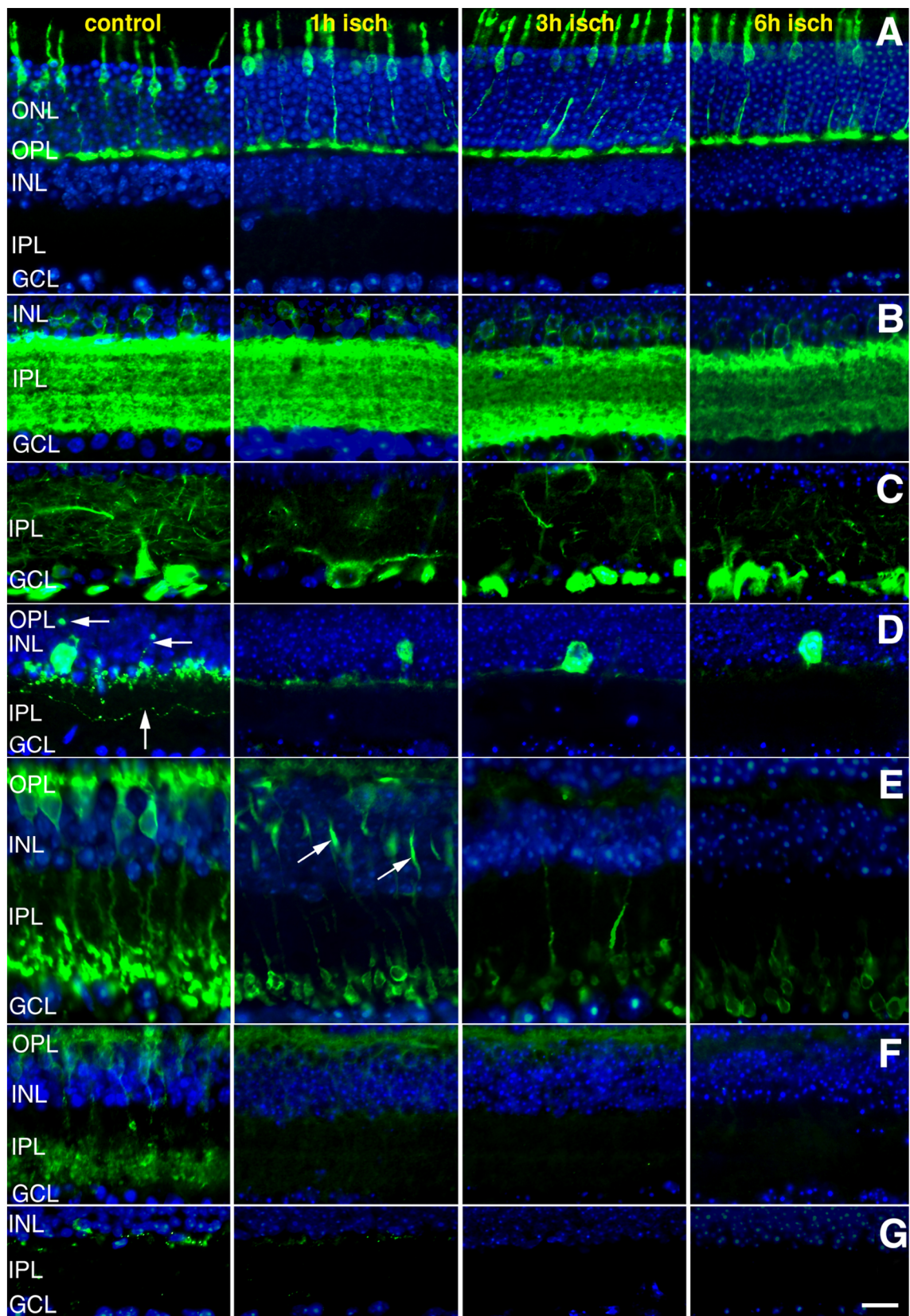


Figura 3.4 Marker immunoistochimici in retine WT di controllo ed ischemiche. (A) Coni marcati con anticorpi diretti contro l'arrestina. (B) Cellule amacrine marcate con anticorpi diretti contro il GAT-1. (C) Cellule ganglionari marcate con anticorpi diretti contro la β -tubulina III. (D) Cellule amacrine contenenti TH. Le frecce in D indicano i processi varicosi TH-immunopositivi localizzati nella porzione mediana dell'IPL e nell'INL/OPL in retine di controllo. (E) Cellule bipolari dei bastoncelli marcate con anticorpi diretti contro la PKC. Le frecce in E indicano gli ingrossamenti nella porzione prossimale degli assoni delle cellule bipolari dei bastoncelli dopo 1h di trattamento ischemico. (F) Cellule bipolari di tipo ON marcate con anticorpi diretti contro la G γ 13. (G) Cellule amacrine contenenti SRIF. Per abbreviazioni vedi "Tabella delle abbreviazioni". Barra di calibrazione: 20 μ m.

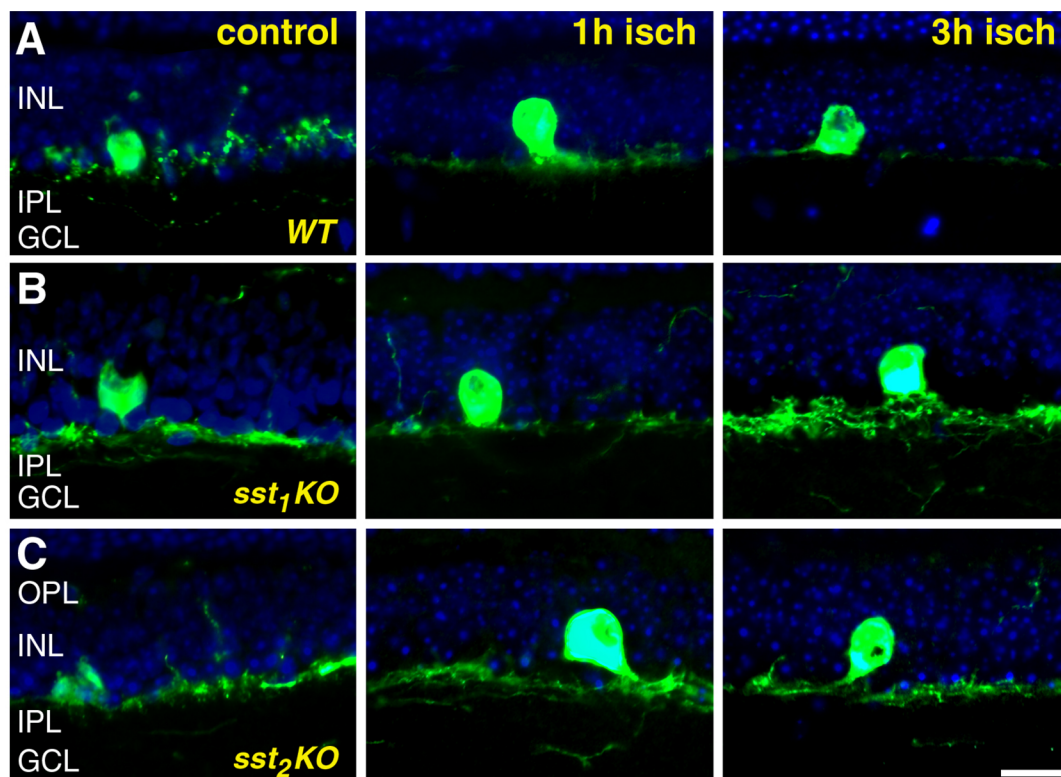


Figura 3.5 Immunomarcatura TH in retine WT (A), *sst1* KO (B) ed *sst2* KO (C), di controllo e dopo 1h o 3h di trattamento ischemico. Le fibre contenenti TH appartenenti a retine *sst1* KO o *sst2* KO, rispetto alle retine WT, non sembrano essere danneggiate dal trattamento ischemico. Per abbreviazioni vedi “Tabella delle abbreviazioni”. Barra di calibrazione: 20 μ m.

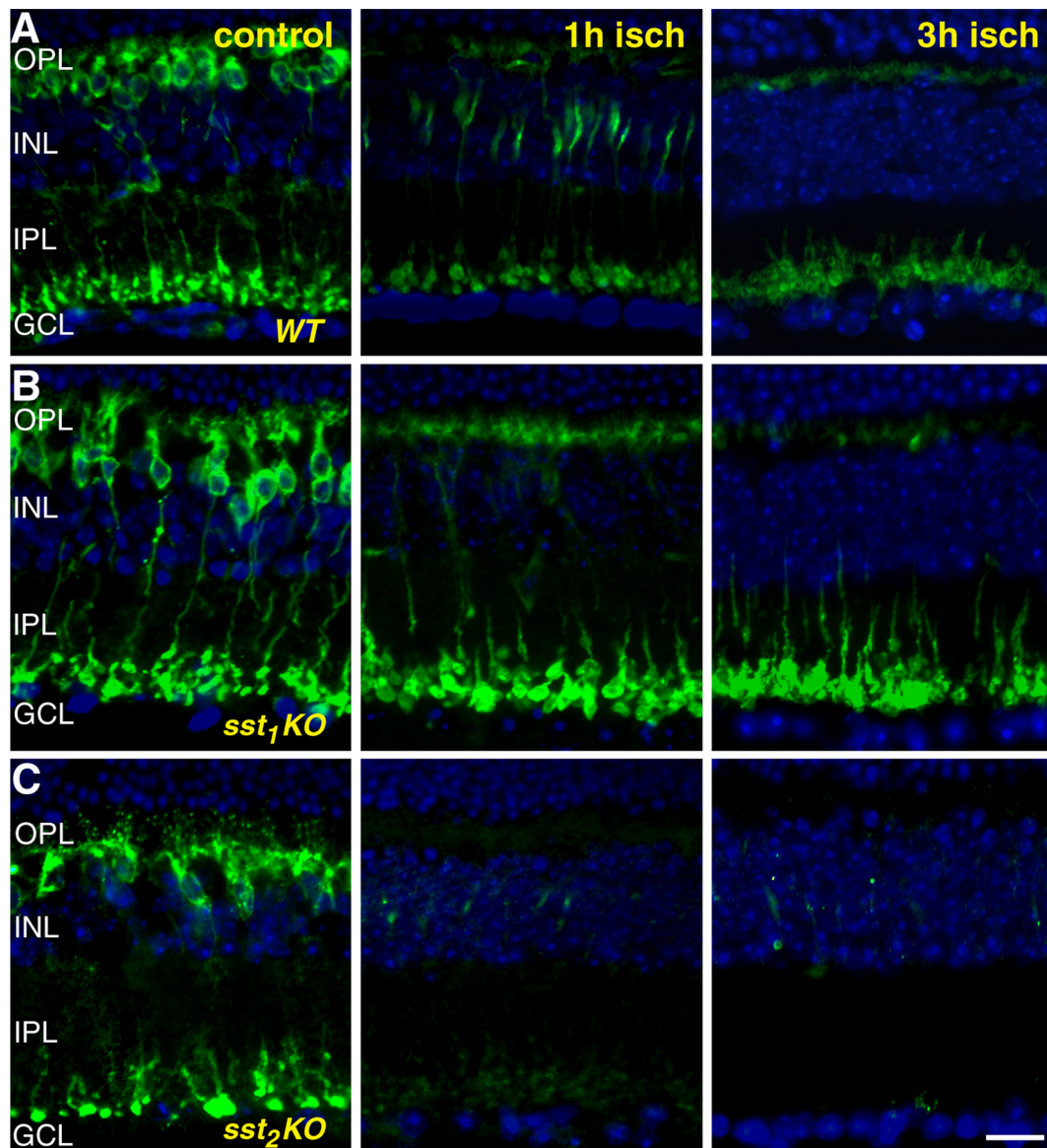


Figura 3.6 Immunomarcatura PKC in retine WT (A), *sst1* KO (B) ed *sst2* KO (C), di controllo e dopo 1h o 3h di trattamento ischemico. Le cellule bipolari dei bastoncelli nelle retine *sst1* KO appaiono meno colpite dall'insulto ischemico rispetto alle retine WT, mentre nelle retine *sst2* KO ischemiche esse appaiono seriamente danneggiate. Per abbreviazioni vedi "Tabella delle abbreviazioni". Barra di calibrazione: 20 μ m.

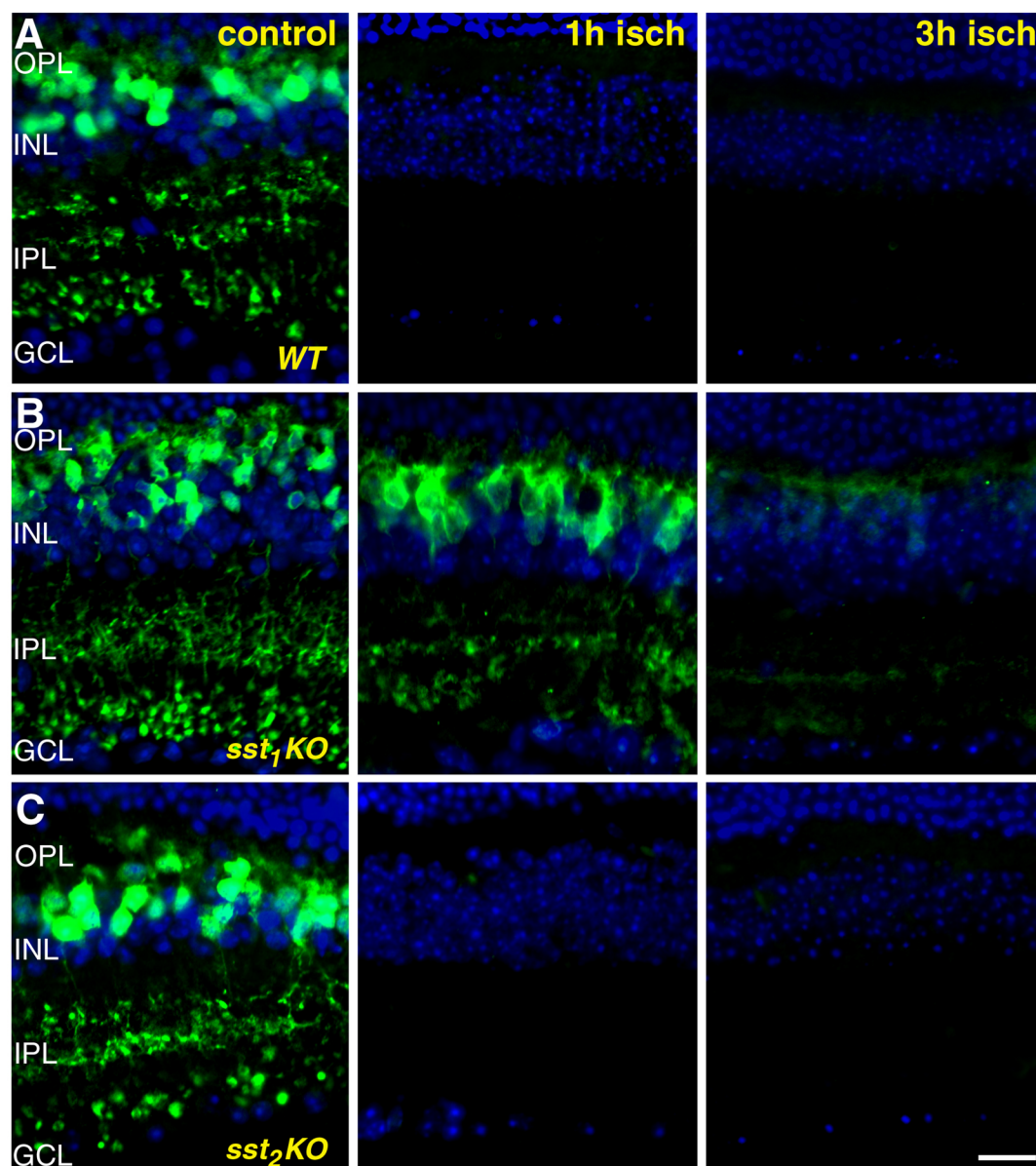


Figura 3.7. Immunomarcatura CaBP5 in retine WT (A), *sst1* KO (B) ed *sst2* KO (C), in condizioni di controllo e dopo 1h o 3h di trattamento ischemico. Nelle retine *sst1* KO, a differenza delle retine WT ed *sst2* KO, le cellule bipolari marcate con CaBP5 persistono dopo 1h di trattamento ischemico. Per abbreviazioni vedi “Tabella delle abbreviazioni”. Barra di calibrazione: 20 μ m.

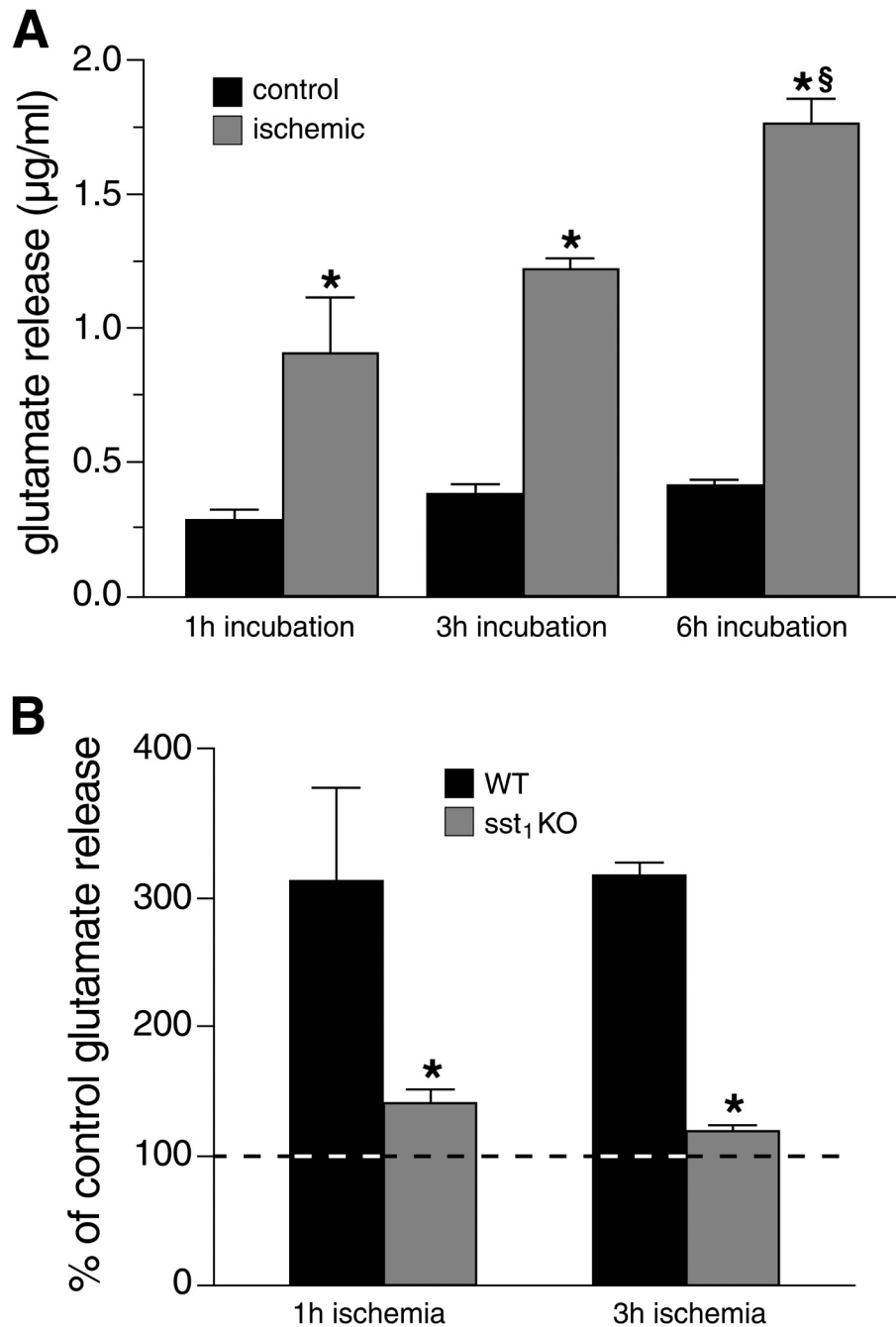


Figura 3.8 (A) Rilascio di glutammato in retine WT di controllo ed ischemiche dopo 1h, 3h o 6h di trattamento. Il rilascio di glutammato aumenta all'aumentare dei tempi di trattamento * $P < 0.001$ vs. rispettivi valori di controllo; § $P < 0.001$ vs. rispettivi valori dopo 1h (ANOVA e post-test Tukey). $n=3$ in tutti i casi ad eccezione di $n=6$ per le retine di controllo ad 1h di incubazione. (B) Rilascio di glutammato in retine ischemiche WT ed sst_1 KO dopo 1h o 3h di trattamento. Ciascun istogramma rappresenta la percentuale relativa ai rispettivi valori di controllo (linea tratteggiata). Il rilascio di glutammato nelle retine ischemiche sst_1 KO è significativamente più basso che nelle retine ischemiche WT. * $P < 0.001$ vs rispettivi valori WT (ANOVA e post-test Tukey). $n=3$ in tutti i casi. Per abbreviazioni vedi "Tabella delle abbreviazioni".

CAPITOLO 4

Modulazione della risposta all'ischemia retinica da parte di agonisti o antagonisti dei recettori sst2 della SRIF

Numerosi studi sono volti alla ricerca di possibili interventi che possano arginare i danni prodotti dall'ischemia, in particolare occorrono specifiche strategie farmacologiche che possano modulare le singole cascate di segnalazione che si innescano durante questo fenomeno. Tra i vari target farmacologici, il sistema somatostatinergico sembra essere uno dei migliori candidati. Infatti, numerosi studi mostrano che la SRIF, nella retina colpita da ischemia, può agire come fattore neuroprotettivo (Celiker and Ilhan, 2002; Casini et al., 2005; Mastrodimitou et al., 2005; per ulteriori informazioni vedi capitolo 2 e 3). Inoltre, come descritto nel capitolo 3, un'alterata espressione dei recettori della SRIF comporta una modulazione della risposta al danno neuronale indotto dall'ischemia in un modello in vitro nella retina di topo. In particolare, retine sst1 KO, dove i recettori sst2 sono sovra-espressi e più funzionali, mostrano una marcata riduzione della morte cellulare ed una ridotta espressione di marker per l'apoptosi rispetto alle retine WT o sst2 KO. Tuttavia, queste osservazioni non dimostrano in maniera diretta la partecipazione dei recettori sst2 in questi fenomeni. Quindi, nel tentativo di dimostrare il diretto coinvolgimento dei recettori sst2 nelle azioni neuroprotettive esercitate dalla SRIF in condizioni di ischemia, sono stati effettuati trattamenti farmacologici utilizzando agonisti ed antagonisti di questi recettori in retine di controllo ed ischemiche, WT ed sst1 KO. In particolare, nel lavoro sperimentale descritto in questo capitolo, sono stati effettuati trattamenti con SRIF-14, pasireotide (o SOM 230, un analogo di SRIF), octreotide (o SMS 201-995 o sandostatina, un agonista specifico del recettore sst2) o cianamide (o D-Tyr8 CYN 154806, un antagonista specifico dei recettori sst2). Il trattamento con la SRIF-14 è stato effettuato per verificare, in condizioni di ischemia, una sua eventuale azione protettiva diretta. Tuttavia la SRIF-14 ha una stabilità molto limitata a causa della rapida degradazione da parte di peptidasi. Inoltre, la SRIF-14 mostra alta affinità per tutti i recettori sst (Siehler et al., 1999; Olias et al., 2004). Perciò sono stati effettuati trattamenti anche con un analogo della SRIF a più basso peso molecolare ed a più alta stabilità, la pasireotide. La pasireotide lega specificamente i recettori sst1, sst2, sst3 ed sst5 ma non l'sst4 (Lewis et al., 2003). La pasireotide è stata introdotta recentemente in clinica

poiché sembra esercitare una potente azione inibitoria sulla secrezione ormonale in numerosi modelli sperimentali sia in vivo che in vitro (Bruns et al., 2002; Weckbecker et al., 2002; Murray et al., 2004; Schmid and Schoeffter, 2004; van der Hoek et al., 2004). Come agonista specifico dei recettori sst2 è stata utilizzata l'octreotide, infatti essa viene correntemente utilizzata nel trattamento di vari tipi di malattie grazie al suo basso peso molecolare ed alla sua stabilità (Lamberts et al., 2002; Weckbecker et al., 2003). Inoltre, nella retina l'octreotide sembra esercitare effetti protettivi in condizioni di ischemia o di ischemia-riperfusion (Celiker and Ilhan, 2002; Mastrodimou et al., 2005), oltre ad esercitare un'azione anti-angiogenica regolando la secrezione di fattori angiogenici come l'IGF-1 ed il VEGF (Danesi et al., 1997; Lawnicka et al., 2000; Garcia de la Torre et al., 2002; Wilkinson-Berka et al., 2006; Boehm, 2007). Infine, come ulteriore verifica del coinvolgimento specifico dei recettori sst2 nell'azione di protezione della SRIF, è stata utilizzata la cianamide come molecola antagonista dei recettori sst2. La cianamide infatti agisce bloccando i recettori sst2.

L'ipotesi alla base di questo studio è che agonisti o antagonisti dei recettori sst2 possano modulare la risposta della retina all'insulto ischemico. Tuttavia, i meccanismi attraverso i quali questa modulazione potrebbe realizzarsi sono ancora poco chiari. Si può supporre, ovviamente, che sia coinvolta la via di trasduzione del segnale che si innesca successivamente all'interazione della SRIF con i recettori sst2. I recettori sst2, come anche gli altri recettori della SRIF, sono accoppiati a proteine G. Quindi, nel lavoro di seguito descritto, al fine di capire a che livello potrebbe essere modulata la via di segnalazione che coinvolge i recettori sst2, è stata indagata l'espressione di proteine regolatrici dei recettori accoppiati a proteine G. A questa categoria appartengono le proteine regolatrici RGS, che regolano la risposta dei recettori accoppiati a proteine G dopo il loro legame al ligando e stimolano l'attività GTPasica delle proteine $G\alpha$ (Jean-Baptiste et al., 2006). Inoltre, le proteine GRK rappresentano elementi chiave nella via che porta alla desensitizzazione, all'endocitosi, agli scambi intracellulari, alla risensitizzazione ed alla modulazione di importanti cascate di segnalazione intracellulari in cui sono coinvolti recettori accoppiati a proteine G (Ribas et al., 2007). Sebbene alcuni studi indichino che le RGS possono interagire con differenti recettori della SRIF ricombinanti (Zitzer et al., 1999a; Zitzer et al., 1999b; Schwarzler et al., 2000; Kong et al., 2002), il preciso ruolo che esse rivestono all'interno della trasduzione del segnale non è del tutto chiaro.

4.1 Materiali e metodi

In questo lavoro sono state utilizzate retine WT ed sst1 KO normali, ischemiche dopo 1h di incubazione (per dettagli fare riferimento al paragrafo 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3) ed ischemiche dopo 1h di incubazione trattate farmacologicamente. In queste retine è stato valutato il livello di morte cellulare mediante la tecnica TUNEL (fare riferimento al paragrafo 3.1.4). Inoltre, le soluzioni di incubazione sono state processate con il metodo HPLC ESI-MS per determinare la quantità di glutammato rilasciato (fare riferimento al paragrafo 3.1.7). Infine, è stata effettuata una valutazione del livello di espressione dell'mRNA di proteine regolatrici di recettori accoppiati a proteine G. L'analisi statistica e la preparazione delle figure è stata effettuata secondo quanto riportato nei paragrafi 3.1.8 e 3.1.9.

4.1.1 Trattamento farmacologico

SRIF-14 è stata acquistata da "Bachem AG" (Bubendorf, Switzerland); pasireotide, octreotide e cianamide sono prodotti da "Novartis Pharma" (Basel, Switzerland). I trattamenti farmacologici sono stati effettuati aggiungendo queste sostanze alla soluzione ischemica in concentrazione di 10^{-5} M.

4.1.2 RT-PCR e Real Time PCR

Estrazione dell'mRNA ed RT. L'RNA totale è stato estratto mediante il kit "RNeasy Mini Kit with DNase digestion (Qiagen)". Dopo aver effettuato la solubilizzazione in acqua RNase-free, l'RNA totale è stato quantificato mediante lo spettrofotometro "Bio-Rad SmartSpec 3000 spectrophotometer" (Hercules, CA, USA). Il primo filamento di cDNA è stato generato a partire da 3 µg di RNA utilizzando il kit "iScript cDNA Synthesis Kit" (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

RT-PCR. La reazione di PCR è stata effettuata utilizzando 1 µl di cDNA in 15 µl di volume totale di buffer per PCR (Invitrogen, Milano, Italy), contenente 3 mM $MgCl_2$, 300 µM dNTPs, 300 nM dei primers appropriati (Tabella 4.1) ed infine Taq polimerasi (0.35 U, Invitrogen). La reazione di amplificazione è stata effettuata in un termociclatore Bio-Rad (Hercules, CA, USA) per 40 cicli. Ciascun ciclo è costituito da: denaturazione per 30 secondi a 94°C, annealing per 30 secondi a 58°C, estensione per 30 secondi a 72°C. L'amplificazione è stata portata a termine con un ultimo ciclo di estensione per 5 minuti a 72°C. Per ciascuna amplificazione sono stati effettuati due tipi di controllo: nel primo controllo è stata omessa la

trascrittasi inversa per controllare la contaminazione del DNA genomico; nel secondo controllo è stato omesso il cDNA per testare eventuali contaminazioni esterne. Un volume pari a 5 µl di prodotto della PCR è stato utilizzato per l'elettroforesi su gel di agarosio contenente il 2% di bromuro di etidio, utilizzando il sistema "Bio-Rad Sub-cell GT".

Real Time PCR. La Real Time PCR è stata effettuata utilizzando il "SYBER Green on MiniOpticon Two-Color Real-Time PCR detection System" (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La miscela utilizzata è stata preparata utilizzando 1 µl di cDNA, 300 nM di ciascun primer (Tabella 4.1), 7.5 µl di iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) ed acqua RNase-free in un volume finale di 15 µl. Ogni corsa è stata effettuata in triplicato. La Real Time PCR è stata effettuata con uno step iniziale di denaturazione a 95°C per 3 minuti, successivamente sono stati effettuati 40 cicli a 95°C per 10 secondi ed a 58° per 20 secondi. La fluorescenza è stata rilevata durante la reazione così da permettere un continuo monitoraggio dei prodotti della PCR. La "melt-curve analysis" è stata effettuata alla fine di ogni esperimento. Inoltre, la grandezza dei prodotti amplificati è stata verificata mediante elettroforesi su gel. I campioni sono stati comparati utilizzando il metodo CT (threshold cycle) comparativo, come precedentemente descritto da Livak and Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001), normalizzato rispetto alla proteina ribosomiale L13a (RPL13a; ammontare del target = $2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Gene	Sequenza primer	Lunghezza dei prodotti (bp)	Real Time PCR: efficienza	Gene Bank Accesso No.	Referenze
RPL13a	F: 5'-cactctggaggagaaacggaagg-3' R: 5'-gcaggcatgaggcaaacagtc-3'	182	94%	NM_009438	[RTPrimer DB ID: 3587]
GRK1	F: 5'-ttgacaaagcggacacagag-3' R: 5'-tggtgattcccttcagtca-3'	153	93%	NM_011881	[primer 3]
GRK2	F: 5'-gccatggagaagagcaagac-3' R: 5'-cactgcttccccaatttcac-3'	195	95%	NM_177078	[primer 3]
RGS1	F: 5'-gccaaagacttttggaatgg-3' R: 5'-tggttggaaggagttttc-3'	153	99.5%	NM_015811	[primer 3]
RGS2	F: 5'-gctacatgagaccaggagtc-3' R: 5'-cctaggttgctgacttcctg-3'	187	91%	NM_009061	[RTPrimer DB ID: 3320]
RGS5	F: 5'-cggagaaggcaaagcaa-3' R: 5'-ccaggttctcatggtgatg-3'	102	100%	NM_009063	[RTPrimer DB ID: 759]
RGS9	F: 5'-gaggatggcatttccaaa-3' R: 5'-ggttctgtgcctccaggta-3'	182	100%	NM_011268	[primer 3]

Tabella 4.1. Elenco dei primer utilizzati per l'analisi PCR.

4.2 Risultati

4.2.1 Marcatura TUNEL

La tecnica TUNEL è stata utilizzata per rilevare i nuclei apoptotici in retine WT ed sst1 KO di controllo, dopo 1h di ischemia o dopo 1h di ischemia e trattamento farmacologico. La figura 4.1 mostra immagini rappresentative di esperimenti condotti con octreotide o con cianamide. Il trattamento farmacologico è stato effettuato anche con SRIF e pasireotide, le cui immagini di marcatura TUNEL non vengono mostrate poiché esse risultano del tutto simili a quelle relative al trattamento con octreotide.

Retine WT (Fig. 4.1A) ed sst1 KO (Fig. 4.1B) incubate 1h, in condizioni di controllo, non mostrano alcuna marcatura TUNEL. La presenza di cellule apoptotiche risulta invece evidente in retine incubate 1h in soluzione ischemica. Infatti, sono visibili nuclei picnotici, tipici delle cellule apoptotiche ed un certo grado di marcatura nell'ONL, nell'INL e nel GCL. In particolare, le retine WT dopo 1h di trattamento mostrano un livello di marcatura TUNEL più

consistente rispetto alle retine sst1 KO. Questo risultato conferma le osservazioni illustrate nel capitolo 3 di questa tesi.

La figura 4.1 mostra che dopo trattamento con octreotide le retine WT presentano una consistente diminuzione della marcatura TUNEL in confronto a retine WT ischemiche non trattate. Infatti, il livello di marcatura risulta inferiore in tutti gli strati nucleari retinici. Le retine ischemiche sst1 KO trattate con octreotide mostrano invece un notevole aumento della marcatura TUNEL, sia rispetto alle retine sst1 KO ischemiche non trattate, sia rispetto al WT che ha subito lo stesso trattamento. Nelle retine ischemiche sst1 KO trattate con octreotide il maggiore livello di marcatura TUNEL si può osservare nell'ONL, mentre una minore marcatura si può vedere nell'INL e nel GCL. La figura 4.1 mostra anche che dopo trattamento con cianamide il livello di marcatura TUNEL sia in retine WT che in retine sst1 KO è sensibilmente maggiore rispetto alle retine ischemiche non trattate. In particolare, le retine sst1 KO trattate con cianamide mostrano un livello di marcatura TUNEL lievemente superiore a quelle WT che hanno subito lo stesso trattamento in tutti gli strati nucleari retinici.

L'analisi quantitativa effettuata utilizzando i dati ottenuti dalla marcatura TUNEL fornisce informazioni più dettagliate riguardo alla percentuale di morte cellulare in ciascuno strato nucleare retinico (Fig. 4.2). Nei grafici riportati in figura vengono mostrati i dati relativi alla morte cellulare in retine ischemiche WT ed sst1 KO dopo trattamento con SRIF, octreotide, pasireotide o cianamide. Come si può osservare, la percentuale di morte cellulare in tutti gli strati nucleari di retine WT ischemiche dopo trattamento con SRIF, octreotide o pasireotide è quasi sempre significativamente ridotta rispetto al controllo, mentre risulta notevolmente più elevata dopo trattamento con cianamide. Le retine ischemiche sst1 KO mostrano, invece, livelli di morte cellulare significativamente superiori sia rispetto al controllo, sia rispetto alle retine WT che hanno subito lo stesso trattamento. Ciò accade in tutti gli strati nucleari retinici per i trattamenti con SRIF, octreotide o pasireotide. Riguardo invece al trattamento con cianamide, nelle retine sst1 KO i livelli di morte cellulare risultano più alti rispetto al controllo in tutti gli strati cellulari. Tuttavia, se confrontata con il WT che ha subito lo stesso trattamento, la percentuale di morte cellulare negli sst1 KO risulta superiore nell'ONL ed inferiore nell'INL e nel GCL.

4.2.2 Rilascio di glutammato

La percentuale di glutammato rilasciato in seguito ad ischemia e trattamento farmacologico conferma i dati ottenuti dall'analisi TUNEL. In particolare, la figura 4.3 mostra che la percentuale di glutammato rilasciata da retine ischemiche WT in seguito a trattamento con octreotide è inferiore rispetto a retine ischemiche non trattate. Al contrario, il livello di glutammato rilasciato da retine sst1 KO ischemiche in seguito a trattamento con octreotide risulta considerevolmente elevato sia rispetto alle retine ischemiche sst1 KO non trattate, che rispetto ai WT trattati con octreotide.

4.2.3 Espressione di molecole regolatrici di recettori accoppiati a proteine G

Mediante RT-PCR, sono stati dosati i livelli di mRNA relativi a molecole regolatrici di recettori accoppiati a proteine G. In particolare, è stata indagata la presenza in retine WT degli mRNA relativi a proteine appartenenti alla famiglia delle proteine GRK (Ribas et al., 2007) o a quella delle RGS (Willars, 2006). La figura 4.4A mostra i risultati della RT-PCR che rileva prodotti di amplificazione corrispondenti ai pesi molecolari di proteine GRK1, GRK2, RGS1, RGS2, RGS5 ed RGS9. Come mostrato in figura 4B, l'analisi mediante Real Time PCR rivela un aumento significativo di espressione dell'mRNA relativo alle proteine GRK1 ed RGS1 in retine WT ischemiche rispetto a retine non ischemiche di controllo. I livelli di mRNA relativi alle altre proteine regolatrici non subiscono alcuna variazione di rilievo in seguito a trattamento ischemico.

4.2.4 Espressione di molecole regolatrici di recettori accoppiati a proteine G in retine ischemiche trattate farmacologicamente

Dal momento che l'espressione di GRK1 e di RGS1 si è mostrata sensibile alla condizione ischemica, gli mRNA di GRK1 e RGS1 sono stati dosati, in retine ischemiche, anche in seguito a trattamento con octreotide. I risultati di questi esperimenti sono visibili in figura 4.5. In particolare, l'espressione dell'mRNA per le proteine GRK1 in retine ischemiche WT trattate con octreotide risulta significativamente inferiore rispetto a quella in retine ischemiche WT non trattate, ed una diminuzione simile si osserva anche per le retine sst1 KO (Fig. 4.5A). Anche l'espressione dell'mRNA per le RGS1 nelle retine WT ischemiche dopo trattamento con octreotide risulta inferiore rispetto a quella osservata in retine WT ischemiche non trattate. Tuttavia, le retine ischemiche sst1 KO trattate con octreotide mostrano livelli di mRNA per le proteine RGS1 del tutto simili rispetto alle retine ischemiche sst1 KO non

trattate, e tali valori sono nettamente superiori a quelli in retine WT che hanno subito lo stesso trattamento (Fig. 4.5B).

4.3 Discussione

Il presente lavoro mostra che in seguito a trattamento farmacologico con SRIF o con octreotide, in retine ischemiche WT si osserva un certo grado di protezione nei confronti del danno ischemico, mentre nelle retine sst1 KO si osserva un peggioramento. Nel tentativo di chiarire questa condizione, è stata inizialmente indagata la presenza nella retina normale di topo di molecole regolatrici di recettori accoppiati a proteine G ed in seguito è stata valutata l'espressione di queste proteine in seguito ad ischemia ed al trattamento farmacologico. In particolare, è stata rilevata la presenza mediante RT-PCR delle proteine GRK1 e GRK2 e delle proteine RGS1, RGS2, RGS5, RGS9. Di queste, solamente le GRK1 e le RGS1 mostrano variazione di espressione in seguito ad ischemia. Infine, mediante Real Time PCR è stata osservata variazione dell'espressione delle proteine GRK1 ed RGS1 in seguito a trattamento farmacologico.

4.3.1 Apoptosi

Il livello di morte cellulare presente in retine ischemiche WT ed sst1 KO osservato mediante l'analisi TUNEL e la relativa analisi quantitativa confermano quanto già descritto nel capitolo 3 di questa tesi. Infatti, le retine sst1 KO mostrano un certo grado di protezione nei confronti dell'insulto ischemico rispetto alle retine WT. Come ipotizzato sulla base di precedenti osservazioni (capitolo 3), l'effetto protettivo osservato in retine sst1 KO potrebbe essere dovuto alla presenza di sovra-espressione di recettori sst2. I recettori sst2, in retine sst1 KO, risultano essere anche più funzionali (Dal Monte et al., 2003b; Bigiani et al., 2004; Pavan et al., 2004; Casini et al., 2005). Quindi, con lo scopo di verificare il diretto coinvolgimento dei recettori sst2 nelle azioni neuroprotettive esercitate dalla SRIF in condizioni di ischemia, sono stati effettuati trattamenti farmacologici utilizzando agonisti ed antagonisti di questi recettori in retine di controllo ed ischemiche, WT ed sst1 KO. I risultati hanno mostrato che, in seguito a trattamenti con octreotide, in retine WT si osserva un certo grado di protezione nei confronti del danno ischemico, come del resto è stato osservato anche dopo trattamento con SRIF o con un suo analogo, la pasireotide. Questi risultati sono in accordo con precedenti

osservazioni in retine ischemiche di ratto in vitro (Mastrodimou et al., 2005) e rafforzano l'idea che siano proprio i recettori sst2 responsabili dell'effetto protettivo nei confronti dell'insulto ischemico. Ciò è confermato anche dalle osservazioni sul trattamento con cianamide, che agisce bloccando i recettori sst2 ed abolisce l'effetto protettivo provocando anzi un consistente aumento di apoptosi. In modo analogo, anche in retine ischemiche sst1 KO trattate con cianamide scompare l'effetto di protezione osservato in assenza di trattamento. Risultati inattesi si osservano invece dopo trattamento di retine ischemiche sst1 KO con octreotide. Infatti, utilizzando tale agonista dei recettori sst2 in retine ischemiche sst1 KO, ciò che si osserva è un peggioramento del danno ischemico. Infatti, il livello di morte cellulare indica un completo annullamento dell'effetto di protezione dall'insulto ischemico che era stato precedentemente osservato in retine sst1 KO. L'annullamento dell'effetto protettivo presente in retine sst1 KO nei confronti dell'ischemia si osserva anche dopo trattamento con SRIF o pasireotide. Questo dato suggerisce che in questo caso sia l'octreotide che la SRIF o la pasireotide potrebbero agire bloccando l'azione dei recettori sst2.

4.3.2 Rilascio di glutammato

I risultati dello studio illustrato nel capitolo 3 confermano l'ipotesi che l'eccitotossicità da glutammato è una delle principali cause di morte cellulare in seguito ad ischemia. Il livello di glutammato rilasciato in condizioni ischemiche appare sempre in linea con il grado di apoptosi. Infatti, in retine WT ischemiche trattate con octreotide dove il livello di morte cellulare è più basso rispetto al controllo, anche il livello di glutammato rilasciato appare minore. Invece, in retine sst1 KO all'aumentare dei livelli di apoptosi, dopo trattamento con octreotide, si osserva anche un aumento del rilascio di glutammato.

4.3.3 Risposta al trattamento con octreotide di retine ischemiche WT ed sst1 KO

L'inaspettato effetto di peggioramento della morte cellulare osservato in retine sst1 KO in seguito al trattamento con octreotide potrebbe essere dovuto al fatto che l'attivazione dei recettori accoppiati a proteine G da parte dei loro agonisti innesca un processo di desensitizzazione (Métayé et al., 2005) che diminuisce la quantità di segnalazione evitando un'eccessiva stimolazione della cellula. Come prima ipotesi, è stata valutata la possibilità che, in retine sst1 KO in presenza di octreotide, i recettori sst2 venissero internalizzati. Questa ipotesi è stata verificata mediante immunistochimica (dati non mostrati), ed i risultati hanno

rivelato che non si verifica alcuna internalizzazione dei recettori sst2. Abbiamo quindi valutato l'espressione di molecole regolatrici di recettori accoppiati a proteine G con l'ipotesi che esse siano in qualche misura responsabili della risposta al trattamento con octreotide di retine ischemiche sst1 KO. Per la prima volta è stata condotta un'accurata indagine riguardo all'espressione dell'mRNA di proteine GRK ed RGS nella retina di topo mediante RT-PCR. Tra le GRK, le GRK1 e le GRK7 (chiamate anche rodopsina chinasi) sono tipiche della retina di mammifero (Penela et al., 2003; Mètayè et al., 2005). Tuttavia, mentre le GRK1 vengono espresse nella retina di numerosi mammiferi, le GRK7 non sono state mai osservate nel topo e nel ratto (Weiss et al., 2001). Nella retina di topo abbiamo anche riscontrato le GRK2, che in precedenza non erano state descritte nella retina di questo mammifero. Tra le proteine RGS presenti nella retina di mammifero, le RGS9 sembrano essere quelle maggiormente espresse (He et al., 1998; Larminie et al., 2004; Willars et al., 2006). I risultati della RT-PCR descritti in questa tesi confermano che nella retina di topo vengono espresse numerose RGS ed in particolare le RGS1, RGS2, RGS5 e RGS9. Numerosi studi illustrano le caratteristiche funzionali delle RGS9 nella retina, poiché sembrano quelle maggiormente coinvolte nella modulazione di recettori accoppiati a proteine G coinvolti nella trasduzione del segnale luminoso (Larminie et al., 2004; Krispel et al., 2006; Pugh et al., 2006). Tuttavia, le RGS maggiormente coinvolte nel processo ischemico nella retina di topo non sono risultate essere le RGS9 ma le RGS1. Infatti, in condizioni ischemiche, tra le proteine GRK ed RGS indagate, solamente le GRK1 e le RGS1 mostrano un consistente aumento di espressione rispetto al controllo. Si può supporre che queste due molecole, che vengono sovra-espresse durante il processo ischemico, possano modulare l'attività di recettori accoppiati a proteine G coinvolti nella risposta all'ischemia.

Un dato altrettanto interessante è stato fornito dall'analisi dell'espressione delle proteine GRK1 ed RGS1 dopo trattamento farmacologico in retine ischemiche WT ed sst1 KO. Nelle retine WT ischemiche dopo trattamento con octreotide, sia l'mRNA relativo alle proteine GRK1 che quello relativo alle RGS1 subiscono un consistente decremento. La diminuzione di queste proteine regolatorie potrebbe avere come conseguenza l'aumento dell'attività dei recettori sst2 che possono quindi esercitare la loro attività di mediatori dell'effetto protettivo della SRIF.

Il trattamento con octreotide nelle retine ischemiche sst1 KO produce invece una risposta diversa. Infatti, l'mRNA relativo alle GRK1 diminuisce proprio come nei WT mentre quello

relativo alle proteine RGS1 rimane praticamente uguale all'ischemico sst1 KO non trattato. La diminuzione delle proteine GRK1 nelle retine ischemiche sst1 KO dovrebbe avere come conseguenza l'instaurarsi di una situazione simile a quella che si osserva nel WT. Tuttavia, al contrario delle retine WT, nelle retine sst1 KO ischemiche l'espressione delle proteine RGS1 non diminuisce in seguito a trattamento con octreotide. Questo dato è compatibile con una situazione in cui una persistente espressione di proteine regolatrici potrebbe limitare la funzionalità del recettore sst2, ed indica che gli effetti del trattamento farmacologico su retine sst1 KO può essere spiegato, almeno in parte, con meccanismi che coinvolgono proteine regolatrici dei recettori sst2.

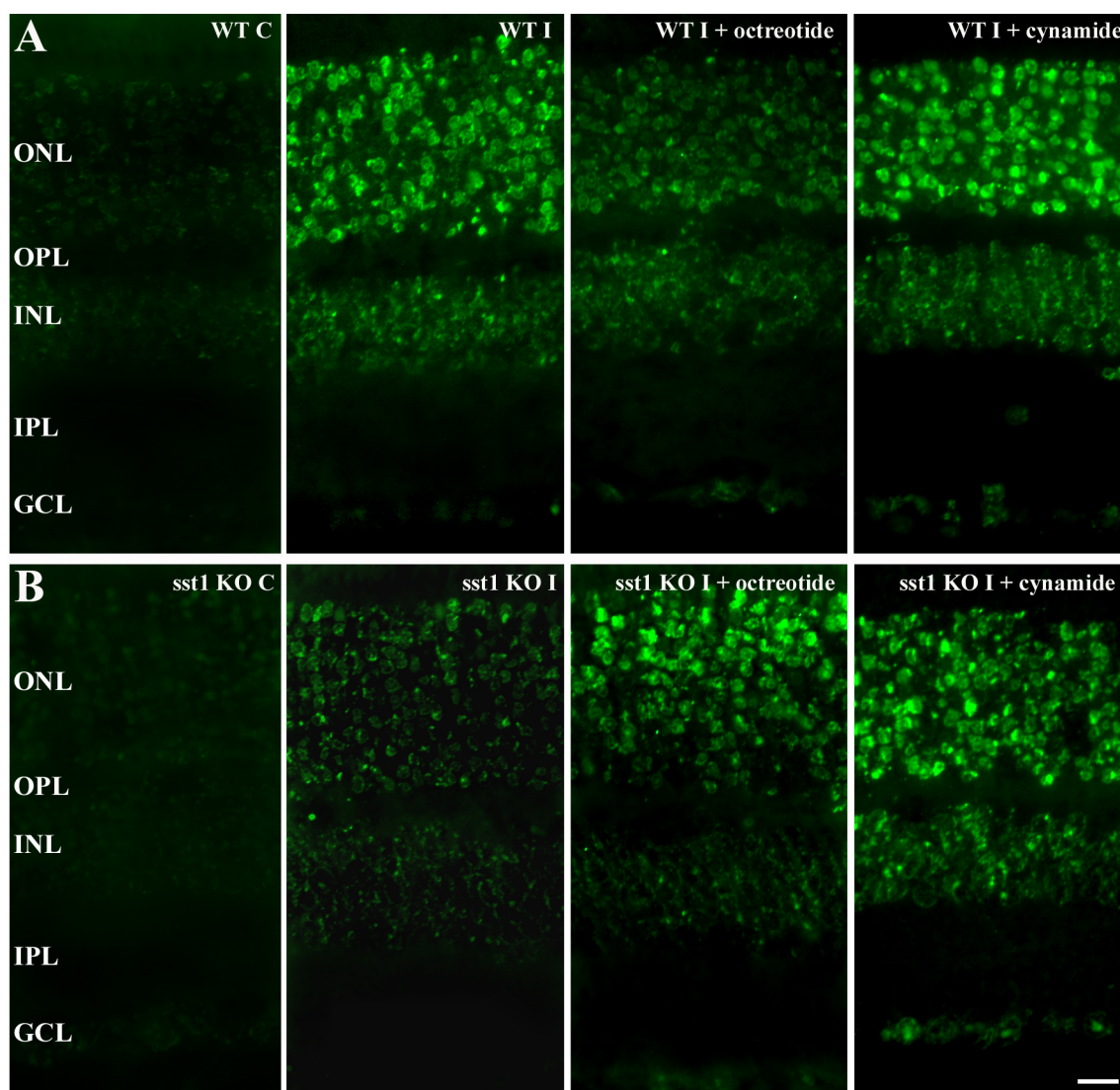


Figura 4.1 Marcatura TUNEL in retine ischemiche WT (A) ed sst1 KO (B) . Ogni pannello mostra, partendo da sinistra, la marcatura TUNEL in retine di controllo (C), retine ischemiche (I), retine ischemiche dopo trattamento con octreotide e retine ischemiche dopo trattamento con cianamide. Nelle retine WT, la quantità di marcatura TUNEL aumenta dopo 1h di ischemia rispetto al controllo. Dopo trattamento con octreotide la marcatura TUNEL diminuisce sensibilmente rispetto alle retine ischemiche non trattate, mentre aumenta dopo trattamento con cianamide. Nelle retine sst1 KO ischemiche si può osservare una riduzione della marcatura TUNEL rispetto a quelle WT ischemiche. Dopo trattamento con octreotide la marcatura TUNEL aumenta sensibilmente rispetto alle retine ischemiche sst1 KO non trattate ed anche rispetto alle retine WT sottoposte allo stesso trattamento. Dopo trattamento con cianamide la marcatura TUNEL nelle retine ischemiche sst1 KO aumenta ulteriormente. Per abbreviazioni vedi “Tabella delle abbreviazioni”. Barra di calibrazione: 20 μ m.

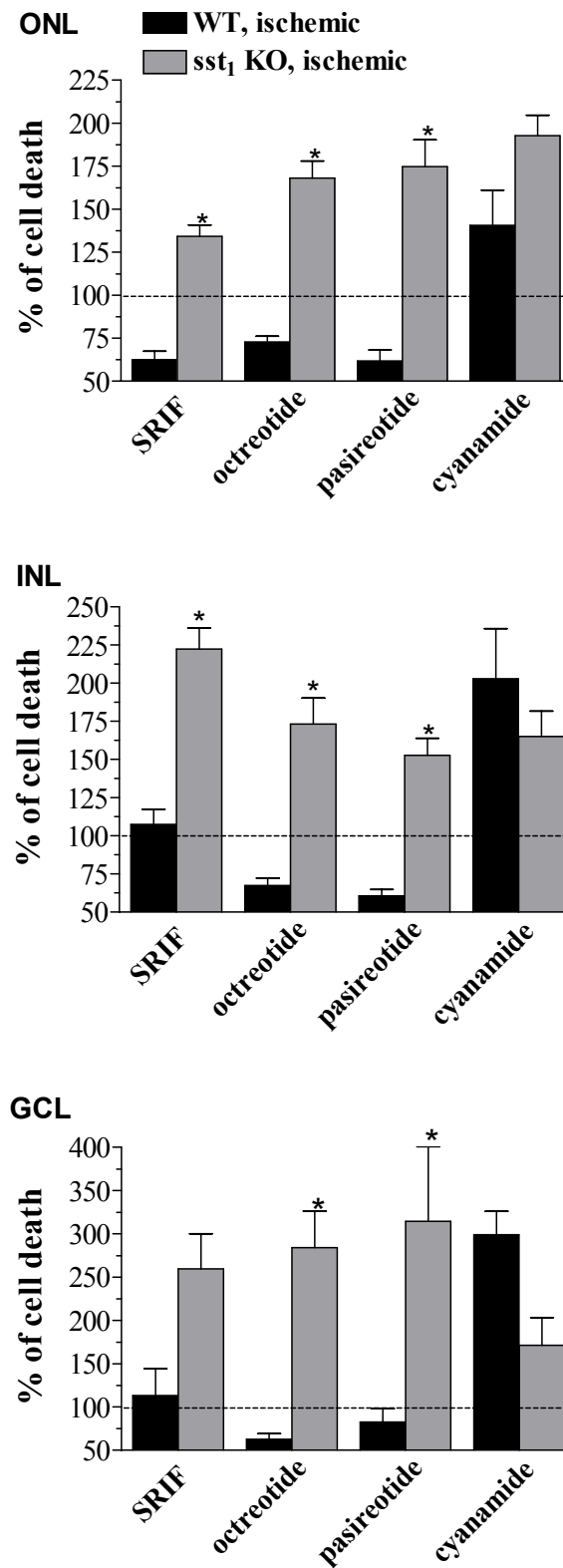


Figura 4.2 Analisi quantitativa della marcatura TUNEL nell'ONL, INL e GCL dopo 1h di trattamento ischemico in retine WT (istogrammi neri) ed *sst1* KO (istogrammi grigi). * $P < 0.001$ vs rispettivi valori WT (ANOVA e post-test Tukey). Gli istogrammi rappresentano la media $\pm$ SEM con n da 20 a 50. Per abbreviazioni vedi "Tabella delle abbreviazioni".

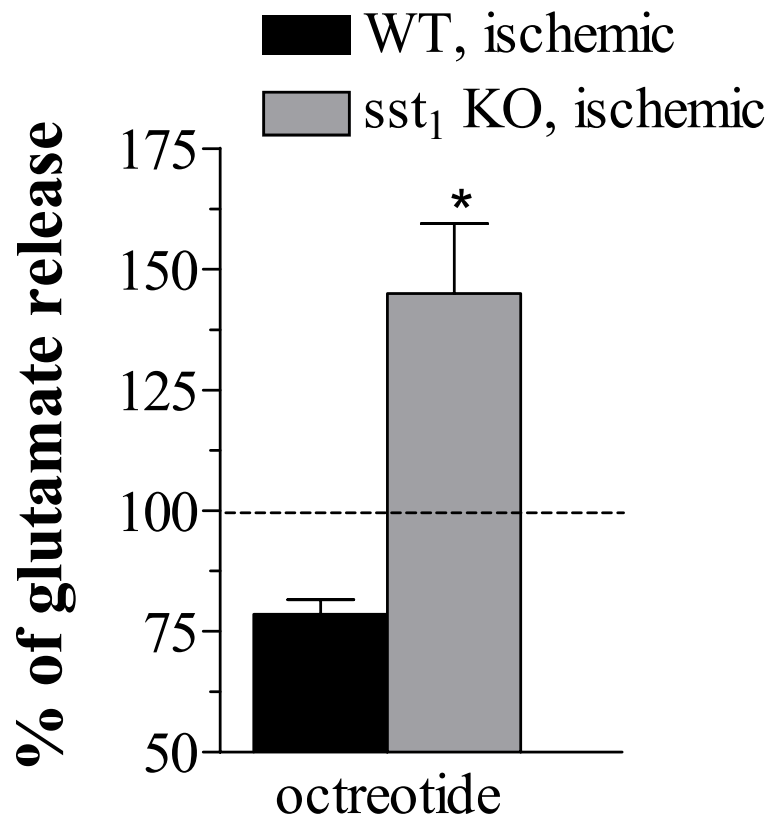


Figura 4.3 Rilascio di glutammato in retine ischemiche WT ed sst1 KO dopo 1h di incubazione, trattate con octreotide. Ciascun istogramma rappresenta la percentuale relativa ai rispettivi valori di controllo (linea tratteggiata). Il rilascio di glutammato nelle retine ischemiche sst1 KO è significativamente più alto che nelle retine ischemiche WT. * $P < 0.001$ vs rispettivi valori WT (ANOVA e post-test Tukey). $n=3$ in tutti i casi. Per abbreviazioni vedi “Tabella delle abbreviazioni”.

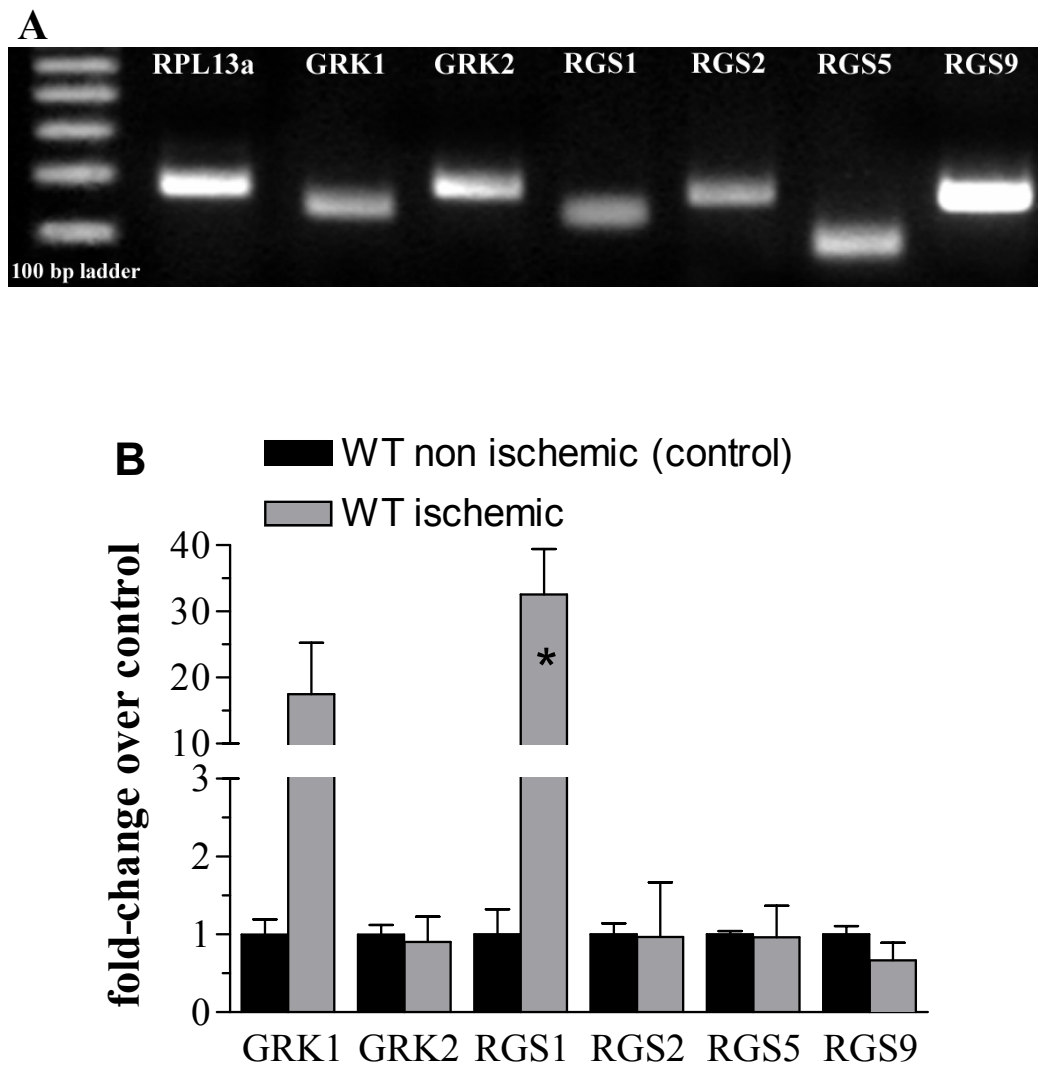


Figura 4.4 (A) Espressione dell'mRNA di proteine regolatrici di recettori accoppiati a proteine G (GRK1, GRK2, RGS1, RGS2, RGS5 ed RGS9) in retine di topo WT valutata mediante RT-PCR semiquantitativa. Come standard interno è stato utilizzato l'mRNA per la proteina ribosomiale RPL13a. (B) Prodotti di Real Time PCR corrispondenti all'mRNA per le proteine GRK1, GRK2, RGS1, RGS2, RGS5 ed RGS9 in retine WT non ischemiche di controllo (istogrammi neri) e dopo 1h di trattamento ischemico (istogrammi grigi). Un significativo aumento di espressione dell'mRNA relativo alle proteine GRK1 ed RGS1 si può osservare nelle retine WT ischemiche rispetto alle retine WT di controllo. I livelli di mRNA relativi alle altre proteine regolatrici rimangono costanti. * $P < 0,001$ (ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). Per abbreviazioni vedi "Tabella delle abbreviazioni".

CAPITOLO 5

Effetto anti-angiogenico della SRIF in retine di topo normali e geneticamente modificate: coinvolgimento del sistema AC/cAMP

Numerose linee di ricerca forniscono indicazioni circa il ruolo anti-angiogenico esercitato dalla SRIF e dai suoi analoghi (Grant et al., 2000; Davis et al., 2001; Grant and Caballero 2002; Simo et al., 2002; Baldysiak-Figiel et al., 2004). È stato proposto che questo peptide possa agire sia in modo diretto sulla proliferazione endoteliale, sia in modo indiretto attraverso la riduzione del rilascio di fattori pro-angiogenici come ad esempio il VEGF (Garcia de la Torre et al., 2002; Dasgupta, 2004; Sall et al., 2004). Il recettore sst2 sembra essere il principale responsabile degli effetti anti-angiogenici della SRIF nella retina. Infatti, agonisti dei recettori sst2 inibiscono la neovascolarizzazione nella retinopatia diabetica di tipo proliferativo (Davis et al., 2001; Grant and Caballero, 2002) ed inducono la proliferazione delle cellule endoteliali in condizioni ipossiche (Baldysiak-Figiel et al., 2004). In modelli di ipossia realizzati utilizzando retine sst1 KO ed sst2 KO, è stato recentemente osservato che la neovascolarizzazione e l'espressione del VEGF aumentano significativamente in assenza dei recettori sst2 (Dal Monte et al., 2007). Inoltre, l'espressione del VEGF è significativamente inferiore quando i recettori sst2 sono sovra-espressi, una condizione caratteristica delle retine sst1 KO (Dal Monte et al., 2003a,b; Casini et al., 2004). Tuttavia, i meccanismi che sono alla base delle azioni anti-angiogeniche esercitate dalla SRIF, rimangono ancora da chiarire. Inoltre, la via di traduzione della SRIF nella retina di mammifero non è stata completamente caratterizzata. La via che coinvolge l'AC sembra rivestire un ruolo importante. La SRIF nella retina di topo sembra inibire l'attività dell'AC (Pavan et al., 2004). Inoltre, sebbene ciascun recettore sst della SRIF possa influenzare differenti vie di trasduzione del segnale, tutti i cinque recettori della SRIF sono funzionalmente accoppiati all'inibizione dell'AC (Olias et al., 2004) che porta alla riduzione di cAMP intracellulare. L'inibizione dell'AC può essere implicata nell'azione anti-angiogenica della SRIF. Infatti, è stato osservato che l'attivazione della via del cAMP ha come conseguenza effetti pro-angiogenici in numerosi modelli animali studiati (Amano et al., 2001; Casibang et al., 2001; Sakurai et al., 2002; Schwarz et al., 2006). Si conoscono nove diverse isoforme di AC (AC I-IX) nella retina di mammifero (Beitz et al.,

1998; Abdel-Majid et al., 2002), tutte sono state clonate tranne l'isoforma AC VII (Hanoune and Defer, 2001).

Nel lavoro descritto di seguito è stato utilizzato il topo come modello sperimentale di ipossia. Lo scopo di questa indagine è correlare l'espressione dei recettori sst2, l'attività dell'AC e l'espressione delle varie isoforme di AC al fine di dimostrare un ruolo del sistema AC/cAMP nella mediazione degli effetti antiangiogenici che la SRIF può esercitare attraverso i recettori sst2.

5.1 Materiali e metodi

5.1.1 Modello animale

Gli esperimenti sono stati condotti su retine normali ed ipossiche di topi WT (C57BL/6) ed sst1 o sst2 KO di entrambe i sessi. I topi ipossici sono stati ottenuti utilizzando il modello di ipossia descritto da Smith et al. (Smith et al., 1994). In particolare, topi al settimo giorno di vita post-natale (PND 7) vengono esposti al 75% di ossigeno per 5 giorni. A PND 12 i topi vengono trasferiti in ambiente con percentuale di ossigeno normale. Nelle retine di questi topi si può osservare che la condizione ipossica porta all'induzione della vasoproliferazione che raggiunge il massimo livello a PND 17. I topi di controllo vengono tenuti in un ambiente arieggiato. A PND 17, i topi ipossici e quelli di controllo vengono sacrificati, le loro retine dissezionate come descritto da Dal Monte et al. (Dal Monte et al., 2007).

5.1.2 Preparazione delle membrane

Retine ipossiche e di controllo dissezionate da topi WT e transgenici a PND 17 sono state sottoposte a teasing a partire dall'epitelio pigmentato e mantenute in tampone (10 mM HEPES/Tris, 10% saccarosio, pH 7.4). Le retine (12 per ciascuna vial) sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80°C. Successivamente sono state scongelate e ed omogeneizzate nel medesimo tampone utilizzando un omogenizzatore "Dounce". L'omogenato è stato centrifugato a 1000g per 10 minuti, il soprannatante è stato aspirato e conservato. Il pellet è stato di nuovo sospeso, omogenizzato e centrifugato come descritto sopra. I due soprannatanti ottenuti da queste due fasi sono stati uniti e centrifugati a 11000g per 20 minuti. I pellet sono stati nuovamente sospesi in 30 ml di tampone senza saccarosio e centrifugati a 27000g per 10 minuti. Infine, il pellet risultante è stato nuovamente sospeso in

tampone con l'aggiunta degli inibitori delle proteasi aprotinina (20 µg/ml) e leupeptina (20 µg/ml) ed utilizzato immediatamente. Tutti i passaggi sopra descritti sono stati eseguiti ad una temperatura di 4°C. La concentrazione proteica è stata determinata secondo Bradford (Bradford et al., 1976), utilizzando bsa (bovine serum albumin) come standard.

5.1.3 Valutazione dell'attività dell'AC

L'attività dell'adenilato ciclastasi è stata misurata secondo quanto descritto da Pavan et al. (Pavan et al., 2004). La soluzione standard (0.4 ml/tubo) contiene 75 mM Hepes/Tris, 1 mM MgSO₄, 10 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 500 µM GTP, 1 mM EGTA, pH 7.4, 50 µg di proteine di membrana per ciascun tubo e sostanze di controllo, quando indicato. Le membrane sono state preincubate per 20 minuti a 0°C, la reazione è stata avviata mediante l'aggiunta di 500 µM ATP, portata avanti per 10 minuti a 30°C e bloccata dopo 2 minuti di ebollizione. Dopo aver centrifugato le provette, la quantità di cAMP è stata misurata nel sopranatante, secondo il metodo di Brown et al. (Brown et al., 1972). Ciascun esperimento è stato effettuato in duplicato. I dati sono stati espressi come pmol di cAMP/mg di proteine/10 min.

5.1.4 Estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e Real Time PCR

L'mRNA totale è stato estratto da sei retine di controllo ed iposiche WT e KO a PND 17 utilizzando il kit "RNeasy Mini Kit" (Qiagen, Valencia, CA). La sintesi di cDNA e la Real Time PCR sono state effettuate secondo la metodica descritta nel capitolo 4 (paragrafo 4.1.2). I primer utilizzati sono riportati in tabella 5.1. L'efficienza dell'amplificazione ha mostrato valori vicini al 100% per tutte le combinazioni di primer. I campioni sono stati comparati utilizzando il metodo CT comparativo, come precedentemente descritto da Livak and Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001), normalizzato rispetto alla ciclofilina B, che risulta essere stabile in queste condizioni sperimentali.

Gene	Sequenza dei primer	T _a (°C)	Lunghezza prodotti (bp)	n° cicli	Gene Bank Accesso N°	Referenze
AC I	F: 5'-agctatgagccaatcatggc-3' R: 5'-gacatgaggaagtgtgtgc-3'	60	206	25	AF053980	Al-Hakim et al., 2004
AC II	F: 5'-ctgtgtgaaaatgggactgg-3' R: 5'-agatgctgaggactccgtct-3'	60	357	26	NM_153534	Designed by Primer3 software (Rozen et al., 2000)
AC III	F: 5'-cctgtgtgctatcatcgtgg-3' R: 5'-tcatctaggtagtcgcagcg-3'	58	753	31	NM_138305	Al-Hakim et al., 2004
AC IV	F: 5'-cgttctctgtggagtcattgg-3' R: 5'-cctggaagaacttagcatcacc-3'	57	233	32	AF442771	Designed by Primer3 software (Rozen et al., 2000)
AC V	F: 5'-atgtcatgtgatggagtcgg-3' R: 5'-tcctccttctcttctgtggc-3'	60	450	29	BC035550	Al-Hakim et al., 2004
AC VI	F: 5'-ctccatggaaggactgatgc-3' R: 5'-ccgctggtgtaagtgcagc -3'	58	623	31	NM_007405	Al-Hakim et al., 2004
AC VII	F: 5'-ggctccggagtggttcaat-3' R: 5'-tcagttcacaggccagagtc -3'	60	190	30	NM_007406	Designed by Primer3 software (Rozen et al., 2000)
AC VIII	F: 5'-tcagtgggtggcaggtgtaat-3' R: 5'-tttgctgttgagagactgg-3'	60	337	29	NM_009623	Designed by Primer3 software (Rozen et al., 2000)
AC IX	F: 5'-gaaatgggcttaggcattgat-3' R: 5'-ggactccttggtctctgac 3'	60	348	30	NM_009624	Designed by Primer3 software (Rozen et al., 2000)
Cyclophilin B	F: 5'-ccatcgtgtcatcaaggacttc-3' R: 5'-ttgccatccagcaggaggtct-3'	60	216	30	M60456.1	Cristiani et al., 2002

Tabella 5.1. Sequenza dei primer e condizioni sperimentali per la Real Time PCR.

5.1.5 Immunoistochimica

Gli occhi di topi normali ed ipossici WT, sst1 KO e sst2 KO a PND 17 sono stati rimossi dagli animali, fissati, tagliati e conservati secondo la metodica descritta nel capitolo 4 (paragrafo 4.1). Per la marcatura relativa all'AC VII, le sezioni retiniche di controllo ed ipossiche WT e KO sono state lavate in PB 0,1M ed incubate tutta la notte a 4°C in una soluzione contenente anticorpi diretti contro AC VII (sc-25501) diluiti 1:400 in PB 0,1M contenente 1% di triton X-100. Successivamente i vetrini sono stati lavati in PB 0.1M ed incubati in una miscela contenente gli opportuni anticorpi secondari coniugati con Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) ad una diluizione 1:200 in PB 0.1M contenete 0.5% di Triton X-100 per 1 o 2 ore a temperatura ambiente. Infine, i vetrini sono stati montati con coprioggetto utilizzando come mezzo montante una miscela di PB 0.1M e glicerolo. Negli esperimenti di controllo, dove l'anticorpo primario è stato omesso, non è stata osservata alcuna marcatura specifica in nessuno strato retinico. Tutte le immagini in immunofluorescenza sono state acquisite con un microscopio confocale (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany). Le immagini digitali sono state ottimizzate per luminosità e contrasto utilizzando il software Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA). Le immagini finali sono state salvate ad un minimo di 300 dpi.

5.1.6 Analisi statistica

I dati sono stati elaborati con il "t-test" o con il test "ANOVA", seguito dal post-test "Dunnett". Le differenze sono state considerate significative per $p < 0,05$. L'elaborazione statistica è stata effettuata utilizzando il software "PRISM" (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). Tutti i dati sono riportati come media $\pm$ SEM.

5.1.7 Reagenti chimici

[8-3H] adenosine 3'-5'-cyclic phosphate (attività specifica 24 Ci/mmol) distribuito da "Amersham Biosciences" (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, England). Aprotinina, leupeptina, IBMX, GTP, cAMP, ATP, EGTA, forskolina (FSK), SRIF ed epinefrina distribuiti da "Sigma" (St. Louis, MO). L'octreotide è distribuita da "Novartis" (Basel, Switzerland). Gli anticorpi diretti contro l'AC VII (sc-25501) sono distribuiti da "Santa Cruz Biotechnology" (Santa Cruz, CA). Gli anticorpi secondari coniugati con Alexa Fluor 546 sono distribuiti da "Molecular Probes" (Eugene, OR).

5.2 Risultati

5.2.1 Attività dell'AC

L'attività dell'AC misurata nei vari campioni è riassunta nella Tabella 5.2. L'attività basale dell'AC appare simile in retine normali WT ed sst1 KO, mentre risulta significativamente ridotta nelle retine sst2 KO (-21%). L'AC è fortemente stimolata dall'FSK e viene anche attivata dall'epinefrina i cui recettori, positivamente accoppiati all'AC, sono espressi nella retina dei roditori (Tsai et al., 1987). Nelle retine WT ed sst2 KO l'attività dell'AC stimolata dall'FSK non è sensibile alla SRIF o all'octreotide, mentre nelle retine sst1 KO sia la SRIF che l'octreotide riducono fortemente l'attività dell'AC stimolata da FSK (-47% e -51%, rispettivamente). La concentrazione dell'FSK e dell'epinefrina, (1 μ M), è stata scelta sulla base di una curva dose-risposta (dati non mostrati). SRIF ed octreotide sono state utilizzate alla concentrazione di 1 μ M in accordo con studi precedenti (Pavan et al., 2004). Le osservazioni nelle retine normali sono in accordo con quanto riportato in precedenza da Pavan et al. (Pavan et al., 2004).

Nelle retine sst2 KO ipossiche l'attività basale dell'AC è significativamente pronunciata rispetto alle retine normali (+65%). Inoltre, la risposta dell'AC all'FSK ed all'epinefrina aumenta significativamente sia nelle retine WT (+26%, +34%, rispettivamente) che in quelle sst2 KO (+90%, +158%, rispettivamente), ma non nelle retine sst1 KO. In maniera del tutto simile al normale, anche nelle retine ipossiche la SRIF e l'octreotide non modificano l'attività dell'AC stimolata dalla FSK sia nelle retine WT che in quelle sst2 KO. In contrasto, nelle retine ipossiche sst1 KO sia la SRIF che l'octreotide fanno diminuire l'attività dell'AC stimolata dalla FSK (-48% e -56%, rispettivamente) ed i valori registrati non differiscono di molto da quelli delle retine normali.

Riassumendo, il trattamento ipossico causa un massiccio aumento dell'attività dell'AC stimolata da FSK o da epinefrina sia nelle retine WT che in quelle sst2 KO. Inoltre, in queste retine l'attività dell'AC stimolata dalla FSK non viene influenzata né dalla SRIF né dall'octreotide. Nelle retine sst1 KO sottoposte ad ipossia l'attività dell'AC stimolata dalla FSK o dall'epinefrina tende a rimanere simile a quella delle retine non trattate e persiste l'inibizione su tale attività esercitata dalla SRIF o dall'octreotide.

Trattamenti	Retine normali			Retine ipossiche		
	WT	sst1 KO	sst2 KO	WT	sst1 KO	sst2 KO
Nessuno	201±12	194±11	159±10*	189±15	198±18	262±19*
FSK	1648±120	1542±122	1477±124	2076±145**	1821±143	2799±184*
FSK + SRIF	1658±102	811±48§	1391±125	1998±115**	952±80§	2694±211*
FSK + OCTR	1690±105	752±46§	1444±123	2114±107**	796±62§	2841±269*
Epinephrine	331±20	336±26	283±23	443±32**	372±25	731±64*

Tabella 5.2. Attività dell'AC misurata sui preparati di membrane da retine di topo di controllo ed ipossiche WT, sst1 KO ed sst2 KO. I dati sono espressi come pmol cAMP/mg proteine/10 min e come la media±SEM. * $p < 0.05$ vs rispettive retine WT (ANOVA, post test Dunnett); § $p < 0.01$ vs FSK (ANOVA, post test Dunnett); ** $p < 0.05$ vs WT retine normali (unpaired t-test).

5.2.2 Espressione dell'mRNA per le varie isoforme dell'AC

Un'accurata indagine è stata effettuata col fine di valutare eventuali cambiamenti nell'attività dell'AC nelle differenti condizioni sperimentali sopra descritte. A questo scopo è stata effettuato uno studio in Real Time PCR determinando il livello di espressione dell'mRNA delle varie isoforme di AC (AC I-IX) in retine normali ed ipossiche WT, sst1 KO ed sst2 KO. Inizialmente è stata valutata l'espressione delle varie isoforme di AC in retine di topo normali a PND 17 ed i risultati hanno mostrato che in queste retine sono presenti i trascritti di tutte le isoforme (Fig. 5.1). Successivamente sono stati valutati i livelli dei trascritti di ciascuna isoforma in condizioni normali ed ipossiche normalizzando rispetto alla ciclofilina B (Fig. 5.2). In retine normali i dati ottenuti hanno mostrato che nelle retine sst1 KO i livelli di espressione delle varie isoforme di AC sono sostanzialmente identici a quelli delle retine WT (Fig. 5.2A). Nelle retine sst2 KO invece, si osserva una significativa riduzione dei livelli di mRNA relativi ad alcune specifiche isoforme di AC. In particolare le isoforme AC II, III, VI e IX mostrano una riduzione rispettivamente del 29%, 37%, 43%, 40%.

L'analisi condotta sulle retine ipossiche (Fig 5.2B) mostra invece un pattern d'espressione significativamente diverso delle varie isoforme di AC. In particolare, nelle retine WT l'espressione dell'mRNA per l'AC II, III e V diminuisce rispettivamente del 25%, 27% e 28%, mentre l'espressione dell'mRNA per l'AC VII aumenta addirittura del 103% rispetto alle retine normali. Le retine sst1 KO in condizioni ipossiche mostrano una significativa diminuzione dei livelli di mRNA per l'AC III e IX, rispettivamente del 30% e del 27%. Inoltre, in queste retine i livelli di mRNA per l'AC VII ed VIII aumentano rispettivamente del 41% e del 38%. Le retine sst2 KO mostrano una diminuzione dell'espressione dell'mRNA per l'AC V del 24% mentre un significativo incremento si osserva riguardo alle isoforme AC I, VI, VII ed VIII rispettivamente del 41%, 48%, 169%, e 34%.

Questi risultati mostrano che il trattamento ipossico induce un significativo cambiamento nell'espressione delle varie isoforme di AC nelle tre diverse tipologie di retina (WT, sst1 KO ed sst2 KO). La variazione maggiormente evidente si osserva a carico dell'isoforma VII dell'AC, la cui espressione aumenta notevolmente in tutti e tre i tipi di retina. In particolare nelle retine sst1 KO l'incremento del livello di espressione dell'mRNA relativo all'AC VII risulta più moderato rispetto alle retine WT mentre nelle retine sst2 KO esso risulta assai più consistente.

5.2.3 *Immunoistochimica*

Come mostrato dai risultati della Real Time PCR, l'isoforma VII dell'AC appare la più sensibile al trattamento ipossico. Questa isoforma nella retina di mammifero non è stata mai precedentemente descritta. Quindi, è stata effettuata un'indagine mediante immunoistochimica per descrivere il suo pattern d'espressione su sezioni retiniche di topo e per supportare quanto osservato mediante Real Time PCR. Sebbene l'immunoistochimica non sia un metodo quantitativo, esso risulta utile per verificare se le alterazioni dovute all'ipossia siano visibili anche mediante marcatura direttamente sul tessuto retinico. Il pattern di espressione immunoistochimico dell'AC VII nelle retine normali WT (Fig. 5.3A) appare caratterizzato da una marcatura punteggiata confinata nel segmento esterno dei fotorecettori (POS), nell'OPL, nell'IPL e nel GCL. Un pattern simile può essere osservato anche in retine normali sst1 KO ed sst2 KO. Le retine ipossiche invece, non mostrano alcune differenze rispetto alle retine normali (Fig. 5.3B-D). In particolare, nelle WT si può osservare un lieve ma evidente incremento dell'intensità della immunofluorescenza, soprattutto nell'OPL (Fig.

5.3B). Le retine sst1 KO ipossiche non mostrano differenze rilevabili rispetto a quelle normali (Fig. 5.3C). Infine, le retine sst2 KO mostrano un consistente aumento nell'intensità di marcatura relativa all'AC VII in tutti gli strati retinici che contengono AC (Fig. 5.3D). I risultati ottenuti mediante immunoistochimica confermano il panorama osservato mediante Real Time PCR.

5.3 Discussione

Nel lavoro sperimentale sopra descritto è stata mostrata la correlazione esistente tra condizione ipossica, livelli di espressione dei recettori sst2 della SRIF ed alterazioni del sistema AC/cAMP. Tale correlazione indica che questo sistema di trasduzione è coinvolto nell'azione anti-angiogenica della SRIF mediata dai suoi recettori sst2. Inoltre, i dati ottenuti confermano ed espandono studi precedenti in cui è stato osservato che la SRIF può modulare il sistema AC/cAMP nella retina di topo (Pavan et al., 2004). I risultati del lavoro sopra descritto ribadiscono l'utilità dei modelli transgenici utilizzati, infatti essi consentono di studiare meglio il ruolo dei recettori della SRIF come mediatori delle azioni della SRIF stessa. In questo studio è stata inoltre valutata l'attività dell'AC in risposta al trattamento con SRIF o con octreotide. A questo scopo l'attività dell'AC è stata stimolata con FSK. Infatti, come è stato precedentemente riportato nella retina ed in altri tessuti (Colas et al., 1992; Pavan et al., 2004; Masmoudi et al., 2005), l'effetto della SRIF sull'attività dell'AC diviene molto evidente quando tale attività viene stimolata da sostanze come la FSK.

5.3.1 La SRIF ed il sistema AC/cAMP in retine normali

I dati relativi all'attività dell'AC in retine normali sono in linea con quanto osservato in studi precedenti (Pavan et al., 2004). L'attività basale dell'AC è simile nelle retine WT ed sst1 KO, mentre una riduzione si può osservare nelle retine sst2 KO. La sensibilità dell'AC a sostanze con attività stimolatoria come l'FSK o l'epinefrina è simile in tutti e tre i tipi di retine utilizzate (WT, sst1 KO, sst2 KO), sebbene l'inibizione dell'AC da parte della SRIF o dell'octreotide sia stata osservata solamente nelle retine sst1 KO. Questo effetto è dovuto probabilmente al migliore accoppiamento tra i recettori sst2 e la subunità G α_o , dovuto alla maggiore espressione dei recettori sst2 e delle proteine G nelle retine sst1 KO (Dal Monte et al., 2003b; Pavan et al., 2004). I risultati dello studio da noi effettuato mostrano la presenza

degli mRNA di tutte e nove le isoforme di AC in differenti tipi di retina di topo, anche quello dell'isoforma AC VII che non è stata mai precedentemente osservata nella retina di mammifero (Beitz et al., 1998; Abdel-Majid et al., 2002). Probabilmente l'isoforma AC VII non è stata mai osservata in studi precedenti a causa del diverso modello sperimentale o del diverso protocollo sperimentale utilizzato.

Il livello di espressione dell'mRNA per l'AC non è sostanzialmente diverso nelle retine sst1 KO rispetto a quelle WT, mentre una riduzione di espressione dell'mRNA relativo a numerose isoforme di AC è evidente in retine sst2 KO. Queste osservazioni indicano che il pattern di espressione delle isoforme dell'AC è fortemente influenzato dalla mancata presenza dei recettori sst2 ma non da quella dei recettori sst1 (in assenza dei quali i recettori sst2 vengono sovra-espressi). Questa evidenza non è di facile interpretazione, tuttavia studi precedenti mostrano un'incremento dell'espressione delle proteine G α o nelle retine di topo con delezione del recettore sst1. Inoltre, un'alterata funzionalità dei recettori accoppiati a proteine G α i/o, sst inclusi, può influenzare l'espressione di vari componenti del sistema di trasduzione della via dell'AC, subunità catalitiche incluse (Watts and Neve 2005). La diminuzione di alcune isoforme di AC nelle retine sst2 KO può spiegare la diminuzione dell'attività basale di questo enzima rispetto alle retine WT.

5.3.2 La SRIF ed il sistema AC/cAMP in retine ipossiche

La condizione ipossica, sia in retine WT che in retine sst2 KO, sembra aumentare la risposta dell'AC nei confronti della FSK e dell'epinefrina. In particolare, nelle retine sst2 KO tale aumento dell'attività dell'AC è sensibilmente più elevato che nelle retine WT. Nelle retine sst1 KO invece, l'ipossia non induce nessun particolare effetto sull'attività dell'AC. Tuttavia, mentre il trattamento con SRIF o con octreotide non produce effetti rilevanti in retine WT o sst2 KO, nelle retine sst1 KO tale trattamento fa diminuire l'attività dell'AC fino a livelli simili a quelli osservati in retine sst1 KO normali. Queste osservazioni indicano che la sovra-espressione dei recettori sst2 (presente nelle retine sst1 KO) argina gli effetti che l'ipossia produce sull'attività dell'AC, mentre l'assenza di questi recettori amplifica tali effetti. L'analisi dell'espressione dell'mRNA relativo alle varie isoforme di AC nelle retine ipossiche WT mostra una diminuzione dell'espressione dell'AC II, III e V ma un notevole aumento dell'espressione dell'isoforma VII, rispetto alle retine WT normali. D'altra parte, l'alterazione nell'espressione delle varie isoforme di AC in risposta alla mancanza di ossigeno

è stata osservata in vari tipi di tessuto (Zhao et al., 2002; Takeo et al., 2003). Nelle retine sst1 o sst2 KO, la combinazione della condizione ipossica e l'espressione del recettore sst2 produce una condizione caratteristica. Infatti, l'espressione dell'mRNA relativo all'AC VII, aumenta in tutti e tre i tipi di retine ma, rispetto al WT, in maniera molto contenuta nelle retine sst1 KO ed in misura molto consistente nelle retine sst2 KO. L'indagine condotta in immunoistochimica conferma queste osservazioni. L'alterazione che si osserva nelle retine sst1 o sst2 KO in condizioni ipossiche non trova facilmente spiegazione. In ogni caso è da escludere una ulteriore alterazione dei recettori sst2 dato che è stato già dimostrato che l'ipossia non altera di per se l'espressione di questi recettori (Dal Monte et al., 2007). L'isoforma VII dell'AC risulta essere altamente sensibile agli agenti stimolanti, mentre risulta totalmente insensibile a tutti gli agenti inibenti conosciuti, proteine G α i/o incluse (Cooper and Crossthwaite, 2006). Quindi, l'aumento della sua espressione potrebbe essere la causa dell'aumento della risposta dell'AC agli agenti stimolatori osservata in vitro. Questo aspetto è confermato dal fatto che il profilo dell'attività dell'AC indotta da stimolazione e l'aumento di espressione dell'isoforma AC VII segue lo stesso andamento nei tre tipi di retine. Inoltre, l'AC VII in condizioni di ipossia potrebbe svolgere un ruolo di rilievo nel determinare l'aumento del cAMP, infatti è stato documentato che l'ipossia causa l'aumento del rilascio di fattori stimolatori dell'AC, ad esempio catecolammine, l'adenosina e dei loro recettori (Palmer et al., 1985; Rocha-Singh et al., 1991; Kuroko et al., 2007). L'incremento di questo nucleotide durante l'ipossia potrebbe essere uno degli eventi che induce la neoangiogenesi e l'aumento di espressione dei fattori proangiogenici come ad esempio il VEGF. La variazione dell'espressione del VEGF è stata recentemente osservata sia nelle retine WT che in quelle sst1 ed sst2 KO. In particolare, in condizioni ipossiche in confronto al WT, sia la neoangiogenesi che l'espressione del VEGF aumentano nelle retine sst2 KO mentre nelle retine sst1 KO l'espressione del VEGF diminuisce (Dal Monte et al., 2007). Queste osservazioni indicano che l'aumento della funzionalità del sistema somatostatinergico, grazie all'aumento della funzionalità e della quantità dei recettori sst2, conferisce protezione nei confronti della produzione del cAMP proangiogenico, mentre l'assenza dei recettori sst2 produce l'effetto opposto.

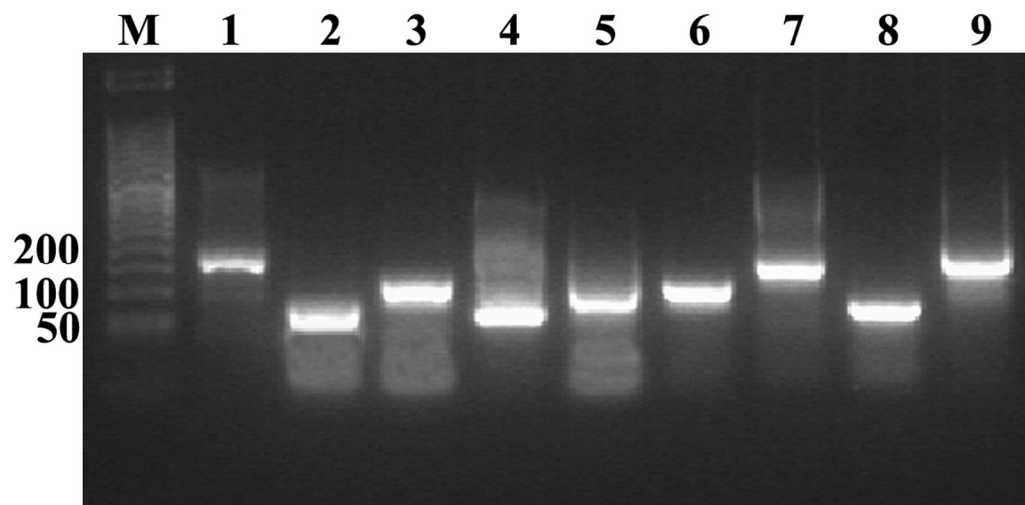


Figura 5.1 Espressione dell'mRNA relativo alle diverse isoforme di AC in retine WT normali a PND 17 valutata mediante Real Time PCR. M: DNA marker 50 bp. 1-9: isoforme di AC I-IX. Per abbreviazioni vedi "Tabella delle abbreviazioni".

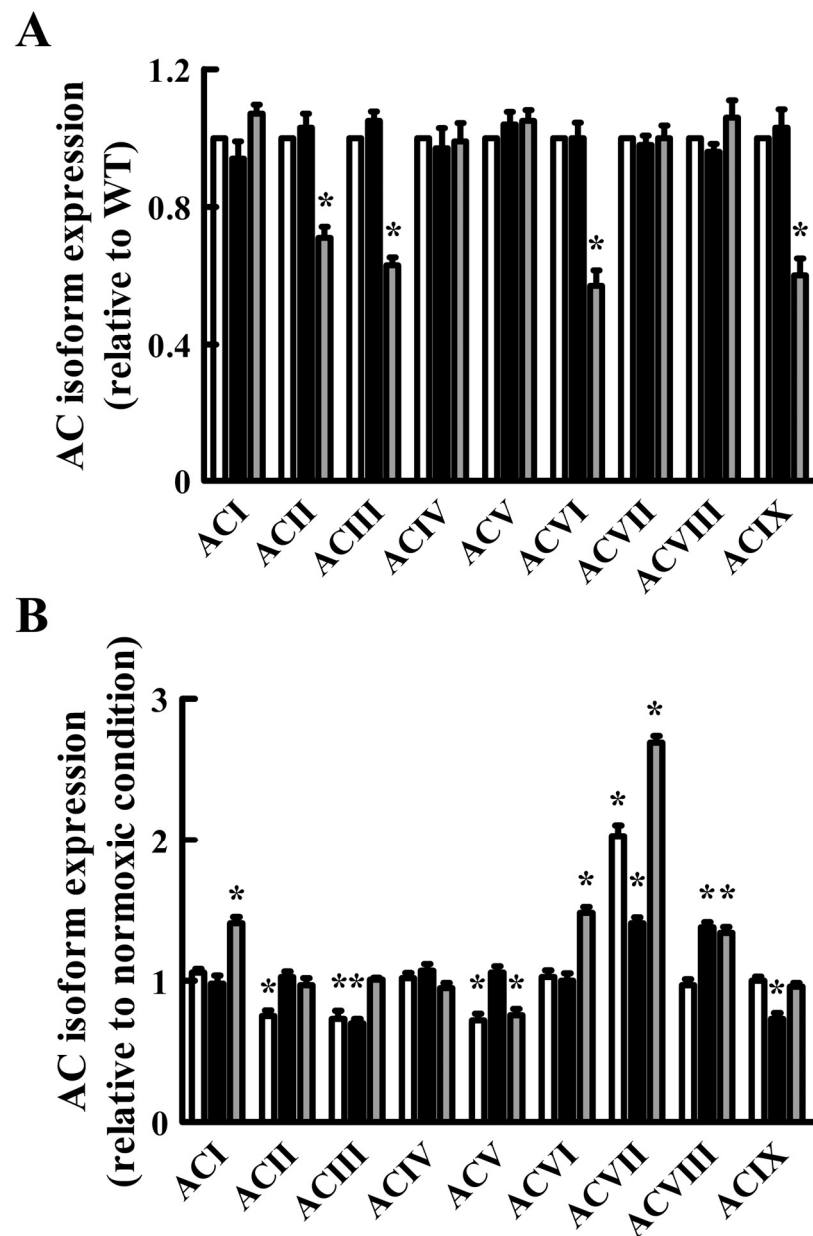


Figura 5.2 Real Time PCR: espressione dell'mRNA relativo alle varie isoforme di AC in retine di topo WT (istogrammi bianchi), sst1 KO (istogrammi neri) ed sst2 KO (istogrammi grigi), normalizzate rispetto alla ciclofilina B. (A) Espressione delle varie isoforme di AC in condizioni normali. I dati sono espressi come la media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs WT (ANOVA, post test di Dunnett). (B) Espressione delle varie isoforme di AC in condizioni ipossiche. * $p < 0,05$ vs rispettiva condizione normale (unpaired t test). Per abbreviazioni vedi "Tabella delle abbreviazioni".

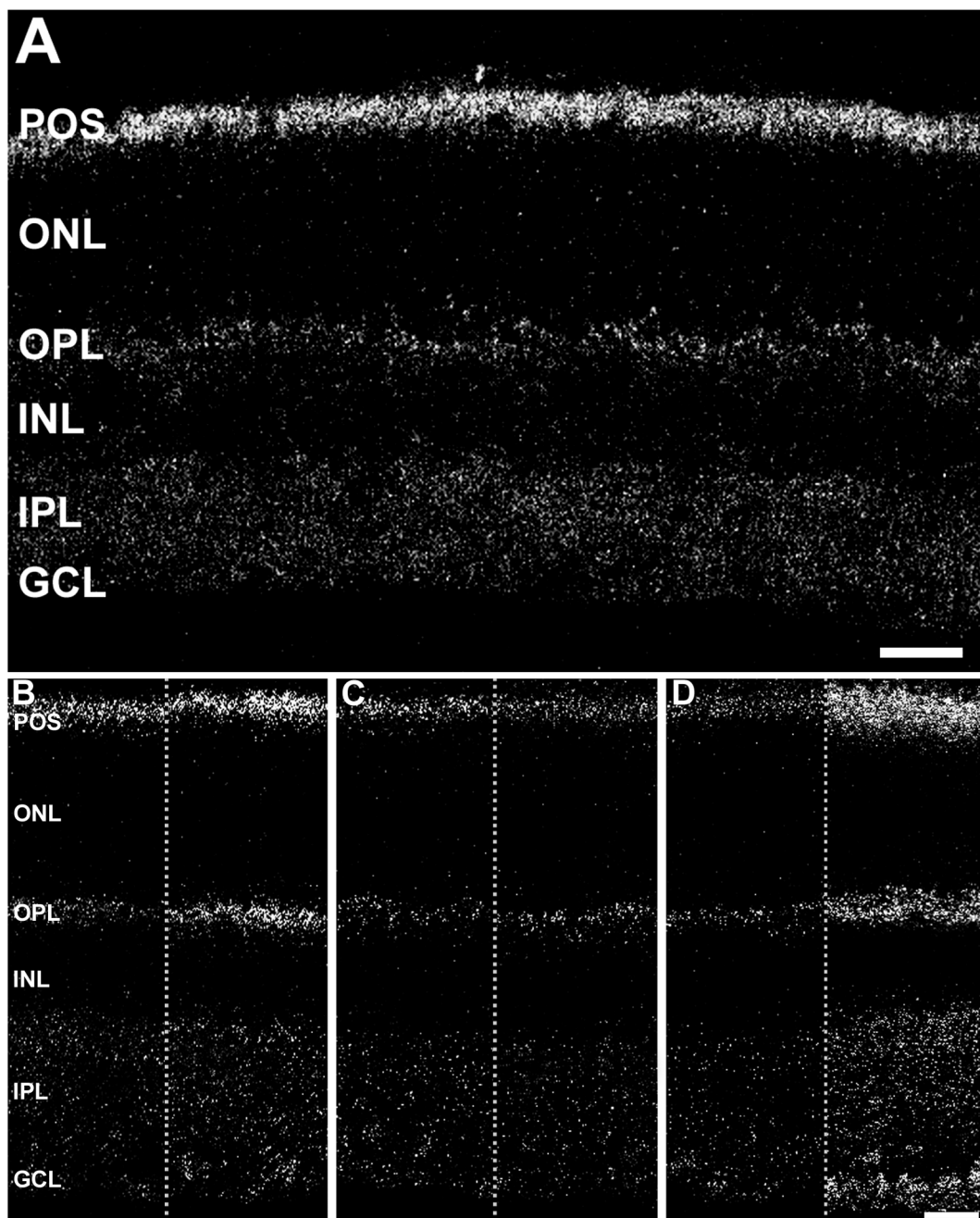


Figura 5.3 (A) Pattern d'espressione dell'AC VII in retine di topo WT, normali. Marcatura di tipo puntiforme è densamente distribuita nel POS, nel'IPL e nel GCL. (B)-(D): Pattern d'espressione dell'AC VII in retine WT (B), sst1 KO (C) ed sst2 KO (D) in condizioni normali (sinistra in ciascun pannello) o ipossiche (destra in ciascun pannello). Un incremento nell'intensità della marcatura può essere apprezzato successivamente al trattamento ipossico in retine WT, nessun cambiamento è visibile nelle retine sst1 KO, un evidente incremento è visibile nelle retine sst2 KO. Le immagini in figura sono state ottenute da singole sezioni ottiche acquisite al microscopio confocale. Per abbreviazioni vedi "Tabella delle abbreviazioni". Barra di calibrazione: 20 μ m.

CONCLUSIONI

I numerosi studi condotti riguardo alle azioni fisiologiche della SRIF indicano che questo peptide esercita importanti azioni fisiologiche, la maggior parte di tipo inibitorio. La SRIF legandosi a recettori accoppiati a proteine G agisce modulando numerose vie di trasduzione. Sebbene ad oggi questa funzione modulatoria risulti ancora poco chiara, queste evidenze rappresentano le basi sulle quali si fonda l'idea dell'uso farmacologico della SRIF o di molecole ad essa analoghe nella cura di patologie che colpiscono la retina. Infatti, la complessità del sistema somatostatinergico fa sperare di poter compiere passi avanti non solo nella comprensione della circuiteria in cui è coinvolta la SRIF ma anche nell'individuazione di nuove molecole utilizzabili come farmaci per la cura di patologie del sistema nervoso centrale.

In quest'ottica, il lavoro sperimentale di questa tesi ha avuto come tema principale lo studio della fisiologia della retina nella sua condizione normale e nella patologia ischemica. Lo scopo generale di questo progetto di ricerca è stato quello di fornire informazioni riguardo a particolari circuiti retinici che coinvolgono neuropeptidi e fattori di crescita nella retina, tramite studi di tipo morfologico e funzionale. In particolare, le nostre indagini sono state rivolte allo studio dell'azione neuroprotettiva che la SRIF esercita sulla retina colpita da ischemia, una condizione patologica comune a molte malattie retiniche. Infine, con lo scopo di fornire informazioni riguardo al sistema somatostatinergico nella retina, in relazione al ruolo protettivo che esso esercita, sono state effettuate varie indagini riguardo alla via di trasduzione del segnale ad esso accoppiato.

In questa tesi è stata descritta la messa a punto di un nuovo modello di ischemia retinica nel topo. Questo modello è stato utilizzato per studi su retine di animali transgenici. I risultati hanno mostrato che la sovra-espressione e la maggiore funzionalità dei recettori sst2, condizione presente nelle retine sst1 KO protegge la retina nei confronti del danno ischemico. Questi dati sostengono l'idea che analoghi della SRIF, agendo sui recettori sst2, potrebbero essere utilizzati come validi agenti terapeutici in malattie degenerative della retina come ad esempio il glaucoma o la retinopatia diabetica. In base a queste osservazioni si può supporre che la morte neuronale in retine sst1 KO sottoposte ad ischemia possa risultare ritardata grazie all'inibizione del rilascio in eccesso di glutammato mediata dai recettori sst2. Inoltre, i recettori sst2 possono agire come mediatori dell'azione protettiva che la SRIF esercita su quei

neuroni che esprimono quegli stessi recettori. Ciò suggerisce che il meccanismo di protezione mediato dai recettori sst2 è altamente complesso. Quindi sono stati effettuati studi sul sistema di trasduzione del segnale accoppiato ai recettori della SRIF anche in relazione a trattamenti farmacologici. Questi trattamenti includono l'utilizzo di SRIF-14 ed un suo analogo la pasireotide, di octreotide che è un agonista specifico del recettore sst2 e di cianamide che è un antagonista specifico dei recettori sst2. I risultati hanno mostrato che come ci si aspettava l'utilizzo di SRIF, pasireotide o octreotide in retine WT riduce il danno ischemico, mentre l'utilizzo di cianamide lo peggiora. Questo risultato conferma che la SRIF esercita un effetto protettivo nei confronti dell'ischemia mediato dai recettori sst2. Nelle retine sst1 KO invece è stato osservato un inaspettato peggioramento della condizione ischemica in seguito a tutti i trattamenti farmacologici. Probabilmente questo risultato è dovuto al fatto che i recettori sst2 vengono bloccati dai farmaci da noi utilizzati. Inoltre, tra le molecole da noi indagate in condizioni ischemiche nella retina di topo, le proteine RGS1 sembrano quelle che più di tutte potrebbero agire come modulatori dei recettori sst2.

Infine è stata studiata la via di trasduzione AC/cAMP in un modello in vivo di ipossia utilizzando retine di topo WT, sst1 KO ed sst2 KO. In risposta alla condizione ipossica sono stati osservati cambiamenti nell'espressione e nell'attività dell'AC correlati a differenti livelli di espressione dei recettori sst2. Infatti, il livello di attività dell'AC e l'espressione delle sue varie isoforme risultano diversi a seconda che si considerino retine WT, sst1 KO o sst2 KO. Questi dati sostengono l'ipotesi che il sistema AC/cAMP sia coinvolto nella mediazione della neoangiogenesi retinica indotta dall'ipossia. Inoltre, supportano l'idea che la SRIF eserciti un'azione protettiva nei confronti della neoangiogenesi retinica. In particolare, l'isoforma VII dell'AC sembra essere quella maggiormente coinvolta in queste complesse funzioni. I meccanismi alla base delle azioni anti angiogeniche esercitate dalla SRIF non sono del tutto chiari, tuttavia, il recettore sst2 sembra essere il principale mediatore di tali effetti. Alcuni studi indicano che questo peptide possa agire sia in modo diretto sulla proliferazione endoteliale, sia in modo indiretto attraverso la riduzione del rilascio di fattori pro-angiogenici.

Note

L'attività di ricerca sperimentale da me svolta durante il triennio di dottorato ha prodotto le seguenti pubblicazioni su riviste internazionali:

Casini G, **Catalani E**, Dal Monte M and Bagnoli P (2005). Functional aspects of the somatostatinergic system in the retina and the potential role of somatostatin in retinal disease. *Histol Histopathol* 20: 615-632

Catalani E, Dal Monte M, Gangitano C, Lucattelli M, Fineschi S, Bosco L, Bagnoli P and Casini G (2006). Expression of Substance P, Neurokinin 1 receptors (NK1) and Neurokinin 3 receptors in the developing mouse retina and in the retina of NK1 knock out mice. *Neuroscience* 138: 487–499

Armani C, **Catalani E**, Balbarini A, Bagnoli P and Cervia D (2007). Expression, pharmacology and functional role of somatostatin receptor subtypes 1 and 2 in human macrophages. *J Leukoc Biol* 81:845-855

Catalani E, Cervia D, Martini D, Bagnoli P, Simonetti E, Timperio AM, Casini G (2007). Changes in neuronal response to ischemia in retinas with genetic alterations of somatostatin receptor expression. *Eur J Neurosci* 25:1447-1459

Tomassini S, Cuoghi V, **Catalani E**, Casini G, Bigiani A (2007). Long-term effects of nicotine on rat fungiform taste buds. *Neuroscience* 147: 803–810

Ristori C, Ferretti ME, Pavan B, Cervellati F, Casini G, **Catalani E**, Dal Monte M, Biondi C (2007). Adenylyl cyclase/cAMP system involvement in the antiangiogenic effect of somatostatin in the retina. Results from transgenic mice. *Neurochem Res*, in press.

Catalani E, Dal Monte M, Bagnoli P and Casini G (2007). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, submitted.

Partecipazioni a congressi nazionali ed internazionali durante il triennio di dottorato:

Catalani E, Martini D, Cervia D, Papeschi C, Bagnoli P, Casini G (2006). Somatostatin receptor gene deletion differentially affects neuronal death and survival in a retina model of in vitro ischemia. Soc. Neurosci. Abst (2006-A-138060-SFN)

Catalani E, Martini D, Cervia D, Bagnoli P, Casini G (2007). Retinal ischemia and the somatostatinergic system: responses to ischemia in pharmacologically treated transgenic mouse models. Soc. Italiana di Fisiologia. Acta Physiologica 191:109-110. P124, Abst.

Ristori C, Ferretti ME, Pavan B, Cervellati F, Casini G, **Catalani E**, Dal Monte M, Biondi C (2007). Adenyl cyclase/cAMP system involvement in the antiangiogenic effect of somatostatin in the retina. Soc. Italiana di Fisiologia. Acta Physiologica 191:16. OC 10, Abst.

Catalani E, Dal Monte M, Papeschi C, Bagnoli P, Casini G (2007). Vascular endothelial growth factor and its receptors in the retina. Soc. Neurosci. Abst . Program No. 759.14.

Bibliografia

- Abdel-Majid R.M., Tremblay F., Baldrige W.H., 2002. Localization of adenylyl cyclase proteins in the rodent retina. *Brain Res Mol Brain Res* 101:62-70.
- Abu El-Asrar A.M., Desmet S., Meersschaert A., Dralands L., Missotten L., Geboes K., 2001. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the retinas of human subjects with diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 132:551-6.
- Adamis A.P., Miller J.W., Bernal M.T., D'Amico D.J., Folkman J., Yeo T.K., Yeo K.T., 1994. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118:445-50.
- Afford S. and Randhawa S., 2000. Demystified apoptosis. *J Clin Pathol* 53:55-63.
- Agardh C.D., Gustavsson C., Hagert P., Nilsson M. and Agardh E., 2006. Expression of antioxidant enzymes in rat retinal ischemia followed by reperfusion. *Metabolism* 55:892–898.
- Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg P.G., Keyt B.A., Jampel H.D, Shah S.T., Pasquale L.R., Thieme H., Iwamoto M.A., Park J.E., 1994. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331:1480–1487.
- Aiello L.P., Pierce E.A., Foley E.D., Takagi H., Chen H., Riddle L., Ferrara N., King G.L., Smith L.E., 1995. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10457–10461.
- Al-Hakim A., Rui X., Tsao J., Albert P.R., Schimmer B.P., 2004. Forskolin-resistant Y1 adrenal cell mutants are deficient in adenylyl cyclase type 4. *Mol Cell Endocrinol* 214:155-165.
- Allen J., Hathway G., Clarke N., Jowett M., Topps S., Kendrick K., Humphrey P., Wilkinson L. and Empson P., 2003. Somatostatin receptor 2 knock-out/lacZ knock-in mice show impaired motor coordination and reveal sites of somatostatin action within the striatum. *European Journal of Neuroscience* 17:1881–1895.
- Alon T., Hemo I., Itin A., Pe'er J., Stone J., Keshet E., 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med* 1:1024-1028.

- Amano H., Ando K., Minamida S. Hayashi I, Ogino M, Yamashina S, Yoshimura H, Majima M., 2001. Adenylate cyclase/protein kinase A signaling pathway enhances angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in vivo. *Jpn J Pharmacol* 87:181-188
- Amano S., Rohan R., Kuroki M., Tolentino M., Adamis A.P., 1998. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:18-22.
- Ameisen J.C., 2002. On the origin, evolution and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 126:255-262.
- Armani C., Catalani E., Balbarini A., Bagnoli P., Cervia D., 2007. Expression, pharmacology, and functional role of somatostatin receptor subtypes 1 and 2 in human macrophages. *J Leukoc Biol* 81:845-855.
- Arundine M. and Tymianski M., 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325-37.
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M., 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964–967.
- Ashton N., Ward B., Serpell G. 1953. Role of oxygen in the genesis of retrolental fibroplasia: preliminary report. *Br J Ophthalmol* 37:513–520.
- Bagnoli P., Dal Monte M., Casini G., 2003. Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals. *Histol Histopathol* 18:1219-1242.
- Balasubramanian N., Levay K., Keren-Raifman T., Faurobert E., Slepak V.Z., 2001. Phosphorylation of the regulator of G protein signaling RGS9-1 by protein kinase A is a potential mechanism of light- and Ca²⁺- mediated regulation of G protein function in photoreceptors. *Biochemistry (Mosc)* 40:12619–27.
- Baldysiak-Figiel A., Lang G.K., Kampmeier J., Lang G.E., 2004. Octreotide prevents growth factor-induced proliferation of bovine retinal endothelial cells under hypoxia. *J Endocrinol* 180:417-424.
- Banerjee A., Roach M.C., Wall K.A., Lopata M.A., Cleveland D.W. and Luduena R.F., 1988. A monoclonal antibody against the type II isotype of beta-tubulin. Preparation of isotypically altered tubulin. *J Biol Chem* 263:3029-3034.

- Bano D. and Nicotera P., 2007. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* 38:674-6.
- Barber A.J., 2003. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27:283–290.
- Batista D.L., Zhang X., Gejman R., Ansell P.J., Zhou Y., Johnson S.A., Swearingen B., Hedley-Whyte E.T., Stratakis C.A., Klibanski A., 2006. The effects of SOM230 on cell proliferation and adrenocorticotropin secretion in human corticotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4482-4488.
- Bauer W., Briner U., Doepfner W., Haller R., Huguenin R., Marbach P., Petcher T.J., Pless, 1982. SMS 201-995: a very potent and selective analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 31:1134–1140.
- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620–1624.
- Beckman J.S., Koppenol W.H., 1996a. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271:C1424–C1437.
- Beckman J.S., 1996b. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 9:836–844.
- Beitz E., Volkel H., Guo Y., Schultz J.E., 1998. Adenylyl cyclase type 7 is the predominant isoform in the bovine retinal pigment epithelium. *Acta Anat* 162:157-162.
- Benchoua A., Guegan C., Couriaud C., 2001. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 21:7127–7134.
- Benjamin L.E. and Keshet E., 1997. Conditional switching of vascular endothelial growth factor VEGF expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8761-8766
- Bennett M.R., 2002. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart* 87:480–487.
- Bigiani A., Petrucci C., Ghiaroni V., Dal Monte M., Cozzi A., Kreienkamp H.J., Richter D., Bagnoli P., 2004. Functional correlates of somatostatin receptor 2 overexpression in the retina of mice with genetic deletion of somatostatin receptor 1. *Brain Res* 1025:177-185.
- Blake A.D., Badway A.C. and Strowski M.Z., 2004. Delineating somatostatin's neuronal actions. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:153-160.

- Block F. and Schwarz M., 1997. Effects of antioxidants on ischemic retinal dysfunction. *Exp Eye Res* 64:559–564.
- Boehm B.O., 2007. Use of long-acting somatostatin analogue treatment in diabetic retinopathy. *Dev Ophthalmol* 39:111-121.
- Bonne C., Muller A., Villain M., 1998. Free radicals in retinal ischemia. *Gen Pharmacol* 30: 275–280.
- Boris-Moller F. and Wieloch T., 1998. Changes in the extracellular levels of glutamate and aspartate during ischemia and hypoglycemia. Effects of hypothermia. *Exp Brain Res* 121:277–284.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brecha N.C., 2003. Peptide and peptide receptor expression and function in the vertebrate retina. In Chalupa, L.M., Werner, J.S. (eds.) *The visual neurosciences*. The MIT Press, Cambridge (MA), pp. 334-354.
- Brown B.L., Ekins R.P., Albano J.D., 1972. Saturation assay for cyclic AMP using endogenous binding protein. *Adv. Cyclic. Nucleotide Res* 2:25-40.
- Bruns C., Lewis I., Briner U., Meno-Tetang G., Weckbecker G., 2002. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol* 146:707-716.
- Buko V.U., Artsukevich A.A., Ignatenko K.V., 1999. Aldehydic products of lipid peroxidation inactivate cytochrome P-450. *Exp Toxicol Pathol* 51:294–298.
- Bull N.D. and Barnett N.L., 2004. Retinal glutamate transporter activity persists under simulated ischemic conditions. *J Neurosci Res* 78:590-599.
- Camacho A. and Massieu L., 2006. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37:11-18.
- Campochiaro P.A., 2000. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 184:301-310.
- Casibang M., Purdom S., Jakowlew S., Neckers L., Zia F., Ben-Av P., Hla T., You L., Jablons D.M., Moody T.W., 2001. Prostaglandin E2 and vasoactive intestinal peptide increase

- vascular endothelial cell growth factor mRNAs in lung cancer cells. *Lung Cancer* 31:203-212.
- Casini G., Catalani E., Dal Monte M., Bagnoli P., 2005. Functional aspects of the somatostatinergic system in the retina and the potential therapeutic role of somatostatin in retinal disease. *Histol Histopathol* 20:615-632.
- Casini G., Dal Monte M., Petrucci C., Gambellini G., Grouselle D., Allen J.P., Kreienkamp H.J., Richter D., Epelbaum J., Bagnoli P., 2004. Altered morphology of rod bipolar cell axonal terminals in the retinas of mice carrying genetic deletion of somatostatin subtype receptor 1 or 2. *Eur J Neurosci* 19:43-54.
- Casini G., Rickman D.W. and Brecha N.C., 2006. Expression of the gamma-aminobutyric acid (GABA) plasma membrane transporter-1 in monkey and human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1682-1690.
- Casson R.J., Chidlow G., Wood J.P.M., Osborne N.N., 2004. The effect of hyperglycemia on experimental retinal ischemia. *Arch Ophthalmol* 122:361-6.
- Catherine G., Ruben M., Afshin S., 2002. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease: a novel therapeutic target? *FASEB* 16:135–146.
- Celebi S., Dilsiz N., Yilmaz T., Kukner A.S., 2002. Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia–reperfusion in the guinea pig retina. *Eur J Ophthalmol* 12:77–83.
- Celiker U. and Ilhan N., 2002. Nitric oxide and octreotide in retinal ischemia-reperfusion injury. *Doc Ophthalmol* 105:327-338.
- Cervia D., Langenegger D., Schuepbach E., Cammalleri M., Schoeffter P., Schmid H.A Bagnoli P., Hoyer D., 2005a. Binding and functional properties of the novel somatostatin analogue KE 108 at native mouse somatostatin receptors. *Neuropharmacology* 48:881-893.
- Cervia D, Nunn C, Bagnoli P, 2005b. Multiple signalling transduction mechanisms differentially coupled to somatostatin receptor subtypes: a current view. *Curr Enzyme Inhibition* 1:265-279.
- Chen Q., Olney J.W., Lukasiewicz P.D., Almlı T., Romano C., 1998. Ca²⁺-independent excitotoxic neurodegeneration in isolated retina, an intact neural net: a role for Cl⁻ and inhibitory transmitters. *Mol Pharmacol* 53:564–572.

- Chen S. and Diamond J.S., 2002. Synaptically released glutamate activates extrasynaptic NMDA receptors on cells in the ganglion cell layer of rat retina. *J Neurosci* 22:2165–2173.
- Cheng H., Yibchok-anun S., Coy D. H. and Hsu W. H., 2002. SSTR2 mediates the somatostatin-induced increase in intracellular Ca²⁺ concentration and insulin secretion in the presence of arginine vasopressin in clonal β -cell HIT-T15. *Life Sci* 71:927–936.
- Cheon E.W., Park C.H., Kang S.S., Cho G.J., Yoo J.M., Song J.K., Choi W.S., 2003. Change in endothelial nitric oxide synthase in the rat retina following transient ischemia. *Neuroreport* 14:329–333.
- Chidlow G., Schmidt K.G., Wood J.P., Melena J., Osborne N.N., 2002. Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemiareperfusion. *Neuropharmacology* 43:1015–1025.
- Choi D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369–379.
- Choi D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623–634.
- Choi D.W., 1992. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261–1276.
- Choi D.W., 1996. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:667-672.
- Colas B., Valencia A.M., Prieto J.C., Arilla E., 1992. Somatostatin binding and modulation of adenylate cyclase in ovine retina membranes. *Mol Cell Endocrinol* 88:111-117.
- Conway E.M., Collen D., Carmeliet P., 2001. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovas Res* 49:507–521.
- Cooper D.M. and Crossthwaite A.J., 2006. Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends Pharmacol Sci* 27:426-431.
- Coy D. H., Coy E. J., Arimura A. and Schally A. V., 1973. Solid phase synthesis of growth hormone release inhibiting factor. *Biochem. Biophys Res Commun* 54:1267–1273
- Cristiani R., Fontanesi G., Casini G., Petrucci C., Viollet C. and Bagnoli P., 2000. Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 41:3191-3199.
- Cristiani R., Petrucci C., Dal Monte M. and Bagnoli P., 2002. Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. *Brain Res* 936:1-14.
- Croxen R., Baarsma G.S., Kuijpers R.W., van Hagen P.M., 2004. Somatostatin in diabetic retinopathy. *Pediatr Endocrinol Rev* 1 Suppl 3:518-524.

- Cui Q., Yip H.K., Zhao R.C., So K.F. and Harvey A.R., 2003. Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Mol Cell Neurosci* 22:49-61.
- Dal Monte M., Cammalleri M., Martini D., Casini G., Bagnoli P., 2007. Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: results from transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:3480-9.
- Dal Monte M., Petrucci C., Cozzi A., Allen J.P., Bagnoli P., 2003a. Somatostatin inhibits potassium-evoked glutamate release by activation of the sst (2) somatostatin receptor in the mouse retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367:188-192.
- Dal Monte M., Petrucci C., Vasilaki A., Cervia D., Grouselle D., Epelbaum J., Kreienkamp H.J., Richter D., Hoyer D., Bagnoli P., 2003b. Genetic deletion of somatostatin receptor 1 alters somatostatinergic transmission in the mouse retina. *Neuropharmacology* 45:1080-1092.
- Danesi R., Agen C., Benelli U., Paolo A.D., Nardini D., Bocci G., Basolo F., Campagni A., Tacca M.D., 1997. Inhibition of experimental angiogenesis by the somatostatin analogue octreotide acetate (SMS 201-995). *Clin Cancer Res* 3:265-72.
- Dasgupta P., 2004. Somatostatin analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacol Ther* 102:61-85.
- Daugeliene L., Niwa M., Hara A., Matsuno H., Yamamoto T., Kitazawa Y. and Uematsu T., 2000. Transient ischemic injury in the rat retina caused by thrombotic occlusion-thrombolytic reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2743-2747.
- Davis MI, Wilson SH, Grant MB., 2001. The therapeutic problem of proliferative diabetic retinopathy: targeting somatostatin receptors. *Horm Metab Res* 33:295-299
- de Vries C., Escobedo J.A., Ueno H., Houck K., Ferrara N., Williams L.T., 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255:989-991.
- Dijk F. and Kamphuis W., 2004. An immunocytochemical study on specific amacrine cell subpopulations in the rat retina after ischemia. *Brain Res* 1026:205-217.
- Dijk F., van Leeuwen S. and Kamphuis W., 2004. Differential effects of ischemia/reperfusion on amacrine cell subtype-specific transcript levels in the rat retina. *Brain Res* 1026:194-204.

- Djonov V., Baum O., Burri P.H., 2003. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* 314:107–117.
- Djonov V., Schmid M., Tschanz S.A., Burri P.H., 2000. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res* 86:286–292.
- dos Santos A.A., de Araujo E.G., 2000. The effect of PKC activation on the survival of rat retinal ganglion cells in culture. *Brain Res* 853:338–343.
- Du Y., Bales K.R., Dodel R.C., Hamilton-Byrd E., Horn J.W., Czilli D.L., Simmons L.K., Ni B. and Paul S.M., 1997. Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11657-11662.
- Duchen M.R., 2000. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 529 (Part 1), 57–68.
- Dun N.J., Dun S.L., Wong R.K. and Forstermann U., 1994. Colocalization of nitric oxide synthase and somatostatin immunoreactivity in rat dentate hilar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2955-2959.
- Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M., 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146:1029–1039.
- Eckenstein F. and Thoenen H., 1982. Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. *Embo J* 1:363-368.
- Eimerl S. and Schramm M., 1991. Acute glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells: agonist potency, effects of pH, Zn²⁺ and the potentiation by serum albumin. *Brain Res* 560:282–290.
- el Asrar A.M., Morse P.H., Maimone D., Torczynski E., Reder A.T., 1992. MK-801 protects retinal neurons from hypoxia and the toxicity of glutamate and aspartate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:3463–3468.
- Endo S., Tomita H., Ishiguro S. and Tamai M., 2002. Effect of betaxolol on aspartate aminotransferase activity in hypoxic rat retina in vitro. *Jpn J Pharmacol* 90:121-124.
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81–128.

- Feigenspan A. and Bormann J., 1994. Facilitation of GABAergic signaling in the retina by receptors stimulating adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10893-10897.
- Ferrara N. and Davis-Smyth T., 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:4-25.
- Ferrara N., 2001. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1358–1366.
- Ferrara N., 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25:581-611.
- Ferrara N., Houck K., Jakeman L. and Leung D. W., 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev.* 13:18-32.
- Ferrara N., Houck K.A., Jakeman L.B., Winer J., Leung D.W., 1991. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cellular Biochem* 47:211–218.
- Firth S.I., Boelen M.K. and Morgan I.G., 1998. Enkephalin, neurotensin and somatostatin increase cAMP levels in the chicken retina. *Aust N Z J Ophthalmol* 26:S65-S67.
- Flaherty J.T., Weisfeldt M.L., 1988. Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 5:409–419.
- Fontanesi G., Gargini C., Bagnoli P., 2000. Postnatal development of somatostatin 2A (sst2A) receptors expression in the rabbit retina. *Brain Res Dev Brain Res* 123:67-80.
- Forloni G., Lucca E., Angeretti N., Chiesa R., Vezzani A., 1997. Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDA-induced neuronal death: role of cyclic GMP. *J Neurochem* 68:319-327.
- Forsythe J.A., Jiang B.-H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D., Semenza G., 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16:4604–4613.
- Friedlander R.M., 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *NEJM* 34: 1365–1375.
- Friedlander R.M., Yuan J., 1998. ICE, neuronal apoptosis and neurodegeneration. *Cell Death Differ* 5:823–831.
- Gabriel R., de Souza S., Ziff E.B. and Witkovsky P., 2002. Association of the AMPA receptor-related postsynaptic density proteins GRIP and ABP with subsets of glutamate-sensitive neurons in the rat retina. *J Comp Neurol* 449:129-140.

- Gale N.W., Yancopoulos G.D., 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13:1055–1066.
- Garcia de la Torre N., Wass J.A., Turner H.E., 2002. Antiangiogenic effects of somatostatin analogues. *Clin Endocrinol (Oxf)* 57:425-441.
- Gerber H.-P., Condorelli F., Park J., Ferrara N., 1997. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 272:23659–23667.
- Gerber H.-P., Dixit V., Ferrara N., 1998. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273:13313-13316.
- Geske F.J., Gerschenson L.E., 2001. The biology of apoptosis. *Human Pathol* 32:1029–1038.
- Ghosh K.K., Bujan S., Haverkamp, S., Feigenspan A. and Wassle H., 2004. Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 469:70-82.
- Gilgun Sherki Y., Rosenbaum Z., Melamed E., Offen D., 2002. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* 54:271–284.
- Gillies G., 1997. Somatostatin: the neuroendocrine story. *Trends Pharmacol Sci* 18:87–95.
- Gottesman I. S., Mandarino L. J. and Gerich J. E., 1982. In *Special Topics in Endocrinology and Metabolism* 4:177–243.
- Graham M.E. and Burgoyne R.D., 1995. Effects of calcium channel antagonists on calcium entry and glutamate release from cultured rat cerebellar granule cells. *J Neurochem* 65:2517-2524.
- Grant M.B. and Caballero S., 2002. Somatostatin analogues as drug therapies for retinopathies. *Drugs Today* 38:783-791
- Grant M.B., Mames R.N., Fitzgerald C., Hazariwala K.M., Cooper-DeHoff R., Caballero S., Estes K.S., 2000. The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. *Diabetes Care* 23:504-509.
- Greferath U., Grunert U. and Wassle H., 1990. Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C-like immunoreactivity. *J Comp Neurol* 301:433-442.

- Gupta L.Y., Marmor M.F., 1993. Mannitol, dextromethorphan, and catalase minimize ischemic damage to retinal pigment epithelium and retina. *Arch Ophthalmol* 111:384-388.
- Gur P.K., Amar B.S., Sudhir V.S., 1998. Identification of gene family of caspase in rat kidney and altered expression in ischemia–reperfusion injury. *Am J Physiol, Renal Fluid Electrolyte Physiol* 274:F587–F595.
- Gwon A., Duran D., Thom S.R., Ischiropoulos H., 1996. Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* 333:42–48.
- Haeseleer F., Sokal I., Verlinde C. L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Pronin A. N., Benovic J. L., Fariss R. N. and Palczewski K., 2000. Five members of a novel Ca(2+)-binding protein (CABP) subfamily with similarity to calmodulin. *J Biol Chem* 275:1247-1260.
- Halliwell B., Gutteridge J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186:1–85.
- Hangai M., Miyamoto K., Hiroi K., Tujikawa A., Ogura Y., Honda Y., Yoshimura N., 1999. Roles of constitutive nitric oxide synthase in postischemic rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:450–458.
- Hangai M., Yoshimura N., Hiroi K., Mandai M., Honda Y., 1996. Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury. *Exp Eye Res* 63:501–509.
- Hanneken A., de Juan E.J., Luty G.A., Fox G.M., Schiffer S., Hjelmeland L.M., 1991. Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 109:1005–1011.
- Hannon J. P., Nunn C., Stolz B., Bruns C., Weckbecker G., Lewis I., Troxler T., Hurth K., Hoyer D., 2002. Drug design at peptide receptors: somatostatin receptor ligands. *J Mol Neurosci* 18:15–27.
- Hanoune J. and Defer N., 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:145-174.
- Hara H., Freidlander R.M., Gagliardini V., 1997. Inhibition of interleukin 1 beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2007–2012.

- Hardy P., Dumont I., Bhattacharya M., Hou X., Lachapelle P., Varma D. R., Chemtob S., 2000. Oxidants, nitric oxide and prostanoids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy. *Cardiovascular Research* 47:489–509.
- Haverkamp S. and Wassle H., 2000. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424:1-23.
- He W., Cowan C.W., Wensel T.G., 1998. RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction. *Neuron* 20:95–102.
- Helboe L. and Moller M., 1999. Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2376-2382.
- Hernandez C., Carrasco E., Casamitjana R., Deulofeu R., Garcia-Arumi J., Simo R., 2005. Somatostatin molecular variants in the vitreous fluid: a comparative study between diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic control subjects. *Diabetes Care* 28:1941-1947.
- Higgins R.D., Yan Y., Schrier B.K., 2002. Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularization. *Exp Eye Res* 74:553-559.
- Hofman P., van Blijswijk B.C., Gaillard P.J., Vrensen G.F., Schlingemann R.O., 2001. Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina: new insights into the pathogenesis of capillary nonperfusion. *Arch Ophthalmol* 119:861–866.
- Huang L., Max M., Margolskee R.F., Su H., Masland R.H. and Euler T., 2003. G protein subunit G gamma 13 is coexpressed with G alpha o, G beta 3, and G beta 4 in retinal ON bipolar cells. *J Comp Neurol* 455:1-10.
- Iversen L.L., 1991. Pharmacological approaches to the treatment of ischaemic neuronal damage. *Eye* 5:193-197.
- Iwata A., Nishio K., Winn R.K., Chi E.Y., Harlan J.M., 2003. A broad spectrum caspase inhibitor attenuates allergic airway inflammation in murine asthma model. *J Immunol* 170:3386–3391.
- Izumi Y., Hammerman S.B., Kirby C.O., Benz A.M., Olney J.W., Zorumski C.F., 2003. Involvement of glutamate in ischemic neurodegeneration in isolated retina. *Vis Neurosci* 20:97–107.
- Jean-Baptiste G., Yang Z., and Greenwood M.T., 2006. Regulatory mechanisms involved in modulating RGS function. *Cell Mol Life Sci* 63:1969-1985.

- Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X.O., Xie L., Greenberg D.A., 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11946–11950.
- Johnson J., Chen T.K., Rickman D.W., Evans, C. and Brecha N.C., 1996. Multiple gamma-Aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina. *J Comp Neurol* 375:212-224.
- Johnson J., Wong H., Walsh J.H., Brecha N.C., 1998. Expression of the somatostatin subtype 2A receptor in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 393:93-101.
- Johnson J., Wu V., Wong H., Walsh J.H. and Brecha N.C., 1999. Somatostatin receptor subtype 2A expression in the rat retina. *Neuroscience* 94:675-683.
- Joo C.K., Choi J.S., Ko H.W., Park K.Y., Sohn S., Chun M.H., Oh Y.J., Gwag B.J., 1999. Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:713–720.
- Josko J., Gwozdz B., Jedrzejowska-Szypulka H. and Hendryk S., 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 6:1047-1052.
- Kanauchi H., Wada N., Clark O.H., Duh Q.Y., 2002. Apoptosis regulating genes, BCL2, Bax and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in adrenal tumors: possible diagnostic and prognostic importance. *Surgery* 132:1021–1027.
- Kanduc D., Mittelman A., Serpico R., 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol* 21:165–170.
- Kaneda K., Kashii S., Kurosawa T., Kaneko S., Akaike A., Honda Y., Minami M. and Satoh M., 1999. Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Res* 815:11-20.
- Katai N. and Yoshimura N., 1999. Apoptotic Retinal Neuronal Death by Ischemia–Reperfusion Is Executed by Two Distinct Caspase Family Proteases. *IOVS* 40:2697-2705.
- Katsetos C.D., Jami M.M., Krishna L., Jackson R., Patchefsky A.S. and Cooper H.S., 1994. Novel immunohistochemical localization of 28,000 molecular-weight (Mr) calcium binding protein (calbindin-D28k) in enterochromaffin cells of the human appendix and neuroendocrine tumors (carcinoids and small-cell carcinomas) of the midgut and foregut. *Arch Pathol Lab Med* 118:633-639.

- Ke J.B. and Zhong Y.M., 2007. Expression of somatostatin receptor subtype 5 in rat retinal amacrine cells. *Neuroscience* 144:1025-1032.
- Kiechle F.L. and Zhang X., 2002. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin. Chim. Acta* 16:363–371.
- Kim J.S., Quian T., Lemaster J.J., 2003. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* 124:494–503.
- Kimura H., Weisz A., Kurashima Y. Hashimoto K., Ogura T., D'Acquisto F., Addeo R., Makuuchi M., Esumi H., 2000. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95:189–197.
- Kinukawa J., Shimura M., Harata N. and Tamai M., 2005. Gliclazide attenuates the intracellular Ca²⁺ changes induced in vitro by ischemia in the retinal slices of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Curr Eye Res* 30:789-798.
- Kitanaka C. and Kuchino Y., 1999. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death and Differentiation* 6:508-515.
- Klagsbrun M. and D'Amore P. A., 1996. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7:259-270.
- Klisovic D.D., O'Dorisio M.S., Katz S.E., Sall J.W., Balster D., O'Dorisio, T.M., Craig E., Lubow M., 2001. Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2193-2201.
- Kobayashi M., Kuroiwa T., Shimokawa R., Okeda R., Tokoro T., 2000. Nitric oxide synthase expression in ischemic rat retinas. *Jpn J Ophthalmol* 44:235–244.
- Komeima k., Brian S., Lu L., Campochiaro P.A., 2006. Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11300-5.
- Kong J.L., Panetta R., Song W., Somerville W., and Greenwood M.T., 2002. Inhibition of somatostatin receptor 5-signaling by mammalian regulators of G-protein signaling (RGS) in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1542:95-105.
- Kouvidi E., Papadopoulou-Daifoti Z., Thermos K., 2006. Somatostatin modulates dopamine release in rat retina. *Neurosci Lett* 391:82-86.

- Krantic S., Goddard I., Saveanu A., Giannetti N., Fombonne J., Cardoso A., Jaquet P. and Enjalbert A., 2004. Novel modalities of somatostatin actions. *Eur J Endocrinol* 15:643–655.
- Kreienkamp H.J., Akgun E., Baumeister H., Meyerhof W. and Richter D., 1999. Somatostatin receptor subtype 1 modulates basal inhibition of growth hormone release in somatotrophs. *FEBS Lett* 462:464–466.
- Krispel C.M., Chen D., Melling N., Chen Y-J., Martemyanov K.A., Quillinan N., Arshavsky V.Y., Wensel T.G., Chen C.-K. and Burns M.E., 2006. RGS Expression Rate-Limits Recovery of Rod Photoresponses. *Neuron* 51:409-416.
- Kukreja R.C., Kontos H.A., Hess M.L., Ellis E.F., 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 59:612–619.
- Kunz A., Park L., Abe T., Gallo E.F., Anrather J., Zhou P., Iadecola C., 2007. Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *J Neurosci* 27:7083-93
- Kuriyama H., Waki M., Nakagawa M., Tsuda M., 2001. Involvement of oxygen free radicals in experimental retinal ischemia and the selective vulnerability of retinal damage. *Ophthalmic Res* 33:196–202.
- Kuroiwa S., Katai N., Shibuki H., Kurokawa T., Umihira J., Nikaido T., Kametani K., Yoshimura N., 1998. Expression of cell cyclereleted genes in dying cells in retinal ischemic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:610–617.
- Kuroiwa S., Katai N., Yoshimura N., 1999. A possible role for p16INK4 in neuronal cell death after retinal ischemia–reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:528–533.
- Kuroko Y., Yamazaki T., Tokunaga N., Akiyama T., Kitagawa H., Ishino K., Sano S., Mori H., 2007. Cardiac epinephrine synthesis and ischemia-induced myocardial epinephrine release. *Cardiovasc Res* 74:438-444.
- Kvanta A., 2006. Ocular angiogenesis: the role of growth factors. *Acta Ophthalmol Scand* 84:282-288.
- Lam T.T., Siew E., Chu R., Tso M.O., 1997. Ameliorative effect of MK-801 on retinal ischemia. *J Ocul Pharmacol Ther* 13:129–137.
- Lamberts S.W., de Herder W.W., Hofland L.J., 2002. Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab* 13:451-457.

- Lamberts S.W.J., van der Lely A.-J., de Herder W.W. and Hofland L. J., 1996. Octreotide. Drug therapy. *New Engl J Med* 334:246–254.
- Larminie C., Murdock P., Walhin JP., Duckworth M., Blumer K.J., Scheideler M.A., Garnier M., 2004. Selective expression of regulators of G-protein signaling (RGS) in the human central nervous system. *Molecular Brain Research* 122:24–34.
- Larsen J.N., Bersani M., Olcese J., Holst J.J., Moller M., 1990. Somatostatin and prosomatostatin in the retina of the rat: an immunohistochemical, in-situ hybridization, and chromatographic study. *Vis Neurosci* 5:441-452.
- Lawnicka H., Stepień H., Wyczółkowska J., Kolago B., Kunert-Radek J., Komorowski J., 2000. Effect of somatostatin and octreotide on proliferation and vascular endothelial growth factor secretion from murine endothelial cell line (HECa10) culture. *Biochem Biophys Res Commun* 268:567-71.
- Lee D.H., Cho H.J., Kim J.T., Choi J.S., Joo C.K., 2001. Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea* 20:738–742.
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW., 1999. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399:A7–14.
- Lee S.H., Kim H.S., Kim S.Y., Jang J.J., Jang J., Oh R.R., Yoo N.J., Park J.Y., 2000. Somatic mutation of Fas gene in cutaneous squamous cell carcinoma arising from a burn scar. *J Invest Dermatol* 114:122–126.
- Lees G.J., Leong W., 1993. Differential effects of NBQX on the distal and local toxicity of glutamate agonists administered intrahippocampally. *Brain Res* 628:1–7.
- Levin L.A. and Louhab A., 1996. Apoptosis of retinal ganglion cells in anterior ischemic optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 114:488-491.
- Levin L.A., Schlamp C.L., Spieldoch R.L., Geszvain K.M., Nickells R.W., 1997. Identification of the bcl-2 family of genes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2545–2553.
- Levy A.P., Levy N.S., Goldberg M.A., 1996. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 271: 2746-2753
- Lewis I., Bauer W., Albert R., Chandramouli N., Pless J., Weckbecker G., Bruns C., 2003. A novel somatostatin mimic with broad somatotropin release inhibitory factor receptor binding and superior therapeutic potential. *J Med Chem* 46:2334-2344.

- Li S.H., Lam S., Cheng A.L., Li X.J., 2000. Intracellular huntingtin increase the expression of caspase 1 and induces apoptosis. *Hum Mol Genet* 9:2859–2867.
- Li Y., Li A.C., Shi H., Zhou S., Shou W.Z., Jiang X., Naidong W. and Lauterbach J.H., 2005. The use of chemical derivatization to enhance liquid chromatography / tandem mass spectrometric determination of 1-hydroxypyrene, a biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 19:3331–3338.
- Liou A.K.F., Clark R.S., Henshall D.C., Yin XM, Chen J., 2003. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways *Progress in Neurobiology* 69:103–142.
- Lipton P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431–1568.
- Lipton S.A., 2003. Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Surv Ophthalmol* 48 (Suppl. 1), S38–S46.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402-408.
- Lombardi G., Moroni F., Moroni F., 1994. Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage. *Eur J Pharmacol* 271:489–495.
- Loughman M.S., Chatzistefanou K., Gonzalez E.M., Flynn E., Adamis A.P., Shing Y., D’Amato R.J., Folkman J., 1996. Experimental corneal neovascularisation using sucralate and basic fibroblast growth factor. *Aust NZ J Ophthalmol* 24:289–295.
- Lucas D.R. and Newhouse J.P., 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 58:193–201.
- Ludvigsen E., Stridsberg M., Taylor J.E., Culler M.D., Oberg K., Janson E.T., Sandler S., 2007. Regulation of insulin and glucagon secretion from rat pancreatic islets in vitro by somatostatin analogues. *Regul Pept* 138:1-9.
- Luo X., Heidinger V., Picaud S., Lambrou G., Dreyfus H., Sahel J., Hicks D., 2001. Selective excitotoxic degeneration of adult pig retinal ganglion cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1096–1106.
- Lutty G. A., McLeod D. S., Merges C., Diggs A. and Plouet J., 1996. Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid. *Arch Ophthalmol* 114:971-977.
- Malecaze F., Clamens S., Simorre-Pinatel V., Mathis A., Chollet P., Favard C., Bayard F., Plouet J., 1994. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and

- vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 112:1476–1482.
- Manjo G. and Joris I., 1995. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3–15.
- Martin L.J., 1999. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:459–471.
- Masmoudi O., Gandolfo P., Tokay T., Leprince J., Ravni A., Vaudry H., Tonon M.C., 2005. Somatostatin down-regulates the expression and release of endozepines from cultured rat astrocytes via distinct receptor subtypes. *J Neurochem* 94:561-571.
- Mastrodinou N. and Thermos K., 2004. The somatostatin receptor (sst1) modulates the release of somatostatin in rat retina. *Neurosci Lett* 356:13-16.
- Mastrodinou N., Kiagiadaki F., Hodjarova M., Karagianni E., Thermos K., 2006. Somatostatin receptors (sst2) regulate cGMP production in rat retina. *Regul Pept* 133:41-46.
- Mastrodinou N., Lambrou G.N., Thermos K., 2005. Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371:44-53.
- Matini P., Moroni F., Lombardi G., Faussone-Pellegrini M.S., Moroni F., 1997. Ultrastructural and biochemical studies on the neuroprotective effects of excitatory amino acid antagonists in the ischemic rat retina. *Exp Neurol* 146:419–434.
- Maynard K.I., Arango P.M., Chen D. and Ogilvy C.S., 1998. Acetylsalicylate administered during simulated ischemia reduces the recovery of neuronal function in the in vitro rabbit retina. *Neurosci Lett* 249:159-162.
- McNamara J.O., 1999. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 399:A15–A22.
- Métayé T., Gibelin H., Perdrisota R., Kraimps J.L., 2005. Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases *Cellular Signalling* 17:917–928.
- Meyer-Schwickerath R., Pfeiffer A., Blum W.F., Freyberger H., Klein M., Losche C., Rollmann R., Schatz H., 1993. Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. Studies in nondiabetic and diabetic subjects. *J Clin Invest* 92:2620–2625.

- Michaelis E.K., 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54:369–415.
- Michaelson I., 1948. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal diseases. *Trans Ophthalmol Soc UK* 68:137–180.
- Miller J.W., Adamis A.P., Shima D.T., D'Amore P.A., Moulton R.S., O'Reilly M.S., Folkman J., Dvorak H.F., Brown L.F., Berse B., Yeo T.-K., Yeo K.-T., 1994. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 145:574–584.
- Missotten T., Baarsma G.S., Kuijpers R.W., van der Born L.I., van der Loos T., Croxen R., Hofland L.J., van Hagen P.M., 2005. Somatostatin-related therapeutics in ophthalmology: a review. *J Endocrinol Invest* 28:118-126.
- Mizutani Y., Yoshida O., Ukimura O., Kawauchi A., Bonavida B., Miki T., 2002. Prognostic significance of combination of soluble Fas and soluble Fas ligand in serum of patients with bladder cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 17:563–567.
- Moller L., Stidsen C., Hartmann B. and Holst J., 2003. Somatostatin receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1616:1–84.
- Morbidelli L., Chang C.-H., Douglas J.G., Granger H.J., Ledda F., Ziche M., 1996. Nitric oxide mediates the mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 270:H411–H415.
- Mori M., Aihara M. and Shimizu T., 1997. Differential expression of somatostatin receptors in the rat eye: SSTR4 is intensely expressed in the iris/ciliary body. *Neurosci Lett* 223:185-188.
- Mousa S.A., Lorelli W., Campochiaro P.A., 1999. Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Biochem* 74:135–143.
- Murray R.D., Kim K., Ren S.G., Lewis I., Weckbecker G., Bruns C., Melmed S., 2004. The novel somatostatin ligand (SOM230) regulates human and rat anterior pituitary hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3027-3032.
- Murthy K. S., Coy D. H., Makhoulf G., 1996. Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C- β 3 by Gbetagamma and inhibition of adenylyl cyclase by Galphai1 and Galphao. *J Biol Chem* 271:23458-63

- Namura S., Zhu J., Fink K., Endres M., Srinivasan A., Tomaselli K.J., Yuan J, Moskowitz MA., 1998. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischaemia. *J Neurosci* 18:3659–3668.
- Naomichi K. and Nagashisa Y., 1999. Apoptotic retinal neuronal death by ischemia reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 40:2697–2705.
- Napper G.A., Pianta M.J. and Kalloniatis M., 2001. Localization of amino acid neurotransmitters following in vitro ischemia and anoxia in the rat retina. *Vis Neurosci* 18:413-427.
- Neal M.J., Cunningham J.R., Hutson P.H., Hogg J., 1994. Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J Neurochem* 62:1025–1033.
- Neufeld A.H., 1999. Nitric oxide: a potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol* 43:S129–S135.
- Neufeld A.H., Kawai S., Das S., Vora S., Gachie E., Connor J.R., Manning P.T., 2002. Loss of retinal ganglion cells following retinal ischemia: the role of inducible nitric oxide synthase. *Exp Eye Res* 75:521–528.
- Ni B., Wu X., Su Y., Stephenson D., Smalstig E.B., Clemens J., Paul SM., 1998. Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Cereb. Blood Flow Metab* 18:248–256.
- Nicholls D.G., Budd S.L., Ward M.W., Castilho R.F., 1999. Excitotoxicity and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 66:55–67.
- Nicholson D.W. and Thornberry N.A., 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299–306.
- Nickells R.W. and Zack D.J., 1996. Apoptosis in ocular disease: a molecular overview. *Ophthalmic Genet* 17:145–165.
- Nishizawa Y., 1999. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci* 69:369–381.
- Nolan L.A., Schmid H.A., Levy A., 2007. Octreotide and the novel multi-receptor ligand somatostatin receptor agonist pasireotide (SOM230), block the adrenalectomy-induced increase in mitotic activity in male rat anterior pituitary. *Endocrinology* 148:2821-7.

- Ogata N., Nishikawa M., Nishimura T., Mitsuma Y., Matsumura M., 2002. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 134:348–353.
- Olias G., Viollet C., Kusserow H., Epelbaum J., Meyerhof W., 2004. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem* 89:1057-1091.
- Olney J.W., Price M.T., Salles K.S., Labruyere J., Ryerson R., Mahan K., Friedrich G., Samson L., 1987. L-homocysteic acid: an endogenous excitotoxic ligand of the NMDA receptor. *Brain Res Bull* 19:597–602.
- Ona V.O., Li M., Cha J.H., Penny J.B., Khan S.Q., Frey A.S., Minon A.S., 1999. Inhibition of caspase 1 slows disease progression in a mouse model of Huntington disease. *Nature* 399:263–267.
- Onoda N. and Fujita S.C., 1987. A monoclonal antibody specific for a subpopulation of retinal bipolar cells in the frog and other vertebrates. *Brain Res* 416:359-363.
- Osborne N.N., 1999e. Memantine reduces alterations to the mammalian retina, in situ, induced by ischemia. *Vis Neurosci* 16:45–52.
- Osborne N.N., Casson R.J., Wood J.P., Chidlow G., Graham M., Melena J., 2004. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 23:91-147.
- Osborne N.N., Cazevielle C., Carvalho A.L., Larsen A.K., DeSantis L., 1997. In vivo and in vitro experiments show that betaxolol is a retinal neuroprotective agent. *Brain Res* 751:113–123.
- Osborne N.N., DeSantis L., Bae J.H., Ugarte M., Wood J.P.M., Nash M.S., Chidlow G., 1999a. Topically applied betaxolol attenuates NMDA-induced toxicity to ganglion cells and the effects of ischaemia to the retina. *Exp Eye Res* 69:331–342.
- Osborne N.N. and Herrera A.J., 1994. The effect of experimental ischaemia and excitatory amino acid agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina. *Neuroscience* 59:1071–1081
- Osborne N.N., Safa R., Nash M.S., 1999b. Photoreceptors are preferentially affected in the rat retina following permanent occlusion of the carotid arteries. *Vision Res.* 39:3995–4002.
- Osborne N.N., Ugarte M., Chao M., Chidlow G., Bae J.H., Wood J.P.M., Nash M.S., 1999c. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 43:102–128.

- Osborne N.N., Wood J.P.M., Chidlow G., Bae J.H., Melena J., Nash M.S., 1999d. Ganglion cell death in glaucoma: what do we really know? *Br J Ophthalmol* 83:980–986.
- Ostwald P., Goldstein I.M., Pachnanda A., Roth S., 1995. Effect of nitric oxide synthase inhibition on blood flow after retinal ischemia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2396–2403.
- Ozaki H., Hayashi H., Viores S.A., Moromizato Y., Campochiaro P.A., Oshima K., 1997. Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the bloodretinal barrier in rabbits and primates. *Exp Eye Res* 64:505–517.
- Ozaki H., Yu A., Della N., Ozaki K., Luna J.D., Yamada H., Hackett S.F., Okamoto N., Zack D.J., Semenza G.L., Campochiaro P.A., 1999. Hypoxia inducible factor-1a is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:182–189.
- Palii S.S., Caballero S., Jr., Shapiro G., Grant M.B., 2007. Medical treatment of diabetic retinopathy with somatostatin analogues. *Expert Opin Investig Drugs* 16:73-82.
- Palmer GC., 1985. Cyclic nucleotides in stroke and related cerebrovascular disorders. *Life Sci* 36:1995-2006
- Panteris V. and Karamanolis D.G., 2005. The puzzle of somatostatin: action, receptors, analogues and therapy. *Hepatogastroenterology* 52:1771-1781.
- Patan S., 2004. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 117:3–32.
- Patel B., Hiscott P., Charteris D., Mather J., McLeod D., 1994. Retinal and preretinal localisation of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptor in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 78:714–718.
- Patel Y. C. and Wheatley T., 1983. In vivo and in vitro plasma disappearance and metabolism of somatostatin-28 and somatostatin-14 in the rat. *Endocrinology* 112:220–225
- Patel Y.C., 1999. Somatostatin and its receptor family. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20:157–198.
- Pavan B., Fiorini S., Dal Monte M., Lunghi L., Biondi C., Bagnoli P., Cervia D., 2004. Somatostatin coupling to adenylyl cyclase activity in the mouse retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370:91-98.
- Payet O., Maurin L., Bonne C. and Muller A., 2004. Hypoxia stimulates glutamate uptake in whole rat retinal cells in vitro. *Neurosci Lett* 356:148-150.

- Pellegrini-Giampietro D.E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Moroni F., 1990. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10:1035-41.
- Penela P., Ribas C., Mayor F., 2003. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cellular Signalling* 15:973–981.
- Penn J.S., Tolman B.L., Henry M.M., 1994. Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3429–3435.
- Peterson C., Neal J.H., Cotman C.W., 1989. Development of Nmethyl- D-aspartate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 48:187–195.
- Petrucci C., Resta V., Fieni F., Bigiani A., Bagnoli P., 2001. Modulation of potassium current and calcium influx by somatostatin in rod bipolar cells isolated from the rabbit retina via sst2 receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363:680-694.
- Pierce E.A., Avery R.L., Foley E.D., Aiello L.P., Smith L.E., 1995. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:905–909.
- Pochet R., Pasteels B., Seto-Ohshima A., Bastianelli E., Kitajima S. and Van Eldik L.J., 1991. Calmodulin and calbindin localization in retina from six vertebrate species. *J Comp Neurol* 314:750-762.
- Price D.L., 1999. New order from neurological disorders. *Nature* 399:A3–A5.
- Pugh E.N., 2006. RGS Expression Level Precisely Regulates the Duration of Rod Photoresponses. *Neuron* 51:391-393.
- Quigley H.A., Miller N.R. and Green W.R., 1985. The pattern of optic nerve fiber loss in anterior ischemic optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 100:769-776.
- Quigley H.A., Nickells R.W., Kerrigan L.A., Pease M.E., Thibault D.J. and Zack D.J., 1995. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:774-786.
- Quinones-Hinojosa A., Ames A., Malek J.Y., Maynard K.I., 1999. An in vitro rabbit retina model to study electrophysiologic and metabolic function during and following ischemia. *J Neurosci Methods* 90:107–115.
- Rabuffetti M., Sciorati C., Tarozzo G., Clementi E., Manfredi A., Beltramo M., 2000. Inhibition of caspase 1 like activity by Ac-Try-Val-Ala-Asp-Cmk induces long lasting

- neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease in proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 20:4398–4404.
- Rauca C., Schäfer K., Höllt V., 1999. Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360:633-8.
- Reed J.C., 2000. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157:1415–1430.
- Reynaud X., Dorey C.K., 1994. Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3169–3177.
- Ribas C., Penela P., Murga C., Salcedo A., Garcia-Hoz C., Jurado-Pueyo M., Aymerich I., Mayor F. Jr., 2007. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: Role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta* 176: 913-22.
- Ritter M.R., Banin E., Moreno S.K., Aguilar E., Dorrell M.I., Friedlander M., 2006. Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J Clin Invest* 116:3266-76.
- Rivier J., Brown M., Rivier C., Ling N. and Vale W. In *Peptides 1976* (ed. Loffet, A.) 427–521 (Editions de l'Universites, Bruxelles, 1976).
- Robinson G.S., Pierce E.A., Rook S.L., Foley E., Webb R., Smith L.E.S., 1996. Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4851–4856.
- Rocha-Singh K.J., Honbo N.Y., Karliner J.S., 1991. Hypoxia and glucose independently regulate the beta-adrenergic receptor-adenylate cyclase system in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 88:204-213.
- Rohrer H., Acheson A.L., Thibault J. and Thoenen H., 1986. Developmental potential of quail dorsal root ganglion cells analyzed in vitro and in vivo. *J Neurosci* 6:2616-2624.
- Rosenbaum D.M., Rosenbaum P.S., Gupta A., Michaelson M.D., Hall D.H., Kessler J.A., 1997a. Retinal ischemia leads to apoptosis which is ameliorated by aurintricarboxylic acid. *Vision Res* 37:3445–3451.
- Rosenbaum D.M., Rosenbaum P.S., Gupta H., Singh M., Aggarwal A., Hall D.H., Roth S., Kessler J.A., 1998. The role of the p53 protein in the selective vulnerability of the inner retina to transient ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2132–2139.
- Rosenbaum P.S., Gupta H., Savitz S.I., Rosenbaum D.M., 1997b. Apoptosis in the retina. *Clin Neurosci* 4:224 –232.

- Roskopf D., Schürks M., Manthey I., Joisten M., Busch S., Siffert W., 2003. Signal transduction of somatostatin in human B lymphoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C179–C190.
- Rowland L.P. and Shneider N.A., 2001 Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344:1688-700.
- Rozen S and Skaletsky H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386.
- Rupinder S.K., Gurpreet A.K., Manjeet S., 2007. Cell suicide and caspases. *Vascular Pharmacology* 46:383-393.
- Sagar S.M., Marshall P.E., Landis D.M., 1985. Immunoreactive somatostatin in the rat retina: light microscopic immunocytochemistry and chromatographic characterization. *Brain Res* 33:235-242.
- Sakurai S., Alam S., Pagan-Mercado G., Hickman F., Tsai J.Y., Zelenka P., Sato S., 2002. Retinal capillary pericyte proliferation and c-Fos mRNA induction by prostaglandin D2 through the cAMP response element. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 43:2774-2781.
- Sall J.W., Klisovic D.D., O'Dorisio M.S., Katz S.E., 2004. Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 79:465-476.
- Saraste A., 1999. Morphological criteria and detection of apoptosis. *Herz* 24:189–195.
- Saraste A. and Pulkki K., 2000. Morphological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45:528–537.
- Sattler R. and Tymianski M., 2001. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol* 24:107–129.
- Sauer D., 1993: Receptors and excitotoxicity. *DNandP* 6:88-94
- Schmid H.A. and Schoeffter P., 2004. Functional activity of the multiligand analog SOM230 at human recombinant somatostatin receptor subtypes supports its usefulness in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 80:47-50.
- Schorderet M., Sovilla J.Y. and Magistretti P.J., 1981. VIP-and glucagon-induced formation of cyclic AMP in intact retinae in vitro. *Eur J Pharmacol* 71:131-133.
- Schulz J.B., Weller M., Moskowitz M.A., 1999. Caspases in treatment of stroke and neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 45:421–429.

- Schwarz N., Renshaw D., Kapas S., Hinson J.P., 2006. Adrenomedullin increases the expression of calcitonin-like receptor and receptor activity modifying protein 2 mRNA in human microvascular endothelial cells. *J Endocrinol* 190:505-514.
- Schwarzler A., Kreienkamp H.J., and Richter D., 2000. Interaction of the somatostatin receptor subtype 1 with the human homolog of the Shk1 kinase-binding protein from yeast. *J Biol Chem* 275:9557-9562.
- Sennlaub F., Courtois Y., Goureau O., 2001. Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. *J Clin Invest* 107:717-725.
- Sherry D.M., Townes-Anderson E., 2000. Rapid glutamatergic alterations in the neural retina induced by retinal detachment. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 41:2779-2790.
- Shi Y., 2002. Mechanism of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9:459-470.
- Shibuya M., 2001. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 26:25-35.
- Shimizu K., Kobayashi Y., Muraoka K., 1981. Midperipheral fundus involvement in diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 88:601-612.
- Shweiki D., Itin A, Soffer D., Keshet E., 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845.
- Siehl S., Seuwen K., Hoyer D., 1999. Characterisation of human recombinant somatostatin receptors. 1. Radioligand binding studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360:488-499.
- Simo R., Lecube A., Sararols L. García-Arumí J., Segura R.M., Casamitjana R., Hernández C., 2002. Deficit of somatostatin-like immunoreactivity in the vitreous fluid of diabetic patients: possible role in the development of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 25:2282-2286.
- Singh M., Savitz S.I., Hoque R., Gupta G., Roth S., Rosenbaum P.S. and Rosenbaum D.M., 2001. Cell-specific caspase expression by different neuronal phenotypes in transient retinal ischemia. *Journal of Neurochemistry* 77:466-475.
- Sjolie A.K. and Moller F., 2004. Medical management of diabetic retinopathy. *Diabet Med* 21:666-672.

- Smith L.E., Wesolowski E., McLellan A., Kostyk S.K., D'Amato R., Sullivan R., D'Amore P.A., 1994. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:101-111.
- Smith S.B., 2002. Diabetic retinopathy and the NMDA receptor. *Drug News Perspect* 15:226–232.
- Southorn P.A., Powis G., 1988. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 63:381–389.
- Spira A.W., Shimizu Y., Rorstad O.P., 1984. Localization, chromatographic characterization, and development of somatostatin-like immunoreactivity in the guinea pig retina. *J Neurosci* 4:3069-3079.
- Springer J.E., 2002. Apoptotic cell death following traumatic injury to the central nervous system. *J Biochem Mol Biol* 35:94-105.
- Stone J., Itin A., Alon T., Pe'er J., Gnessin H., Chan-Ling T. and Keshet E., 1995. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 15:4738- 4747.
- Storkebaum E., Lambrechts D. and Carmeliet P., 2004. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays* 26:943–954.
- Sucher N.J., Lipton S.A., Dreyer E.B., 1997. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res* 37:3483–3493.
- Sun D. and Kalloniatis M., 2006. Mapping glutamate responses in immunocytochemically identified neurons of the mouse retina. *J Comp Neurol* 494:686-703.
- Sun Q., Ooi V.E., Chan S.O., 2001. N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in adult rat retina is antagonized by single systemic injection of MK-801. *Exp Brain Res* 138:37–45.
- Szabo M.E., Droy Lefaix M.T., Doly M., Carre C., Braquet P., 1991. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 32:1471–1478.
- Takeo S., Niimura M., Miyake-Takagi K., Nagakura A, Fukatsu T, Ando T, Takagi N, Tanonaka K, Hara J., 2003. A possible mechanism for improvement by a cognition-enhancer nefiracetam of spatial memory function and cAMP-mediated signal transduction system in sustained cerebral ischaemia in rats. *Br J Pharmacol* 138:642-654

- Tamada Y., Fukiage C., Daibo S., Yoshida Y., Azuma M. and Shearer T.R., 2002. Involvement of calpain in hypoxia-induced damage in rat retina in vitro. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 131:221-225.
- Tenneti L. and Lipton S.A., 2000. Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 74:134-142.
- Terman B.I., Dougher-Vermazen M., Carrion M.E., Dimitrov D., Armellino D.C., Gospodarowicz D., Bohlen P., 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys Res Commun* 187:1579–1586.
- Tezel G. and Wax M.B., 1999. Inhibition of caspase activity in retinal cell apoptosis induced by various stimuli in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2660-2667.
- Thermos K., 2003. Functional mapping of somatostatin receptors in the retina: a review. *Vision Res* 43:1805-1815.
- Thermos K., Bagnoli P., Epelbaum J., Hoyer D., 2006. The somatostatin sst1 receptor: an autoreceptor for somatostatin in brain and retina? *Pharmacol Ther* 110:455-464.
- Thornberry N.A. and Lazebnik Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312–1316.
- Tornqvist K. and Ehinger B., 1988. Peptide immunoreactive neurons in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:680-686.
- Tornqvist K., Uddman R., Sundler F., Ehinger B., 1982. Somatostatin and VIP neurons in the retina of different species. *Histochemistry* 76:137-152.
- Troy C.M., Salvesen G.S., 2002. Caspases on brain. *J Neurosci Res* 69:145–150.
- Tsai W.H., Koh S.W., Puro D.G., 1987. Epinephrine regulates cholinergic transmission mediated by rat retinal neurons in culture. *Neuroscience* 22:675-680.
- Ueda M., Fujita R., Koji T. and Ueda H., 2004. The cognition-enhancer nefiracetam inhibits both necrosis and apoptosis in retinal ischemic models in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 309:200-207.
- Ullian E.M., Barkis W.B., Chen S., Diamond J.S., Barres B.A., 2004. Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity. *Mol Cell Neurosci* 26:544–557.
- Vallazza-Deschamps G., Fuchs C., Cia D., Tessier L.H., Sahel J.A., Dreyfus H and Picaud S., 2005. Diltiazem-induced neuroprotection in glutamate excitotoxicity and ischemic insult of retinal neurons. *Documenta Ophthalmologica* 110:25–35.

- van der Hoek J., de Herder W.W., Feelders R.A., van der Lely A.J., Uitterlinden P., Boerlin V., Bruns C., Poon K.W., Lewis I., Weckbecker G., Krahne T., Hofland L.J., Lamberts S.W., 2004. A single-dose comparison of the acute effects between the new somatostatin analog SOM230 and octreotide in acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 89:638-645.
- van der Hoek J., Waaijers M., van Koetsveld P.M., Sprij-Mooij D., Feelders R.A., Schmid H.A., Schoeffter P., Hoyer D., Cervia D., Taylor J.E., Culler M.D., Lamberts S.W., Hofland L.J., 2005. Distinct functional properties of native somatostatin receptor subtype 5 compared with subtype 2 in the regulation of ACTH release by corticotroph tumor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E278-287.
- van Hagen P.M., Baarsma G.S., Mooy C.M., Ercoskan E.M., ter Averst E., Hofland L.J., Lamberts S.W., Kuijpers R.W., 2000. Somatostatin and somatostatin receptors in retinal diseases. *Eur J Endocrinol* 143 Suppl 1, S43-51.
- Vardi, N. and Sterling, P., 1994. Subcellular localization of GABAA receptor on bipolar cells in macaque and human retina. *Vision Res* 34:1235-1246.
- Vasilaki A., Gardette R., Epelbaum J. and Thermos K., 2001. NADPHdiaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci* 42:1600-1609.
- Vasilaki A., Mouratidou M., Schulz S. and Thermos K., 2002. Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst(2) receptors in the rat retina. *Neuropharmacology* 43:899-909.
- Veikkola T. and Alitalo K., 1999. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 9:211-220.
- Veikkola T., Karkkainen M., Claesson-Welsh L. and Alitalo K., 2000. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 60:203-212.
- Watling K.J. and Dowling J.E., 1983. Effects of vasoactive intestinal peptide and other peptides on cyclic AMP accumulation in intact pieces and isolated horizontal cells of the teleost retina. *J Neurochem* 41:1205-1213.
- Watts V.J. and Neve K.A., 2005. Sensitization of adenylate cyclase by Galpha i/o-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 106:405-421.

- Weber M., Bonaventure N., Sahel J.A., 1995. Protective role of excitatory amino acid antagonists in experimental retinal ischemia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233:360–365.
- Weckbecker G., Briner U., Lewis I., Bruns C., 2002. SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs. *Endocrinology* 143:4123–4130.
- Weckbecker G., Lewis I., Albert R., Schmid H.A., Hoyer D., Bruns C., 2003. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2:999–1017.
- Weckbecker G., Raulf F., Stolz B. and Bruns C., 1993. Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer. *Pharmac Ther* 60:245–264.
- Weiss E.R., Ducceschi M.H., Horner T.J., A.Li, Craft C.M. and Osawa S., 2001. Species-Specific Differences in Expression of G-Protein-Coupled Receptor Kinase (GRK) 7 and GRK1 in Mammalian Cone Photoreceptor Cells: Implications for Cone Cell Phototransduction. *J Neurosci* 21:9175–9184.
- Wiedemann P., 1992. Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. *Surv Ophthalmol* 36:373–384.
- Wilkinson-Berka J.L., Wraight C., Werther G., 2006. The role of growth hormone, insulin-like growth factor and somatostatin in diabetic retinopathy. *Curr Med Chem* 13:3307–3317.
- Willars G.B., 2006. Mammalian RGS proteins: Multifunctional regulators of cellular signalling *Seminars in Cell and Developmental Biology* 17:363–376.
- Witmer A.N., Vrensen G.F., Van Noorden C.J., Schlingemann R.O., 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog. Retin. Eye Res* 22:1–29.
- Won S.J., Kim D.Y. and Gwag B.J., 2002. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol* 35:67–86.
- Wu B., Iwakiri R., Fujise T., Fujimoto K., 2003. Platelet-activating factor promotes mucosal apoptosis via FasL-mediating caspase-9 active pathway in rat small intestine after ischemia reperfusion. *FASEB J* 17:1156–1158.

- Wulle I. and Schnitzer J., 1989. Distribution and morphology of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the developing mouse retina. *Brain Res Dev Brain Res* 48: 59-72.
- Yakovlev A.G., Fan L., Fox G.B., Goodnight R., Faden A.I., 1997. Activation of CPP32 -like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* 17:7415-7424.
- Yamada Y., Post S.R., Wang K., Tager H.S., Bell G.I., Seino S., 1992. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:251–255.
- Yamamoto H., Schmidt-Kastner R., Hamasaki D.I. and Parel J.M., 2006. Complex neurodegeneration in retina following moderate ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion in Wistar rats. *Exp Eye Res* 82:767-779.
- Yamamoto R., Bredt D.S., Snyder S.H., Stone RA., 1993. The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience* 54:189–200.
- Yang W. and Xia SH., 2006. Mechanisms of regulation and function of G-protein-coupled receptor kinases. *World J Gastroenterol* 12:7753-7757.
- Yasuhara T., Shingo T., Kobayashi K., Takeuchi A., Yano A., Muraoka K., Matsui T., Miyoshi Y., Hamada H., Date I., 2004. Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor upon dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 19:1494–1504.
- Yla-Herttuala S., Rissanen T.T., Vajanto I. and Hartikainen J., 2007. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 49:1015-1026.
- Yuan J. and Yanker B.A., 2000. Apoptosis in nervous system. *Nature* 407:802–809.
- Zachary I. and Glick G., 2001. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 49, 568-581.
- Zachary I., 2005. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals* 14:207-221.
- Zagvazdin Y.S., Fitzgerald M.E.C., Sancesario G., Reiner A., 1996. Neural nitric oxide mediates Edinger-Westphal nucleus evoked increase in choroidal blood flow in the pigeon. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:666–672.

- Zandy A.J., Lakhani S., Zheng T., Flavell R.A., Bassnett S., 2005. Role of the executioner caspases during lens development. *J Biol Chem* 280:30263-72.
- Zatelli, M.C., Piccin, D., Vignali, C., Tagliati, F., Ambrosio, M.R., Bondanelli, M., et al., 2007. Pasireotide, a multiple somatostatin receptor subtypes ligand, reduces cell viability in non-functioning pituitary adenomas by inhibiting vascular endothelial growth factor secretion. *Endocr Relat Cancer* 14:91-102
- Zeevalk G.D. and Nicklas W.J., 1990. Chemically induced hypoglycaemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Ther* 253:1285–1292.
- Zeevalk G.D., Bernard L.P., Sinha C., Ehrhart J., Nicklas W.J., 1998. Excitotoxicity and oxidative stress during inhibition of energy metabolism. *Dev Neurosci* 20:444–453.
- Zeevalk G.D., Hyndman A.G., Nicklas W.J., 1989. Excitatory amino acid-induced toxicity in chick retina: amino acid release, histology, and effects of chloride channel blockers. *J Neurochem* 53:1610–1619.
- Zeevalk G.D. and Nicklas W.J., 1991. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg^{2+} block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem* 59:1211–1220.
- Zhang S. X. and Ma J.X., 2007. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 26:1-37.
- Zhao Y., Xu D., Quaegebeur J.M., Emala CW, Sun LS., 2002. Expression of adenylyl cyclase V/VI mRNA and protein is upregulated in cyanotic infant human myocardium. *Pediatr Cardiol* 23:536-541.
- Zhu X., Li A., Brown B., Weiss E.R., Osawa S. and Craft C.M., 2002. Mouse cone arrestin expression pattern: light induced translocation in cone photoreceptors. *Mol Vis* 8:462-471.
- Ziche M. and Morbideli L., 2000. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neuro-Oncol* 50:139-148.
- Zimmerman K.C., Bonzon C., Green D.R., 2002. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92:57–70.
- Zitzer H., Honck H.H., Bachner D., Richter D., and Kreienkamp H.J., 1999a. Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. *J Biol Chem* 274:32997-33001.

Zitzer H., Richter D., and Kreienkamp H.J., 1999b. Agonist-dependent interaction of the rat somatostatin receptor subtype 2 with cortactin-binding protein 1. *J Biol Chem* 274:18153-18156.

Ringraziamenti

Ringrazio il Professor Giovanni Casini per avere messo a mia disposizione la sua esperienza ed il suo “sapere” e per tutta la disponibilità mostrata in questi anni.

Ringrazio inoltre tutte le persone che hanno collaborato a questo lavoro ed in particolare il Dottor Davide Cervia, il Dottor Davide Martini, la Dottoressa Anna Maria Timperio, la Professoressa Paola Bagnoli, la Professoressa Carla Biondi.