

UNIVERSITÀ DELLA
CALABRIA

DOTTORATO DI RICERCA

IN

“BIOCHIMICA CELLULARE ED ATTIVITÀ DEI FARMACI
IN ONCOLOGIA”

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/14 - FARMACOLOGIA

XXIV CICLO

*Caratterizzazione del ruolo dell'autofagia in un
modello sperimentale di glaucoma acuto*

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Diego Sisci

Relatore

Dott.ssa Rossella Russo

Dottorando

Dott. Giuseppe Pasquale Varano

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INDICE

<u>SOMMARIO</u>	-4-
<u>1. INTRODUZIONE</u>	-7-
1.1 Il glaucoma	-7-
1.1.1 L'epidemiologia della patologia.....	-7-
1.1.2 Principali fattori di rischio.....	-7-
1.1.3 Tipologie di glaucoma.....	-9-
1.2 Cenni di anatomia oculare	-13-
1.2.1 L'occhio.....	-13-
1.2.2 Vascolarizzazione oculare.....	-14-
1.2.3 La retina e le vie centrali.....	-15-
1.3 Glaucoma e neurodegenerazione	-20-
1.3.1 Fattori coinvolti nel danno cellulare.....	-20-
1.3.2 Il glutammato: recettori e trasportatori.....	-23-
1.3.3 Evidenze sperimentali alla base del processo eccitotossico.....	-26-
1.3.4 Ischemia ed eccitotossicità.....	-29-
1.4 L'autofagia	-33-
1.4.1 Generalità.....	-33-
1.4.2 Tipologie di autofagia.....	-35-
1.5 Formazione dell'autofagosoma	-38-
1.5.1 Il complesso ULK1 (Atg1).....	-38-
1.5.2 La proteina Beclin-1 (Atg6) e il complesso PI3K-III.....	-40-
1.5.3 Beclin-1 e la correlazione apoptosi/autofagia.....	-44-
1.5.4 La proteina Atg9 e VMP1.....	-47-
1.5.5 La proteina LC3 (Atg8) e i sistemi di coniugazione.....	-48-
1.6 Maturazione dell'autofagosoma	-51-
1.6.1 Le proteine ESCRET, RAB-SNARE e LAMP.....	-51-
1.7 La fase di degradazione	-53-

<u>2. SCOPO DELLA TESI</u>	-55-
<u>3. MATERIALI E METODI</u>	-57-
3.1 Studi in vivo	-57-
3.1.1 Animali.....	-57-
3.1.2 Ischemia retinica.....	-57-
3.1.3 Somministrazioni intravitreali.....	-58-
3.1.4 Knockdown dell'espressione della subunità-1 delle calpaine (CAPNS1) e della proteina Beclin-1 (BECN1) mediante l'utilizzo di siRNA.....	-59-
3.1.5 Western blot.....	-60-
3.1.6 Immunocistochemica.....	-63-
3.2 Studi in vitro	-64-
3.2.1 Colture cellulari e trattamenti.....	-64-
3.2.2 Saggio di vitalità cellulare MTT.....	-65-
3.2.3 Test di vitalità cellulare FDI/PI.....	-66-
3.2.4 Analisi del ciclo cellulare e dell'ipodiploidia.....	-67-
3.2.5 Immunocistochemica.....	-68-
3.2.6 Analisi statistiche.....	-68-
<u>4. RISULTATI</u>	-70-
4.1 Studi <i>in vivo</i>	-70-
4.1.1 Localizzazione della proteina Beclin-1 nella retina normale di ratto.....	-70-
4.1.2 L'espressione delle proteine autofagiche LC3II, p62 e Beclin-1 si riduce in seguito all'ischemia/riperfusione retinica.....	-72-
4.1.3 Valutazione dei livelli di espressione delle proteine Atg4, Atg7 e Atg12.....	-75-
4.1.4 L'ischemia/riperfusione retinica induce il clivaggio della proteina Beclin-1.....	-77-

4.1.5 Le proteasi calpaine sono attivate dall'ischemia/riperfusion nella retina.....	-79-
4.1.6 Il clivaggio della proteina Beclin-1 dipende dall'attivazione del recettore NMDA del glutammato.....	-81-
4.1.7 Le proteasi calpaine inducono il clivaggio della proteina Beclin-1 <i>in vivo</i>	-83-
4.2 Studi <i>in vitro</i>.....	-87-
4.2.1 La deprivazione da siero riduce la vitalità delle RGC-5.....	-87-
4.2.2 La deprivazione da siero modifica la distribuzione delle RGC-5 nelle fasi del ciclo cellulare.....	-89-
4.2.3 La deprivazione da siero non induce morte cellulare delle RGC-5.....	-91-
4.2.4 L'autofagia promuove la sopravvivenza delle cellule RGC-5.....	-94-
4.2.5 Il silenziamento genico della proteina Beclin-1 riduce la vitalità delle cellule RGC-5.....	-97-
<u>5. DISCUSSIONE</u>.....	-99-
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>.....	-114-
<u>7. PARTE SPECIALE</u>.....	-140-
7.1 Attività di ricerca svolta durante lo stage all'estero.....	-141-

SOMMARIO

Il termine glaucoma indica un gruppo eterogeneo di neuropatie ottiche progressive caratterizzate da alterazioni del campo visivo dovute alla morte delle cellule ganglionari retiniche (*Retinal Ganglion Cells*, RGCs) e alla degenerazione del nervo ottico. Le strutture interessate in corso di glaucoma, retina e nervo ottico, costituiscono parte del sistema nervoso centrale (SNC), pertanto, il glaucoma è considerato, sotto ogni aspetto, una malattia neurodegenerativa. Così come per molte altre patologie neurodegenerative, l'eziologia del glaucoma è complessa e multifattoriale e la fisiopatologia cellulare e molecolare rimane poco sconosciuta.

L'aumento della pressione intraoculare è considerato il principale fattore di rischio associato alla patologia, sebbene non sia la condizione necessaria e sufficiente per l'insorgenza della malattia e le cause responsabili della morte delle cellule ganglionari retiniche rimangono ancora ignote. Tuttavia, diversi sono i fattori che possono essere coinvolti per spiegare la perdita delle cellule ganglionari retiniche, fra questi: la deprivazione di fattori trofici, il danno da ischemia-riperfusion, lo stress ossidativo, la disfunzione mitocondriale e l'eccitotossicità indotta dal glutammato.

Il processo autofagico rappresenta il principale sistema di degradazione lisosomiale per il turnover di organelli e di proteine a lunga emivita. Questo processo permette alla cellula di eliminare componenti tossici o danneggiati allo scopo di mantenere i livelli energetici e l'omeostasi cellulare in condizioni di stress metabolico.

Un crescente numero di evidenze sperimentali suggerisce che la disfunzione o la deregolazione autofagica è associata a diverse patologie neurodegenerative di tipo cronico, come il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la malattia di Huntington, ma anche

di tipo acuto, come il danno ipossico e ischemico. Tuttavia, nonostante i numerosi studi sul ruolo dell'autofagia nelle malattie neurodegenerative, il ruolo di tale processo nella degenerazione retinica rimane ancora poco studiato.

Pertanto, gli obiettivi del presente lavoro di ricerca sono stati:

- verificare la modulazione del processo autofagico in un modello sperimentale di glaucoma *in vivo* ottenuto attraverso l'aumento transitorio della pressione intraoculare con conseguente ischemia retinica.
- valutare il ruolo dell'autofagia sulla vitalità cellulare in colture di cellule ganglionari retiniche RGC-5 attraverso la manipolazione farmacologica ed il silenziamento genico di proteine tipicamente coinvolte nel processo autofagico.

I risultati ottenuti dimostrano che l'insulto ischemico induce una riduzione significativa dell'espressione della forma associata all'autofagosoma della proteina LC3 (LC3II) e della proteina Beclin-1, coinvolta nelle fasi iniziali del processo autofagico. Quest'ultimo evento è accompagnato dal clivaggio proteolitico della proteina Beclin-1 nella fase post-ischemica con accumulo di un frammento proteico di 50kDa.

L'attivazione della cascata eccitotossica, che consegue all'eccessiva stimolazione dei recettori NMDA per il glutammato, caratterizza l'insulto ischemico retinico e la morte delle cellule ganglionari ad esso associata. Nel presente lavoro è stata studiata l'attivazione delle proteasi Ca^{2+} -dipendenti calpaine, tipicamente associate al fenomeno eccitotossico, in seguito all'induzione dell'ischemia retinica.

Il profilo temporale di attivazione di questi enzimi proteolitici mostra un andamento compatibile con un loro coinvolgimento nel clivaggio della proteina Beclin-1. Il

trattamento con l'antagonista non competitivo dei recettori NMDA del glutammato, l'MK-801 (50nM, 5µl/occhio), con gli inibitori delle calpaine MDL28170 ed SJA6017 (1mM, 3µl/occhio) ed il silenziamento genico della subunità-1 delle calpaine *in vivo* (CAPNS1-siRNA, 10µg/occhio), mentre riducono l'attività delle proteasi, prevengono l'accumulo del frammento di 50kDa. L'insieme dei dati conferma il coinvolgimento delle calpaine nel clivaggio di Beclin-1, che viene pertanto identificata come un nuovo substrato di queste proteasi.

Infine, il ruolo protettivo o detrimentalmente dell'autofagia è stato valutato in colture cellulari RGC-5 *in vitro*. La deprivazione da siero per un periodo di 24h induce l'attivazione dell'autofagia; il trattamento con gli inibitori del processo autofagico, Bafilomicina-A1 (100nM) e 3-metil-adenina (10mM), ed il silenziamento genico della proteina Beclin-1 *in vitro* riducono in modo significativo la vitalità delle RGC-5 in condizioni di deprivazione da siero.

In conclusione, i dati riportati in questo studio indicano una deregolazione dell'autofagia in seguito all'ischemia/riperfusionne retinica associata al clivaggio, mediato dalle calpaine, della proteina Beclin-1 e supportano il ruolo neuroprotettivo di questo processo nelle cellule ganglionari retiniche.

Pertanto, la regolazione del processo autofagico potrebbe rappresentare un aspetto importante nelle patologie oculari associate ad eventi ischemici e quindi un potenziale bersaglio per nuove strategie neuroprotettive.

1. INTRODUZIONE

1.1 IL GLAUCOMA

1.1.1 L'epidemiologia della patologia

Il termine glaucoma indica un gruppo distinto di neuropatie ottiche progressive di natura multifattoriale caratterizzate da neurodegenerazione e morte delle cellule ganglionari retiniche, perdita delle fibre nervose assonali ed escavazione della papilla ottica. Il glaucoma rappresenta la seconda causa di cecità irreversibile nel mondo con più di 60 milioni di persone colpite nel 2010 ed una stima, per il 2020, di circa 79,6 milioni (Quigley and Broman, 2006). L'elevata incidenza della patologia fa sì che il trattamento di pazienti colpiti da glaucoma costituisca ogni anno un onere finanziario notevole per la spesa sanitaria (Rylander and Vold, 2008).

1.1.2 Principali fattori di rischio

Nonostante i progressi compiuti nella diagnosi e nel trattamento del glaucoma le principali cause alla base della patologia rimangono sconosciute. Sono stati individuati diversi fattori di rischio associati allo sviluppo di questa patologia come le anomalie vascolari, l'aumento della pressione intraoculare, l'appartenenza etnica, l'età, il diabete (Quigley and Vitale, 1997; Sommer et al., 1991; Tielsch et al., 1995a; Tielsch et al., 1995b; Tielsch et al., 1991).

Studi condotti su diverse popolazioni hanno stabilito come l'etnia Eschimese e Cinese presenta un rischio da 20 a 40 volte superiore di sviluppare il glaucoma rispetto alle popolazioni Caucasiche con una maggiore incidenza nelle donne rispetto agli uomini. Ciò

potrebbe essere dovuto alle ridotte dimensioni oculari e alla conformazione della camera anteriore (Congdon et al., 1997). Lo stesso accade per gli individui di origine Ispanica e Africana che sono soggetti ad un maggior rischio di danno glaucomatoso a causa di un disco ottico più ampio associato ad un maggiore stress meccanico (Quigley et al., 1990).

Un altro fattore di rischio rilevante è rappresentato dall'età. Infatti, l'incidenza della patologia aumenta notevolmente negli individui di età superiore ai 50 anni (Leibowitz et al., 1980).

Inoltre, diversi studi hanno dimostrato una maggiore incidenza del glaucoma nei soggetti diabetici rispetto a quelli non diabetici che potrebbe derivare da una pressione intraoculare più elevata o dall'effetto del diabete stesso sui piccoli vasi oculari e sulla testa del nervo ottico (Mitchell et al., 1997; Tielsch et al., 1995a).

Tuttavia è importante considerare altri fattori come la storia familiare, l'incidenza dei fattori ambientali (David et al., 1985) la presenza di patologie oculari preesistenti come l'iperopia (Erie et al., 1997), i difetti di rifrazione oculare e la miopia che risulta associata ad una maggiore predisposizione del disco miope al danno glaucomatoso del nervo ottico (Quinn et al., 1995).

Fra tutti i fattori di rischio menzionati, l'elevata pressione intraoculare è considerata il più importante (Le et al., 2003) tanto che, ad oggi, l'unico trattamento clinicamente approvato per la neuropatia è costituito dalle terapie volte a ridurre la pressione intraoculare (Kwon et al., 2009). Questo fattore di rischio è stato, infatti, identificato come possibile insulto primario nella patologia glaucomatosa responsabile della produzione di un danno di tipo meccanico e ischemico che porta alla morte delle cellule ganglionari retiniche (Levin, 2003).

Tuttavia, il rapporto tra pressione intraoculare e danno glaucomatoso non è diretto. L'atrofia ottica può verificarsi anche quando i pazienti presentano valori pressori fisiologici (Shah and Wormald, 2003) e, viceversa, soggetti con pressione intraoculare elevata non sviluppano necessariamente il glaucoma (Gordon et al., 2002).

Sebbene la terapia farmacologica riesca a controllare l'incremento pressorio, spesso i pazienti colpiti non dimostrano un recupero della vista né un blocco nella progressione della patologia (Goldberg, 2007). Pertanto appare chiaro che il controllo della pressione intraoculare non può essere considerato l'unico obiettivo della terapia glaucomatosa ma bensì deve essere affiancato da strategie neuroprotettive che possano prevenire il danno glaucomatoso o ritardare la sua progressione (Leske et al., 2003; Weinreb, 2007).

1.1.3 Tipologie di glaucoma

Il glaucoma viene convenzionalmente suddiviso in due principali categorie: quello primario, che si verifica in assenza di patologie oculari preesistenti senza dimostrare necessariamente un incremento della pressione oculare, e quello secondario, quando al contrario vi è evidenza di un processo patologico che innalza la pressione al di sopra dei normali valori di perfusione oculare (Foster et al., 2002).

All'interno di queste categorie è possibile effettuare altre suddivisioni in base alla conformazione gonioscopica "chiusa" o "aperta" dell'angolo camerale interno. Il glaucoma primario è quindi ulteriormente suddiviso in glaucoma primario ad angolo aperto e glaucoma primario ad angolo chiuso. I glaucomi secondari sono invece generalmente suddivisi in base al tipo di patologia scatenante come ad esempio la sindrome di dispersione del pigmento epiteliale, le uveiti e il glaucoma di tipo neovascolare e

traumatico (Khaw et al., 2004a; Khaw et al., 2004b; Shah and Wormald, 2002). Tuttavia da un punto di vista neurologico questo tipo di classificazione appare di utilità limitata non tenendo conto della natura e del profilo spazio-temporale dell'insulto alle cellule ganglionari retiniche né dei fattori che possono influenzare la suscettibilità al danno.

Il glaucoma primario ad angolo aperto rappresenta la maggior parte delle forme di glaucoma. Nel 50% dei casi il danno al nervo ottico è associato a valori iniziali di pressione intraoculare superiori a 21mmHg mentre altri soggetti, circa il 30%, presentano un danno caratteristico del nervo ottico in assenza di valori sopra fisiologici della pressione intraoculare. In quest'ultimo caso si identifica la categoria di glaucomi che viene indicata come glaucoma a bassa pressione o a tensione normale (Shah and Wormald, 2003).

L'aumento pressorio è spesso associato all'ostruzione delle vie di deflusso dell'umor acqueo. Studi condotti su soggetti colpiti da glaucoma primario ad angolo aperto hanno riportato un'alterazione strutturale della via trabecolare con una riduzione del numero di cellule endoteliali e dello spessore della membrana basale il quale porta ad un incremento della resistenza di deflusso. Inoltre è stata osservata un'alterazione della matrice extracellulare dovuta alla comparsa di placche elastiche nel reticolo iuxta-canalicolare e alla riduzione del numero dei vacuoli giganti legati al trasporto dell'umor acqueo (Allingham et al., 1992; Lutjen-Drecoll et al., 1986) (Figura 1.1). Fra le possibili cause del danno a livello del nervo ottico associato al glaucoma a tensione normale vi sono l'alterazione del flusso ematico associato a shock, vasospasmo, ipotensione sistemica e anomalie nella coagulazione del sangue (Tezel et al., 1996).

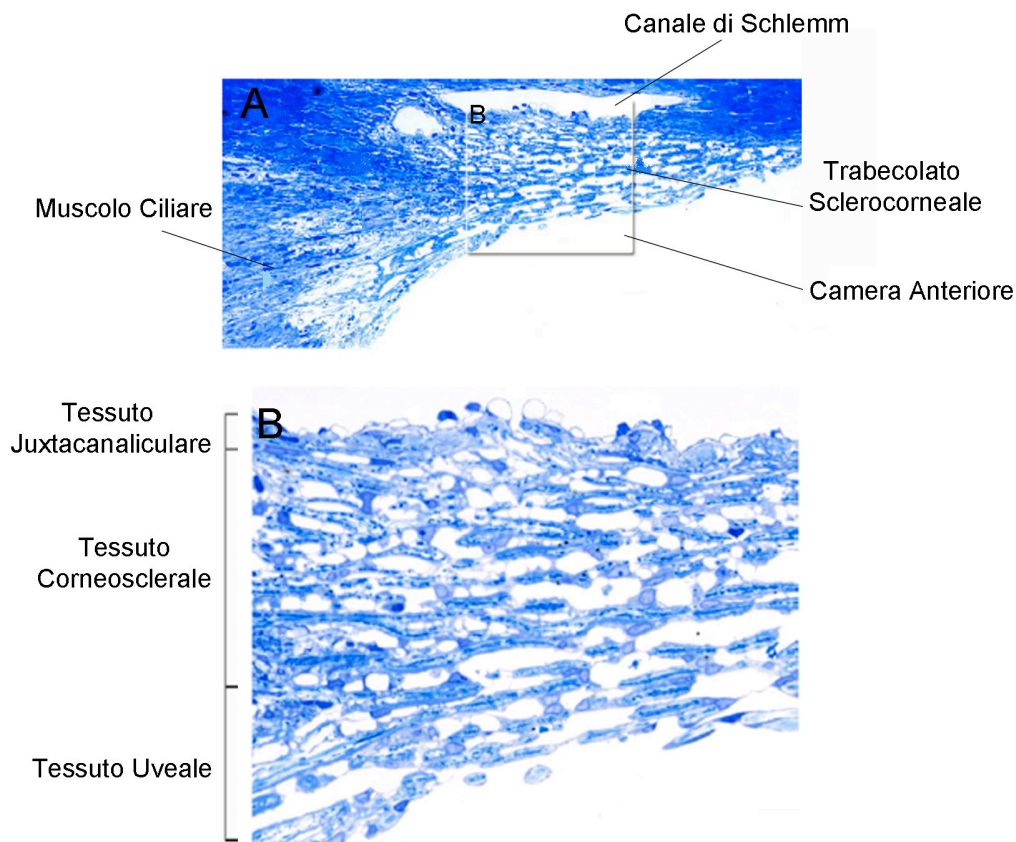


Figura 1.1 – Il Trabecolato Sclerocorneale.

Immagine al microscopio di una sezione longitudinale del principale sistema di deflusso dell'umor acqueo costituito dalla porzione uveale, corneosclerale e dal tessuto connettivo iuxtacanalicolare che si trova in prossimità del rivestimento endoteliale del canale di Schlemm (A). Il sistema trabecolare svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della pressione intraoculare e della resistenza al deflusso. (B) è un ingrandimento della figura (A). Modificata da "Tamm, 2009. Exp. Eye. Res. 10.1016".

Il glaucoma primario ad angolo chiuso si manifesta in individui particolarmente suscettibili. Esso è associato a una riduzione dell'angolo a livello della camera anteriore con occlusione del sistema angolare di filtrazione dell'umor acqueo. In particolare, questo tipo di glaucoma si verifica quando l'umor acqueo non riesce a passare liberamente dalla camera posteriore, attraverso la pupilla, a quella anteriore e ciò deriva dall'opposizione

dell'iride sul cristallino sottostante. Quando la resistenza prodotta dal blocco irido-lenticolare supera la pressione della camera posteriore, l'iride periferica viene schiacciata in avanti ocludendo l'angolo camerale e la via di deflusso trabecolare.

Questo determina un rapido aumento della pressione intraoculare che si manifesta con dolore intenso, iperemia congiuntivale profonda e rapida perdita della visione (Congdon et al., 1992) (Figura 1.2).

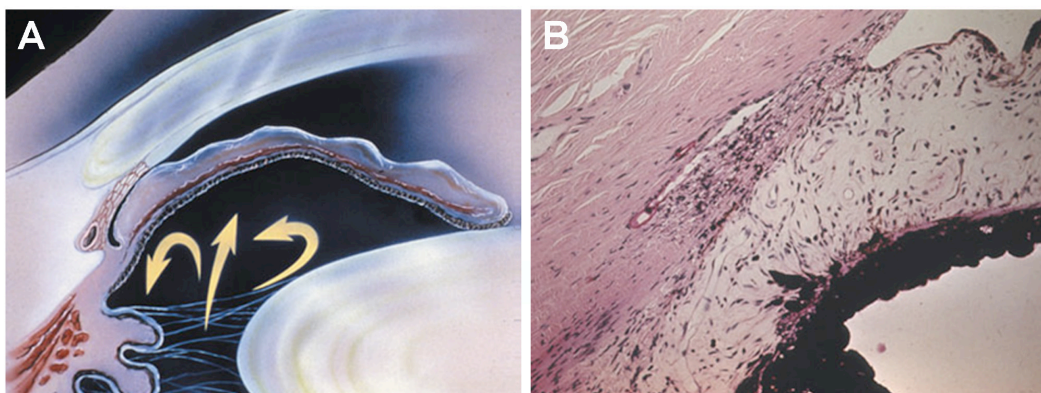


Figura 1.2 – Configurazione dell'angolo camerale in un paziente colpito da glaucoma primario ad angolo chiuso.

L'umor acqueo si accumula dietro la pupilla in seguito al blocco irido-lenticolare. L'innalzamento della pressione nella camera posteriore spinge l'iride periferica in avanti determinando la chiusura dell'angolo camerale (A). Angolo camerale in un soggetto con glaucoma primario ad angolo chiuso. Opposizione dell'iride periferica sul trabecolato sclero-corneale (B).

1.2 CENNI DI ANATOMIA OCULARE

1.2.1 L'occhio

L'occhio è un organo sensoriale sferico estremamente complesso costituito da diverse strutture specializzate. Lo strato più esterno è formato da un tessuto connettivo resistente di colore bianco, la sclera, che a sua volta continua nella porzione anteriore dell'occhio formando una struttura trasparente chiamata cornea. Il limite tra queste due membrane è definito limbus sclero-corneale. All'interno della sclera sono inseriti sei muscoli extraoculari che controllano la direzione del bulbo oculare durante il processo di visione. Lo strato mediale è formato da un sottile strato pigmentato e altamente vascolarizzato, la coroide, mentre lo strato più interno è rappresentato dalla retina (Figura 1.3).

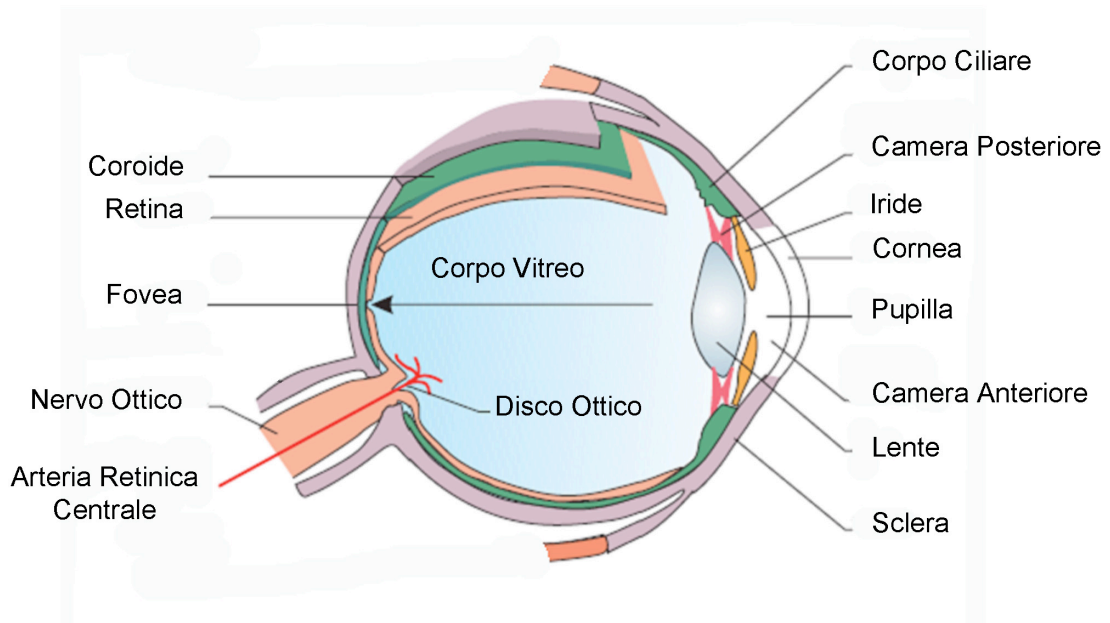


Figura 1.3 – Anatomia oculare.

Sezione trasversale del bulbo oculare e delle strutture anatomiche coinvolte nell'elaborazione iniziale dell'impulso visivo. Modificata da "Greenstein, 2000 – Color Atlas of Neuroscience – Neuroanatomy and Neurophysiology".

La luce passa attraverso la cornea ed entra nell'occhio attraverso la pupilla che è circondata da una tonaca muscolare pigmentata chiamata iride. Nella porzione posteriore dell'iride si trova il cristallino o lente, una struttura trasparente biconvessa costituita da proteine fibrose ed elastiche, circondata da un processo muscolare chiamato corpo ciliare e sostenuto da legamenti sospensori radiali chiamate fibre zonulari. Il corpo vitreo, una sostanza gelatinosa trasparente, riempie la cavità oculare che si forma tra la parete posteriore della lente e la superficie anteriore della retina. Lo spazio tra cornea e iride viene chiamato camera anteriore mentre quello tra l'iride, il cristallino e il corpo ciliare prende il nome di camera posteriore. Queste strutture sono bagnate da un liquido incolore, l'umor acqueo, che viene secreto attivamente dal corpo ciliare nella camera posteriore e successivamente passa nella camera anteriore dove defluisce attraverso il sistema trabecolare nella circolazione venosa (Figura 1.3).

1.2.2 Vascolarizzazione oculare

L'apporto di substrati metabolici e di ossigeno alla retina viene compiuto principalmente dal sistema vascolare retinico e coroidale. Entrambi derivano dall'arteria oftalmica che origina a sua volta dall'arteria carotide interna. L'arteria oftalmica entra nell'orbita oculare attraverso il canale ottico e si divide in diverse branche formando l'arteria retinica centrale, le arterie ciliari posteriori e le arterie muscolari mediale e laterale.

L'arteria retinica centrale si dispone ventralmente al nervo ottico mentre quelle ciliari posteriori viaggiano in avanti su entrambi i lati dando origine a 15-20 arteriole ciliari che entrano nella sclera formando un anello intorno al nervo ottico. Queste arterie sono deputate alla vascolarizzazione della retina, della coroide e della testa del nervo ottico.

Oltre a queste le arterie ciliari posteriori danno origine anche alle arterie ciliari posteriori lunghe mediale e laterale che entrano nella sclera ventralmente e lateralmente al nervo ottico e viaggiano all'interno dello spazio sovracoroideale verso il segmento anteriore. Qui si uniscono alle branche delle arterie ciliari anteriori nella vascolarizzazione dell'iride e del corpo ciliare (Pournaras et al., 2008).

L'arteria muscolare mediale invece è deputata alla vascolarizzazione del muscolo retto mediale, inferiore e laterale mentre il ramo laterale rifornisce il muscolo retto superiore. Allo stesso modo il deflusso ematico a livello oculare è mediato dal sistema venoso che a partire dall'uvea anteriore decorre nelle vene episclerali che inoltre ricevono l'umor acqueo filtrato a livello del trabecolato sclerocorneale e del canale di Schlemm. Tuttavia, la maggior parte del sangue proveniente dall'iride e dal corpo ciliare defluisce nelle vene vorticosi. Le vene episclerali drenano principalmente nelle vene dei muscoli extraoculari e successivamente nelle vene oftalmiche superiore e inferiore insieme al sangue proveniente dalle vene vorticosi. Posteriormente la vena retinica centrale, che riceve la maggior parte del drenaggio venoso della testa del nervo ottico, lascia l'occhio decorrendo in una tunica avventizia insieme all'arteria retinica centrale. Viaggiando al di sotto del nervo ottico la vena retinica centrale lascia l'orbita oculare attraverso il canale ottico e si unisce alle vene oftalmiche superiore ed inferiore per svuotarsi nel seno cavernoso (Pournaras et al., 2008).

1.2.3 La retina e le vie visive

La retina è una struttura altamente specializzata organizzata a strati, con uno spessore di circa 200 μ m, costituita da cinque tipologie di cellule neuronali: i fotorecettori, le cellule

bipolari, le cellule orizzontali, le cellule amacrine e le cellule ganglionari (Masland, 2001; Nathans, 1999) (Figura 1.4).

I fotorecettori, localizzati nello strato nucleare interno (*Outer Nuclear Layer, ONL*), si trovano in prossimità dell'epitelio pigmentato retinico e si dividono in coni e bastoncelli. Le loro funzioni sono sostanzialmente simili sebbene presentino differenze di tipo strutturale e biochimico. I bastoncelli sono distribuiti in tutta la retina, sono molto sensibili alla luce e mediano la visione notturna. I coni si trovano principalmente nella fovea, sono meno sensibili alla luce e mediano la visione diurna (Palczewski, 2006).

A livello delle terminazioni sinaptiche dei fotorecettori, nello strato plessiforme esterno (*Outer Plexiform Layer, OPL*), l'impulso elettrico viene trasferito alle cellule bipolari ed orizzontali che insieme alle cellule amacrine formano lo strato nucleare interno (*Inner Nuclear Layer, INL*) (Figura 1.4). Le cellule bipolari si dividono in due gruppi: le cellule ON e le cellule OFF. I coni rispondono alla stimolazione luminosa con una graduale iperpolarizzazione e con il rilascio di glutammato a livello della terminazione sinaptica. I neuroni postsinaptici esprimono tipi diversi di recettori per il glutammato. Infatti, le cellule bipolari OFF e le cellule orizzontali esprimono i recettori ionotropici del glutammato AMPA (Amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazol-propionico) e KA (Acido Kainico) mentre le cellule bipolari ON esprimono recettori metabotropici, in particolare il recettore mGluR6 (Haverkamp et al., 2000; Haverkamp et al., 2001a; Haverkamp et al., 2001b).

Le cellule orizzontali e le cellule bipolari OFF sono iperpolarizzate dalla luce e trasferiscono il segnale elettrico nello strato plessiforme interno (*Inner Plexiform Layer, IPL*) attraverso la formazione di sinapsi eccitatorie con le cellule ganglionari OFF. Le cellule bipolari ON vengono depolarizzate e formano sinapsi con le cellule ganglionari

ON. Così le cellule ganglionari OFF sono eccitate da stimoli in condizioni di buio mentre le cellule ganglionari ON da stimoli in condizioni di luce.

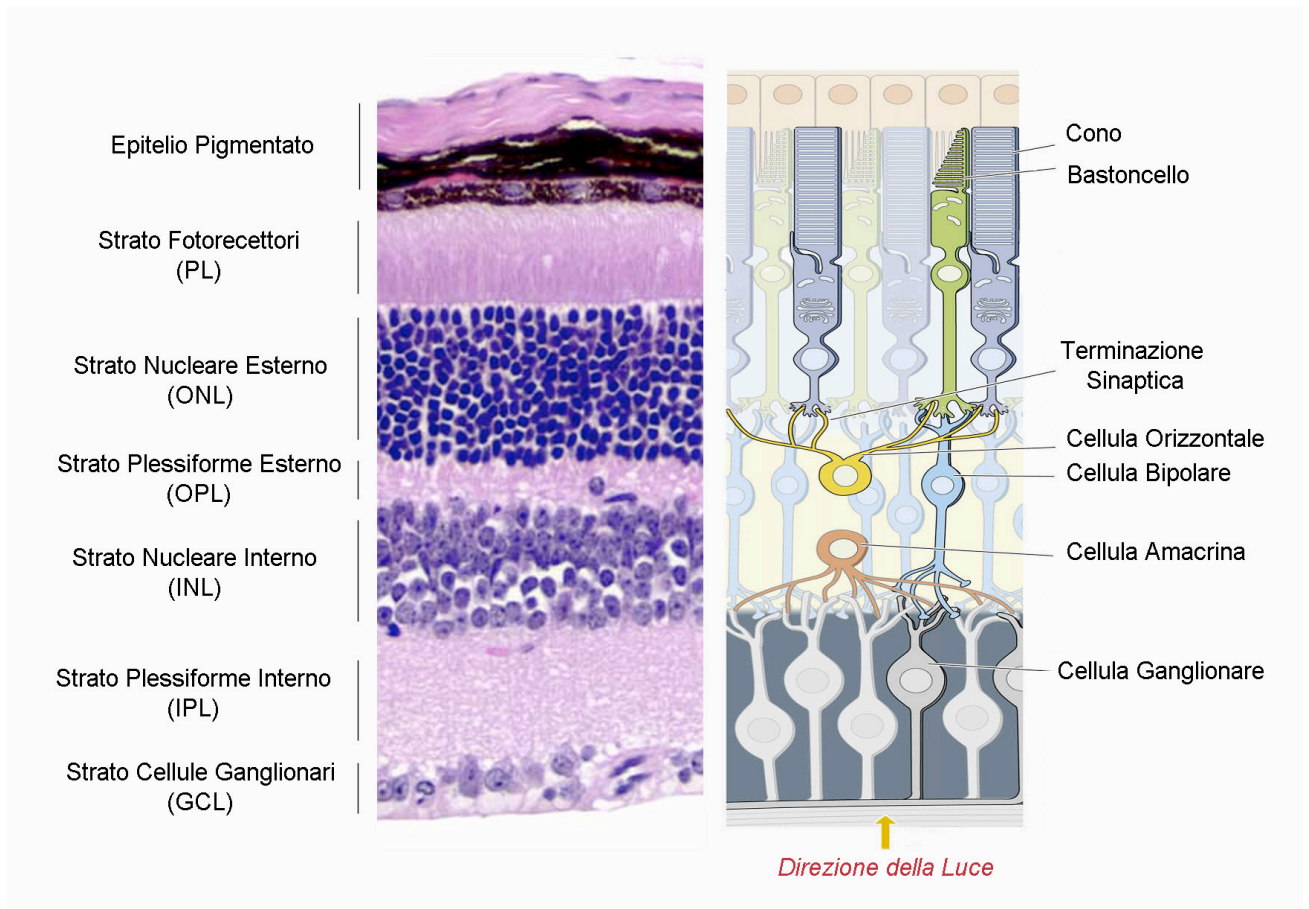


Figura 1.4 – La retina..

Questa struttura è localizzata nello strato più interno dell'occhio ed è costituita da cinque classi di cellule neuronali distribuiti nei diversi strati retinici. Il segnale luminoso viene elaborato dai fotorecettori (coni e bastoncelli) e trasmesso alle cellule bipolari nello strato nucleare interno (INL) e alle cellule ganglionari (GCL) secondo una traduzione verticale del segnale elettrico. Le cellule orizzontali formano sinapsi nello strato plessiforme esterno (OPL) e modulano l'interazione tra fotorecettori e cellule bipolari secondo una traduzione orizzontale del segnale elettrico mentre le cellule amacrine svolgono lo stesso ruolo nello strato plessiforme interno (IPL) modulando l'interazione tra cellule bipolari e cellule ganglionari. Modificata da “ Mustafi et al., 2009. Prog. Ret. Eye. Res. 28, 289-302”.

Tuttavia le cellule bipolari ON non inviano il segnale elettrico direttamente alle cellule ganglionari ma formano prima sinapsi con le cellule AII-amacrine. Queste cellule sommano gli impulsi elettrici formando sinapsi sulle terminazioni assionali delle cellule bipolari ON e sinapsi inibitorie sulle cellule bipolari OFF (Euler and Masland, 2000; Hack et al., 1999; Soucy et al., 1998) (Figura 4).

Il segnale retinico si distribuisce in direzione verticale e orizzontale. La trasmissione verticale parte dai fotorecettori, arriva alle cellule bipolari e infine alle cellule ganglionari che, a loro volta, rappresentano la via comune finale del flusso di informazioni verso il nervo ottico. Il principale neurotrasmettitore di questo sistema verticale è il glutammato che agisce attraverso recettori ionotropici eccitatori e metabotropici inibitori. Altre cellule mediano la neurotrasmissione orizzontale nello strato plessiforme interno ed esterno svolgendo un ruolo importante nella qualità spaziale e temporale del processo di visione. Le sinapsi delle cellule orizzontali nello strato plessiforme esterno modulano l'interazione tra fotorecettori e cellule bipolari mentre le sinapsi delle cellule amacrine svolgono lo stesso ruolo nello strato plessiforme interno riguardo l'interazione tra cellule bipolari e cellule ganglionari. La neurotrasmissione orizzontale è mediata principalmente dai neurotrasmettitori inibitori GABA e glicina (DeVries and Baylor, 1995; Raviola and Dacheux, 1987).

I prolungamenti assionali delle cellule ganglionari si uniscono in fasci di fibre nervose che attraversano la retina interna formando il nervo ottico, il quale si diparte dalla porzione posteriore dell'orbita oculare verso i centri nervosi superiori. Gli assoni della porzione temporale della retina sinistra proiettano verso il nucleo genicolato laterale sinistro del talamo, mentre gli assoni della porzione nasale della retina destra si incrociano formando il

chiasma ottico. Pertanto il nucleo genicolato laterale sinistro riceve input da entrambi gli occhi relativi alla metà destra del campo visivo.

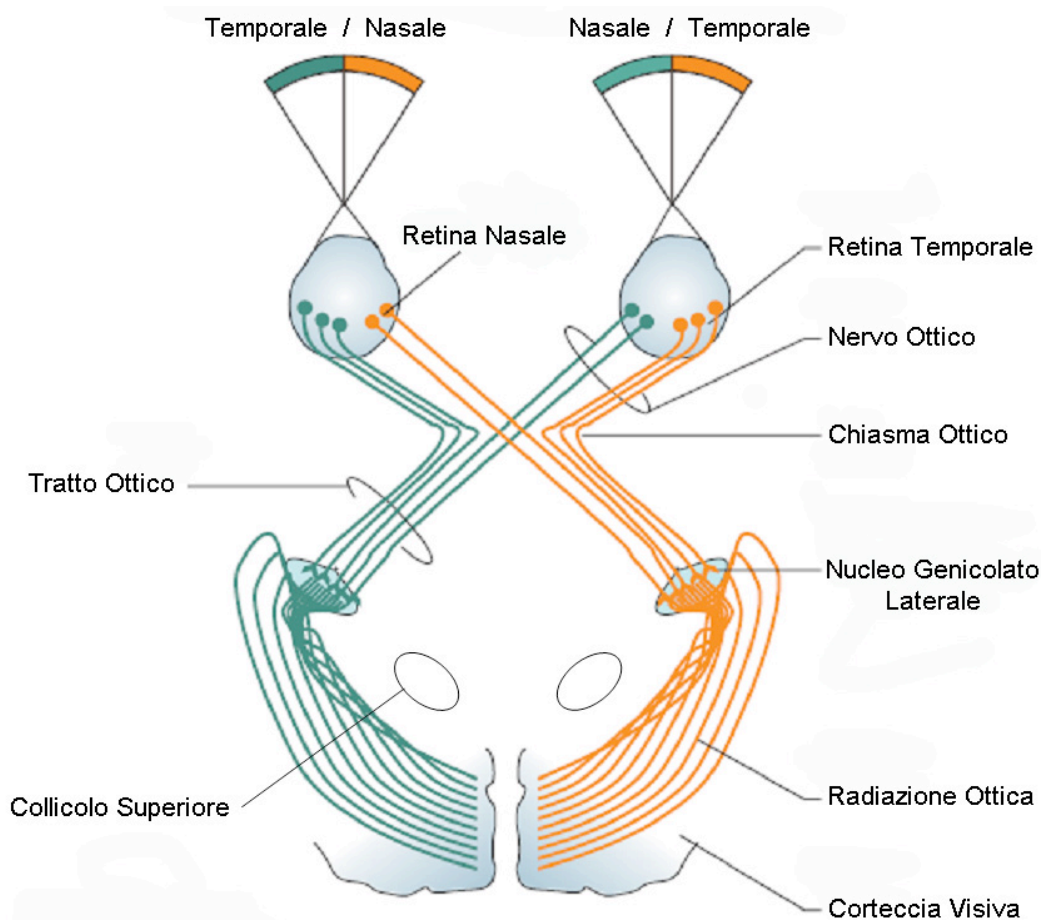


Figura 1.5 – Vie visive centrali.

Attraverso le fibre assionali del nervo ottico il segnale visivo arriva ai centri cerebrali superiori. La porzione destra e sinistra di ogni retina invia i dati rispettivamente alla parte destra e sinistra della corteccia visiva. Questi dati vengono poi elaborati e combinati insieme fornendo così l'immagine completa del campo visivo. Modificata da "Greenstein, 2000 – Color Atlas of Neuroscience – Neuroanatomy and Neurophysiology".

Allo stesso modo, il nucleo genicolato laterale destro riceve input da entrambi gli occhi relativi alla metà sinistra del campo visivo. I neuroni di ciascun corpo genicolato del talamo proiettano alla corteccia visiva del lobo occipitale tramite le radiazioni ottiche e rappresentano circa il 75% degli assoni che si dipartono dalla retina. Il 25% delle fibre rimanenti seguono una via secondaria che proietta ai collicoli superiori, detto anche tetto ottico (Figura 1.5). Da qui si dipartono fibre nervose che stimolano i muscoli oculari estrinseci ed intrinseci deputati rispettivamente al controllo dei movimenti oculari simultanei, come il monitoraggio e la convergenza oculare e al controllo dei muscoli oculari dell'iride e del corpo ciliare.

1.3 GLAUCOMA E NEURODEGENERAZIONE

1.3.1 Fattori coinvolti nel danno cellulare

La retina e il nervo ottico sono parte del sistema nervoso centrale e rappresentano le principali strutture colpite dalla patologia glaucomatosa; di conseguenza il glaucoma viene considerato, a tutti gli effetti, una patologia neurodegenerativa. Tuttavia, come accade per altre patologie neurodegenerative, l'eziologia della malattia risulta complessa e i meccanismi cellulari e molecolari alla base di questo processo rimangono sconosciuti.

Negli ultimi anni la disponibilità di nuovi modelli cellulari e animali ha favorito una maggiore comprensione degli eventi molecolari che mediano la disfunzione e la morte delle cellule ganglionari retiniche in corso di glaucoma. Diversi fattori di stress cellulare sono stati identificati come potenzialmente coinvolti nella neurodegenerazione retinica e questi includono:

- l'alterazione del supporto neurotrofico (Anderson and Hendrickson, 1974; Pease et al., 2000)
- la tossicità mediata dall'attivazione di astrociti e microglia (Kreutzberg, 1996; Tezel and Wax, 2004)
- lo stress ossidativo (Tezel, 2006)
- la disfunzione mitocondriale (Kong et al., 2009)
- mutazioni genetiche che predispongono alla patologia oculare (OPA-1, OPTN, MYOC) (Allingham et al., 2009; Ray and Mookherjee, 2009)
- fenomeni autoimmuni (Wax, 2011)
- condizioni ipossico/ischemiche (Kaur et al., 2008; Osborne et al., 2004)
- l'eccitotossicità mediata dal glutammato (Martin et al., 2002; Naskar et al., 2000)

L'alterazione del supporto trofico rappresenta un fattore importante nella neurodegenerazione retinica in corso di glaucoma (Pease et al., 2000). In questo contesto, la presenza di valori pressori elevati sarebbe responsabile della torsione o compressione degli strati della lamina, provocando l'interruzione o alterazione del trasporto assonale e il blocco dell'apporto di sostanze necessarie per la sopravvivenza cellulare (Quigley and Anderson, 1977).

Le neurotrofine vengono secrete a livello dei dendriti e agiscono sulle cellule presinaptiche in senso retrogrado o su bersagli postsinaptici viaggiando lungo gli assoni. Nel sistema visivo, le neurotrofine sono espresse nella retina e nei centri visivi primari cerebrali dove regolano i processi di sopravvivenza, differenziamento e la rigenerazione dei neuroni attraverso proprietà autocrine, endocrine e paracrine (Altar and DiStefano, 1998; Herzog

and von Bartheld, 1998). La deprivazione di fattori neurotrofici come l'NGF (*Nerve Growth Factor*), il BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), l'NT3, NT4 e l'NT5 (*Neurotrophins 3, 4, 5*), che agiscono attraverso il legame al recettore ad attività tirosin-chinasi (*Tyrosine kinase receptor, TrkA*) e al recettore p75NTR (*p75 neurotrophin receptor*), assume un ruolo rilevante nei processi neurodegenerativi (Berkemeier et al., 1991; Kaplan et al., 1991). Diversi studi hanno dimostrato come il flusso di fattori neurotrofici, dal collicolo superiore alle cellule ganglionari retiniche, è notevolmente ridotto in modelli animali di glaucoma dove il trasporto assonale e retro-assonale risulta alterato (Rudzinski et al., 2004). Questo determina una riduzione del supporto neurotrofico compromettendo la sopravvivenza neuronale e attivando il processo apoptotico, come osservato in cellule ganglionari retiniche in seguito alla transezione del nervo ottico (Berkelaar et al., 1994).

Le cellule della glia distribuite nella parte interna della retina e nella regione laminare e prelaminare della testa del nervo ottico forniscono il supporto metabolico alle cellule ganglionari e mantengono l'omeostasi di neurotrasmettitori e ioni extracellulari. I livelli di espressione di alcuni marker delle cellule gliali come la proteina fibrillare acidica gliale (*Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP*) risultano notevolmente aumentati in modelli sperimentali di glaucoma indicandone la loro attivazione. Tuttavia il loro coinvolgimento nella patologia glaucomatosa è molto complesso e i loro effetti possono avere sia un ruolo protettivo che detrimentalmente (Wang et al., 2000; Xue et al., 2006).

Infatti, le cellule della glia possono indurre apoptosi attraverso l'attivazione della via estrinseca mediata dalla secrezione del fattore di necrosi tumorale (*TNF- α , Tumor Necrosis*

Factor- α) (Nakazawa et al., 2006). Inoltre il recettore TNFR-2 (*Tumor Necrosis Factor Receptor-2*) può mediare l'attivazione della microglia provocando a sua volta un effetto tossico sugli oligodendrociti del nervo ottico e la degenerazione ritardata delle cellule ganglionari retiniche (Nakazawa et al., 2006).

L'insufficienza vascolare e la deprivazione di ossigeno e nutrienti a livello retinico e della testa del nervo ottico gioca un ruolo importante nell'insorgenza della neuropatia ottica. Essendo uno dei tessuti maggiormente attivi a livello metabolico, la retina consuma ossigeno più rapidamente di altri tessuti e pertanto, la sua integrità strutturale e funzionale dipende dal suo costante apporto (Ames et al., 1992).

1.3.2 Il glutammato: recettori e trasportatori

Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio nel sistema nervoso centrale dei mammiferi e svolge un'importante funzione nello sviluppo neuronale, nella plasticità sinaptica, nell'apprendimento e memoria in condizioni fisiologiche (Bliss and Collingridge, 1993; Suzuki et al., 2006).

Normalmente, il glutammato viene rilasciato dal terminale presinaptico in seguito al processo di depolarizzazione e si accumula nello spazio sinaptico dove agisce su specifici recettori (GluRs) localizzati sui dendriti o sui terminali dei neuroni postsinaptici. I recettori del glutammato si dividono in due grandi famiglie: i recettori ionotropici (iGluR) e i recettori metabotropici (mGluR).

I recettori ionotropici sono classificati in base al legame dell'agonista e si dividono in recettori N-metil-d-aspartato (NMDA) e recettori non NMDA, di cui fanno parte i recettori

α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazol-propionico (AMPA) e Kainato (KA) (Ozawa et al., 1998). I recettori AMPA/KA sono permeabili agli ioni Na^+ e K^+ ; la loro attivazione permette l'entrata di ioni Na^+ nella cellula e l'attivazione del processo di depolarizzazione della membrana cellulare. I recettori NMDA sono permeabili allo ione Na^+ ma soprattutto allo ione Ca^{2+} ; questi recettori sono caratterizzati dal blocco voltaggio-dipendente esercitato dallo ione Mg^{2+} che agisce come sensore di voltaggio e blocca il canale ionico in condizioni di potenziale negativo di membrana. Quando la membrana viene depolarizzata da uno stimolo eccitatorio il blocco dello ione Mg^{2+} viene rimosso ed il legame del glutammato e della glicina al recettore permette l'apertura del canale ionico e l'entrata dello ione Ca^{2+} nella cellula (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984).

Nella retina, i recettori NMDA sono presenti nelle cellule bipolari ON, amacrine e ganglionari (Euler et al., 1996; Fletcher et al., 2000; Hartveit and Veruki, 1997). I recettori AMPA si distribuiscono invece in tutti i neuroni retinici ad eccezione dei fotorecettori mentre quelli KA si localizzano in modo particolare nelle cellule bipolari OFF ed amacrine (Brandstatter et al., 1994; DeVries, 2000; Grunder et al., 2000).

I recettori metabotropici (mGluR1-8) sono recettori accoppiati a proteine-G e si dividono in tre sottogruppi, in base alle caratteristiche farmacologiche, all'omologia di sequenza e al meccanismo di trasduzione del segnale. Il primo gruppo (mGluR-I) comprende i recettori mGluR1 e mGluR5 che, in seguito all'attivazione della fosfolipasi-C (PLC), mediano l'idrolisi del fosfatidil-inositolo con formazione dell'inositolo-tri-fosfato (IP_3) il quale stimola il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari. Il secondo (mGluR-II) e il terzo gruppo (mGluR-III) comprendono rispettivamente i recettori mGluR3, mGluR4 e i recettori mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8. Entrambi i gruppi sono accoppiati

negativamente all'enzima adenilato cilasi e riducono la produzione di cAMP (Conn and Pin, 1997). I recettori mGluR-I sono presenti nelle cellule bipolari, orizzontali, amacrine e ganglionari, gli mGluR-III sono distribuiti in tutte le cellule della retina mentre i recettori mGluR-II si localizzano solo a livello dei fotorecettori e nelle cellule bipolari OFF (Gerber, 2003; Hartveit et al., 1995).

In condizioni fisiologiche la risposta eccitatoria del glutammato viene velocemente bloccata grazie all'efficiente rimozione di questo neurotrasmettitore dallo spazio sinaptico attraverso l'uptake a livello di neuroni e cellule della glia che circondano la sinapsi, le quali contribuiscono a mantenere le concentrazioni di glutammato al di sotto dei livelli di depolarizzazione (Nicholls and Attwell, 1990). Questo processo è mediato dai trasportatori per gli aminoacidi eccitatori (EAATs) che cotrasportano il glutammato insieme allo ione Na^+ utilizzando il gradiente elettrochimico generato dall'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi di membrana. Nella retina sono stati identificati quattro tipologie diverse di trasportatori per il glutammato. Il trasportatore glutammato-aspartato GLAST (EAAT1), localizzato principalmente a livello delle cellule di Müller, il trasportatore GLT1 (EAAT2) che si trova a livello dei fotorecettori e nelle terminazioni delle cellule bipolari retiniche, il trasportatore per gli aminoacidi eccitatori EAAC1 (EAAT3), nelle cellule orizzontali, amacrine e nelle cellule ganglionari e il trasportatore per gli aminoacidi eccitatori EAAT5, presente nei fotorecettori e nelle cellule bipolari retiniche (Pow and Barnett, 1999; Pow and Barnett, 2000; Rauen and Kanner, 1994; Schultz and Stell, 1996).

Mentre gli astrociti assumono un ruolo importante nell'uptake del glutammato nel sistema nervoso centrale, nella retina questa funzione è esercitata prevalentemente dalle cellule di Müller. E' stato dimostrato come l'esposizione di cellule ganglionari retiniche isolate di

ratto a concentrazioni crescenti di glutammato determina un aumento dose-dipendente della morte cellulare. L'effetto neurotossico viene bloccato in presenza di cellule di Müller in coltura e revertito quando l'uptake del glutammato è inibito attraverso il trattamento con D,L-treo- β -idrossi-aspartato (THA), il quale inibisce l'attività dei trasportatori di membrana (Kawasaki et al., 2000).

In seguito all'uptake nelle cellule della glia il glutammato, attraverso l'azione della glutammina sintetasi (GS), viene convertito in glutammina. Quest'ultima viene rilasciata nello spazio extracellulare e captata dai neuroni dove viene riconvertita nuovamente in glutammato. Questo “*shunt*” metabolico tra neuroni e glia rappresenta una componente essenziale per il metabolismo del glutammato e la sua alterazione potrebbe portare a danno eccitotossico, come osservato in condizioni d'ischemia nella retina isolata di ratto (Napper et al., 1999; Osborne et al., 2003).

1.3.3 Evidenze sperimentali alla base del processo eccitotossico

Nel 1957 Lucas e Newhouse dimostrarono l'effetto neurotossico e la perdita dei neuroni negli strati più interni della retina di topo in seguito alla somministrazione sottocutanea di glutammato. Sebbene il meccanismo fosse ancora sconosciuto, questa fu la prima dimostrazione di un insulto eccitotossico (Lucas and Newhouse, 1957a; Lucas and Newhouse, 1957b).

Nel 1959 Curtis e colleghi descrissero l'effetto depolarizzante del glutammato sui neuroni spinali di ratto sviluppando la prima evidenza sperimentale dell'effetto di un neurotrasmettitore eccitatorio (Curtis et al., 1959). Dieci anni più tardi Olney, dopo aver documentato l'insorgenza di lesioni cerebrali nel topo in seguito al trattamento con

glutammato, con il termine “eccitotossicità” per descrivere il processo di morte cellulare causato dall’eccessiva o prolungata stimolazione dei recettori glutammatergici (Olney, 1969). Successivamente, diversi studi hanno supportato questa scoperta indicando che l’aumento dei livelli extracellulari di glutammato possono essere tossici per le cellule neuronali, inclusa la retina, e che l’eccitotossicità gioca un ruolo importante nella patogenesi di diverse malattie neurodegenerative (Doble, 1999).

Numerose evidenze sperimentali hanno riportato come l’eccessiva attivazione dei recettori glutammatergici è coinvolta nel danno neuronale in seguito ad un insulto di tipo acuto, come l’ischemia cerebrale, l’ipoglicemia e l’epilessia, oppure legato ad uno stato neurodegenerativo di tipo cronico come per la sclerosi laterale amiotrofica, la malattia di Huntington, il morbo di Parkinson e la malattia di Alzheimer (Beal, 1992; Lipton and Rosenberg, 1994; Meldrum and Garthwaite, 1990).

Diversi studi hanno evidenziato come il recettore NMDA sia il principale mediatore del danno eccitotossico in quanto coinvolto nell’aumento sostenuto dei livelli di Ca^{2+} intracellulari responsabili dell’attivazione dei processi di morte cellulare (Choi, 1988a; Choi, 1988b).

Nella retina è stato ampiamente documentato come la cascata eccitotossica gioca un ruolo chiave nella morte delle cellule ganglionari retiniche. Infatti, in condizione di glaucoma sperimentale, indotto mediante l’aumento transitorio della pressione intraoculare, è stato osservato un incremento dei livelli intravitreali di questo neurotrasmettitore nel coniglio, nel ratto (Louzada-Junior et al., 1992; Nucci et al., 2005), nella scimmia e nell’uomo (Dreyer et al., 1996). L’iniezione di glutammato o NMDA nell’occhio adulto di ratto induce danno istologico e perdita dose-dipendente di cellule amacrine e cellule ganglionari

retiniche (Nash and Osborne, 1999). Inoltre, l'utilizzo di antagonisti del recettore NMDA del glutammato, come l'MK-801, e inibitori della nitrossido sintasi (NOS) hanno dimostrato un effetto neuroprotettivo in seguito al danno ischemico sia *in vitro* che *in vivo* (Adachi et al., 1998; Nucci et al., 2005).

La morte neuronale eccitotossica è caratterizzata dall'attivazione sia del processo necrotico che apoptotico, a seconda dell'entità e della durata dell'insulto. Diverse evidenze sperimentali hanno riportato come l'esposizione a basse concentrazioni di glutammato induce morte apoptotica mentre l'esposizione a concentrazioni elevate favorisce la morte necrotica (Bonfoco et al., 1995).

Studi recenti hanno suggerito, inoltre, un coinvolgimento del processo autofagico come possibile meccanismo di morte cellulare non apoptotica indotta da eccitotossine, nonostante la presenza di evidenze in cui questo processo rappresenta una strategia di sopravvivenza in diverse condizioni di stress cellulare. E' stato osservato nel ratto come la somministrazione di acido kainico, un agonista dei recettori ionotropici del glutammato, a livello dello striato, determina l'attivazione dell'autofagia. Il blocco di tale processo attraverso l'utilizzo di 3-metil-adenina (3-MA) o inibitori dell'attività lisosomiale blocca parzialmente il danno neuronale (Wang et al., 2008a; Zhang et al., 2009). Allo stesso modo, Sadasivan e collaboratori hanno riportato come l'attivazione del processo autofagico partecipa alla morte cellulare in colture neuronali cerebellari trattate con NMDA supportando un possibile coinvolgimento dell'autofagia nel danno neuronale mediato dal processo eccitotossico (Sadasivan et al., 2010).

1.3.4 Ischemia ed eccitotossicità

I fenomeni ischemici assumono un ruolo importante nell'insorgenza del glaucoma e rappresentano un fattore determinante nella morte delle cellule ganglionari retiniche (Kaur et al., 2008). Il termine ischemia riflette, infatti, una condizione patologica complessa che si verifica in seguito alla riduzione del flusso ematico ai tessuti il quale risulta insufficiente a soddisfare la richiesta energetica cellulare (Osborne et al., 2004).

A livello retinico, il principale effetto del blocco dell'apporto di ossigeno e glucosio risulta nell'alterazione del metabolismo energetico cellulare. In seguito alla riduzione del processo glicolitico e della fosforilazione ossidativa si verifica una caduta dei livelli di ATP che causa un'alterazione delle funzioni di membrana e la perdita dell'omeostasi ionica innescando una serie di eventi cellulari che portano alla morte neuronale. Studi condotti sulla retina di coniglio hanno evidenziato come il 50% del consumo di ossigeno è richiesto per la produzione di ATP necessario per il trasporto dello ione Na^+ (Ames et al., 1992). Quando la concentrazione intracellulare di ATP si riduce, la funzione della pompa Na^+/K^+ ATPasi viene compromessa determinando l'alterazione del potenziale di membrana cellulare e l'inibizione dei processi di ripolarizzazione degli assoni e delle membrane sinaptiche (Lipton, 1999).

Questo fenomeno elimina il blocco voltaggio-dipendente esercitato dallo ione Mg^{2+} sui recettori NMDA del glutammato che, attivati dall'innalzamento dei livelli extracellulari dello stesso neurotrasmettitore, determinano un rapido aumento delle concentrazioni intracellulari dello ione Ca^{2+} (Zeevalk and Nicklas, 1992). Tale processo è potenziato dall'apertura sostenuta dei canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti di tipo L (Aarts et al., 2003; Xiong et al., 2004). Studi condotti sulla retina isolata di ratto hanno dimostrato come

l'attivazione di questi canali ionici è responsabile per circa il 50% del flusso di Ca^{2+} che deriva dalla stimolazione del recettore NMDA (Melena and Osborne, 2001).

Tuttavia, l'accumulo di Ca^{2+} attraverso i sistemi descritti è solo transitoria poiché questi canali ionici possono andare incontro a una rapida desensitizzazione dovuta all'eccessiva depolarizzazione della membrana cellulare. L'aumento dei livelli di Ca^{2+} dipende inoltre dal rilascio del Ca^{2+} dalla matrice mitocondriale e dall'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato, che stimolano la produzione di IP_3 e la liberazione di questo ione dal reticolo endoplasmatico (Abe et al., 1992; Kruman et al., 1998).

Quando la deplezione energetica si protrae per un periodo di tempo elevato il rilascio del glutammato diventa indipendente dal Ca^{2+} ed è sostenuto dall'inversione dei trasportatori di membrana determinando l'accumulo di questo neurotrasmettitore nello spazio sinaptico (Phillis et al., 2000; Rossi et al., 2000). La particolare suscettibilità dei neuroni retinici all'ischemia, in particolare delle cellule ganglionari retiniche, è dovuta al fatto che queste cellule esprimono un numero elevato di recettori ionotropici del glutammato i quali vengono iperattivati, causando un'eccessiva depolarizzazione ed eventualmente la morte cellulare in seguito al danno eccitotossico (Brandstatter et al., 1994). L'aumento dei livelli di glutammato non solo promuove un rapido influsso di Na^+ attraverso i recettori ionotropici AMPA/KA ma anche un aumento dei livelli dello ione Cl^- che deriva dall'attività di diversi sistemi di trasporto cellulari come lo scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, l'attivazione del recettore GABA_A e del trasportatore Na-K-Cl di tipo I (NKCC1) (Babot et al., 2005; Russell, 2000). Questo processo favorisce l'entrata di H_2O nella cellula causando uno shock osmotico, il rigonfiamento degli organelli intracellulari e la morte necrotica attraverso lisi cellulare (Beck et al., 2003; Lipton, 1999).

Quando le concentrazioni di Ca^{2+} citoplasmatiche superano i livelli fisiologici, a livello cellulare vengono attivati diversi meccanismi che favoriscono la sua rimozione. Tuttavia durante l'ischemia o l'eccitotossicità questi sistemi risultano alterati o insufficienti (Orrenius et al., 2003). L'attività dello scambiatore di membrana $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) svolge un ruolo centrale nella regolazione dei livelli intracellulari del Ca^{2+} nelle cellule neuronali (White and Reynolds, 1995). Studi recenti hanno dimostrato come la ridotta espressione di questo scambiatore si traduce in un sovraccarico di ioni Ca^{2+} e nel danno neuronale (Pignataro et al., 2004). In condizioni ischemiche e in seguito alla depolarizzazione della membrana l'NCX inverte la direzione di trasporto favorendo l'accumulo di ioni Ca^{2+} all'interno della cellula come osservato in colture di cellule granulari cerebellari esposte a glutammato (Jeffs et al., 2007; MacGregor et al., 2003).

L'eccesso di Ca^{2+} stimola l'attivazione di numerosi enzimi e proteine cellulari come lipasi, proteasi, fosfatasi ed endonucleasi coinvolti nella degradazione di numerosi substrati cellulari, nello stress ossidativo e nell'attivazione dei processi di morte necrotica e apoptotica. Inoltre questo processo è rafforzato dalla produzione di radicali liberi, nitrossido e dalla disfunzione mitocondriale che insieme culminano nella morte cellulare (Orrenius et al., 2003).

Fra gli enzimi Ca^{2+} -dipendenti attivati vi sono le proteasi a cisteina calpaine, enzimi con attività simile alla papaina implicati nella degradazione di proteine del citoscheletro, come l'actina e la spectrina, proteine di membrana e molecole di trasduzione del segnale.

Fra i vari substrati clivati, la proteina spectrina è spesso utilizzata per indicare lo stato di attivazione delle proteasi calpaine poiché l'attività proteolitica di questi enzimi determina la formazione di due caratteristici frammenti di clivaggio a 150/145 kDa (Wang, 2000).

Sono state identificate due isoforme di questo enzima, la μ -calpaina (calpaina I), che si localizza essenzialmente nel citosol e viene attivata da concentrazioni micromolari di Ca^{2+} *in vitro*, e la m-calpaina (calpaina II) che si localizza sulle membrane cellulari e viene attivata da concentrazioni millimolari di Ca^{2+} (Cong et al., 1989). Le calpaine regolano, a loro volta, l'attività di numerose proteine coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} attraverso il clivaggio e il blocco dell'attività dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ di tipo 3 (NCX3) (Bano et al., 2005) e dell'ATPasi della membrana plasmatica PMCA (*Plasma Membrane Calcium ATPasi*) (Pottorf et al., 2006). Allo stesso modo, le calpaine inducono l'aumento dei livelli intracellulari dello ione Ca^{2+} e il suo rilascio dal reticolo endoplasmatico mediante il clivaggio rispettivamente dei canali-L del Ca^{2+} e dell'ATPasi SERCA (*Sarco/Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPasi*) (French et al., 2006), del recettore per la rianodina (RyR) (Rardon et al., 1990) e del recettore per l'inositolo trifosfato (IP_3) (Magnusson et al., 1993).

Altri substrati dell'attività proteolitica delle calpaine riguardano le subunità dei recettori AMPA e NMDA del glutammato (Bi et al., 2000; Gascon et al., 2008), alcuni enzimi citoplasmatici come la proteina chinasi Ca^{2+} -calmodulina dipendente (CaMK), la proteina fosfatasi calcineurina (CaN) (Vosler et al., 2008) e alcune proteine regolatrici del processo apoptotico come Bid, Bax e Apaf-1 (Chen et al., 2001; Choi et al., 2001; Reimertz et al., 2001).

L'aumento del Ca^{2+} intracellulare favorisce il suo accumulo a livello dei mitocondri portando alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) coinvolte nella perossidazione di lipidi, proteine e nel danno al DNA (Kumar and Agarwal, 2007; Siu and To, 2002; Yuan and Neufeld, 2001). Questo processo è un evento cruciale nella cascata

eccitotossica che si verifica in seguito al danno ipossico/ischemico (Murphy et al., 1999). Studi condotti su mitocondri isolati hanno dimostrato come lo ione Ca^{2+} è coinvolto nella formazione di pori di transizione (*mitochondrial Permeability Transition Pore, mtPTP*) favorendo il rigonfiamento mitocondriale, la perdita del potenziale di membrana e il rilascio di fattori pro-apoptotici come il citocromo-c e la proteina Smac/DIABLO (Budd and Nicholls, 1996; Shibata et al., 2002).

1.4 L'AUTOFAGIA

1.4.1 Generalità

L'omeostasi cellulare viene mantenuta attraverso il corretto bilanciamento tra i processi di biosintesi e di degradazione dei componenti cellulari. Nelle cellule eucariotiche i lisosomi, o i vacuoli nelle piante e nei lieviti, rappresentano le strutture primarie deputate al processo di degradazione grazie alla presenza e all'azione delle idrolasi acide lisosomiali. L'autofagia, il cui termine significa auto-digestione, è un processo di degradazione cellulare altamente regolato attraverso il quale porzioni di citoplasma e componenti cellulari vengono inglobati in una struttura a doppia membrana chiamata autofagosoma (Figura 1.6). Successivamente, il contenuto vescicolare viene veicolato e degradato a livello lisosomiale, portando così alla formazione di nucleotidi, aminoacidi e acidi grassi liberi che possono essere riutilizzati per la sintesi di macromolecole essenziali e per la produzione di energia (Yorimitsu and Klionsky, 2005) (Figura 1.6).

Questo processo è presente a livelli basali in tutte le cellule e viene stimolato quando vi è la necessità di generare energia e nutrienti cellulari, come ad esempio accade in condizioni di deprivazione di nutrienti o fattori di crescita (Kim et al., 2008b; Mortimore and Poso,

1987), ipossia (Zhu et al., 2005), ischemia (Adhami et al., 2006) e stress del reticolo endoplasmatico (Ding et al., 2007).

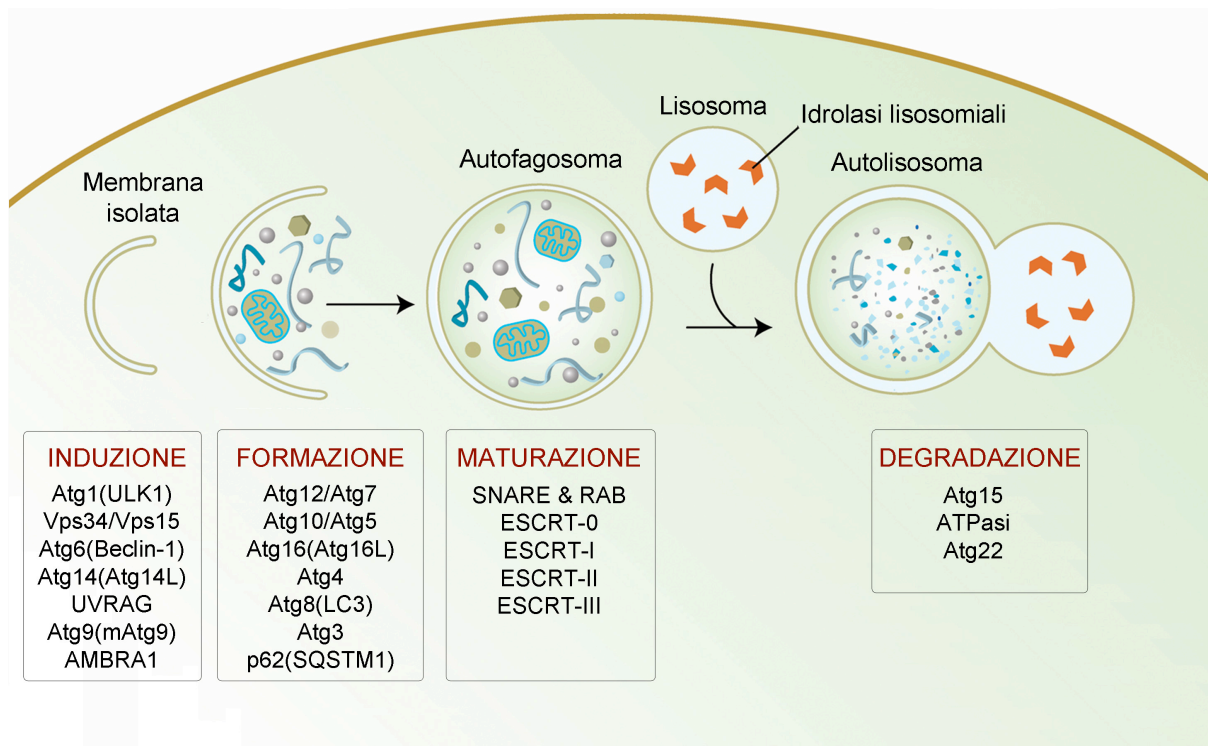


Figura 1.6 – Il processo autofagico.

L'induzione dell'autofagia inizia con la formazione di un fagoforo o membrana isolata. L'azione di diverse proteine Atg, come il complesso Beclin-1/PI3K-III, i sistemi di coniugazione e la proteina LC3 favoriscono l'espansione del fagoforo e la formazione dell'autofagosoma il quale può contenere proteine a lunga emivita, aggregati proteici e organelli cellulari. Questa struttura può andare incontro ad una fase di maturazione attraverso la fusione con endosomi o corpi multi-vescicolari. In seguito la membrana esterna dell'autofagosoma si fonde con il lisosoma formando così un autolisosoma, attraverso cui i componenti sequestrati vengono degradati dalle idrolasi acide lisosomiali e i prodotti ottenuti utilizzati per il mantenimento del metabolismo cellulare. Modificata da "Melendez and Levine, 2009. WormBook, doi/10.1895".

L'autofagia è coinvolta nei normali processi di sviluppo e rimodellamento cellulare, nel turnover di proteine a lunga emivita e organelli danneggiati, come ribosomi e mitocondri e nell'eliminazione di prodotti potenzialmente tossici come l'accumulo di aggregati proteici e patogeni intracellulari (Maiuri et al., 2007b; Rubinsztein et al., 2007).

D'altra parte, l'alterazione del processo autofagico sembra essere coinvolta in numerose patologie come cancro, malattie neurodegenerative, disordini cardiovascolari ed infezioni microbiche (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007).

La formazione degli autofagosomi fu osservata per la prima volta al microscopio elettronico negli anni cinquanta da Novikoff e successivamente da De Duve, mentre i primi studi molecolari e lo studio della dinamica e funzione del processo autofagico sono molto più recenti (De Duve and Wattiaux, 1966; Novikoff, 1956). Ad oggi, lo screening genetico nelle cellule di lievito di "*Saccharomyces cerevisiae*", "*Pichia pastoris*" e "*Hansenula polymorpha*" ha portato all'identificazione di 32 proteine coinvolte nel processo autofagico (*Autophagy-Related Genes, ATG*) (Klionsky et al., 2003; Mizushima, 2007; Xie and Klionsky, 2007). La maggior parte delle proteine ATG sono state successivamente identificate e caratterizzate negli organismi eucarioti superiori suggerendo che l'autofagia è un processo cellulare altamente conservato (Nakatogawa et al., 2009).

1.4.2 Tipologie di Autofagia

E' possibile distinguere tre diverse tipologie di autofagia in base alla modalità con cui i componenti intracellulari vengono veicolati a livello lisosomiale per la successiva degradazione: l'autofagia chaperone-mediata (*chaperone-mediated autophagy, CMA*), la macroautofagia e la microautofagia (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). I diversi tipi di

autofagia mostrano lo stesso punto di arrivo, rappresentato dal lisosoma, ma sono caratterizzati da diversi substrati bersaglio, da una diversa via di regolazione e dalle diverse condizioni che ne portano all'attivazione. Tra questi l'autofagia chaperone-mediata è stata descritta solo nei mammiferi e agisce in modo selettivo nella degradazione di proteine citosoliche che possiedono una sequenza aminoacidica ben definita (KFERQ) (Backer et al., 1983; Dice et al., 1990). Circa il 30% di tutte le proteine citosoliche presentano questa sequenza e sono potenzialmente soggette a questo processo catabolico in particolare durante la deprivazione di nutrienti a lungo termine. Esse vengono riconosciute e legate dal complesso citosolico Hsc70 e successivamente veicolate sulla superficie della membrana lisosomiale (Agarraberes and Dice, 2001). Qui vengono riconosciute dal recettore di membrana LAMP-2A e attivamente trasportate nel lume lisosomiale per essere infine degradate (Cuervo and Dice, 1996; Cuervo and Dice, 2000).

Il processo di traslocazione richiede, inoltre, la presenza di altre proteine, come il complesso Hsp90 e la proteina Hsc73, che guidano la fase d'internalizzazione prevenendo in tal modo il ritorno del substrato nel citosol (Terlecky et al., 1992). Il legame della proteina bersaglio al dominio citosolico del recettore LAMP-2A rappresenta il processo limitante nella CMA e cambiamenti nei livelli d'espressione di questo recettore sono utilizzati dalla cellula per modulare questo processo autofagico. In molti casi l'attivazione della CMA non richiede la sintesi *ex novo* di LAMP-2A ma è mediata da cambiamenti nell'organizzazione e nella degradazione del recettore sulla superficie della membrana lisosomiale (Bandyopadhyay et al., 2008).

Il meccanismo che regola la dinamica del recettore LAMP-2A rimane ancora incerto. Tuttavia studi recenti supportano l'ipotesi che il recettore si localizzi tra la regione fluida e

i microdomini lipidici della membrana lisosomiale dove viene degradato. Quando il processo autofagico viene attivato LAMP-2A viene rilasciato da questi domini e si localizza sulla membrana attraverso un processo regolato dall'isoforma lisosomiale della proteina GFAP che stabilizza il complesso di traslocazione. In presenza di GTP il fattore di allungamento EF1 α favorisce il distacco della proteina GFAP e l'attivazione del complesso di traslocazione (Bandyopadhyay et al., 2010).

La microautofagia è stata inizialmente descritta nel fegato e parte della sua attivazione è stata osservata nelle cellule di lievito. Questo processo è caratterizzato dal sequestro di intere porzioni citoplasmatiche e di piccole molecole direttamente dai lisosomi attraverso la formazione di invaginazioni circolari o tubolari della membrana che entrano nel lume lisosomiale dove vengono rapidamente degradate (Dubouloz et al., 2005). La microautofagia è coinvolta nel continuo turnover dei costituenti cellulari in condizioni basali, nella rimozione selettiva di organelli non più necessari e durante la proliferazione dei perossisomi (Farre and Subramani, 2004). Un altro fattore che partecipa a questo processo è rappresentato dal complesso VTC (*Vacuolar Transport Chaperone*), costituito dalle proteine Vtc1-4, il quale si localizza a livello della membrana vacuolare dove assume un ruolo importante nell'organizzazione delle strutture tubolari e nel distacco delle vescicole (Uttenweiler et al., 2007). Infine la macroautofagia rappresenta la principale forma di autofagia caratterizzata dal sequestro di grandi porzioni di citoplasma, proteine solubili, organelli cellulari e aggregati proteici in una struttura a doppia membrana chiamata autofagosoma. Dopo il processo di maturazione, che avviene grazie alla sua fusione con strutture multi-vescicolari o con un endosoma precoce o tardivo, il contenuto vescicolare viene degradato dalle idrolasi acide a livello lisosomiale. Questo processo

viene regolato dalla famiglia delle proteine ATG. I prodotti di degradazione ottenuti, come aminoacidi e acidi grassi liberi, vengono riportati a livello citoplasmatico grazie all'azione delle permeasi e dei trasportatori lisosomiali e possono essere successivamente utilizzati per la formazione di macromolecole essenziali o per sostenere il normale metabolismo cellulare (Levine and Klionsky, 2004).

1.5 FORMAZIONE DELL'AUTOFAGOSOMA

1.5.1 Il complesso ULK1 (Atg1)

L'identificazione della famiglia dei geni ATG nelle cellule di lievito e dei loro omologhi nei mammiferi ha permesso di descrivere e comprendere il processo generale attraverso cui l'autofagia ingloba e degrada i suoi bersagli. La prima fase del processo autofagico è costituita dall'induzione e formazione di una membrana isolata o fagoforo che costituisce l'autofagosoma, un processo regolato dall'attività di diverse complessi proteici e lipidici al quale partecipano alcuni dei geni ATG. L'origine della membrana isolata non è stata ancora definita con certezza; tuttavia studi recenti hanno dimostrato un possibile coinvolgimento del reticolo endoplasmatico (ER) (Axe et al., 2008; Hayashi-Nishino et al., 2009), della membrana mitocondriale esterna (Hailey et al., 2010) e della membrana plasmatica (Ravikumar et al., 2010). Il complesso Atg1, il cui omologo nei mammiferi è rappresentato dalla chinasi ULK1 (*Unc-51 Like Kinase*), gioca un ruolo importante nel processo d'induzione dell'autofagia agendo a valle del complesso multiproteico mTORC1 (*mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) costituito dalle proteine mTOR, Raptor, mLST8/GβL, Deptor e PRAS40 (Efeyan and Sabatini, 2010). In condizioni fisiologiche in cui vi è disponibilità di nutrienti a supporto del fabbisogno cellulare, mTORC1 possiede

attività chinastica e interagisce con il complesso Atg1 (ULK1) costituito dalle proteine Atg1-Atg13-Atg17 (FIP200) e Atg101, scoperta recentemente nei mammiferi, la quale si localizza a livello del fagoforo stabilizzando la proteina Atg13. Le proteine Atg13 e FIP200 svolgono un ruolo essenziale per l'attività della proteina chinasi ULK1 e la sua localizzazione a livello del fagoforo in via di formazione (Ganley et al., 2009).

Durante la deprivazione di nutrienti, o in seguito al trattamento con rapamicina, mTORC1 è inibita e si dissocia dal complesso Atg1 favorendo in tal modo la defosforilazione della proteina ULK1 e Atg13. Questo processo determina l'attivazione catalitica di ULK1 che, a sua volta, fosforila altri residui aminoacidici sulla proteina Atg13 e FIP200. Pertanto, l'inibizione di mTORC1 è associata all'attivazione della proteina ULK1 che, attraverso un processo che coinvolge eventi di fosforilazione e defosforilazione e alla dissociazione di diversi complessi multiproteici, induce l'attivazione dell'autofagia (Mizushima, 2010).

Recentemente è stato suggerito un altro meccanismo mediante il quale ULK1 potrebbe essere positivamente regolata in condizioni di bassi livelli di energia attraverso l'interazione con diverse subunità della chinasi energia-dipendente attivata dall'AMP (*AMP-activated protein kinase*, AMPK) (Behrends et al., 2010). Il dominio C-terminale della chinasi ULK1 regola diverse funzioni di AMPK come la sua localizzazione sull'autofagosoma, il legame con Atg13, FIP200 e Atg101, l'attività chinastica per la fosforilazione dei substrati e il cambiamento conformazionale della proteina. Studi recenti dimostrano come la regione C-terminale di ULK1 si avvolge con il dominio chinastico N-terminale mantenendo la proteina in una conformazione chiusa e favorendo la fosforilazione dei substrati (Chan et al., 2009).

Il meccanismo mediante il quale ULK1 attiva i componenti a valle del processo autofagico non è ancora interamente conosciuto; tuttavia è stato riportato come ULK1 interagisce con la proteina Ambra1 (*activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy 1*), un componente del complesso Beclin-1/fosfatilinositolo-3-chinasi classe-III (PI3K-III) (He and Levine, 2010). Infatti, la chinasi ULK1 è coinvolta nel processo di localizzazione cellulare del complesso PI3K-III che, durante la disponibilità di nutrienti, è legato alla struttura del citoscheletro. Questa interazione è mediata dalla proteina Ambra-1 attraverso il legame del complesso PI3K-III alla proteina dineina associata ai microtubuli (Di Bartolomeo et al., 2010).

In condizione di stress cellulare o di scarso apporto di nutrienti, la proteina ULK1 fosforila Ambra-1 permettendo il rilascio del complesso Ambra-1/PI3K-III dai microtubuli ed il loro trasferimento a livello del reticolo endoplasmatico, una tra le principali strutture che, si ipotizza, contribuiscono alla formazione dell'autofagosoma (Di Bartolomeo et al., 2010).

1.5.2 La proteina Beclin-1 (Atg6) e il complesso PI3K-III

La proteina Beclin-1 è espressa in diversi tessuti e si localizza principalmente all'interno di strutture citoplasmatiche come il reticolo endoplasmatico, i mitocondri e la membrana perinucleare (Kang et al., 2011). Essa è costituita da tre distinti domini: un dominio BH3 in posizione N-terminale (aa 114-123), un dominio centrale CCD (*coiled-coil domain*, aa 144-269) e un dominio conservato ECD (*evolutionarily conserved domain*, aa 244-337), importante nella fase d'induzione del processo autofagico. Inoltre Beclin-1 contiene una breve sequenza ricca in residui di leucina (NES) responsabile della trasduzione del segnale. Mutazioni nella sequenza NES riducono la capacità di Beclin-1 di attivare il processo

autofagico in seguito alla deprivazione di nutrienti o in condizioni di stress cellulare (Liang et al., 2008). Questi domini sono importanti nella formazione di complessi multiproteici con Ambra1, UVRAG e Atg14 che si legano al dominio CCD, oppure con la chinasi Vps34 che si lega ai domini CCD ed ECD. Il nucleo centrale del complesso di Beclin-1 è formato dalle proteine Beclin-1, Vps34, Vps15 e Ambra1 (He and Levine, 2010). La formazione di questo complesso multiproteico è importante per l'attivazione allosterica della PI3K di classe III, Vps34. Questa proteina favorisce la produzione di fosfoinositolo-3-fosfato e richiama altre proteine effettrici come DFCP1 (*double FYVE domain-containing protein 1*) e WIPI (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*) le quali mediano la fasi iniziali del processo di formazione dell'autofagosoma (Axe et al., 2008; Polson et al., 2010).

Numerose proteine che interagiscono con Beclin-1 hanno la capacità di attivare o inibire il processo autofagico. La proteina Ambra1 ha la capacità di legare direttamente Beclin-1 e la sua down-regolazione riduce drasticamente l'attivazione dell'autofagia in condizioni di stress cellulare (Di Bartolomeo et al., 2010) (Figura 1.7).

La proteina Atg14 (Atg14L o Barkor) è importante per l'attività della PI3K e l'induzione dell'autofagia mentre UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene*) compete con Atg14 per il legame con Beclin-1 e favorisce il processo di maturazione attraverso la fusione dell'autofagosoma con l'endosoma tardivo o il lisosoma grazie all'interazione con il complesso C-Vps/HOPS e Rab7 (He and Levine, 2010) (Figura 1.7). La proteina Bif-1 interagisce con Beclin-1 attraverso UVRAG, agisce come regolatore positivo del complesso PI3K e può favorire la curvatura della membrana nel processo di formazione dell'autofagosoma (Liang et al., 2008).

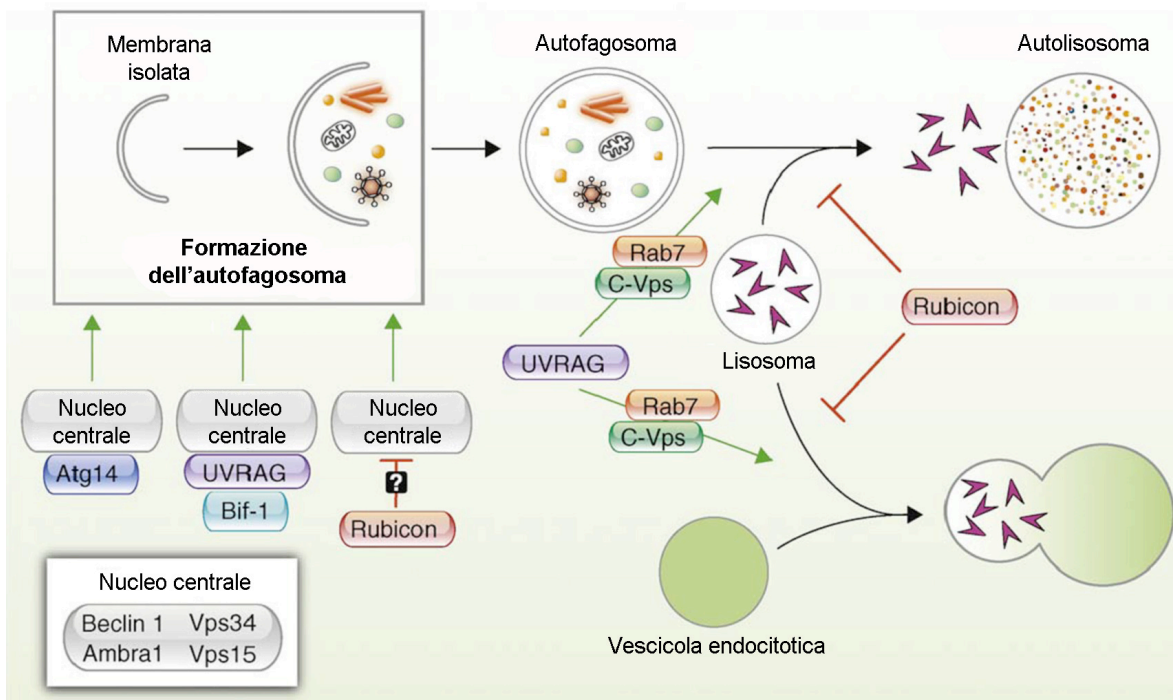


Figura 1.7 – Regolazione del complesso Beclin-1/PI3K-III.

Le proteine Beclin-1, VPS34, Vps15 e Ambra1 formano il nucleo centrale del complesso PI3K-III. Il legame di Atg14 e UVRAG/Bif1 attivano il complesso stimolando il processo di formazione dell'autofagosoma. Alcuni studi hanno dimostrato un ruolo di UVRAG nella fase di maturazione e di fusione attraverso il reclutamento delle proteine C-Vps e della GTPasi Rab7. Al contrario la proteina Rubicon inibisce il processo autofagico bloccando la fase di formazione e il processo di fusione con il lisosoma. Modificata da "Congcong and Levine, 2010. *Curr. Op. Cell. Biol.* 22, 140-149".

La proteina Rubicon (*RUN domain protein as Beclin 1 interacting and cysteine-rich containing*) si localizza a livello dell'endosoma e del lisosoma e la sua down-regolazione attraverso l'utilizzo di shRNA determina un aumento del numero di autofagosomi e l'accumulo della proteina LC3II dimostrando un effetto inibitorio sul processo autofagico (Figura 1.7). Il meccanismo con cui Rubicon esercita la sua funzione non è ancora chiaro, tuttavia la sua capacità di ridurre l'attività della chinasi Vps34 indica la possibilità che essa

eserciti la sua funzione attraverso l'interazione con il complesso Beclin-1/PI3K-III (Zhong et al., 2009).

Le proteine ad attività anti-apoptotica Bcl2, Bcl-XL e Mcl-1, regolano negativamente l'autofagia attraverso l'interazione con il dominio BH3 della proteina Beclin-1 (Maiuri et al., 2007a; Pattingre et al., 2005).

Sono stati riportati diversi meccanismi attraverso cui i segnali che inducono l'autofagia possono bloccare quest'interazione inibitoria come la competizione con proteine ad attività pro-apoptotica (Bad, Bix, Noxa, Puma, BNIP3) (Maiuri et al., 2007b), la fosforilazione del dominio BH3 della proteina Beclin-1 sul residuo Thr119 mediata dall'attivazione della chinasi DAPK (*death-associated protein kinase*) (Zalckvar et al., 2009), la fosforilazione della proteina Bcl2 attraverso la chinasi JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase-1*) (Wei et al., 2008) o l'interazione con la proteina nucleare HMGB1 (*high mobility group box 1*) (Kang et al., 2010). Questi segnali sono essenziali per il processo d'induzione dell'autofagia in risposta a specifiche forme di stress cellulare (Pattingre et al., 2009).

Altre proteine possono regolare l'attività di Beclin-1 come il recettore dell'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃), un canale al calcio localizzato a livello del reticolo endoplasmatico il quale interagisce indirettamente con Beclin-1 attraverso la proteina Bcl2 (Vicencio et al., 2009).

In condizioni di deprivazione di nutrienti o in seguito al legame di antagonisti del recettore IP₃ come la xestospongina-B, l'interazione con la proteina Beclin-1 viene bloccata e questo potrebbe spiegare come sostanze che causano una riduzione dei livelli di IP₃ inducono l'autofagia attraverso un meccanismo mTOR indipendente (Sarkar et al., 2007).

Inoltre, le molecole adattatrici del recettore TLR (*Toll-like receptor*), MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) e TRIF (*TIR-domain-containing adapter-*

inducing interferon-β), possono interagire con Beclin-1 riducendo in tal modo il legame con Bcl2 (Shi and Kehrl, 2008).

In seguito all'induzione dell'autofagia da parte del recettore TLR4, il fattore TRAF6 interagisce con Beclin-1 favorendo l'ubiquitinazione del residuo aminoacidico K63 determinando l'oligomerizzazione di Beclin-1 e aumentando l'attività del complesso PI3K-III (Shi and Kehrl, 2010).

Sebbene non sia completamente chiaro come tutte queste proteine influenzino la composizione e la funzione del complesso multiproteico Beclin-1/PI3K-III, un'ipotesi possibile è che l'interazione diretta o indiretta con la proteina Beclin-1 trasmetta diversi segnali di stress cellulare favorendo l'attivazione del processo autofagico (Shi and Kehrl, 2010).

1.5.3 Beclin-1 e la correlazione apoptosi/autofagia

Studi recenti hanno dimostrato come la proteina Beclin-1 possiede una sequenza BH3 (*Bcl-2 homology 3 domain*) necessaria per il legame della proteina Bcl-2 e Bcl-XL. La mutazione delle sequenze BH3 di entrambi i domini per la proteina Beclin-1 o Bcl-2 blocca la formazione del complesso Beclin-1/Bcl-2 e stimola l'attivazione dell'autofagia (Maiuri et al., 2007a; Sinha and Levine, 2008). Tuttavia Beclin-1, pur avendo tale dominio, non agisce come una proteina ad attività pro-apoptotica, nemmeno nei casi in cui essa venga iper-espressa (Boya and Kroemer, 2009). Al contrario, essa presenta un'attività anti-apoptotica in diverse condizioni di stress cellulare come la deprivazione di nutrienti e l'ipossia (Ciechomska et al., 2009). In *C. Elegans* la deplezione della proteina Beclin-1 attiva la morte cellulare programmata attraverso la via CED3/caspasi. Inoltre la down-

clivare Beclin-1 bloccando la sua capacità di attivare l'autofagia (Djavaheri-Mergny et al., 2010; Luo and Rubinsztein, 2010).

Il clivaggio di Beclin-1 da parte delle caspasi-3, -7 e -8 induce la formazione di frammenti che perdono la capacità di attivare l'autofagia e, in particolare, porta alla formazione di un frammento C-terminale che si localizza a livello dei mitocondri dove favorisce il rilascio di citocromo-c attivando la via intrinseca dell'apoptosi (Wirawan et al., 2010) (Figura 1.8). Inoltre, l'apoptosi indotta dalla proteina pro-apoptica Bax può bloccare l'attivazione del processo autofagico favorendo il clivaggio di Beclin-1 mediato dalla caspasi-3 sul residuo D149 mentre la mutazione di questo residuo o l'espressione della proteina Bcl-XL blocca questo processo (Luo and Rubinsztein, 2010). Tuttavia recenti studi indicano che la caspasi-8 attivata, una proteasi effettrice dei recettori di morte, può essere degradata dal processo autofagico suggerendo la presenza di un meccanismo complesso che regola l'interazione tra autofagia e apoptosi (Hou et al., 2010).

Oltre a Beclin-1, le proteine Atg5 e Atg4D, coinvolte rispettivamente nella fase di allungamento dell'autofagosoma e nella maturazione proteolitica della proteina LC3, possono essere clivate durante l'attivazione dell'apoptosi. In questo caso è stato osservato come, il clivaggio della proteina Atg5 mediato dalle proteasi calpaine, genera un frammento proteico che interagisce con la proteina Bcl-2 a livello dei mitocondri stimolando l'induzione della morte apoptotica (Yousefi et al., 2006). Sebbene il clivaggio della proteina Beclin-1 e Atg5, associato all'attivazione del processo apoptotico, inattivi l'autofagia, è stato anche dimostrato come il clivaggio della proteina autofagica Atg4D, mediato dalla caspasi-3, genera un frammento proteico che aumenta l'attività autofagica (Betin and Lane, 2009) (Figura 1.8). Così, entrambi questi processi dimostrano stimoli

cellulari e vie di trasduzione comuni indicando che fra di essi esiste una relazione complessa (Hou et al., 2010; Kang et al., 2011).

1.5.4 La proteina Atg9 e VMP1

Atg9 (mAtg9) e VMP1 sono due proteine transmembrana richieste per l'attivazione dell'autofagia nei mammiferi. Alcuni studi hanno rivelato che la proteina Atg9 è localizzata nel sistema *trans*-Golgi e nell'endosoma tardivo (He and Klionsky, 2007; Noda et al., 2000). In condizioni di deprivazioni di nutrienti o in seguito al trattamento farmacologico con rapamicina, Atg9 si ridistribuisce nei diversi compartimenti subcellulari dove colocalizza con MAP-LC3 (*Microtubule Associated Protein Light Chain 3*) e RAB7, entrambi considerate proteine tipicamente associate all'autofagosoma. Il silenziamento genico della proteina mAtg9 nei mammiferi inibisce la formazione della proteina LC3II dimostrando il ruolo cruciale di questa proteina nella regolazione dell'autofagia (Yamada et al., 2005; Young et al., 2006).

Sebbene la sua funzione non sia ancora chiara, studi condotti sulle cellule di lievito hanno dimostrato un ruolo nel trasporto di lipidi di membrana necessari alla formazione della membrana isolata, una funzione mediata anche dalla proteina Atg18 (WIPI1-4) che lega il fosfoinositolo-3-fosfato prodotto dal complesso PI3K-III e si localizza sul fagoforo in via di formazione (Polson et al., 2010).

L'attività di Atg9 richiede la presenza di Atg1 (ULK1) e l'attività chinastica della proteina Vps34 (Young et al., 2006). VMP1 interagisce con Beclin-1 e altre proteine del complesso PI3K-III a livello del fagoforo. Questa funzione è supportata dalla recente scoperta della proteina TP53INP2 (*tumor protein 53-induced nuclear protein 2*) che interagisce con

VMP1 ed è essenziale per l'attivazione del processo autofagico e la localizzazione di Beclin-1 ed LC3 sull'autofagosoma (Yang and Klionsky, 2010).

1.5.5 La proteina LC3 (Atg8) e i sistemi di coniugazione

Una volta espletata la sua funzione, il complesso PI3K-III recluta i due sistemi di coniugazione simili all'ubiquitina (Ubl), Atg12-Atg5-Atg16 e il sistema Atg8 (LC3)-PE (*phosphatidylethanolamine*) a livello del fagoforo, entrambi coinvolti nella regolazione del processo di allungamento ed espansione dell'autofagosoma (Nakatogawa et al., 2009). La prima fase di questo processo coinvolge l'attivazione della proteina Atg12 mediata dall'enzima "E1-like"-Atg7 e la successiva coniugazione alla proteina Atg5 attraverso l'azione dell'enzima "E2-like"-Atg10. Successivamente, il sistema Atg12-Atg5 viene coniugato alla proteina Atg16 attraverso un legame non-covalente formando così il complesso multimerico Atg12-Atg5-Atg16 che agisce come un enzima ad attività "E3-ligasi" sulla proteina LC3 (Yang and Klionsky, 2010) (Figura 1.9).

I livelli intracellulari della proteina Atg5 possono essere regolati dall'attivazione calcio dipendente della proteasi calpaina, la quale ha la capacità di clivare ed inattivare *in vitro* la proteina Atg5 (Yousefi et al., 2006). Pertanto, la riduzione dei livelli di calcio intracellulari o l'inattivazione della calpaina può prevenire il clivaggio di Atg5 favorendo un aumento dei suoi livelli cellulari e l'induzione dell'autofagia attraverso la coniugazione con Atg5-Atg12 (Xia et al., 2010).

La seconda fase di questo processo prevede la coniugazione della fosfatidiletanolamina (PE), un componente del doppio strato fosfolipidico, che avviene grazie alla formazione di un legame ammidico al residuo di glicina C-terminale della proteina Atg8 (LC3I)

attraverso l'azione sequenziale della proteasi Atg4, dell'enzima "E1-like"-Atg7, che attiva e trasferisce LC3 all'enzima "E2-like"-Atg3, e del complesso "E3-like" Atg12-Atg5-Atg16 che promuove la corretta localizzazione della proteina LC3 e facilita il processo di coniugazione con la fosfatidiletanolamina (Fujita et al., 2008)(Figura 1.9).

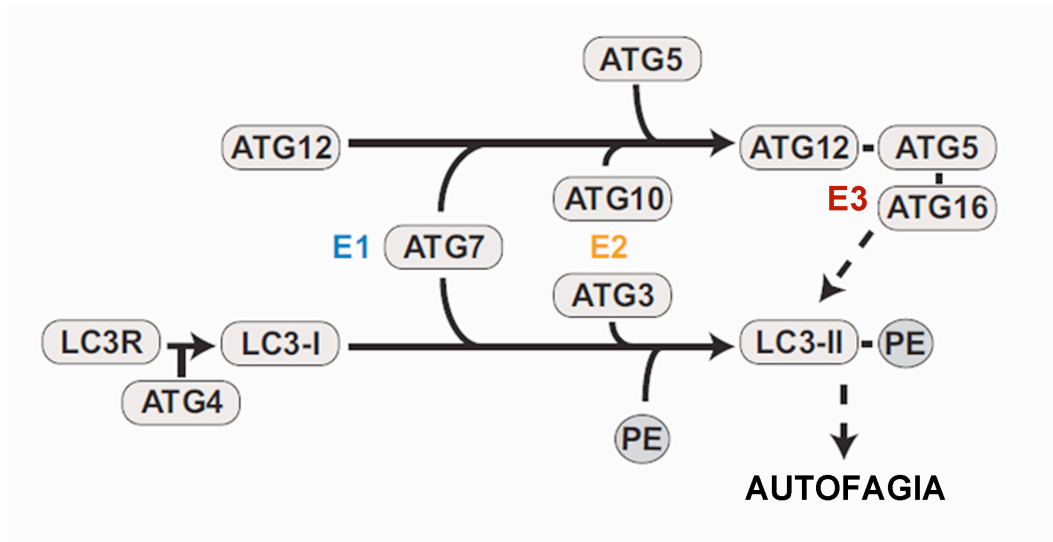


Figura 1.9 – La proteina LC3.

La fase di allungamento dell'autofagosoma è controllata da due sistemi di coniugazione. Nel primo sistema la proteina Atg12 è attivata da Atg7 (E1), trasferita su Atg10 (E2) e coniugata con Atg5 che successivamente forma un complesso con la proteina Atg16 (E3), il quale assume un ruolo importante nel reclutamento della proteina LC3-II che deriva dal secondo sistema di coniugazione. Il clivaggio della proteina LC3 da parte della proteasi Atg4 porta alla formazione di LC3-I che a sua volta viene attivata da Atg7, trasferita su Atg3 (E2) e coniugata alla fosfatidiletanolamina (PE). Questa proteina chiamata LC3-II si localizza sulla membrana dell'autofagosoma e viene degradata all'interno del lisosoma. Modificata da " Jaeger and Tony Wiss-Coray, 2009. Mol. Neurodeg. 4:16".

Questo processo di coniugazione lipidica porta alla conversione della forma solubile citosolica LC3I nella forma associata alla vescicola autofagica LC3II (Yang and Klionsky,

2010) (Figura 1.9). LC3II si lega efficacemente alla porzione interna ed esterna della membrana dell'autofagosoma ed è considerato un marker specifico dell'autofagia (Kabeya et al., 2000; Kirisako et al., 1999). Nei mammiferi sono state identificate quattro ortologhi della proteina Atg4 (A-D) e sei della proteina Atg8 tra i quali LC3B (indicata normalmente come LC3), GABARAP e GATE16 rappresentano le forme più studiate (Weidberg et al., 2010).

Una volta completata la formazione dell'autofagosoma, il complesso "E3-like" si allontana mentre LC3II, localizzata sulla membrana esterna dell'autofagosoma, viene separata dalla fosfatidiletanolamina e rilasciata nel citosol attraverso il clivaggio mediato dalla proteasi Atg4 (Kirisako et al., 2000).

Diversi segnali di stress cellulare regolano l'autofagia a livello del sistema di coniugazione. Ad esempio, la chinasi DAPK (*Death-associated protein kinase1*) regola positivamente l'autofagia attraverso il legame alla proteina MAP1B che interagisce con LC3 (Harrison et al., 2008). Al contrario la proteina c-FLIP (*cellular FLICE-like inhibitor protein*) regola negativamente l'autofagia bloccando l'attività dell'enzima "E2-like"-Atg3 (Lee et al., 2009). Altre proteine come p62/SQSTM1 (*Sequestosome1*) e la proteina NBR1 (*Neighbor of BRCA1 gene 1*) interagiscono con la proteina LC3 attraverso il dominio LIR (*LC3-Interacting Region*) agendo come adattatori per le proteine bersaglio. p62 e NBR1 regolano il trasporto e la degradazione di aggregati proteici, proteine ubiquitinate e organelli cellulari danneggiati attraverso il processo autofagico (Kirkin et al., 2009). In particolare è stato osservato come una ridotta espressione della proteina Atg7 inibisce l'autofagia portando all'accumulo di aggregati ubiquitinati che colocalizzano con la proteina p62 (Komatsu et al., 2007b). Così, l'inibizione del processo di fusione o

dell'attività lisosomiale, in particolare nei neuroni, determina un marcato accumulo della proteina p62 suggerendo che questa proteina è selettivamente degradata dall'autofagia attraverso l'interazione con LC3 (Komatsu et al., 2007a).

1.6 MATURAZIONE DELL'AUTOFAGOSOMA

1.6.1 Le proteine ESCRET, RAB-SNARE e LAMP

La fase di formazione dell'autofagosoma è seguita dalla fase di maturazione attraverso la fusione di questa struttura con endosomi precoci o tardivi (anfisoma) oppure con i corpi multi-vescicolari (MVBs), un diverso tipo di endosoma che funge da intermedio nei processi di internalizzazione di nutrienti, ligandi e recettori attraverso il sistema endo-lisosomiale (Fader et al., 2008). Lo stadio finale dell'autofagia dipende dall'attività di molecole che regolano il processo di maturazione, di acidificazione del compartimento autofagico e di riciclaggio dei metaboliti dal compartimento lisosomiale (Codogno and Meijer, 2005). L'alterazione o il blocco di uno di questi processi può portare ad un accumulo di autofagosomi e al blocco del flusso autofagico (Rubinsztein et al., 2009).

Il processo di maturazione è controllato non solo dall'interazione delle proteine UVRAG e Rubicon con il complesso Beclin-1, come descritto in precedenza, ma anche dall'azione della GTPasi Rab7, che viene stimolata dal legame di UVRAG alle proteine C-Vps e si localizza sulla membrana dell'autofagosoma favorendo la formazione dell'anfisoma o la fusione con il lisosoma (Liang et al., 2008). Altre proteine di questa famiglia come Rab11 sono coinvolte nel processo di fusione dell'autofagosoma con i componenti multi-vescicolari (MVBs) durante la deprivazione di nutrienti (Fader et al., 2008). La famiglia ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) comprende quattro diversi

complessi proteici, ESCRT-0, I, II, III, coinvolti nel trasporto di proteine di membrana ubiquitinate nei corpi multi-vescicolari e nel processo di fusione con il lisosoma (Rothman, 1994; Rusten and Stenmark, 2009). Alcuni studi hanno dimostrato come la mutazione genica o il blocco dell'espressione di ESCRT-I, II, III determina l'accumulo di autofagosomi e riduce il numero di autolisosomi che esprimono la proteina LAMP-1, indicando come il processo di fusione tra queste strutture richiede la presenza delle proteine ESCRT (Lee et al., 2007). Inoltre la proteina Vps27 (Hrs) è parte del complesso ESCRT-0 ed è importante nel processo di maturazione dell'autofagosoma e nella selezione dei componenti ubiquitinati. Essa si localizza sulla membrana dell'endosoma attraverso l'interazione del dominio FYVE con il fosfatidilinositolo-3-fosfato e la sua deplezione riduce in modo significativo il numero di autofagolisosomi nella cellula (Tamai et al., 2007). Tuttavia lo stadio finale del processo autofagico dipende dalla presenza di un secondo sistema chiamato RAB-SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) costituito da un complesso di proteine che attraverso il dominio transmembrana regolano il processo di fusione tra i doppi strati lipidici (Cai et al., 2007).

In base alla loro localizzazione è possibile distinguere le proteine vescicolari (v)-SNAREs come Ykt6 e Nyv1 e le proteine bersaglio di membrana (t)-SNAREs come Vam3, Vam7 e Vti1 (Nichols et al., 1997). Il complesso HOPS (*homotypic fusion and protein sorting*) è formato da quattro proteine C-Vps chiamate Vps11, 13, 18, 33 la cui funzione è quella di interagire con la proteina (t)-SNARE Vam3 e la GTPasi vacuolare Ytp7 attraverso Vps33. Durante il processo di fusione l'interazione tra queste proteine favorisce il primo contatto tra i vacuoli bersaglio. Inoltre diverse evidenze sperimentali indicano che il complesso

HOPS interviene nella fase precoce di attracco e fusione delle vescicole insieme al complesso SNAREs e alla proteina Rab7 (Sato et al., 2000; Seals et al., 2000). Quest'ultima passa continuamente dalla conformazione attiva che lega GTP a quella inattiva che lega GDP favorendo rispettivamente l'interazione o la dissociazione con le proteine effettrici durante il processo di fusione vescicolare (Somsel Rodman and Wandinger-Ness, 2000). La proteina Rab24 è localizzata normalmente nel reticolo endoplasmatico e nel *cis*-Golgi. In condizione di deprivazione di nutrienti si assiste ad un cambiamento della sua distribuzione e, in particolare, alla colocalizzazione con la proteina LC3 sulla membrana dell'autofagosoma (Egami et al., 2005).

Infine, la famiglia LAMP è formata da proteine transmembrana glicosilate distribuite sulla membrana dei lisosomi coinvolte nel processo di fusione e nel riconoscimento di substrati specifici come accade nell'autofagia chaperone-mediata. Alcuni studi hanno dimostrato come la proteina LAMP-2 possa essere coinvolta anche nel processo di maturazione dell'autofagosoma e nella distribuzione sub-cellulare di Rab7 (Saftig et al., 2008) e come la degradazione del contenuto vescicolare e di proteine a lunga emivita in condizioni di stress cellulare è inibita in colture di epatociti che non esprimono l'isoforma LAMP-2 suggerendo pertanto che questa proteina svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del processo autofagico (Tanaka et al., 2000).

1.7 LA FASE DI DEGRADAZIONE

La fase finale del processo autofagico è caratterizzata dalla rottura della membrana dell'autofagosoma regolata dall'azione della lipasi Atg15 e dal rilascio del suo contenuto nel lume lisosomiale dove viene degradato attraverso l'azione di diversi enzimi. Questo

processo dipende dall'attività di proteasi come la proteinasi-A/B, endopeptidasi come le catepsine-B, D, L, lipasi, fosfolipasi, glicosidasi e dall'acidificazione del compartimento lisosomiale (Nakamura et al., 1997). Il silenziamento dei geni che codificano per le proteasi coinvolte o l'utilizzo di inibitori specifici ha dimostrato un accumulo di vacuoli autofagici che invece sono rapidamente degradati una volta ripristinata la loro attività (Klionsky, 2005).

L'acidificazione del lume lisosomiale dipende dall'attivazione dell'ATPasi vacuolare (v-ATPase) (Forgac, 2007). L'inibizione della sua attività attraverso l'utilizzo della Bafilomicina-A1 blocca l'apporto di ioni H^+ all'interno dei lisosomi inibendo gli enzimi lisosomiali, i quali sono attivati a basso pH. Così la Bafilomicina-A1 agisce nella fase finale del processo autofagico bloccando il processo maturazione e prevenendo la degradazione del contenuto vescicolare (Yamamoto et al., 1998). I prodotti di degradazione ottenuti, come aminoacidi e monosaccaridi, vengono infine veicolati nel citosol attraverso l'attività di proteine trasportatrici come la permeasi Atg22 e possono essere utilizzati per la formazione di macromolecole complesse o per il mantenimento del metabolismo energetico cellulare (Yang et al., 2006).

2. SCOPO DELLA TESI

Numerosi fattori contribuiscono alla morte delle cellule ganglionari retiniche che si verifica nei pazienti colpiti dal glaucoma. Tuttavia, sebbene l'aumento della pressione intraoculare sia stata individuata come un importante fattore di rischio, le cause iniziali ed i meccanismi molecolari alla base della patologia sono ancora in parte sconosciuti.

L'autofagia è un processo evolutivamente conservato attraverso il quale le cellule eucariotiche regolano il *turnover* di proteine a lunga emivita ed organelli cellulari, ed eliminano componenti tossici o danneggiati, allo scopo di mantenere i livelli energetici e l'omeostasi cellulare (He and Klionsky, 2009). L'autofagia è presente normalmente a livelli basali in tutte le cellule e agisce come un importante meccanismo neuroprotettivo che permette alla cellula di sopravvivere in risposta a molteplici condizioni di stress cellulare (Komatsu et al., 2007b; Levine and Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008). Una crescente attenzione è stata recentemente focalizzata sul ruolo svolto da questo processo nella morte neuronale, evidenziandone il coinvolgimento sia nel danno neuronale acuto che in malattie neurodegenerative croniche (Jaeger and Wyss-Coray, 2009).

Le caratteristiche neurodegenerative del glaucoma risultano simili a quelle osservate nei disordini neurodegenerativi centrali; nel glaucoma si osserva, infatti, la morte selettiva di uno specifico tipo neuronale (le cellule ganglionari retiniche) (Quigley et al., 1995), l'accumulo di aggregati proteici (McKinnon et al., 2002; Yoneda et al., 2005) e l'aumentata incidenza correlata all'avanzare dell'età (Leske et al., 2001; Mukesh et al., 2002). Tuttavia, nonostante i numerosi studi sul ruolo dell'autofagia nelle malattie neurodegenerative, il ruolo di tale processo nella degenerazione retinica rimane poco studiato ed i dati presenti in letteratura non permettono di trarre conclusioni definitive sul

ruolo svolto dall'autofagia nei meccanismi di danno e morte delle cellule ganglionari retiniche.

Pertanto, il presente lavoro di ricerca si propone di delineare il ruolo del processo autofagico nella morte delle cellule ganglionari retiniche in modelli sperimentali in vivo ed in vitro di danno glaucomatoso.

In dettaglio gli obiettivi preposti sono i seguenti:

- verificare il coinvolgimento dell'autofagia in un modello sperimentale di glaucoma acuto *in vivo* ottenuto attraverso l'aumento transitorio della pressione intraoculare. Verranno pertanto valutati il profilo temporale, l'entità della modulazione e la distribuzione di proteine coinvolte nella progressione del programma autofagico, sia in condizioni basali che dopo esposizione allo stimolo ischemico indotto dall'aumento della pressione intraoculare;
- valutare l'effetto della deprivazione di fattori trofici sulla via autofagica in colture di cellule ganglionari retiniche (RGC-5);
- indagare sulle possibili correlazioni e interazioni molecolari che intercorrono tra l'autofagia e morte cellulare nelle cellule ganglionari retiniche;
- studiare il ruolo dell'autofagia sulla vitalità cellulare attraverso la manipolazione farmacologica e il silenziamento genico di proteine coinvolte nell'attivazione di questo processo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 STUDI IN VIVO

3.1.1 Animali

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando ratti maschi del ceppo Wistar del peso di 280 - 330g forniti dalla Charles – River (Lecco, Italia), stabulati in condizioni controllate di temperatura (22°C), umidità relativa (65%) ed illuminazione, con un ciclo luce/buio di 12 ore e con libero accesso ad acqua e cibo. Tutti gli studi sono stati effettuati nel pieno rispetto delle direttive del Ministero della Salute per la cura degli animali secondo il D.M. 116/1992.

3.1.2 Ischemia retinica

L'ischemia retinica è stata indotta nell'occhio destro del ratto adulto attraverso l'aumento acuto della pressione intraoculare (IOP) secondo un metodo precedentemente descritto (Buchi et al., 1991; Osborne et al., 2004). Il modello sperimentale è considerato un modello animale di glaucoma primario ad angolo chiuso e conduce al danno e progressiva perdita delle cellule ganglionari retiniche.

Gli animali sono stati anestetizzati attraverso l'iniezione intraperitoneale di uretano (1,5 g/Kg), adagiati su un tappetino riscaldato in modo da mantenere una temperatura corporea di 37°C ed immobilizzati con l'ausilio di un apparato stereotassico. L'anestesia locale è stata indotta utilizzando gocce oculari di Ossibuprocaina 0.4% (Novesina, Novartis, Varese, Italia). Nella camera anteriore dell'occhio destro è stato inserito un ago da infusione da 27-gauge, collegato ad un flacone di soluzione salina sterile da 500 ml,

innalzato ad un'altezza tale da produrre una pressione intraoculare pari a 120 mmHg per un periodo di 50 minuti.

Questo valore, al di sopra dei normali livelli pressori di perfusione oculare (13-18mmHg), determina una condizione ischemica dovuta al blocco del flusso ematico attraverso l'arteria retinica centrale e quindi una riduzione dell'apporto di ossigeno e substrati metabolici, alterando la normale omeostasi cellulare e producendo alterazioni morfologiche e funzionali di entità variabile in relazione alla durata e all'intensità dell'insulto (Adachi et al., 1996).

L'ischemia retinica è stata confermata osservando il progressivo sbiancamento dell'iride e la perdita del riflesso rosso retinico. Per ciascun animale l'occhio sinistro è stato utilizzato come controllo non ischemico.

La temperatura corporea è stata monitorata prima e dopo l'induzione dell'ischemia. Gli animali con una temperatura corporea inferiore a 35.8 °C sono stati esclusi dallo studio. I ratti sono stati sacrificati, previa somministrazione di una dose subletale di cloralio idrato, attraverso dislocazione cervicale alla fine dell'ischemia (T=0h), a diversi periodi di riperfusione (1, 6, 24h) oppure 7 giorni dopo l'ischemia. Al termine della procedura sperimentale gli occhi sono stati enucleati e la retina rapidamente isolata per la successiva analisi.

3.1.3 Somministrazioni intravitreali

L'antagonista non competitivo dei recettori NMDA del glutammato, MK-801 (Sigma-Aldrich), è stato disciolto in PBS. Le soluzioni madre degli inibitori delle calpaine MDL28170 e SJA6017 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) sono state preparate utilizzando

dimetil-solfossido sterile (DMSO) alle concentrazioni iniziali rispettivamente di 10mM e 20mM. Questi stock sono stati successivamente diluiti alle concentrazioni finali opportune utilizzando PBS sterile.

Il trattamento con MK801, (50nmol, 5µl/occhio) (Joo et al., 1999; Russo et al., 2008), MDL28170 (0.5-1.0mM, 3µl/occhio), SJA6017 (0.5-1.0mM, 3µl/occhio) o con i rispettivi veicoli (PBS oppure DMSO 2.5-5% in PBS, 3µl/occhio), è stato realizzato attraverso due somministrazioni intravitreali effettuate 5 minuti prima dell'ischemia ed all'inizio del periodo di riperfusione L'iniezione intravitreale è stata eseguita praticando un foro con un ago da 23-gauge in prossimità della giunzione corneosclerale e la somministrazione effettuata in un periodo di tempo di circa 3 minuti, utilizzando una siringa Hamilton da 5µl (Bonaduz, GR, Svizzera). Gli animali sono stati sacrificati dopo 1h di riperfusione. I soggetti con un danno visibile alla lente o con evidenti segni di emorragia sono stati esclusi dallo studio.

3.1.4 Knockdown dell'espressione della subunità-1 delle Calpaine (CAPNS1) e di Beclin-1 (BECN1) mediante l'utilizzo di siRNA

Il silenziamento *in vitro* della proteina Beclin-1 (BECN1) (coiled-coil, myosin-like Bcl-2-interacting protein, NM053739) (ON-TARGET plus SMARTpool L-099237-01) e, *in vivo*, della subunità-1 delle proteasi Ca²⁺-dipendenti Calpaine (CAPNS1) (calpain small-subunit 1, NM017118) (ON-TARGET plus SMARTpool L-082111-01) è stato ottenuto attraverso l'utilizzo di un siRNA (*small interfering RNA*) specifico per il ratto (Dharmacon, Chicago, IL, USA). Il siRNA è stato ricostituito in H₂O priva di RNAsi alla concentrazione finale di 100 µM. La somministrazione intravitreale dell'siRNA (10µg/occhio) è stata effettuata in

condizioni controllate, 72h prima dell'ischemia, attraverso l'utilizzo di una siringa Hamilton da 10 μ l (Bonaduz, GR, Svizzera). Gli animali di controllo sono stati trattati utilizzando una sequenza *scramble* (ON-TARGET plus Non-Targeting Pool D-001819-10) in modo tale da escludere qualsiasi effetto non specifico.

Per il silenziamento *in vitro* della proteina Beclin-1 le cellule RGC-5 sono state trasfettate, 24h prima della deprivazione di nutrienti, con l'siRNA specifico alla concentrazione finale di 25nM utilizzando come reagente di transfezione la Lipofectamina 2000 (Invitrogen Carlsband, CA, USA).

3.1.5 Western blotting

I livelli di espressione di proteine specifiche sono stati quantificati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti e riducenti. Il western blotting rappresenta una delle tecniche maggiormente utilizzate per la separazione di miscele di proteine in base al loro peso molecolare che successivamente vengono riconosciute mediante l'uso di anticorpi specifici.

Le retine isolate sono state omogeneizzate utilizzando un potter vetro/teflon in 130 μ l contenente (50 mM Tris-HCl (pH=8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% IGEPAL, 0.5% sodio deossicolato) contenente inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e inibitori delle fosfatasi (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Le cellule RGC-5 (150.000/pozzetto) sono state lisate direttamente in piastra in 80 μ l di tampone di lisi RIPA.

I campioni sono stati centrifugati a 10.000 g x 15 minuti a 4°C, il supernatante recuperato e la concentrazione proteica determinata utilizzando il metodo DC per l'analisi delle proteine

(BioRad Laboratories, Milano, Italia). Si tratta di un saggio di tipo colorimetrico per la concentrazione delle proteine in seguito alla solubilizzazione mediata da detergenti. Il kit è formato principalmente da una soluzione alcalina di rame tartrato e dal reagente di Folin. Le proteine reagiscono prima con il rame a pH alcalino ed in seguito determinano la riduzione del reagente di Folin, effettuata dagli aminoacidi tirosina e triptofano, portando alla formazione di specie ridotte che mostrano una tipica colorazione blu. Seguendo tale procedura i campioni sono stati quindi caricati su una piastra a 96 pozzetti e la concentrazione proteica valutata mediante la lettura dell'assorbanza a 690 nm utilizzando uno spettrofotometro a piastre (Labsystem Multiskan MS, Helsinki, Finlandia).

Una quantità specifica di proteine, valutata in base al prodotto genico di interesse (8-20 μ g), è stata risolta attraverso elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) a concentrazione stabilita e successivamente trasferita su membrana PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) (Immobilon-P, Millipore Corporation). Per verificare l'effettivo trasferimento delle proteine, la membrana è stata colorata con il colorante Rosso Ponceau e successivamente decolorata attraverso lavaggi in PBS. I siti aspecifici presenti sulla membrana sono stati bloccati utilizzando latte al 5% disciolto in un tampone salino contenente Tris 10mM, (pH8), NaCl 150mM, Tween20 0.05% (TBS-T) per 1 ora a temperatura ambiente.

La membrana è stata quindi incubata per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo primario specifico diretto contro la proteina d'interesse. Gli anticorpi utilizzati e le corrispondenti diluizioni sono riportate in Tab-1:

ANTICORPO	DILUIZIONE	PROVENIENZA
anti-Beclin-1	1:4000	MBL Int.Corp.
anti-LC3	1:3000	MBL Int.Corp.
anti-p62(SQSTM1)	1:1000	MBL Int.Corp.
anti-Atg4	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-Atg7	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-Atg12	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-mAb-Beclin-1	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-spectrina	1:3000	Chemicon Int.Inc.
anti- α -tubulina (B-5-1-2)	1:20.000	Sigma-Aldrich
anti-GAPDH	1:30.000	Sigma-Aldrich
anti-actina (AC-40)	1:1000	Applied Biosystem

Tab-1 – *Elenco degli anticorpi e delle rispettive diluizioni utilizzate.*

Il segnale è stato rilevato mediante l'utilizzo di un anticorpo secondario IgG (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) coniugato con perossidasi di rafano, incubato per 1 ora a temperatura ambiente, e l'attività enzimatica determinata in chemiluminescenza (ECL, Amersham Biosciencies, GE Healthcare, Milano, Italia). In particolare la perossidasi di rafano, in presenza di acqua ossigenata e di luminolo, determina l'ossidazione di quest'ultimo componente portando all'emissione di luce che viene rilevata esponendo la membrana ad una lastra fotografica. Infine i livelli di espressione delle proteine ibridate

sono stati quantizzati mediante analisi densitometrica delle bande fotografiche attraverso l'utilizzo del software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

3.1.6 Immunoistochimica

Questa tecnica ci permette di rilevare a livello del tessuto retinico la presenza e la localizzazione cellulare e subcellulare di antigeni mediante l'utilizzo di anticorpi specifici. Immediatamente dopo il sacrificio entrambi gli occhi sono stati enucleati e fissati in paraformaldeide (PFA) al 2% ad una temperatura di 4°C per 10 minuti. La porzione anteriore dell'occhio è stata rimossa mentre quella posteriore ulteriormente fissata in PFA al 4% per 1h e in seguito crioprotetta in sucrosio al 30% per 12h. Successivamente i campioni sono stati inclusi in un composto crioprotettivo (OCT, Tissue-Tek, Sakura Finetek, Europe) e velocemente congelati in azoto liquido. Sono state quindi praticate delle sezioni retiniche dello spessore di 10 µm utilizzando un criostato (Leica-CM3050S), successivamente montate su vetrini portaoggetto (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) e conservate a -80°C fino al momento dell'uso. Le sezioni sono state idratate utilizzando un tampone fosfato salino (PBS), permeabilizzate in PBS/Triton-X100 0,3% per 30 minuti ed i siti aspecifici bloccati mediante l'incubazione con siero d'asino al 10% per 1h a temperatura ambiente (Sigma, Milano, Italia).

L'incubazione con gli anticorpi primari anti-Bcl-1 (1:50, MBL International Corporation), anti-TUJ1 (βIII tubulina) (1:500; BabCo, Richmond, USA) utilizzato per identificare le cellule ganglionari retiniche adulte (Cui et al., 2003; Snow and Robson, 1994), anti-GFAP (1:800; MAB360; Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA) utilizzato per identificare le cellule di Muller, è stata effettuata per tutta la notte a 4°C in siero

d'asino al 5% all'interno di una camera umidificata. La presenza di segnali aspecifici dovuti al solo anticorpo secondario è stata valutata mediante l'incubazione di sezioni controllo con la soluzione d'incubazione priva dell'anticorpo primario. Al termine dell'incubazione con l'anticorpo primario, le sezioni sono state lavate in PBS e incubate al buio per 1h in siero d'asino al 5% con l'anticorpo secondario Alexa Fluor 488 (1:300) e Alexa Fluor 594 (1:500) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Infine i vetrini sono stati montati con un mezzo montante (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) contenente il colorante nucleare DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindolo) e le immagini acquisite utilizzando un microscopio a deconvoluzione (Leica EL6000, CMS GbH, Mannheim, Germany).

3.2 STUDI IN VITRO

3.2.1 Colture cellulari e trattamenti

La linea continua di cellule ganglionari retiniche (RGC-5) proviene da colture retiniche di ratto ad un giorno di vita post-natale trasformate con il retrovirus 2 ψ -E1A, dalle quali è stato selezionato il clone 5 (ATCC, Manassas, VA, USA) (Krishnamoorthy et al., 2001). Attualmente, questa linea cellulare è l'unica linea continua di cellule ganglionari retiniche disponibile (Das et al., 2006; Liu et al., 2007; McKernan et al., 2007; Shimazawa et al., 2005). Queste cellule risultano positive ai marker neuronali specifici per le cellule ganglionari retiniche come Thy-1, Brn-3c, Neuritina, NMDA-R1, GABA_B-R, sinptofisina e neurotrofine mentre non esprimono il marker gliale delle cellule di Muller (GFAP), delle cellule amacrine (HPC-1/Syntaxina) o delle cellule orizzontali (8A1) (Krishnamoorthy et al., 2001).

Le cellule sono state coltivate in terreno di coltura Eagle modificato secondo Dulbecco con L-glutammina (DMEM; Invitrogen, Carlsband, CA, USA) completo di siero bovino fetale al 10% (FBS; Invitrogen, Carlsband, CA, USA) e mantenute ad una temperature di 37°C in atmosfera controllata al 5% di CO₂. In base ai diversi esperimenti le cellule sono state seminate in piastre a 6 o 96 pozzetti o in capsule petri da 10cm e in seguito mantenute in coltura per 24h prima dei trattamenti con le diverse sostanze.

Negli esperimenti di deprivazione da siero, le cellule sono state sottoposte a deprivazione per 24h e in seguito trattate con Bafilomicina-A1 (Baf1A; 100 nM; Sigma-Aldrich, Milano, Italia) o 3-metil-adenina (3-MA; 10 mM; Sigma-Aldrich, Milano, Italia) mantenute nel mezzo di coltura durante tutto il periodo della deprivazione da siero. Le colture di controllo sono state trattate con il rispettivo veicolo.

3.2.2 Saggio di vitalità cellulare MTT

La vitalità delle RGC-5 è stata valutata mediante l'analisi della funzionalità delle deidrogenasi mitocondriali utilizzando come substrato il composto solubile 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5, difeniltetrazolio bromuro (MTT; Sigma-Aldrich, Milano, Italia). L'attività delle deidrogenasi mitocondriali nelle cellule vitali riduce l'MTT portando alla formazione di formazano, un composto non solubile in acqua e otticamente attivo alla lunghezza d'onda di 540nm (Mosmann, 1983).

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti, con una densità di 1500 cellule per pozzetto, e sottoposte ai diversi trattamenti farmacologici. Al termine dell'esposizione ai farmaci, il mezzo di coltura è stato rimosso, le cellule sono state lavate in tampone fosfato salino (PBS) con Ca²⁺ e Mg²⁺ e successivamente incubate in una soluzione di PBS con

glucosio (10mM), CaCl₂ e MgCl₂ (1,2mM) contenente l'MTT (100µl/pozzetto) alla concentrazione di 0,5 mg/ml per 2h a 37°C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂. In seguito la soluzione è stata rimossa ed i sali di formazano solubilizzati in dimetilsolfossido (100µl/pozzetto) (DMSO, Carlo Erba, Italia). I valori d'assorbanza sono stati rilevati utilizzando uno spettrofotometro mediante lettura alla lunghezza d'onda di 540/690nm (Labsystems Multiskan, MS). I dati ottenuti sono stati espressi come percentuale di sopravvivenza delle cellule trattate rispetto al valore della densità ottica delle cellule di controllo (mantenute in FBS al 10%) posto uguale a 100%.

3.2.3 Test di vitalità cellulare FDI/PI

Il test biparametrico FDA/PI è basato essenzialmente sull'integrità della membrana plasmatica e ci permette di distinguere le cellule vitali da quelle apoptotiche e necrotiche. La fluoresceina-diacetato (FDA) è un composto liposolubile non fluorescente che attraversa facilmente le membrane cellulari e viene idrolizzato nelle cellule metabolicamente attive dalle esterasi cellulari, portando alla formazione di fluoresceina, una sostanza fluorescente verde di natura polare che rimane all'interno della cellula e agisce pertanto come marker delle cellule vitali. Al contrario, lo ioduro-di-propidio (PI) è escluso dalla membrana citoplasmatica a meno che essa non sia danneggiata. Così la positività al PI si manifesterà solo nelle cellule necrotiche o in tarda apoptosi, mentre le cellule vitali saranno negative per il fluorocromo. Le cellule sono state seminate in piastre a 6 pozzetti da 35mm di diametro alla densità di 10×10^6 cellule per pozzetto. Dopo 24 ore il terreno è stato rimosso e sostituito con DMEM al 10% FBS per le cellule controllo o 0% FBS per quelle sottoposte a deprivazione di nutrienti. Dopo 24 ore di trattamento le cellule

sono state raccolte, lavate in tampone fosfato salino (PBS), centrifugate a 1000 g per 6 minuti ed il pellet risospeso e incubato per 5 minuti in 1ml di una soluzione di colorazione contenente FDA 100 μ M e PI 100 μ g/ml in PBS. I campioni sono stati acquisiti (10000 eventi per campione) ed analizzati utilizzando un citofluorimetro FACScalibur (Necton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

3.2.4 Analisi del ciclo cellulare e dell'ipodiploidia

Per l'analisi delle fasi del ciclo cellulare le cellule sono state colorate con PI. Questo colorante si intercala fra le basi del DNA e genera una fluorescenza proporzionale alla quantità di materiale nucleico presente all'interno della cellula, permettendo di discriminare le cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare (n = cellule in fase G0/G1; $>n$ = cellule in fase S; $2n$ = cellule in fase M). Poiché il PI non attraversa le membrane, è necessario prima fissare e permeabilizzare le cellule. Questo processo facilita la fuoriuscita del DNA frammentato che caratterizza le cellule apoptotiche, determinandone una riduzione del contenuto nucleare (nuclei ipodiploidi, picco sub-G1) e una minore fluorescenza rispetto ai nuclei delle cellule vive o necrotiche.

Per l'analisi, le cellule sono state raccolte in seguito al trattamento con tripsina, lavate e risospese in 300 μ L di PBS; quindi, le cellule sono state fissate in etanolo al 70% per 24h ad una temperatura di -20° C. Successivamente, il fissativo è stato allontanato attraverso lavaggi in buffer fosfato salino (PBS) ed il pellet risospeso in 250 μ l di una soluzione di PBS contenente Triton X-100 0,1% e PI 20 μ g/ml a cui sono stati aggiunti 50 μ l di RNAsi priva di DNAsi (1mg/ml; Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Le cellule sono state incubate a temperatura ambiente per 30 minuti ed i campioni acquisiti (30.000 eventi totali per

campione) ed analizzati utilizzando un citofluorimetro FACScalibur (Necton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

3.2.5 Immunocitochimica

Le cellule ganglionari retiniche RGC-5 sono state piastrate su vetrini e, alla fine dei trattamenti stabiliti, fissate in paraformaldeide (PFA) al 4% (Sigma, Milano, Italia) per 20 minuti a temperatura ambiente. In seguito sono state permeabilizzate con una soluzione di PBS/Triton-X100 0,3% per 5 minuti ed i siti aspecifici bloccati con siero d'asino (DS 10%/PBS) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per 30 minuti. Sono stati utilizzati gli anticorpi primari anti-LC3 (MBL, International Corporation; 1:200) e anti-Caspasi-3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA, 1:500) (DS 5%/PBS) incubati per 1h a temperatura ambiente (RT). Dopo tre lavaggi in PBS, i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo secondario fluorescente Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; 1:500) (DS 5%/PBS) per 1h a temperatura ambiente. Infine i vetrini sono stati montati con il mezzo montante Vectashield contenente il colorante nucleare DAPI (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio a deconvoluzione (Leica EL6000, CMS GbH, Mannheim, Germania).

3.2.6 Analisi statistiche

I dati sono stati espressi come media \pm l'errore standard (SEM) di 3-6 esperimenti indipendenti. Per ogni set sperimentale il valore dell'occhio controlaterale è stato posto arbitrariamente pari ad 1. Le differenze fra le medie sono state valutate attraverso il test-t di Student oppure l'analisi della varianza ad una via (ANOVA), seguita dal test di Tukey-

Kramer o di Newman-Keuls per comparazioni multiple (GraPad-Instat Software, San Diego, CA, USA). I valori di $P < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

4. RISULTATI

4.1 STUDI IN VIVO

4.1.1 Localizzazione della proteina Beclin-1 nella retina normale di ratto

La proteina Beclin-1 è parte del complesso multiproteico della PI3K-III e assume un ruolo fondamentale nel processo di formazione dell'autofagosoma (Sinha and Levine, 2008). Nella fase iniziale di questo studio abbiamo voluto verificare la distribuzione della proteina Beclin-1 nella retina attraverso l'analisi in immunistochemica. L'immunoreattività della proteina Beclin-1 risulta distribuita in tutti gli strati retinici con un'espressione più elevata nello strato delle cellule ganglionari retiniche (GCL) (Figura 4.1a).

Lo strato GCL è costituito sia dalle cellule ganglionari retiniche che dai prolungamenti assonali delle cellule di Muller che circondano i corpi cellulari e i dendriti delle GCL svolgendo un ruolo di supporto metabolico, strutturale e regolando la concentrazione di ioni e neurotrasmettitori nello spazio extracellulare (Barbour et al., 1988; Newman, 1985; Tezel, 2009).

Pertanto, allo scopo di verificare in quali tipi cellulari del GCL fosse più marcata la presenza della proteina Beclin-1, è stata condotta una doppia immunofluorescenza utilizzando un marker specifico per le cellule ganglionari retiniche adulte (TUJ1) (Cui et al., 2003) ed uno per le cellule di Muller (GFAP). A livello del GCL, il segnale della proteina beclin-1 colocalizza parzialmente con il compartimento citoplasmatico e dendritico delle cellule ganglionari retiniche TUJ1-positivo (in verde) e con i processi cellulari delle cellule di Muller GFAP-positivi (in rosso) che si sviluppano intorno ad esse (Figura 4.1b, c).

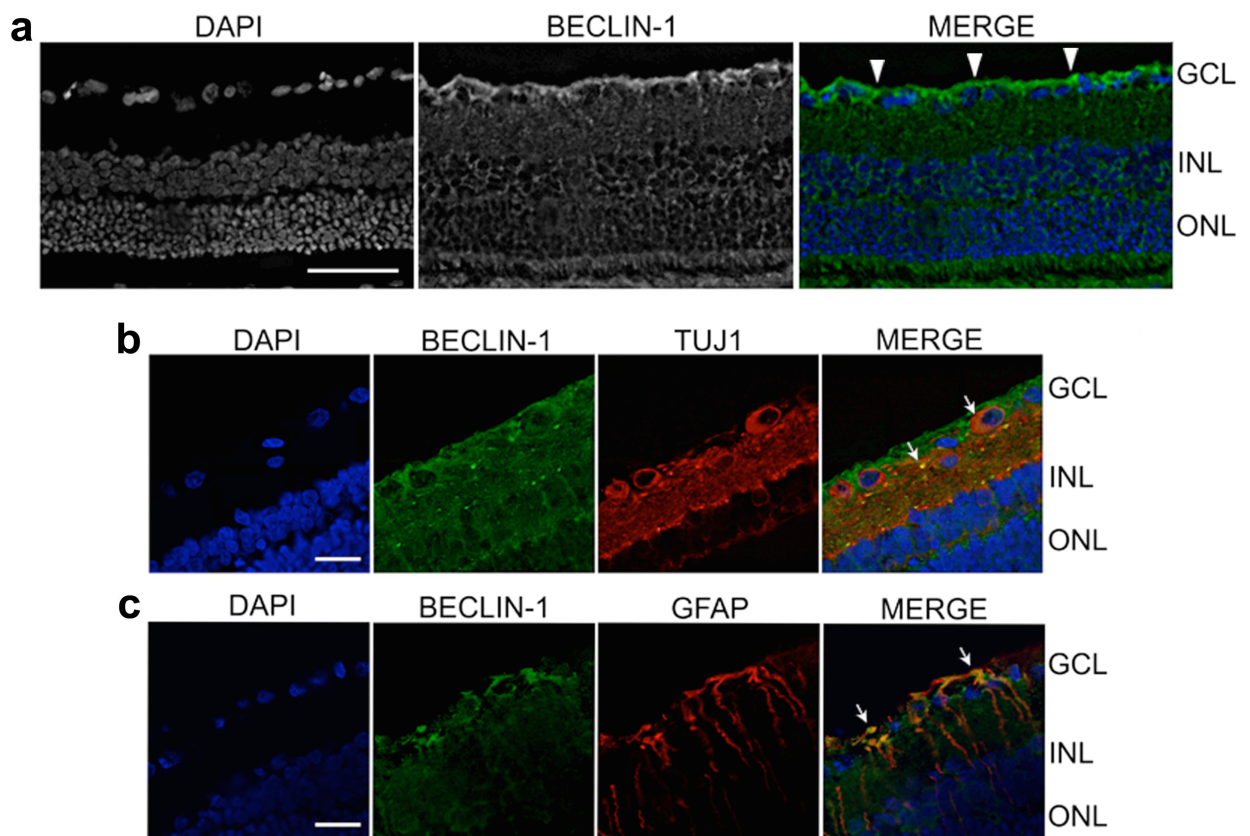


Figura 4.1 – Distribuzione della proteina Beclin-1 nella retina.

(a) L'immunofluorescenza mostra la localizzazione diffusa di beclin-1 (in verde) in tutti gli strati retinici e, in particolare, una maggiore intensità nello strato delle cellule ganglionari (freccie). I nuclei sono stati colorati con il colorante DAPI (barra di scala=50 μ m). (b) La proteina Beclin-1 si distribuisce in modo specifico nella porzione citosolica e dendritico delle cellule ganglionari retiniche TUJ1-positivo (in rosso). (c) Il segnale della proteina Beclin-1 (in verde) colocalizza (in giallo) con i processi cellulari delle cellule di Muller GFAP-positivo (in rosso) che circondano le cellule ganglionari retiniche (barra di scala=20 μ m). GCL, strato delle cellule ganglionari retiniche; INL, strato nucleare interno; ONL, strato nucleare esterno.

4.1.2 L'espressione delle proteine autofagiche LC3II, p62 e Beclin-1 si riduce in seguito all'ischemia/riperfusion retinica

Per valutare se l'autofagia fosse modulata nella retina di ratto in seguito all'insulto ischemico, sono stati monitorati i livelli di espressione di proteine tipicamente associate a questo processo quali LC3, p62 e Beclin-1.

La proteina LC3 esiste in due forme: una forma citosolica (LC3I) e una forma coniugata alla fosfatidil-etanolamina (LC3II). Quest'ultima è associata alla membrana dell'autofagosoma ed è considerata un marker specifico del processo autofagico (Kabeya et al., 2000). L'analisi in western blotting dimostra come i livelli della proteina LC3II sono significativamente ridotti nella retina ischemica (D), a 0 e 1h di riperfusione rispetto all'occhio sinistro non ischemico (S) e ritornano ai livelli basali dopo 24h di riperfusione. Non si osserva invece nessuna variazione significativa della forma citosolica LC3I ai diversi tempi studiati (Figura 4.2a).

La proteina p62 si localizza sulla membrana dell'autofagosoma attraverso l'interazione con LC3II e regola la formazione e la degradazione di proteine alterate e aggregati proteici ubiquitinati (Kirkin et al., 2009). L'ischemia/riperfusion retinica è associata, sebbene in modo non significativo, ad una riduzione dei livelli di espressione di p62 ad 1h di riperfusione nell'occhio destro (D) ischemico confrontato con il sinistro (S) non ischemico (Figura 4.2a).

Infine, sono stati valutati i livelli di espressione della proteina Beclin-1 che agisce come nucleo centrale del complesso PI3K-III nel processo iniziale di formazione dell'autofagosoma (He and Levine, 2010). L'analisi in western blotting mostra una riduzione dell'espressione della proteina al di sotto dei livelli basali nelle prime 24h di

riperfusion. In particolare si osserva una riduzione significativa ad 1h di riperfusion, pari al 36%, nell'occhio destro ischemico (D) rispetto all'occhio controlaterale non ischemico (S) (Figura 4.2b).

Dopo 7 giorni di riperfusion, i livelli di espressione delle proteine LC3II e Beclin-1 nell'occhio destro ischemico (D) risultano paragonabili ai livelli basali della retina non ischemica (S) (Figura 4.2c).

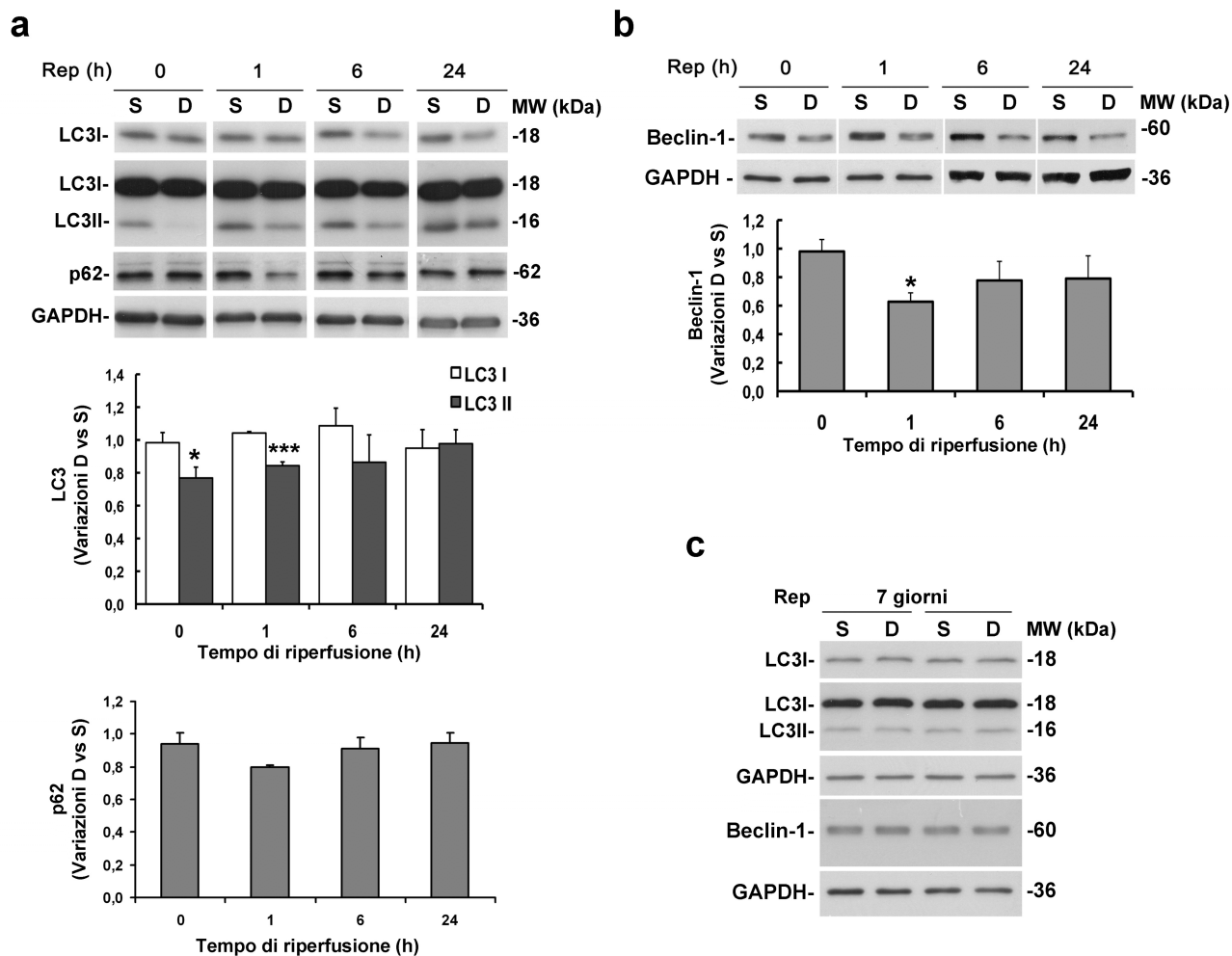


Figura 4.2 – Espressione delle proteine LC3, p62 e Beclin-1 in seguito all'ischemia/riperfusion retinica.

L'ischemia retinica è stata praticata nell'occhio destro del ratto (D) per 50 minuti e l'animale sacrificato ai diversi tempi di riperfusione. Per ogni animale l'occhio sinistro (S) è stato utilizzato come controllo non ischemico. L'estratto proteico totale è stato analizzato in western blotting per le proteine LC3 (a,c), p62 (a) e Beclin-1 (b, c), utilizzando come controllo di caricamento la proteina GAPDH. (a) Nell'occhio destro ischemico (D) i livelli di espressione della proteina LC3II sono significativamente ridotti a 0 e 1h di riperfusione rispetto all'occhio sinistro di controllo (S). Inoltre, è stata osservata, ad 1h di riperfusione, una ridotta espressione della proteina p62. (b) L'ischemia retinica riduce in modo significativo l'espressione della proteina Beclin-1 nell'occhio destro (D) ad 1h di riperfusione rispetto all'occhio sinistro non ischemico (S). (c) Espressione delle proteine LC3 e Beclin-1 dopo 7 giorni di riperfusione. Gli istogrammi rappresentano i valori dell'analisi densitometrica delle bande \pm l'errore standard della media (S.E.M) (n=5-6 animali per ogni gruppo). * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

4.1.3 Valutazione dei livelli di espressione delle proteine Atg4, Atg7 e Atg12

Le proteine Atg4 e Atg7 assumono un ruolo importante nella regolazione dei processi di coniugazione proteica che favoriscono la formazione dell'autofagosoma e l'attivazione del processo autofagico. La cisteina proteasi Atg4 determina il clivaggio di LC3 e la formazione della proteina citosolica LC3I. La glicina C-terminale esposta dal clivaggio Atg4-dipendente è successivamente attivata, in modo ATP-dipendente dall'enzima E1-like Atg7. Tale attivazione permette poi la successiva coniugazione alla fosfatidiletanolamina (PE) per formare LC3II che si associa alla membrana dell'autofagosoma. Questo processo di lipidazione richiede la presenza del complesso E3-like formato dalle proteine Atg12-Atg5-Atg16, la cui formazione è catalizzata dalle proteine Atg7 e Atg10 (Fujita et al., 2008; Kabeya et al., 2004).

Pertanto, è stato valutato se la ridotta espressione delle proteine LC3II e Beclin-1 precedentemente osservata fosse accompagnata da una modulazione dei livelli delle proteine Atg4, Atg7, Atg12 tipicamente coinvolte nelle diverse fasi che regolano l'attivazione del processo autofagico.

I risultati ottenuti dimostrano come l'ischemia/riperfusion retinica non determina una variazione statisticamente significativa, ai diversi tempi studiati, dei livelli di espressione delle proteine Atg4, Atg7 e Atg12 nell'occhio destro ischemico (D) confrontato con il sinistro non ischemico (S) (Figura 4.3a, b, c). Si può tuttavia osservare per la proteina Atg7, a 6h di riperfusion, una tendenza all'aumento che non risulta tuttavia significativa (Figura 4.3b).

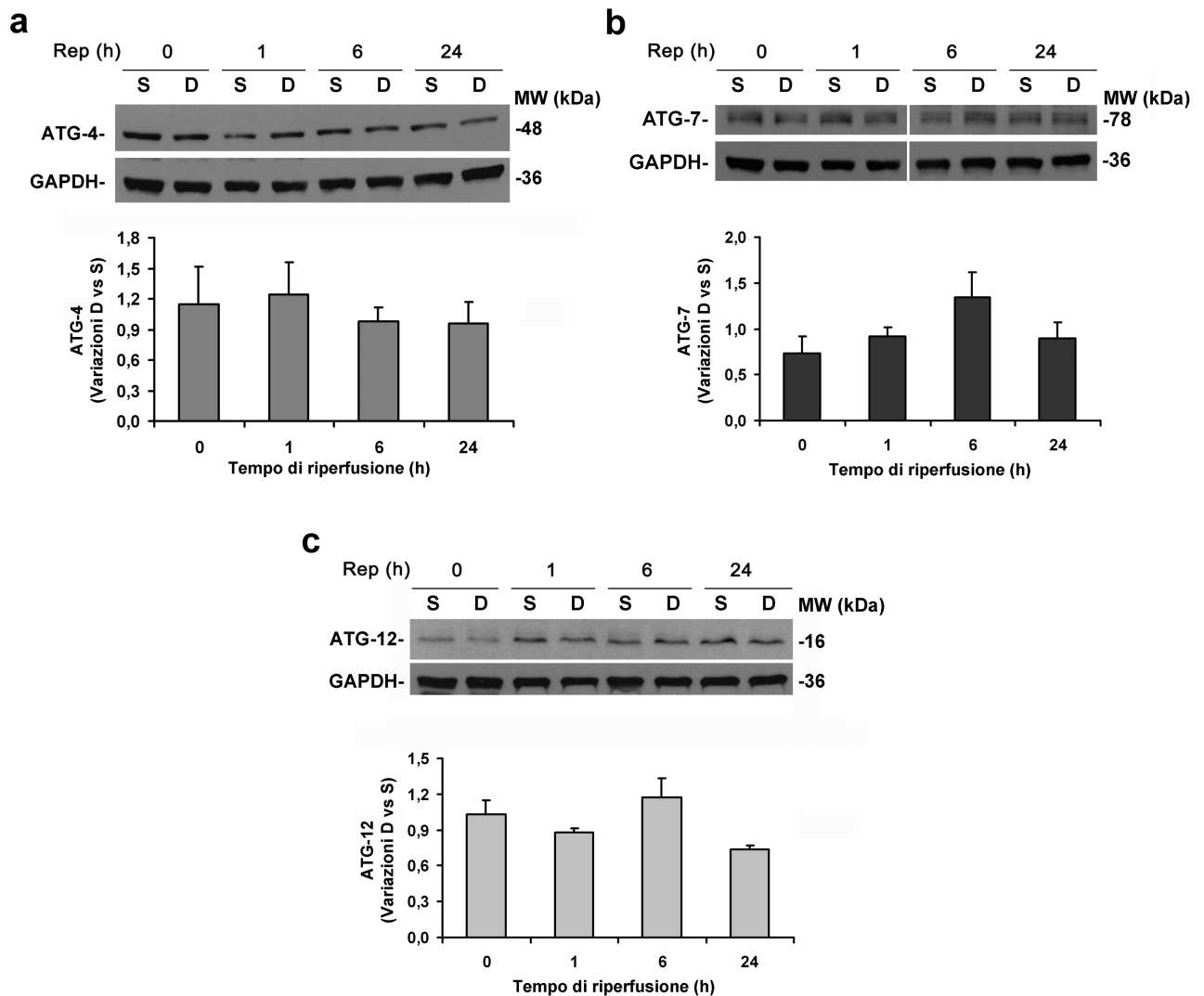


Figura 4.3 – Espressione della proteina Atg4 e Atg7 e Atg12 durante l'ischemia/riperfusion retinica.

Gli animali sono stati sottoposti all'insulto ischemico per 50 minuti e sacrificati ai diversi tempi di riperfusione indicati. L'espressione relativa alle proteine Atg4 (a), Atg7 (b) e Atg12 è stata determinata mediante l'analisi densitometrica delle bande radiografiche normalizzate per la proteina di controllo GAPDH. Ogni valore è stato espresso come la media \pm l'errore standard (S.E.M) di tre esperimenti (n=3).

4.1.4 L'ischemia/riperfusion retinica induce il clivaggio della proteina Beclin-1

Come riportato in figura 4.2, l'ischemia/riperfusion retinica riduce in modo significativo l'espressione della proteina Beclin-1.

Tale riduzione è accompagnata dalla comparsa di un frammento proteico, addizionale alla banda di 60 kDa associata a Beclin-1, che presenta un peso molecolare di 50kDa. La banda addizionale o frammento, si accumula nell'occhio destro ischemico (D) durante la prima ora di riperfusion e si riduce gradualmente dopo 24h, presentando un andamento temporale inverso rispetto alla banda identificata come Beclin-1 e suggerendo che, la ridotta espressione della proteina osservata in precedenza in corso d'ischemia/riperfusion, è dovuta al suo clivaggio proteolitico (Figura 4.4).

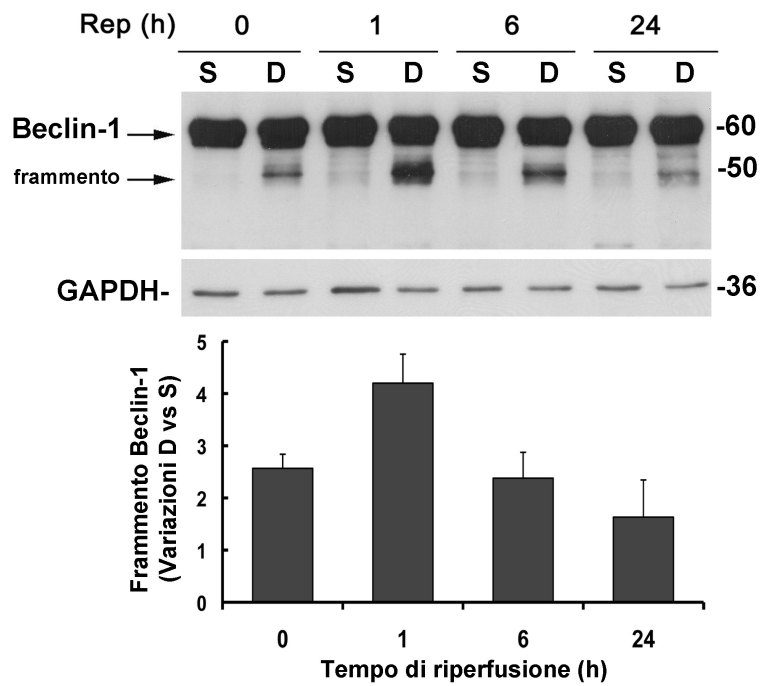


Figura 4.4 – La proteina Beclin-1 viene clivata in seguito ad ischemia/riperfusione retinica.

Il western blotting mostra l'accumulo del frammento proteico della proteina Beclin-1 durante la fase post-ischemica. Tale frammento, che possiede un peso molecolare di 50kDa, è stato rilevato dopo un periodo di esposizione più lungo rispetto alla proteina Beclin-1 a 60kDa. L'istogramma rappresenta i valori relativi all'analisi densitometrica \pm l'errore standard (S.E.M) (n=5-6 animali per ogni gruppo). D, occhio destro ischemico; S, occhio sinistro non ischemico.

4.1.5 Le proteasi calpaine sono attivate dall'ischemia/riperfusionazione nella retina

Numerosi studi hanno dimostrato come l'eccitotossicità partecipa ai processi di morte cellulare indotti dall'ischemia/riperfusionazione retinica (Nucci et al., 2005; Russo et al., 2008). L'aumento dei livelli di glutammato determina l'over-attivazione dei recettori NMDA, l'aumento delle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare e l'attivazione di enzimi proteolitici calcio-dipendenti come le proteasi a cisteina calpaine (Lynch and Guttman, 2002).

Allo scopo di verificare l'attivazione delle calpaine nel nostro modello sperimentale, è stata monitorata la formazione dei prodotti di frammentazione di uno dei substrati delle calpaine, la proteina non-eritroide α -spectrina (*α -spectrin breakdown products, SBDPs*). Diversamente dalla caspasi-3, la cui attività genera un frammento a 150kDa e uno più specifico a 120kDa, le calpaine clivano l' α -spectrina formando due frammenti di 150 e 145kDa (Wang, 2000).

I risultati ottenuti dimostrano come, dopo 50 minuti d'ischemia (Rep=0), si osserva un significativo aumento della formazione dei frammenti di 150/145kDa dell' α -spectrina nell'occhio destro ischemico (D) rispetto al sinistro non ischemico (S) (Figura 4.5). L'attivazione delle calpaine risulta ulteriormente aumentata ad 1h di riperfusionazione e rimane sostenuta a 6 e 24h dall'induzione dell'insulto ischemico (Figura 4.5).

Viceversa, non è stata osservata, nei diversi tempi studiati, alcuna variazione significativa del frammento di 120kDa, associato all'attività proteolitica della caspasi-3. Tuttavia a 24h di riperfusionazione, è possibile notare la formazione di un frammento a 105KDa che suggerisce un ulteriore clivaggio proteolitico dell' α -spectrina (Figura 4.5).

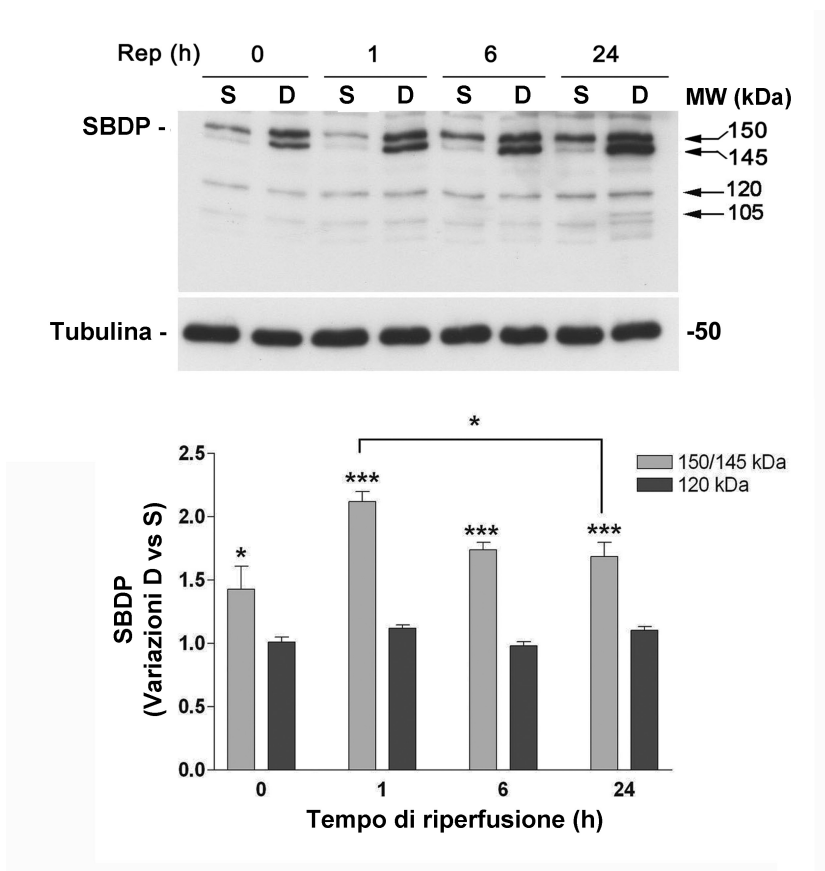


Figura 4.5 – Attivazione delle proteasi calpaine in seguito ad ischemia/riperfusione retinica.

Il western blotting mostra l'aumento dei frammenti di clivaggio a 150/145kDa dell' α -spectrina indice dell'attivazione della calpaina dopo 50 minuti d'ischemia (Rep=0) e a 1, 6 e 24h di riperfusione nell'occhio destro ischemico (D) rispetto al controlaterale non ischemico (S). Non è stato osservato alcuna variazione del frammento a 120KDa prodotto dalla caspasi-3. L'istogramma mostra l'analisi densitometrica delle bande radiografiche relativi ai frammenti di 150/145kDa e 120kDa normalizzati sui valori della proteina tubulina. Ogni valore rappresenta la media \pm l'errore standard (S.E.M.) di tre esperimenti. * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$. (D), occhio destro ischemico; (S), occhio sinistro non ischemico.

4.1.6 Il clivaggio della proteina Beclin-1 dipende dall'attivazione del recettore NMDA del glutammato

Al fine di identificare i possibili meccanismi responsabili del clivaggio della proteina Beclin-1 nella retina di ratto sottoposta ad ischemia/riperfusion, è stato valutato l'effetto del blocco dei recettori NMDA del glutammato sulla modulazione della proteina Beclin-1 osservate in corso di ischemia-riperfusion.

La somministrazione intravitreale dell'antagonista non competitivo del recettore NMDA del glutammato, MK-801 (50nM, 5 μ l/occhio), somministrato 5 minuti prima dell'ischemia e all'inizio della fase di riperfusion, previene l'attivazione delle proteasi calpaine come dimostrato dal ridotto accumulo dei frammenti di clivaggio dell' α -spectrina di 150/145kDa (Figura 4.6a).

Il trattamento intravitreale con MK801, nelle stesse condizioni in cui riduce l'attivazione delle calpaine, porta anche, nell'occhio destro ischemico trattato, alla significativa riduzione dell'accumulo del frammento di clivaggio di 50kDa della proteina Beclin-1, osservato ad 1h di riperfusion (Figura 4.6b).

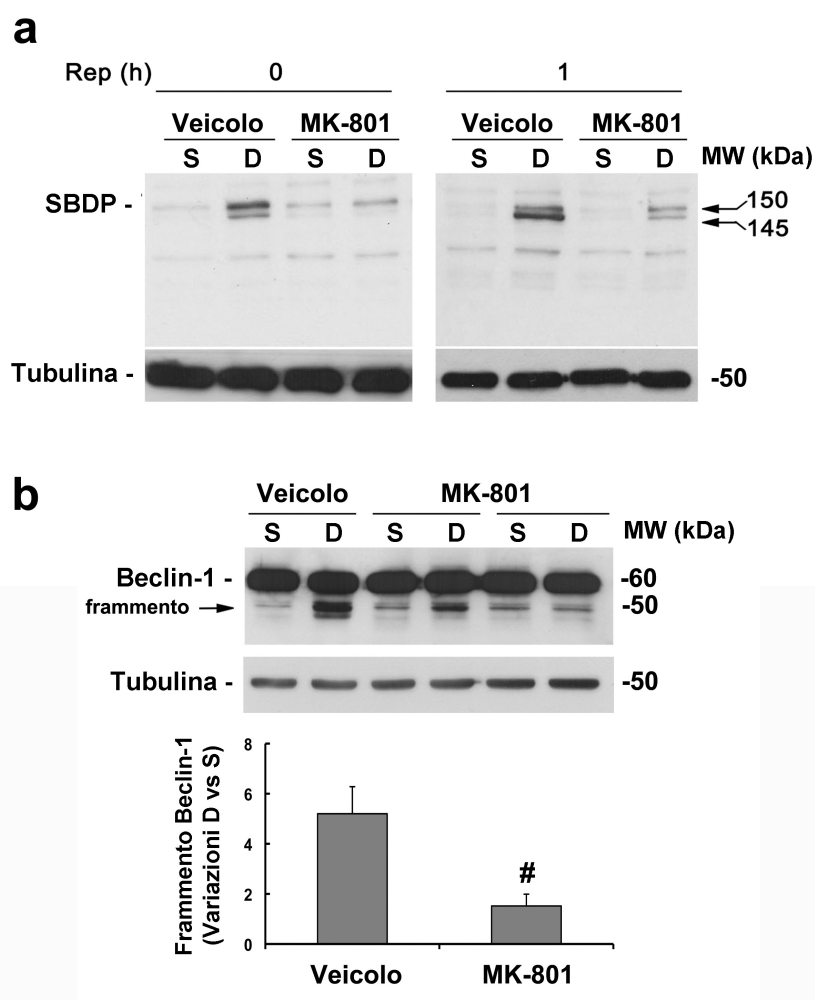


Figura 4.6 – Il blocco del recettore NMDA previene il clivaggio della proteina Beclin-1.

(a) Il trattamento intravitreale con l'antagonista MK-801 riduce l'attivazione della calpaina a 0 e 1h di riperfusione e (b) l'accumulo del frammento di clivaggio a 50kDa della proteina Beclin-1 osservato ad 1h di riperfusione. Gli animali di controllo sono stati sottoposti alla somministrazione intravitreale del solo veicolo (PBS). Gli istogrammi mostrano l'analisi densitometrica delle bande radiografiche relativi alle proteine d'interesse normalizzati sul valore della proteina tubulina. Ogni valore rappresenta la media \pm l'errore standard (S.E.M.) di tre esperimenti. # $P < 0.05$ rispetto al veicolo.

4.1.7 Le proteasi calpaine inducono il clivaggio di Beclin-1 *in vivo*

Per verificare il coinvolgimento diretto delle proteasi calpaine nel processo di clivaggio della proteina Beclin-1, sono stati utilizzati due inibitori specifici delle calpaine, l'MDL28170 (Inibitore III) e l'SJA6017 (Inibitore IV).

La somministrazione intravitreale degli inibitori delle calpaine (1mM, 3 μ l/occhio), 5 minuti prima ed alla fine dell'ischemia, riduce in modo significativo l'attività delle calpaine ad 1h di riperfusione, come è possibile osservare dalla riduzione dei frammenti a 150/145kDa dell' α -spectrina (Figura 4.7).

Inoltre, il trattamento sia con MDL28170 che con SJA6017, previene la riduzione di Beclin-1 tipicamente osservata ad 1h di riperfusione. Questo effetto è associato ad una riduzione significativa dell'accumulo del frammento di clivaggio a 50kDa della proteina Beclin-1 osservato ad 1h di riperfusione (Figura 4.7).

Per dimostrare definitivamente il coinvolgimento delle calpaine nella degradazione proteolitica di Beclin-1 indotta dall'ischemia/riperfusione è stato utilizzato il siRNA specifico per la subunità-1 delle calpaine di ratto (CAPNS1-siRNA).

Le proteasi calpaine sono formate da una subunità catalitica di circa 80kDa e una subunità regolatrice di 28kDa; la sequenza genica di quest'ultima subunità è identica sia della μ - che per la m-calpaina (Ohno et al., 1986; Ohno et al., 1990). Pertanto, l'utilizzo del CAPNS1-siRNA ha permesso il silenziamento di entrambe le isoforme delle proteasi. L'efficacia del trattamento è stata confermata monitorando la formazione dei frammenti di clivaggio dell' α -spectrina a 150/145kDa nell'occhio destro ischemico (D) ad 1h di riperfusione. La somministrazione intravitreale dell'siRNA per la subunità-1 delle calpaine (10 μ g/occhio), 72h prima dell'induzione dell'insulto ischemico, riduce in modo significativo la proteolisi

dell' α -spectrina nell'occhio destro dell'animale trattato rispetto al solo veicolo o all'siRNA di controllo (NT-siRNA) (Figura 4.8a).

Il silenziamento genico delle calpaine previene in maniera significativa l'accumulo del frammento a 50kDa della proteina Beclin-1 e determina il recupero della proteina a 60kDa ad 1h di riperfusione, confermando pertanto che, nelle condizioni sperimentali considerate, le proteasi calpaine sono responsabili del clivaggio della proteina Beclin-1 (Figura 4.8b).

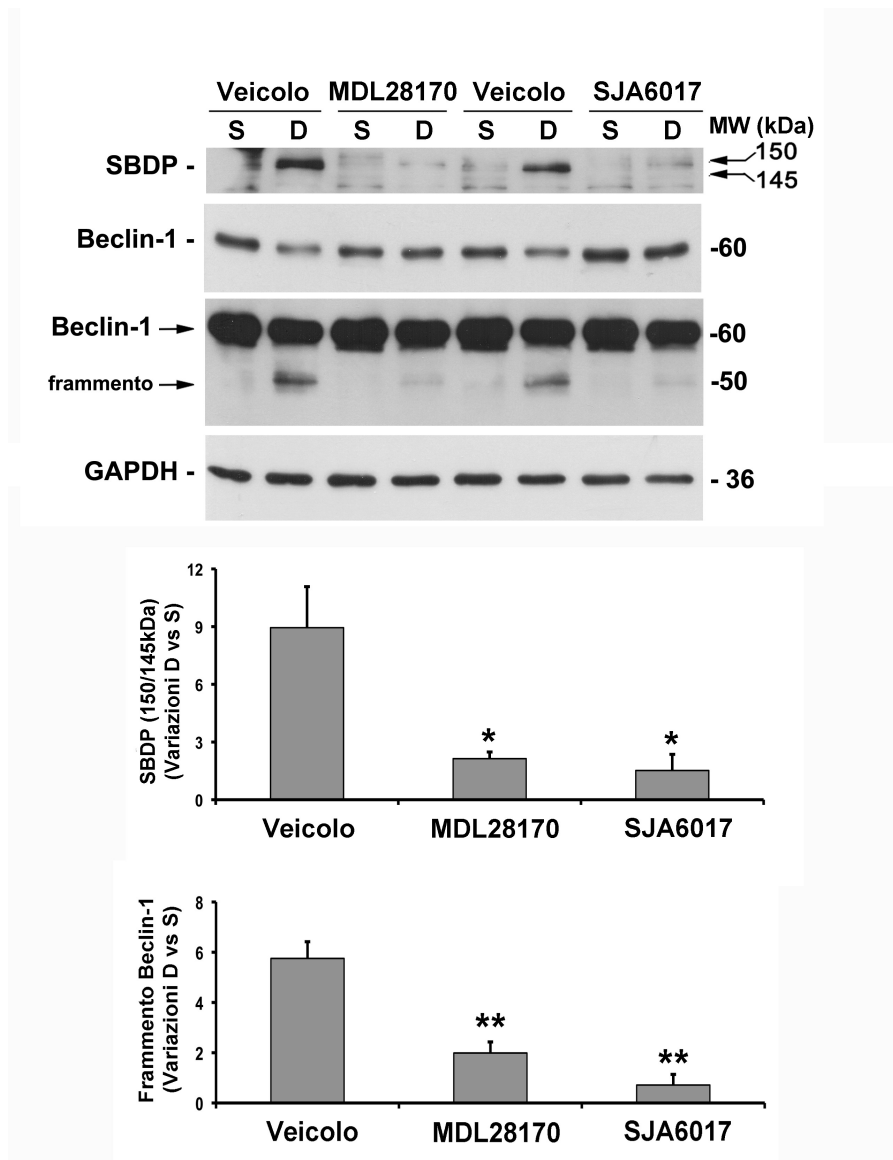


Figura 4.7 – L’inibizione farmacologica della calpaina previene il clivaggio di Beclin-1.

Il western blotting mostra l’effetto della somministrazione intravitale degli inibitori MDL28170 e SJA6017 sull’attività della calpaina e sul clivaggio della proteina Beclin-1 ad 1h di ri-perfusione. Gli animali di controllo sono stati sottoposti alla somministrazione intravitale del solo veicolo (DMSO 10%). Gli istogrammi mostrano l’analisi densitometrica delle bande radiografiche relativi alle proteine d’interesse normalizzati sul valore dei rispettivi controlli. Ogni valore rappresenta la media \pm l’errore standard (S.E.M.) di tre esperimenti. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

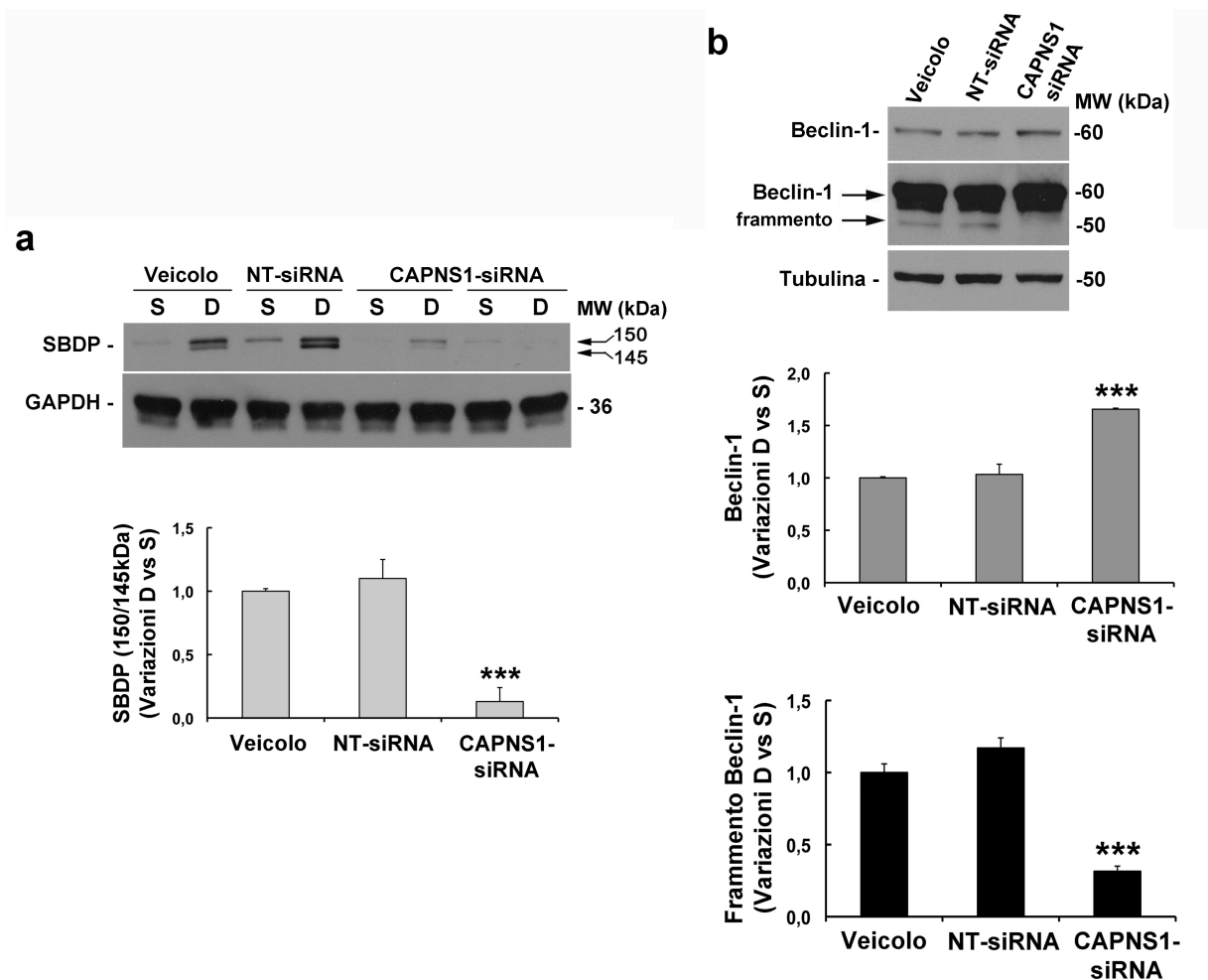


Figura 4.8 – Il silenziamento della subunità-1 delle calpaine previene il clivaggio della proteina Beclin-1.

(a) L'analisi in western blotting mostra l'effetto della somministrazione intravitreale del CAPNS1-siRNA nell'occhio destro ischemico dell'animale trattato rispetto al veicolo o all'NT-siRNA di controllo. L'analisi densitometrica dei prodotti di clivaggio di 150/145kDa dell' α -spectrina indica una riduzione dell'87% nell'animale trattato con il siRNA per la subunità-1 delle calpaine (CAPNS1-siRNA=0.13 \pm 0.11 vs Veicolo=1 \pm 0.02). (b) Il clivaggio della proteina Beclin-1 viene completamente prevenuto dal trattamento con l'CAPNS1-siRNA nella retina ischemica, come dimostrato dall'assenza del frammento a 50kDa e dal recupero della proteina Beclin-1 a 60kDa ad 1h di riperfusione. Gli istogrammi mostrano l'analisi densitometrica delle bande radiografiche relativi alle proteine d'interesse normalizzati sul valore dei rispettivi controlli. Ogni valore rappresenta la media \pm l'errore standard (S.E.M.) di tre esperimenti. ***P<0.01 rispetto al veicolo o all'NT-siRNA.

4.2 STUDI IN VITRO

4.2.1 La deprivazione da siero riduce la vitalità delle RGC-5

La riduzione del supporto trofico è stato proposto come uno dei meccanismi coinvolti nella disfunzione e nella morte delle cellule ganglionari retiniche in corso di glaucoma (Morrison et al., 2005; Pease et al., 2000). Sulla base di questo presupposto, il modello di sofferenza cellulare scelto per lo studio dell'autofagia nelle RGC-5 è stato un modello di deprivazione da siero.

La deprivazione da siero (0% FBS) riduce in modo significativo la vitalità cellulare delle RGC-5 già a 3, 6 e 12h dall'insulto iniziale rispetto alle cellule di controllo mantenute in terreno di coltura al 10% FBS (Figura 4.9b). Tale riduzione aumenta lievemente a 24h mentre risulta ulteriormente marcata dopo 48 e 72h di trattamento (Figura 4.9a, c).

L'analisi al microscopio a contrasto di fase dopo 24 e 48h di deprivazione conferma la riduzione considerevole del numero di cellule in condizione di deprivazione da siero rispetto alle cellule controllo (Figura 4.9a).

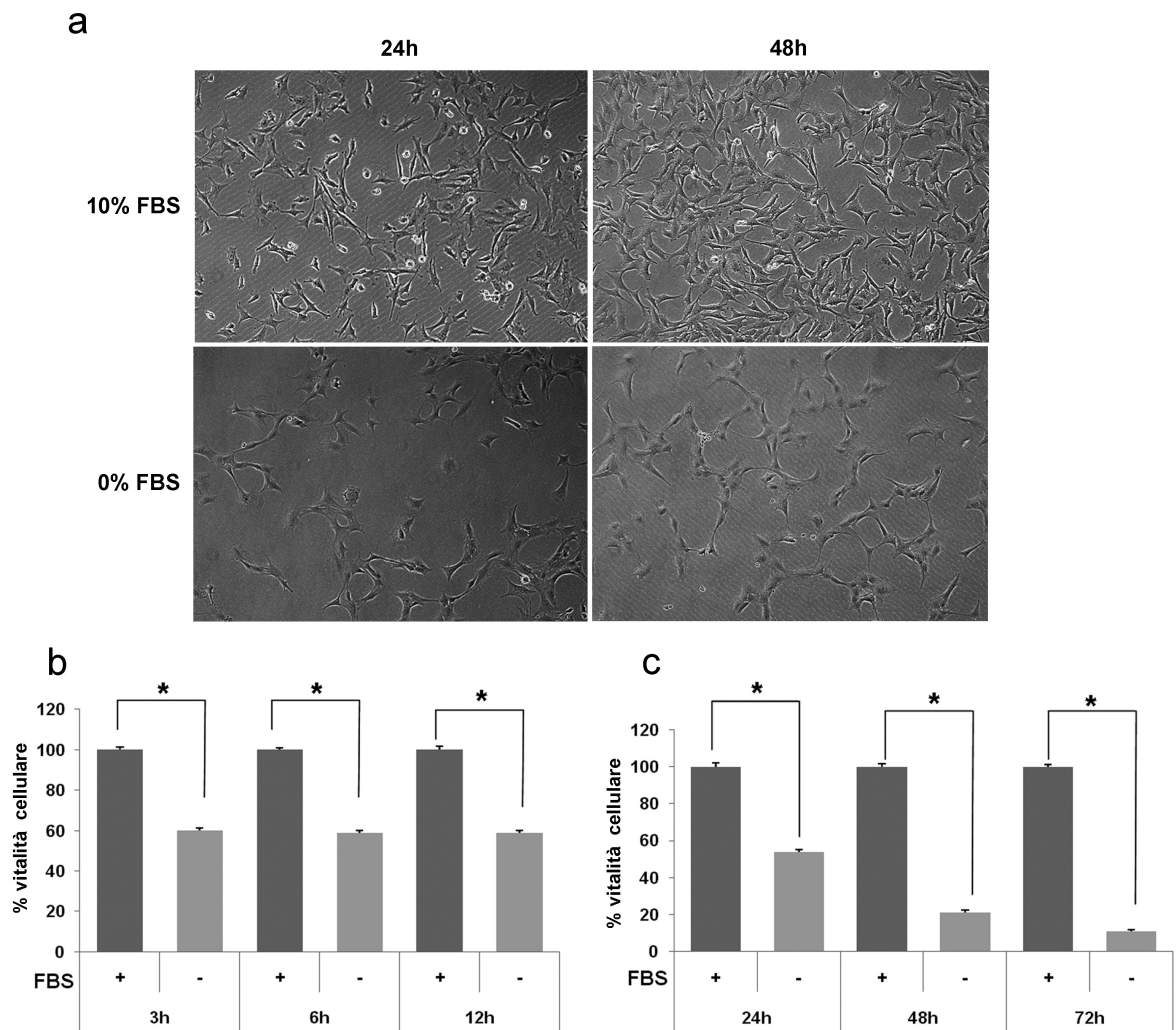


Figura 4.9 - Effetto della deprivazione da siero sulle cellule RGC-5.

La deprivazione da siero riduce la vitalità cellulare delle RGC-5. Le cellule sono state mantenute in terreno di coltura privo di siero per periodi di tempo compresi fra 3 e 72h. (a) Immagini al microscopio a contrasto di fase di cellule RGC-5 in coltura in 10% FBS (CTR) e 0% FBS (DS) dopo 24 e 48h di trattamento. Gli istogrammi (b, c) mostrano la quantificazione percentuale della vitalità cellulare mediante saggio MTT ai diversi tempi studiati paragonati al controllo, arbitrariamente posto pari al 100%. * $P < 0.05$ rispetto alle cellule controllo (10% FBS).

4.2.2 La deprivazione da siero modifica la distribuzione delle RGC-5 nelle fasi del ciclo cellulare

Per verificare se la riduzione della vitalità delle RGC-5 osservata in seguito alla deprivazione da siero ai diversi tempi studiati fosse correlata ad un aumento della morte cellulare o ad una riduzione della crescita, è stata valutata la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare mediante analisi citofluorimetrica.

L'analisi del ciclo cellulare dopo 24 e 48h di deprivazione da siero (0% FBS), ossia nei tempi in cui si osserva una riduzione progressiva della vitalità cellulare, dimostra un significativo aumento di cellule RGC-5 in fase G_0/G_1 rispetto alle cellule di controllo mantenute in 10% FBS. Tale aumento è accompagnato da una riduzione statisticamente significativa della percentuale di cellule in fase S e G_2 -M (Figura 4.10a, b).

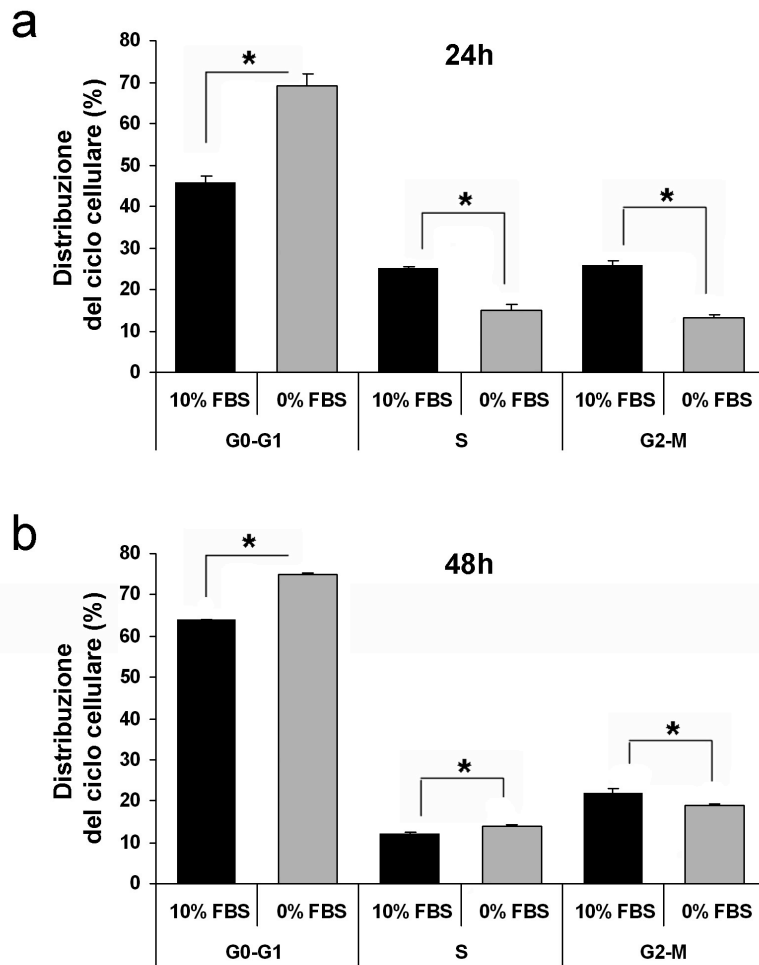
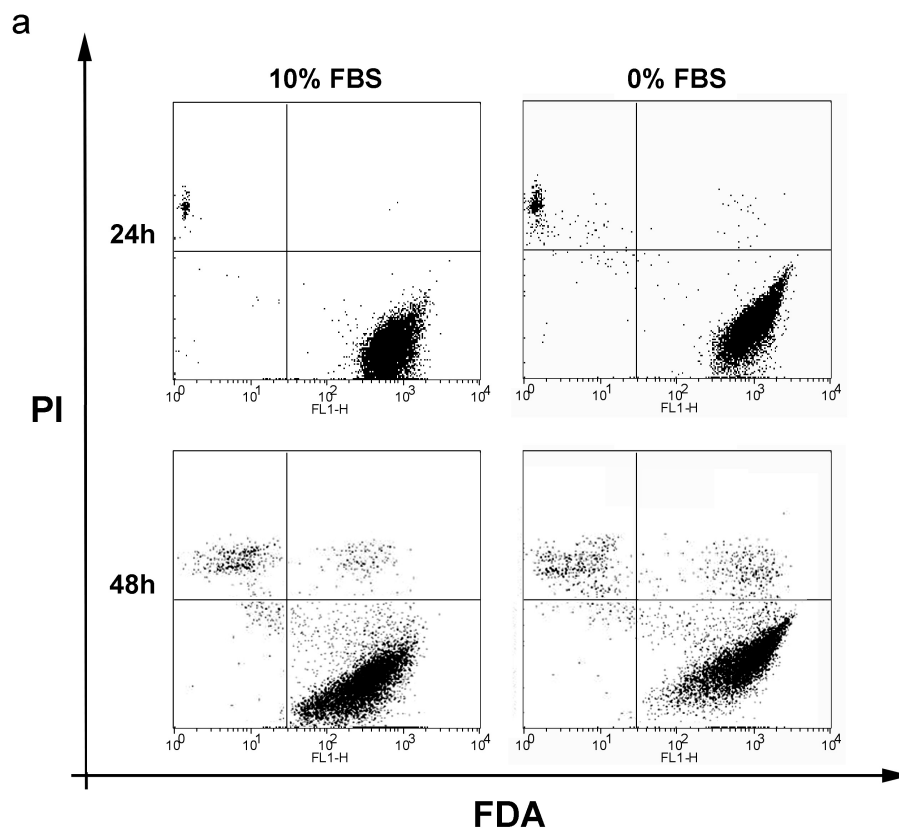


Figura 4.10 - Distribuzione delle RGC-5 nelle fasi del ciclo cellulare.

L'istogramma rappresenta la percentuale di cellule RGC-5 distribuite nelle varie fasi del ciclo cellulare dopo 24h (a) e 48h (b) di deprivazione da siero (0% FBS) rispetto a colture cellulari controllo (10% FBS). * $P < 0.05$ rispetto alle cellule controllo (10% FBS).

4.2.3 La deprivazione da siero non induce morte cellulare delle RGC-5

Allo scopo di verificare se le variazioni nella distribuzione del ciclo cellulare fossero associate ad un aumento della morte necrotica o apoptotica, le cellule RGC-5 sono state analizzate con il test biparametrico FDA/PI mediante analisi citofluorimetrica. In condizioni di deprivazione da siero (0% FBS) non è stata osservata nessuna variazione significativa nel numero degli eventi necrotici o apoptotici dopo 24 e 48h di deprivazione nelle cellule RGC-5 confrontate con le colture controllo (10% FBS) (Figura 4.11 a,b).



Tempo	Trattamento	Vitalità	Necrosi	Tarda Apoptosi	Apoptosi
24h	10% FBS	95 ± 0,9	3,5 ± 0,9	0	0
	0% FBS	93 ± 2,3	5,8 ± 1,9	0	0
48h	10% FBS	92 ± 1,2	5 ± 0,8	1,7 ± 0,3	0,7 ± 0,1
	0% FBS	90 ± 2	5,3 ± 1,1	3,4 ± 1,1	0,6 ± 0,3

Figura 4.11 – Valutazione della morte cellulare in colture RGC-5 sottoposte a deprivazione da siero mediante saggio FDA/PI.

(a) Pannelli rappresentativi della distribuzione degli eventi cellulari in seguito a colorazione con FDA/PI. La deprivazione da siero per 24 e 48h non induce una variazione della distribuzione degli eventi acquisiti nei quadranti relativi alle quattro condizioni identificate dal test citofluorimetrico applicato: cellule necrotiche (quadrante in alto a sinistra), apoptotiche (quadrante in basso a sinistra), in apoptosi tardiva (quadrante in alto a destra), vitali (quadrante in basso a destra). (b) La tabella riporta le medie ± l'errore standard dei valori percentuali relativi agli eventi cellulari considerati a 24 e 48h in presenza e in assenza di siero.

Il mancato coinvolgimento della cascata apoptotica in seguito alla deprivazione da siero è stato inoltre confermato mediante analisi immunocitochimica della caspasi-3 clivata (attiva), una proteina tipicamente associata all'attivazione di questo meccanismo. In cellule RGC-5 mantenute in coltura allo 0% FBS per 24h non è stata osservata, infatti, alcuna differenza significativa nell'immunoreattività alla caspasi-3 clivata rispetto alle cellule di controllo (10% FBS) (Figura 4.12).

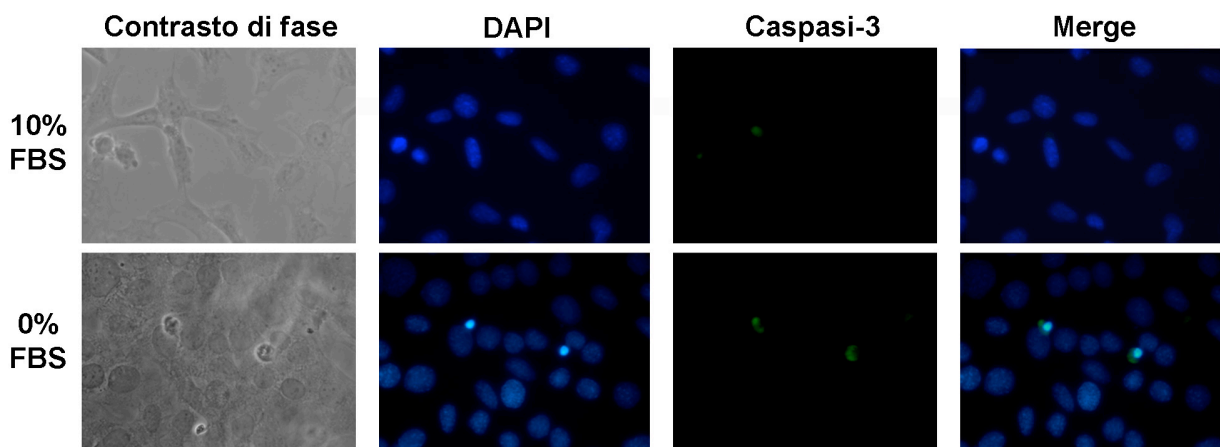


Figura 4.12 – Localizzazione della caspasi-3 in cellule RGC-5.

La figura mostra l'immunoreattività della caspasi-3 attivata (verde) in colture RGC-5 sottoposte a deprivazione da siero per 24h (0% FBS) e colture controllo (10% FBS). I nuclei sono stati marcati utilizzando il colorante DAPI (blu). Non sono state rilevate variazioni significative nell'immunoreattività della caspasi-3 clivata in cellule deprivate (0% FBS) rispetto alle colture controllo (10% FBS).

4.2.4 L'autofagia promuove la sopravvivenza delle cellule RGC-5

La deprivazione di fattori trofici e nutrienti è uno dei principali stimoli in grado di attivare l'autofagia, pertanto è stata valutata l'espressione di proteine tipicamente associate al processo autofagico nelle colture di RGC-5 sottoposte a deprivazione da siero. L'analisi mediante western blotting dimostra un significativo aumento dei livelli di espressione della proteina Beclin-1 ed LC3II in cellule RGC-5 sottoposte a deprivazione da siero (DS, 0% FBS) per 24h (Figura 4.13a).

Questa condizione determina, inoltre, una redistribuzione dell'immunoreattività della proteina LC3 a livello intracellulare come rilevato mediante immunocitochimica (Figura 4.13b). Infatti, in condizioni di deprivazione da siero (DS, 0% FBS) si osserva, nelle cellule RGC-5, la presenza di strutture LC3-positive caratterizzate da un pattern perinucleare puntinato e molto intenso rispetto alle cellule RGC-5 di controllo (CTR, 10% FBS), che invece presentano un segnale citoplasmatico diffuso, supportando pertanto l'ipotesi di un'intensa attività autofagica in condizioni di deprivazione da siero (Figura 4.13b).

Per determinare l'effetto dell'inibizione dell'autofagia sulla vitalità cellulare, le colture RGC-5 sono state trattate con due inibitori: la Bafilomicina-A1 (BafA1), che blocca l'attività dell'ATPasi vacuolare di membrana (V-ATPasi) inibendo il processo di maturazione dell'autofagosoma (Yamamoto et al., 1998), e la 3-metil-adenina (3-MA), un derivato nucleotidico che interferisce con la fase di formazione dell'autofagosoma inibendo l'attività della PI3K-III (Petiot et al., 2000).

Il trattamento delle cellule RGC-5 con Bafilomicina-A1 (100nM) (Kim et al., 2008b) per un periodo di tempo di 24h determina un forte accumulo della proteina LC3II riducendo in

maniera significativa la vitalità cellulare in condizioni di deprivazione da siero (DS, 0% FBS) (46% vs 69% DS; *P<0.05; Figura 4.13c, d). L'effetto osservato sulla vitalità delle cellule RGC-5 risulta ancora più marcato in seguito al trattamento con l'inibitore 3-metiladenina (10mM) (Kim et al., 2008b) (16% vs 69% DS; *P<0.05; Figura 4.13d).

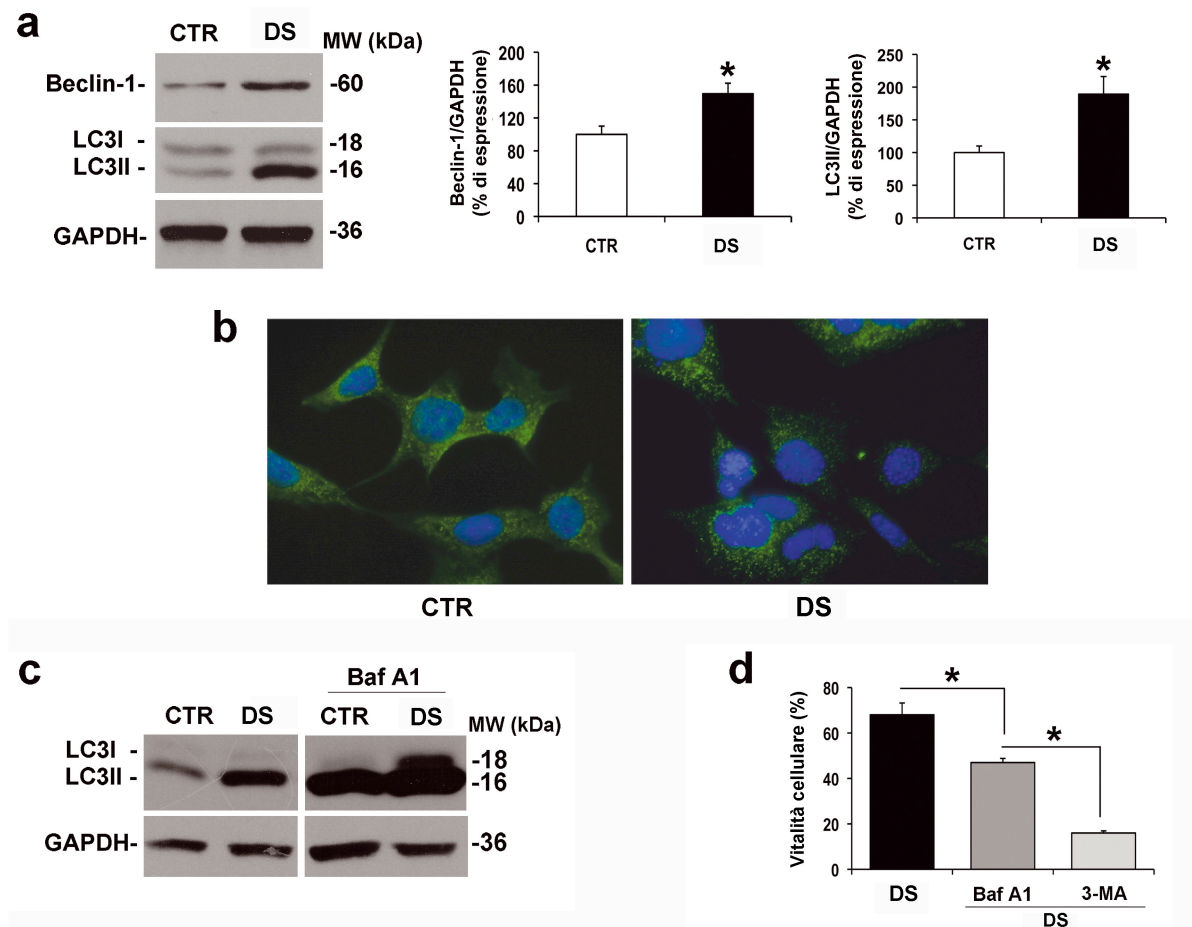


Figura 4.13 – La deprivazione da siero attiva l'autofagia in cellule RGC-5.

(a) Variazione dei livelli di espressione della proteina Beclin-1 ed LC3I-II in cellule RGC-5 sottoposte a deprivazione da siero per 24h (DS: 0% FBS) rispetto a cellule controllo (CTR: 10% FBS). Gli istogrammi mostrano l'analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sulla proteina GAPDH ed espresse come percentuale rispetto al controllo (CTR). * $P < 0.05$. (b) Immunocitochimica della proteina LC3 in cellule RGC-5 in presenza (CTR) e in assenza di siero (DS). Dopo 24h di deprivazione da siero si osserva un redistribuzione intracellulare dell'immunoreattività per la proteina LC3II, con la presenza di strutture puntiformi perinucleari indice di un'aumentata formazione degli autofagosomi. (c) Effetto della Bafilomicina-A1 (BafA1) sui livelli di espressione di LC3. Il western blotting indica l'accumulo di LC3I-II dopo il trattamento in condizioni controllo (CTR) e di deprivazione da siero (DS) per 24h. (d) Valutazione della vitalità cellulare attraverso il saggio MTT in cellule RGC-5 deprivate da siero e trattate con BafA1 (100nM) e 3-MA (10mM) (* $P < 0.05$; $n = 3$).

4.2.5 Il silenziamento genico della proteina Beclin-1 riduce la vitalità delle cellule RGC-5

Allo scopo di valutare l'effetto di una riduzione dell'espressione della proteina Beclin-1 sulla vitalità delle cellule ganglionari retiniche, le cellule RGC-5 sono state transfettate con l'RNA interferente specifico per la proteina Beclin-1 di ratto (BECN1-siRNA) (25nM), 48h prima della deprivazione da siero.

L'analisi in western blotting mostra come il silenziamento genico riduce l'espressione della proteina Beclin-1 del 95% rispetto al siRNA di controllo (NT-siRNA) (Figura 22a). Il silenziamento di Beclin-1 è associato ad una riduzione dell'accumulo della forma lipidata della proteina LC3 (LC3II) in condizioni di deprivazione da siero (Figura 22a). Quest'ultima condizione, risulta simile al pattern di espressione osservato precedentemente nelle retine sottoposte ad ischemia/riperfusion (Figura 4.2).

Per valutare l'effetto sulla vitalità cellulare di una ridotta espressione della proteina Beclin-1 è stato condotto il saggio MTT. I risultati ottenuti dimostrano come il silenziamento genico della proteina Beclin-1 aumenta in modo significativo la riduzione della vitalità delle cellule RGC-5 osservata dopo 24h di deprivazione da siero (36% vs 67%; *P<0.05) (Figura 4.14b).

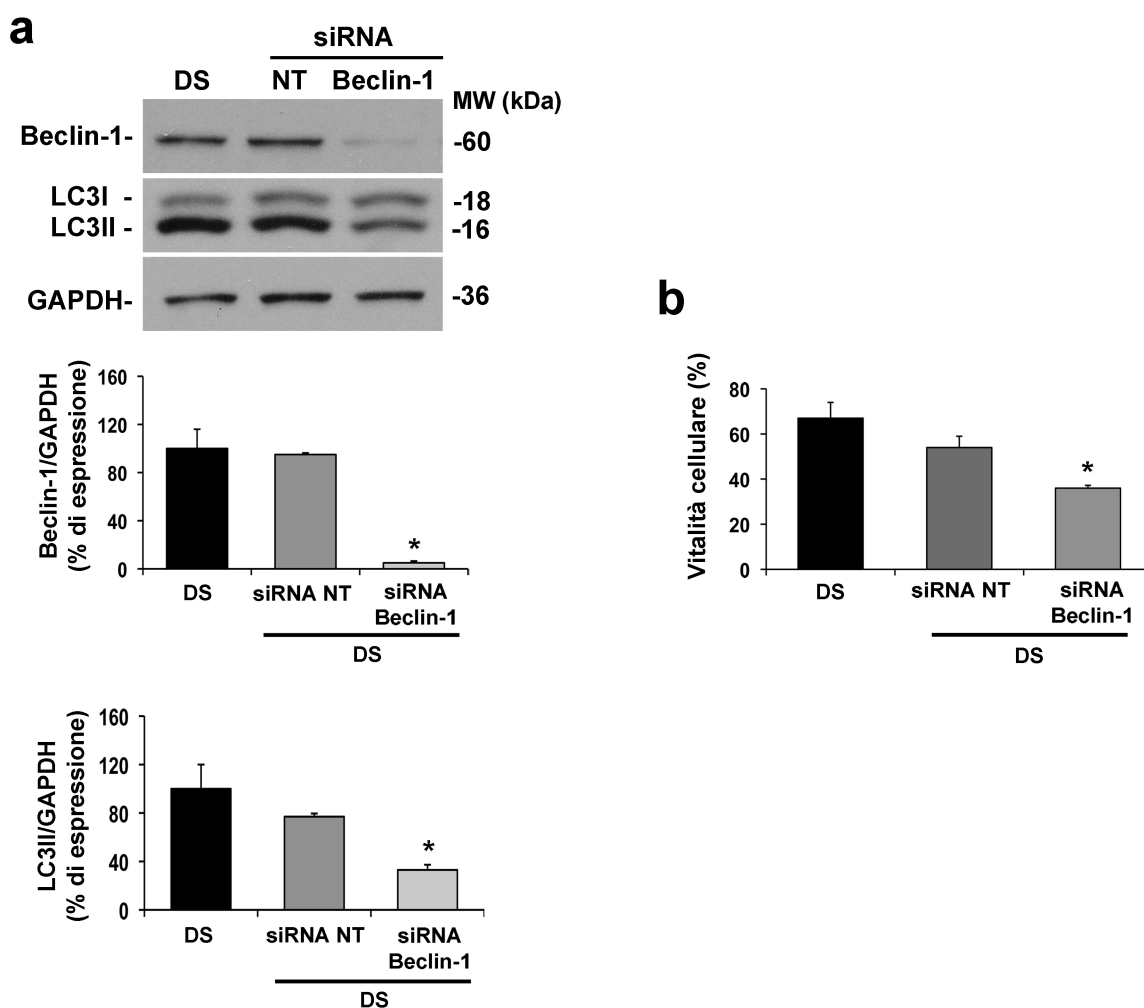


Figura 4.14 – Effetto del silenziamento genico della proteina Beclin-1 sulla vitalità delle cellule RGC-5.

(a) Le cellule sono state transfettate con il siRNA specifico per la proteina Beclin-1 (BECN-siRNA) o con il siRNA di controllo (NT-RNA) alla concentrazione finale di 25nM, 48h prima della deprivazione da siero (DS). Nelle cellule transfettate con BECN-siRNA, l'espressione della proteina è stata ridotta del 95%. Questo effetto è accompagnato da un ridotto accumulo della proteina LC3II. I grafici mostrano l'analisi densitometrica delle bande radiografiche. I dati sono stati normalizzati sul valore della proteina GAPDH ed espressi come percentuale sul valore controllo (n=3). (b) Il silenziamento della proteina Beclin-1 riduce la sopravvivenza delle cellule RGC-5. L'istogramma rappresenta i valori ottenuti dal saggio MTT \pm l'errore standard della media (S.E.M; n=3) della vitalità cellulare. * $P < 0.05$ vs NT-siRNA ed DS (0% FBS).

5. DISCUSSIONE

In questo studio è stato valutato il coinvolgimento del processo autofagico in un modello sperimentale d'ischemia retinica caratterizzato dall'aumento transitorio della pressione intraoculare. Tale modello determina il blocco della circolazione retinica e uveale riducendo l'apporto di ossigeno e nutrienti, una condizione patologica che riproduce alcune delle principali caratteristiche cliniche osservate in seguito all'occlusione dell'arteria retinica centrale e nel glaucoma primario ad angolo chiuso (Osborne et al., 2004).

I risultati ottenuti dimostrano che l'ischemia/riperfusion determina una deregolazione dell'autofagia nella retina di ratto, poiché il processo si associa ad una ridotta espressione della proteina LC3II, un marker specifico che indica il grado di attivazione del processo autofagico, e della proteina Beclin-1, coinvolta nella fase iniziale di formazione dell'autofagosoma.

L'analisi in immunofluorescenza delle proteina Beclin-1 nella retina normale di ratto dimostra che, sebbene si osservi una distribuzione diffusa in tutti gli strati della retina, tale immunoreattività risulta più marcata nello strato delle cellule ganglionari retiniche suggerendo che, a livello dello strato retinico più interno si abbia una maggiore attivazione o coinvolgimento del processo autofagico. A distanza di sette giorni dall'induzione dell'insulto ischemico, i livelli di espressione sia di LC3II che di Beclin-1, risultano paragonabili ai livelli basali delle retine controllo, indicando che la dinamica del processo autofagico, alterata nei tempi precoci della riperfusione, ritorna a livelli fisiologici in tempi più tardivi.

La modulazione del processo autofagico è stata precedentemente riportata anche in altri modelli sperimentali di danno retinico, sebbene a seconda dello stimolo si possa osservare

induzione o deregolazione dell'autofagia. Uno studio recente ha dimostrato come, in seguito al danno indotto mediante transezione del nervo ottico nel ratto, si osservi un'aumentata espressione delle proteine LC3II, Beclin-1, Atg5, Atg7 e Atg12, indicando una rapida attivazione dell'autofagia (Kim et al., 2008b). Nello stesso modello sperimentale di danno retinico sviluppato nel topo, il trattamento con rapamicina attiva l'autofagia *in vivo* e riduce la morte delle cellule ganglionari retiniche, suggerendo un ruolo neuroprotettivo dell'autofagia (Rodriguez-Muela et al., 2011). Questo dato è stato ulteriormente confermato da studi condotti in topi transgenici che non esprimono la proteina Atg4B sottoposti alla transezione del nervo ottico nei quali la ridotta attivazione del processo autofagico si associa ad un aumento della morte delle cellule ganglionari retiniche (Rodriguez-Muela et al., 2011).

L'osservazione di alterazioni della via autofagica in modelli diversi di insulto retinico suggerisce che questa via possa essere coinvolta nei processi di neurodegenerazione retinica così come è già stato riportato per altre patologie neurodegenerative del sistema nervoso centrale. Un crescente numero di evidenze sperimentali suggerisce, infatti, che la disfunzione o la deregolazione autofagica sia associata a numerosi disordini neurodegenerativi cronici, come il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la malattia di Huntington (Garcia-Arencibia et al., 2010; Wong and Cuervo, 2010). I neuroni sembrano infatti mostrare una particolare suscettibilità ad alterazioni del processo autofagico; questo potrebbe in parte derivare dalla loro natura post-mitotica che non permette la redistribuzione delle proteine alterate o danneggiate nelle cellule figlie (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2007b).

E' stato osservato in diversi modelli sperimentali della malattia di Huntington *in vitro*, nella drosofila e nel topo che l'induzione dell'autofagia, attraverso l'inibizione della chinasi mTOR, protegge dalla tossicità mediata dall'accumulo di poliglutamina e della proteina mutata huntingtina riducendo la morte cellulare (Ravikumar et al., 2004). Inoltre, il silenziamento genico della proteina Beclin-1 in colture striatali di topo ST Q111/Q111 determina un accumulo significativo della proteina huntingtina mutata Q111 aggravando la progressione della patologia (Shibata et al., 2006).

Studi post-mortem condotti sul cervello di pazienti colpiti dalla malattia di Alzheimer hanno rivelato un accumulo di vescicole autofagiche (AVs) nell'area neocorticale, a livello dei neuriti e dei terminali sinaptici, dovuto probabilmente all'alterazione dei sistemi di trasporto vescicolare e di maturazione degli autofagosomi (Nixon et al., 2005). Inoltre, i livelli della proteina precursore dell'amiloide (*Amyloid precursor protein, APP*) e della proteina β -amiloide vengono ridotti dall'attivazione del processo autofagico mediata dall'over-espressione della proteina Beclin-1 (Jaeger et al., 2010).

L'effetto neuroprotettivo dell'autofagia è stato osservato anche in modelli sperimentali della malattia di Parkinson dove l'aumento dell'espressione della proteina Beclin-1 in colture cellulari di neuroblastoma di ratto B103 o nella corteccia e nell'ippocampo di topi transgenici che over-esprimono la proteina α -sinucleina riduce il danno neuronale associato alla degenerazione di sinapsi e dendriti (Spencer et al., 2009). Tuttavia, in questa patologia il ruolo dell'autofagia rimane controverso. Alcuni studi hanno, infatti, riportato come l'attivazione dell'autofagia mediata da MPP⁺ (*1-methyl-4-phenylpyridinium*) o dall'over-espressione dell' α -sinucleina-A53T mutata determina morte neuronale (Choubey et al., 2011; Stefanis et al., 2001). Uno stretto legame tra autofagia e neurodegenerazione è

stato evidenziato in studi condotti su topi knockout condizionali per i geni Atg a livello cerebrale. L'assenza dei geni Atg5 ed Atg7 in cellule neuronali di topo causa, infatti, neurodegenerazione dovuta all'accumulo di corpi d'inclusione citoplasmatici e di proteine poli-ubiquitinate a livello neuronale (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Inoltre, è stato osservato come la delezione della proteina Atg7 è associata, nel topo, alla comparsa di disturbi comportamentali come la riduzione dei riflessi degli arti e l'alterazione del movimento coordinato (Komatsu et al., 2006). Analogamente, il silenziamento genico della proteina FIP200 (*FAK family-interacting protein of 200 kDa*), che partecipa al processo d'induzione dell'autofagia insieme alla proteina ULK1 e Atg13, induce morte apoptotica nel cervelletto e degenerazione neuronale causata dall'accumulo di aggregati proteici ubiquitinati, indicando che l'autofagia svolge un ruolo importante nei processi di sopravvivenza neuronale (Liang et al., 2010).

Una crescente attenzione è stata recentemente focalizzata anche sul ruolo dell'autofagia nella perdita neuronale associata all'insulto acuto. Il danno ipossico/ischemico è un potente stimolo per l'induzione dell'autofagia, sebbene il suo ruolo nella morte neuronale rimane controverso. Alcuni studi hanno riportato, in topi sottoposti ad occlusione dell'arteria carotide comune, un aumento del danno cellulare caratterizzato dalla degenerazione di assoni e sinapsi dei neuroni corticali associato all'accumulo di vacuoli autofagici (Adhami et al., 2006; Zhu et al., 2005). Le evidenze riportate da Koike e collaboratori supportano il ruolo detrimentalmente dell'autofagia, evidenziando un'aumentata attività autofagica nei neuroni piramidali dell'ippocampo in seguito all'insulto ipossico/ischemico e come il danno neuronale indotto sia ridotto in topi knockout per la proteina Atg7 (Koike et al., 2008). Viceversa, uno studio condotto da Carloni e colleghi suggerisce che l'inibizione

dell'autofagia, mediante somministrazione intracerebro-ventricolare di 3-metil-adenina e wortmannina, 20 minuti prima dell'insulto ischemico, riduce l'espressione della proteina Beclin-1 aumentando la morte cellulare necrotica ed il danno cerebrale ischemico (Carlioni et al., 2008). Anche per quanto riguarda la neurodegenerazione retinica sono state riportate evidenze sperimentali sia a favore di un ruolo protettivo che detrimentalmente del processo autofagico. L'attivazione sostenuta della via di trasduzione mediata dalla chinasi mTOR inibisce l'autofagia determinando la neurodegenerazione dei fotorecettori nella drosophila e nel topo in seguito al danno indotto dalla luce, dallo stress ossidativo (Kunchithapautham and Rohrer, 2007; Wang et al., 2009) e in modelli sperimentali di retina pigmentosa (Punzo et al., 2009). Viceversa, altri studi hanno riportato come la delezione della fosfatasi PTEN, un regolatore negativo della via di trasduzione mTOR o della proteina TSC1 in cellule ganglionari retiniche adulte, promuove la rigenerazione assonale in seguito alla transezione del nervo ottico (Park et al., 2008). Studi condotti da Knoferle e collaboratori hanno riportato un accumulo di autofagosomi, in seguito alla lesione del nervo ottico indotta da diversi stimoli dannosi o secondariamente al danno indotto dall'accumulo di Ca^{2+} e come, il blocco del processo autofagico, attraverso l'utilizzo dell'inibitore 3-metil-adenina, ritarda la degenerazione assonale riducendo le alterazioni ultrastrutturali a livello del nervo ottico (Knoferle et al., 2010).

Nel nostro studio, il ruolo dell'autofagia nella degenerazione delle cellule ganglionari retiniche è stato valutato utilizzando colture immortalizzate di cellule ganglionari retiniche sottoposte a deprivazione da siero per 24h. Questa tipologia di danno mima la riduzione dell'apporto di fattori trofici osservato in corso di glaucoma (Cohen et al., 1994; Martin et al., 2003) e rappresenta uno dei principali fattori di stress cellulare in grado di stimolare

l'attivazione del processo autofagico (Kim et al., 2008b; Mortimore and Poso, 1987; Rodriguez-Muela et al., 2011). Nelle cellule RGC-5, la deprivazione da siero non induce, ai tempi considerati, morte cellulare, sia di tipo apoptotico che necrotico, in accordo con quanto riportato da alcuni studi che dimostrano come la deprivazione da siero sia associata alla disfunzione mitocondriale e alla morte cellulare apoptotica solo in un periodo di tempo più tardivo (Charles et al., 2005; Krishnamoorthy et al., 2001). Viceversa, si osserva, dopo 24h di deprivazione, una significativa attivazione del processo autofagico, dimostrata dall'induzione della proteina Beclin-1 e dall'accumulo di LC3II. L'inibizione farmacologica dell'autofagia, mediante trattamento con Bafilomicina-A1 o 3-metil-adenina, due sostanze che bloccano rispettivamente il processo di fusione dell'autofagosoma con il lisosoma e l'attività della PI3K-III nella fase iniziale del meccanismo autofagico, ed il silenziamento genico della proteina Beclin-1 *in vitro*, ha ridotto in modo significativo la vitalità cellulare in condizioni di deprivazione da siero.

I dati riportati nel presente lavoro suggeriscono un ruolo protettivo dell'autofagia nelle cellule ganglionari retiniche, e sono in accordo con quanto dimostrato recentemente da Rodriguez e colleghi, i quali riportano come l'induzione farmacologica del processo autofagico con rapamicina protegge le cellule RGC-5 trattate con paraquat riducendo la morte cellulare e il danno mitocondriale indotto dallo stress ossidativo; questo effetto viene revertito dal trattamento con l'inibitore 3-metil-adenina il quale determina una riduzione della vitalità delle cellule RGC-5 (Rodriguez-Muela et al., 2011).

Nelle nostro paradigma sperimentale *in vivo*, la modulazione dei livelli di Beclin-1 e LC3II, non è accompagnata da variazioni dei livelli di espressione di altre proteine coinvolte nella regolazione del processo autofagico come Atg4, Atg7 e Atg12. Viceversa,

abbiamo osservato, dopo 1 ora di riperfusione, un trend alla riduzione di p62/SQSTM1 (*Sequestosome 1*). Questa proteina si localizza sulla membrana dell'autofagosoma, guida la degradazione di aggregati proteici ubiquitinati e proteine alterate attraverso l'interazione con LC3II ed è costantemente degradata durante il processo autofagico (Pankiv et al., 2007). Diversi studi hanno documentato, sia *in vivo* che *in vitro*, che l'inattivazione del processo autofagico determina un aumento dei livelli di espressione della proteina p62 (Komatsu et al., 2007a; Korolchuk et al., 2009; Nezis et al., 2008). Viceversa, una riduzione dei livelli della proteina p62 potrebbe essere interpretata come un aumento dell'attività autofagica o del turnover dell'autofagolisosoma (Kuma et al., 2004; Wang et al., 2006). Pertanto, nel modello d'ischemia retinica utilizzato nel presente lavoro, la riduzione dell'espressione della proteina p62 potrebbe deporre a favore di un'attivazione precoce del processo autofagico nella prima fase dell'insulto ischemico. Questo risultato è supportato inoltre dall'analisi dell'espressione della proteina LC3II in corso d'ischemia. Normalmente, i livelli della forma citosolica LC3I sono molto stabili e si riducono in condizioni di stress cellulare causando un'aumentata espressione della forma lipidata LC3II (Kuma et al., 2004).

Nel nostro studio i livelli di espressione della proteina LC3II si riducono subito dopo l'ischemia; questo risultato, in accordo con quanto osservato in precedenza per la proteina p62, potrebbe indicare un'elevata velocità di degradazione della proteina a livello dell'autofagosoma piuttosto che un ridotta o mancata attivazione del processo autofagico (Mizushima and Yoshimori, 2007).

Tale dato è supportato ulteriormente dal possibile coinvolgimento della chinasi PKB/Akt che interviene nella regolazione del processo autofagico. Questa proteina viene stimolata

dall'attivazione dei recettori ad attività tirosina-chinasi attraverso il legame di ormoni e fattori di crescita ed è coinvolta nell'attivazione della chinasi mTOR la quale agisce come il principale regolatore negativo del processo autofagico (Petiot et al., 2000).

Studi condotti precedentemente nel nostro laboratorio, hanno riportato una rapida deattivazione della chinasi Akt alla fine dell'ischemia nella retina di ratto, seguita da una sostenuta attivazione ad un'ora di riperfusione e nei tempi successivi della fase post-ischemica (Russo et al., 2008).

Pertanto, la riduzione dei livelli di espressione delle proteine p62 ed LC3 potrebbe derivare dalla ridotta attivazione della chinasi Akt conseguente all'ischemia. Tuttavia, l'attivazione sostenuta di Akt, riportata nella fase post-ischemica da Russo e colleghi, potrebbe essere responsabile del blocco del processo autofagico e della ridotta espressione di LC3II osservata dopo 1 ora di riperfusione.

D'altra parte, quest'ultimo evento può essere anche interpretato come conseguenza della riduzione della proteina Beclin-1, la quale agisce a monte di LC3II nella fase d'induzione del processo autofagico. Questa ipotesi è ulteriormente supportata dal silenziamento *in vitro* della proteina Beclin-1 che induce una riduzione dell'accumulo di LC3II riproducendo una condizione simile a quella osservata nel modello ischemico *in vivo*.

Inoltre, la riduzione della vitalità osservata in seguito al silenziamento genico di Beclin1 nelle cellule RGC-5 suggerisce che la riduzione dell'espressione di questa proteina svolga un ruolo importante nella degenerazione e morte delle cellule ganglionari retiniche.

D'altra parte, come riportato in precedenza, l'inibizione dell'autofagia conseguente alla ridotta espressione della proteina Beclin-1 è associata all'alterazione del catabolismo di

aggregati proteici e partecipa ai processi neurodegenerativi in diverse condizioni patologiche (Jaeger et al., 2010; Ravikumar et al., 2004; Shibata et al., 2006).

Abbiamo potuto osservare come, nel nostro modello sperimentale, la riduzione di Beclin-1 dipenda dalla sua degradazione proteolitica con formazione di un frammento di 50kDa, il cui accumulo segue un andamento inverso rispetto alla riduzione della proteina di 60kDa. Il frammento si accumula, infatti, durante la prima ora di riperfusione parallelamente alla riduzione della proteina *full-length*. Beclin-1 è stata recentemente identificata come uno dei substrati delle proteasi caspasi. Cho e collaboratori hanno evidenziato come la proteina Beclin-1 (³⁵S-Atg6) viene clivata *in vitro* in seguito all'incubazione con le caspasi ricombinanti -3, -6, -9 e -10. Nello stesso studio, il trattamento isolato della frazione citosolica di cellule HeLa che over-esprimono la proteina Beclin-1, ed esposte al ligando TRAIL, con le diverse caspasi attive conferma che questa proteina rappresenta un substrato specifico delle caspasi, in particolare delle caspasi-3 e -10 (Cho et al., 2009).

Inoltre, uno studio recente ha osservato che la riduzione del processo autofagico in cellule HeLa, mediata dalla proteina Bax o dal trattamento con TNF- α e cicloesimide (CHX), è dovuta al clivaggio della proteina beclin-1 indotto dalla caspasi-3 (Luo and Rubinsztein, 2010).

Wirawan e collaboratori confermano tale dato riportando il coinvolgimento delle caspasi-3, -7 e -8 nel clivaggio di Beclin-1 in colture di cellule-B di topo Ba/F3. Questo processo di clivaggio si verifica nella porzione C-terminale della proteina e produce due distinti frammenti di 35 e 37kDa che comportano la perdita di funzione di Beclin-1 e la conseguente incapacità di attivare il processo autofagico (Wirawan et al., 2010). Inoltre è stato dimostrato come il clivaggio della proteina alteri la localizzazione subcellulare dei

frammenti ottenuti favorendone la traslocazione a livello mitocondriale (Wirawan et al., 2010). Tale processo è inoltre associato all'acquisizione di una funzione pro-apoptica mediata dall'induzione del rilascio del citocromo-c e della proteina HtrA2/Omi (*high-temperature requirement protein-A2*) dai mitocondri (Wirawan et al., 2010). Il coinvolgimento delle caspasi nella degenerazione neuronale delle cellule retiniche è stato documentato in modelli sperimentali di glaucoma e durante l'insulto ischemico (Katai and Yoshimura, 1999; Kermer et al., 1998; McKinnon et al., 2002; Singh et al., 2001). I meccanismi di morte cellulare indotti dall'ischemia retinica sono caratterizzati da una fase precoce di attivazione del processo necrotico, mediata dall'attivazione della cascata eccitotossica indotta dal glutammato, e da una fase tardiva di attivazione del processo apoptotico che si verifica circa 12h dopo la fase di riperfusione (Fujita et al., 2009; Zhang et al., 2007a). Pertanto, un marcato aumento dell'attivazione delle caspasi, in particolare della caspasi-3 è stata osservata nella retina ischemica solo dopo 3 giorni di riperfusione (Fujita et al., 2009).

Sulla base di questi presupposti, la frammentazione di Beclin-1 osservata in seguito ad ischemia/riperfusione nella retina non può essere ascrivibile ad un'attività caspatica, sia in dipendenza dei diversi tempi di attivazione degli enzimi coinvolti, sia per via dei diversi pesi molecolari dei frammenti osservati. E' possibile pertanto escludere, nelle nostre condizioni sperimentali, il coinvolgimento delle caspasi nella formazione del frammento a 50kDa durante il clivaggio della proteina Beclin-1.

Nella retina, così come in altri tessuti, l'interruzione parziale o completa del flusso ematico porta ad una morte neuronale a carattere eccitotossico (Joo et al., 1999; Neal et al., 1994). Il coinvolgimento della cascata eccitotossica nel modello d'ischemia retinica utilizzato nel

presente lavoro è stato ampiamente documentato da diversi studi. E' stato, infatti, riportato l'accumulo intravitreale di glutammato nel coniglio, nel ratto (Louzada-Junior et al., 1992; Nucci et al., 2005), nella scimmia e nell'uomo (Dreyer et al., 1996). L'eccessiva stimolazione dei recettori NMDA del glutammato porta ad un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} con conseguente attivazione di enzimi Ca^{2+} -dipendenti, come fosfolipasi, endonucleasi e proteasi responsabili della degradazione di componenti cellulari fondamentali. Le calpaine sono proteasi Ca^{2+} -dipendenti la cui attivazione è strettamente correlata all'eccessiva stimolazione dei recettori del glutammato (Chiu et al., 2005; Lynch and Guttman, 2002; Volbracht et al., 2005). I dati riportati nel presente studio dimostrano che le calpaine sono attivate precocemente in seguito all'insulto ischemico, raggiungono la massima attivazione ad 1h di riperfusione, e la loro attività proteolitica si mantiene elevata fino a 24h.

Il coinvolgimento delle proteasi calpaine nella morte neuronale è stato ampiamente documentato in diversi modelli sperimentali. Diversi studi hanno riportato come l'inibizione farmacologica delle calpaine con ALLN riduce il danno neuronale in seguito ad ischemia cerebrale nel ratto o in colture primarie neuronali sottoposte ad ipossia (Hong et al., 1994; Rami et al., 2000; Rami and Kriegstein, 1993). Cao e colleghi ne confermano il ruolo detrimentalmente in colture primarie ippocampali e corticali sottoposti ad insulto ischemico mediante deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD). Inoltre nello stesso modello sperimentale, l'over-espressione dell'inibitore calpastatina riduce la morte cellulare bloccando il rilascio del fattore apoptotico AIF dai mitocondri (Cao et al., 2007). Nella retina, la somministrazione intravitreale dell'inibitore delle calpaine SJA6017 protegge le cellule ganglionari retiniche dal danno ischemico indotto attraverso

l'occlusione dell'arteria retinica centrale nel ratto (Sakamoto et al., 2000). Lo stesso effetto è stato osservato negli studi in cui si riporta che il trattamento sistemico con l'inibitore SNJ-1945 riduce l'attivazione delle calpaine e la neurodegenerazione retinica in un modello ischemico di ipertensione oculare acuta (Oka et al., 2006) o in seguito al danno retinico indotto dalla somministrazione intravitreale di NMDA (Shimazawa et al., 2010).

Nel presente lavoro, il profilo temporale dell'attivazione delle calpaine osservato nella fase di riperfusione dimostra un andamento sovrapponibile alla comparsa ed accumulo del frammento della proteina Beclin-1, suggerendo il possibile coinvolgimento di questi enzimi nella proteolisi di questo substrato.

Questa ipotesi è stata confermata dai risultati ottenuti sia mediante antagonismo del recettore NMDA che attraverso l'inibizione farmacologica delle calpaine. Infatti, la somministrazione intravitreale dell'antagonista non competitivo dei recettori NMDA del glutammato, l'MK-801, mentre riduce l'attivazione delle calpaine, previene la comparsa del frammento proteolitico di Beclin-1. Analogamente, l'inibizione diretta delle calpaine, mediante gli inibitori MDL28170 e SJA6017 previene sia la riduzione di Beclin-1 osservata ad 1h di riperfusione che il suo clivaggio.

Il coinvolgimento diretto delle calpaine nella frammentazione di Beclin-1 è stato definitivamente confermato mediante il silenziamento intravitreale della subunità-1 delle calpaine che, così come osservato mediante l'approccio farmacologico, previene il clivaggio proteolitico di Beclin-1 durante la riperfusione.

Questi risultati identificano per la prima volta *in vivo*, la proteina Beclin-1 come un substrato delle calpaine, offrendo nuovi spunti sia per l'interpretazione degli effetti

neuroprotettivi associati all'inibizione delle calpaine, che per la possibile relazione fra morte eccitotossica ed autofagia.

L'identificazione di Beclin-1 come substrato delle calpaine suggerisce, infatti, che la modulazione del processo autofagico, conseguente all'inibizione dell'attività proteolitica di queste proteasi, possa essere uno dei meccanismi alla base degli effetti neuroprotettivi osservati. Inoltre, i risultati riportati in questo studio, estendono i dati già presenti in letteratura sul coinvolgimento delle calpaine nel processo autofagico. Studi recenti hanno, infatti, dimostrato come le proteasi calpaine inibiscono l'attivazione dell'autofagia *in vitro* attraverso il clivaggio della proteina Atg5 e tale effetto viene revertito dal trattamento con l'inibitore delle calpaine ALLN (Yousefi et al., 2006). L'attività delle calpaine riduce inoltre l'espressione di proteine autofagiche come Beclin-1 e Atg7 in colture di epatociti sottoposte ad anossia e riossigenazione (Kim et al., 2008a).

Riguardo il ruolo dell'autofagia nel danno eccitotossico la letteratura riporta dati contrastanti. Il trattamento di sezioni organotipiche ippocampali con NMDA è associato al danno neuronale mediato dall'attivazione del processo autofagico (Borsello et al., 2003). Inoltre, nello stesso modello sperimentale, il trattamento con l'inibitore 3-metil-adenina, che agisce bloccando il processo di formazione dell'autofagosoma, previene la morte neuronale (Borsello et al., 2003; Sadasivan et al., 2010). Allo stesso modo, Wang e collaboratori hanno riportato l'effetto detrimentalmente dell'autofagia attivata in seguito all'iniezione di acido kainico nello striato del ratto (Wang et al., 2008b). Questi dati suggeriscono pertanto che l'attivazione dell'autofagia e il processo eccitotossico potrebbero agire utilizzando una via comune Ca^{2+} -mediata dovuta all'attivazione dei recettori del glutammato. Viceversa, nel 1993 Gordon e collaboratori hanno riportato

l'inibizione del processo autofagico in epatociti di ratto in seguito all'utilizzo di sostanze che aumentano il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari (Gordon et al., 1993). In accordo con quest'ultimo studio, è stato anche recentemente riportato come l'utilizzo di antagonisti dei canali-L del Ca^{2+} e il silenziamento genico delle calpaine *in vitro* aumentano l'espressione della proteina LC3II favorendo l'attivazione dell'autofagia (Williams et al., 2008; Zhang et al., 2007b). I dati riportati nel nostro studio supportano l'inibizione Ca^{2+} -dipendente del processo autofagico attraverso il clivaggio della proteina Beclin-1 mediato dall'attivazione delle proteasi calpaine e forniscono un possibile legame tra l'eccitotossicità e la riduzione del processo autofagico osservata in diverse patologie neurodegenerative nelle quali si osserva il coinvolgimento dei fenomeni eccitotossici.

In conclusione, i dati riportati nel presente lavoro indicano una deregolazione dell'autofagia nella retina sottoposta ad ischemia/riperfusionne retinica, supportano il ruolo neuroprotettivo di questo processo nelle cellule ganglionari retiniche e suggeriscono che l'eccitotossicità, indotta dall'eccessiva stimolazione dei recettori NMDA del glutammato, regola negativamente l'autofagia attraverso il clivaggio mediato dalle calpaine della proteina Beclin-1.

Recentemente, la connessione tra l'autofagia ed i processi neurodegenerativi è stata rafforzata da diversi studi che hanno evidenziato la vulnerabilità dei neuroni ai segnali di stress cellulare che alterano il processo autofagico. I dati ottenuti suggeriscono che la regolazione di questo processo potrebbe essere particolarmente importante nella retina e nelle patologie oculari associate ad eventi ischemici.

Pertanto, l'ulteriore comprensione della regolazione e modulazione dell'autofagia in condizioni fisiologiche e patologiche nella retina potrebbe portare ad un rilevante progresso delle conoscenze dei meccanismi che sottendono alla neurodegenerazione glaucomatosa ed offrire nuovi target per lo sviluppo di approcci terapeutici neuroprotettivi innovativi.

BIBLIOGRAFIA

- Aarts, M., Iihara, K., Wei, W. L., Xiong, Z. G., Arundine, M., Cerwinski, W., MacDonald, J. F., and Tymianski, M. (2003). A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* *115*, 863-877.
- Abe, T., Sugihara, H., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1992). Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J Biol Chem* *267*, 13361-13368.
- Adachi, K., Kashii, S., Masai, H., Ueda, M., Morizane, C., Kaneda, K., Kume, T., Akaike, A., and Honda, Y. (1998). Mechanism of the pathogenesis of glutamate neurotoxicity in retinal ischemia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* *236*, 766-774.
- Adachi, M., Takahashi, K., Nishikawa, M., Miki, H., and Uyama, M. (1996). High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* *234*, 445-451.
- Adhami, F., Liao, G., Morozov, Y. M., Schloemer, A., Schmithorst, V. J., Lorenz, J. N., Dunn, R. S., Vorhees, C. V., Wills-Karp, M., Degen, J. L., *et al.* (2006). Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am J Pathol* *169*, 566-583.
- Agarraberes, F. A., and Dice, J. F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* *114*, 2491-2499.
- Allingham, R. R., de Kater, A. W., Ethier, C. R., Anderson, P. J., Hertzmark, E., and Epstein, D. L. (1992). The relationship between pore density and outflow facility in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *33*, 1661-1669.
- Allingham, R. R., Liu, Y., and Rhee, D. J. (2009). The genetics of primary open-angle glaucoma: a review. *Exp Eye Res* *88*, 837-844.
- Altar, C. A., and DiStefano, P. S. (1998). Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci* *21*, 433-437.
- Ames, A., 3rd, Li, Y. Y., Heher, E. C., and Kimble, C. R. (1992). Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na⁺ transport. *J Neurosci* *12*, 840-853.
- Anderson, D. R., and Hendrickson, A. (1974). Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol* *13*, 771-783.
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* *182*, 685-701.

- Babot, Z., Cristofol, R., and Sunol, C. (2005). Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci* *21*, 103-112.
- Backer, J. M., Bourret, L., and Dice, J. F. (1983). Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A requires the amino-terminal 20 amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 2166-2170.
- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A. M. (2008). The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol* *28*, 5747-5763.
- Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kaushik, S., Kiffin, R., and Cuervo, A. M. (2010). Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Mol Cell* *39*, 535-547.
- Bano, D., Young, K. W., Guerin, C. J., Lefevre, R., Rothwell, N. J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., and Nicotera, P. (2005). Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* *120*, 275-285.
- Barbour, B., Brew, H., and Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* *335*, 433-435.
- Beal, M. F. (1992). Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J* *6*, 3338-3344.
- Beck, J., Lenart, B., Kintner, D. B., and Sun, D. (2003). Na-K-Cl cotransporter contributes to glutamate-mediated excitotoxicity. *J Neurosci* *23*, 5061-5068.
- Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P., and Harper, J. W. (2010). Network organization of the human autophagy system. *Nature* *466*, 68-76.
- Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., and Aguayo, A. J. (1994). Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* *14*, 4368-4374.
- Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V., and Rosenthal, A. (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* *7*, 857-866.
- Betin, V. M., and Lane, J. D. (2009). Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* *122*, 2554-2566.

- Bi, X., Bi, R., and Baudry, M. (2000). Calpain-mediated truncation of glutamate ionotropic receptors. Methods for studying the effects of calpain activation in brain tissue. *Methods Mol Biol* 144, 203-217.
- Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., and Lipton, S. A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7162-7166.
- Borsello, T., Croquelois, K., Hornung, J. P., and Clarke, P. G. (2003). N-methyl-d-aspartate-triggered neuronal death in organotypic hippocampal cultures is endocytic, autophagic and mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Eur J Neurosci* 18, 473-485.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2009). Beclin 1: a BH3-only protein that fails to induce apoptosis. *Oncogene* 28, 2125-2127.
- Brandstatter, J. H., Hartveit, E., Sassoe-Pognetto, M., and Wassle, H. (1994). Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci* 6, 1100-1112.
- Buchi, E. R., Suivaizdis, I., and Fu, J. (1991). Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica* 203, 138-147.
- Budd, S. L., and Nicholls, D. G. (1996). Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 67, 2282-2291.
- Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* 12, 671-682.
- Cao, G., Xing, J., Xiao, X., Liou, A. K., Gao, Y., Yin, X. M., Clark, R. S., Graham, S. H., and Chen, J. (2007). Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J Neurosci* 27, 9278-9293.
- Carloni, S., Buonocore, G., and Balduini, W. (2008). Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis* 32, 329-339.
- Chan, E. Y., Longatti, A., McKnight, N. C., and Tooze, S. A. (2009). Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 29, 157-171.

- Charles, I., Khalyfa, A., Kumar, D. M., Krishnamoorthy, R. R., Roque, R. S., Cooper, N., and Agarwal, N. (2005). Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *46*, 1330-1338.
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J. C., and Gottlieb, R. A. (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* *276*, 30724-30728.
- Chiu, K., Lam, T. T., Ying Li, W. W., Caprioli, J., and Kwong Kwong, J. M. (2005). Calpain and N-methyl-d-aspartate (NMDA)-induced excitotoxicity in rat retinas. *Brain Res* *1046*, 207-215.
- Cho, D. H., Jo, Y. K., Hwang, J. J., Lee, Y. M., Roh, S. A., and Kim, J. C. (2009). Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Lett* *274*, 95-100.
- Choi, D. W. (1988a). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* *11*, 465-469.
- Choi, D. W. (1988b). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* *1*, 623-634.
- Choi, W. S., Lee, E. H., Chung, C. W., Jung, Y. K., Jin, B. K., Kim, S. U., Oh, T. H., Saïdo, T. C., and Oh, Y. J. (2001). Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *J Neurochem* *77*, 1531-1541.
- Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, P., Kuum, M., Zharkovsky, A., and Kaasik, A. (2011). Mutant A53T alpha-synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *J Biol Chem* *286*, 10814-10824.
- Ciechomska, I. A., Goemans, G. C., Skepper, J. N., and Tolkovsky, A. M. (2009). Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene* *28*, 2128-2141.
- Codogno, P., and Meijer, A. J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* *12 Suppl 2*, 1509-1518.
- Cohen, A., Bray, G. M., and Aguayo, A. J. (1994). Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth in vitro. *J Neurobiol* *25*, 953-959.
- Cong, J., Goll, D. E., Peterson, A. M., and Kapprell, H. P. (1989). The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J Biol Chem* *264*, 10096-10103.

- Congdon, N., Wang, F., and Tielsch, J. M. (1992). Issues in the epidemiology and population-based screening of primary angle-closure glaucoma. *Surv Ophthalmol* 36, 411-423.
- Congdon, N. G., Youlin, Q., Quigley, H., Hung, P. T., Wang, T. H., Ho, T. C., and Tielsch, J. M. (1997). Biometry and primary angle-closure glaucoma among Chinese, white, and black populations. *Ophthalmology* 104, 1489-1495.
- Conn, P. J., and Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 205-237.
- Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501-503.
- Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (2000). Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic* 1, 570-583.
- 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.
- Curtis, D. R., Phillis, J. W., and Watkins, J. C. (1959). Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* 183, 611-612.
- Das, A., Garner, D. P., Del Re, A. M., Woodward, J. J., Kumar, D. M., Agarwal, N., Banik, N. L., and Ray, S. K. (2006). Calpeptin provides functional neuroprotection to rat retinal ganglion cells following Ca²⁺ influx. *Brain Res* 1084, 146-157.
- David, R., Tessler, Z., and Yassur, Y. (1985). Epidemiology of acute angle-closure glaucoma: incidence and seasonal variations. *Ophthalmologica* 191, 4-7.
- De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28, 435-492.
- DeVries, S. H. (2000). Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron* 28, 847-856.
- DeVries, S. H., and Baylor, D. A. (1995). An alternative pathway for signal flow from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10658-10662.
- Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., *et al.* (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol* 191, 155-168.

- Dice, J. F., Terlecky, S. R., Chiang, H. L., Olson, T. S., Isenman, L. D., Short-Russell, S. R., Freundlieb, S., and Terlecky, L. J. (1990). A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes. *Semin Cell Biol* 1, 449-455.
- Ding, W. X., Ni, H. M., Gao, W., Hou, Y. F., Melan, M. A., Chen, X., Stolz, D. B., Shao, Z. M., and Yin, X. M. (2007). Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* 282, 4702-4710.
- Djavaheri-Mergny, M., Maiuri, M. C., and Kroemer, G. (2010). Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene* 29, 1717-1719.
- Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81, 163-221.
- Dreyer, E. B., Zurakowski, D., Schumer, R. A., Podos, S. M., and Lipton, S. A. (1996). Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 114, 299-305.
- Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E., and De Virgilio, C. (2005). The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol Cell* 19, 15-26.
- Efeyan, A., and Sabatini, D. M. (2010). mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol* 22, 169-176.
- Egami, Y., Kiryu-Seo, S., Yoshimori, T., and Kiyama, H. (2005). Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 1206-1213.
- Erie, J. C., Hodge, D. O., and Gray, D. T. (1997). The incidence of primary angle-closure glaucoma in Olmsted County, Minnesota. *Arch Ophthalmol* 115, 177-181.
- Euler, T., and Masland, R. H. (2000). Light-evoked responses of bipolar cells in a mammalian retina. *J Neurophysiol* 83, 1817-1829.
- Euler, T., Schneider, H., and Wassle, H. (1996). Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci* 16, 2934-2944.
- Fader, C. M., Sanchez, D., Furlan, M., and Colombo, M. I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic* 9, 230-250.
- Farre, J. C., and Subramani, S. (2004). Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol* 14, 515-523.

- Fletcher, E. L., Hack, I., Brandstatter, J. H., and Wassle, H. (2000). Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol* 420, 98-112.
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 917-929.
- Foster, P. J., Buhrmann, R., Quigley, H. A., and Johnson, G. J. (2002). The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol* 86, 238-242.
- French, J. P., Quindry, J. C., Falk, D. J., Staib, J. L., Lee, Y., Wang, K. K., and Powers, S. K. (2006). Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H128-136.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* 19, 2092-2100.
- Fujita, R., Ueda, M., Fujiwara, K., and Ueda, H. (2009). Prothymosin-alpha plays a defensive role in retinal ischemia through necrosis and apoptosis inhibition. *Cell Death Differ* 16, 349-358.
- Ganley, I. G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 284, 12297-12305.
- Garcia-Arencibia, M., Hochfeld, W. E., Toh, P. P., and Rubinsztein, D. C. (2010). Autophagy, a guardian against neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 21, 691-698.
- Gascon, S., Sobrado, M., Roda, J. M., Rodriguez-Pena, A., and Diaz-Guerra, M. (2008). Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Mol Psychiatry* 13, 99-114.
- Gerber, U. (2003). Metabotropic glutamate receptors in vertebrate retina. *Doc Ophthalmol* 106, 83-87.
- Goldberg, I. (2007). Is this neuroprotective drug good for my glaucoma patients? Some key factors in clinical decision-making. *Can J Ophthalmol* 42, 418-420.
- Gordon, M. O., Beiser, J. A., Brandt, J. D., Heuer, D. K., Higginbotham, E. J., Johnson, C. A., Keltner, J. L., Miller, J. P., Parrish, R. K., 2nd, Wilson, M. R., and Kass, M. A. (2002). The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 120, 714-720; discussion 829-730.

- Gordon, P. B., Holen, I., Fosse, M., Rotnes, J. S., and Seglen, P. O. (1993). Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. *J Biol Chem* 268, 26107-26112.
- Grunder, T., Kohler, K., and Guenther, E. (2000). Distribution and developmental regulation of AMPA receptor subunit proteins in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3600-3606.
- Hack, I., Peichl, L., and Brandstatter, J. H. (1999). An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14130-14135.
- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656-667.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., and Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889.
- Harrison, B., Kraus, M., Burch, L., Stevens, C., Craig, A., Gordon-Weeks, P., and Hupp, T. R. (2008). DAPK-1 binding to a linear peptide motif in MAP1B stimulates autophagy and membrane blebbing. *J Biol Chem* 283, 9999-10014.
- Hartveit, E., Brandstatter, J. H., Enz, R., and Wassle, H. (1995). Expression of the mRNA of seven metabotropic glutamate receptors (mGluR1 to 7) in the rat retina. An in situ hybridization study on tissue sections and isolated cells. *Eur J Neurosci* 7, 1472-1483.
- Hartveit, E., and Veruki, M. L. (1997). All amacrine cells express functional NMDA receptors. *Neuroreport* 8, 1219-1223.
- Haverkamp, S., Grunert, U., and Wassle, H. (2000). The cone pedicle, a complex synapse in the retina. *Neuron* 27, 85-95.
- Haverkamp, S., Grunert, U., and Wassle, H. (2001a). Localization of kainate receptors at the cone pedicles of the primate retina. *J Comp Neurol* 436, 471-486.
- Haverkamp, S., Grunert, U., and Wassle, H. (2001b). The synaptic architecture of AMPA receptors at the cone pedicle of the primate retina. *J Neurosci* 21, 2488-2500.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 11, 1433-1437.

- He, C., and Klionsky, D. J. (2007). Atg9 trafficking in autophagy-related pathways. *Autophagy* 3, 271-274.
- He, C., and Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93.
- He, C., and Levine, B. (2010). The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol* 22, 140-149.
- Herzog, K. H., and von Bartheld, C. S. (1998). Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. *J Neurosci* 18, 2891-2906.
- Hong, S. C., Goto, Y., Lanzino, G., Soleau, S., Kassell, N. F., and Lee, K. S. (1994). Neuroprotection with a calpain inhibitor in a model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 25, 663-669.
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L. A., and Rabinowich, H. (2010). Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* 6, 891-900.
- Jaeger, P. A., Pickford, F., Sun, C. H., Lucin, K. M., Masliah, E., and Wyss-Coray, T. (2010). Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS One* 5, e11102.
- Jaeger, P. A., and Wyss-Coray, T. (2009). All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurodegener* 4, 16.
- Jefferis, G. J., Meloni, B. P., Bakker, A. J., and Knuckey, N. W. (2007). The role of the Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger (NCX) in neurons following ischaemia. *J Clin Neurosci* 14, 507-514.
- Joo, C. K., Choi, J. S., Ko, H. W., Park, K. Y., Sohn, S., Chun, M. H., Oh, Y. J., and Gwag, B. J. (1999). Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 713-720.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* 19, 5720-5728.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 117, 2805-2812.
- Kang, R., Livesey, K. M., Zeh, H. J., Loze, M. T., and Tang, D. (2010). HMGB1: a novel Beclin 1-binding protein active in autophagy. *Autophagy* 6, 1209-1211.

- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., and Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18, 571-580.
- Kaplan, D. R., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., and Parada, L. F. (1991). The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252, 554-558.
- Katai, N., and Yoshimura, N. (1999). Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2697-2705.
- Kaur, C., Foulds, W. S., and Ling, E. A. (2008). Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol* 2, 879-889.
- Kawasaki, A., Otori, Y., and Barnstable, C. J. (2000). Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3444-3450.
- Kermer, P., Klocker, N., Labes, M., and Bahr, M. (1998). Inhibition of CPP32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary cell death in vivo. *J Neurosci* 18, 4656-4662.
- Khaw, P. T., Shah, P., and Elkington, A. R. (2004a). Glaucoma--1: diagnosis. *BMJ* 328, 97-99.
- Khaw, P. T., Shah, P., and Elkington, A. R. (2004b). Glaucoma--2: treatment. *BMJ* 328, 156-158.
- Kim, J. S., Nitta, T., Mohuczy, D., O'Malley, K. A., Moldawer, L. L., Dunn, W. A., Jr., and Behrs, K. E. (2008a). Impaired autophagy: A mechanism of mitochondrial dysfunction in anoxic rat hepatocytes. *Hepatology* 47, 1725-1736.
- Kim, S. H., Munemasa, Y., Kwong, J. M., Ahn, J. H., Mareninov, S., Gordon, L. K., Caprioli, J., and Piri, N. (2008b). Activation of autophagy in retinal ganglion cells. *J Neurosci Res* 86, 2943-2951.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* 147, 435-446.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* 151, 263-276.

- Kirkin, V., Lamark, T., Johansen, T., and Dikic, I. (2009). NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* 5, 732-733.
- Klionsky, D. J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 118, 7-18.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., and Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5, 539-545.
- Knoferle, J., Koch, J. C., Ostendorf, T., Michel, U., Planchamp, V., Vutova, P., Tonges, L., Stadelmann, C., Bruck, W., Bahr, M., and Lingor, P. (2010). Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6064-6069.
- Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., *et al.* (2008). Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* 172, 454-469.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., *et al.* (2007a). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-1163.
- Komatsu, M., Wang, Q. J., Holstein, G. R., Friedrich, V. L., Jr., Iwata, J., Kominami, E., Chait, B. T., Tanaka, K., and Yue, Z. (2007b). Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14489-14494.
- Kong, G. Y., Van Bergen, N. J., Trounce, I. A., and Crowston, J. G. (2009). Mitochondrial dysfunction and glaucoma. *J Glaucoma* 18, 93-100.
- Korolchuk, V. I., Mansilla, A., Menzies, F. M., and Rubinsztein, D. C. (2009). Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell* 33, 517-527.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19, 312-318.
- Krishnamoorthy, R. R., Agarwal, P., Prasanna, G., Vopat, K., Lambert, W., Sheedlo, H. J., Pang, I. H., Shade, D., Wordinger, R. J., Yorio, T., *et al.* (2001). Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 86, 1-12.

- Kruman, I., Guo, Q., and Mattson, M. P. (1998). Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* *51*, 293-308.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* *432*, 1032-1036.
- Kumar, D. M., and Agarwal, N. (2007). Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence. *J Glaucoma* *16*, 334-343.
- Kunchithapautham, K., and Rohrer, B. (2007). Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress. *Autophagy* *3*, 433-441.
- Kwon, Y. H., Fingert, J. H., Kuehn, M. H., and Alward, W. L. (2009). Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med* *360*, 1113-1124.
- Le, A., Mukesh, B. N., McCarty, C. A., and Taylor, H. R. (2003). Risk factors associated with the incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *44*, 3783-3789.
- Lee, J. A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G., and Gao, F. B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* *17*, 1561-1567.
- Lee, J. S., Li, Q., Lee, J. Y., Lee, S. H., Jeong, J. H., Lee, H. R., Chang, H., Zhou, F. C., Gao, S. J., Liang, C., and Jung, J. U. (2009). FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol* *11*, 1355-1362.
- Leibowitz, H. M., Krueger, D. E., Maunder, L. R., Milton, R. C., Kini, M. M., Kahn, H. A., Nickerson, R. J., Pool, J., Colton, T. L., Ganley, J. P., *et al.* (1980). The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Surv Ophthalmol* *24*, 335-610.
- Leske, M. C., Connell, A. M., Wu, S. Y., Nemesure, B., Li, X., Schachat, A., and Hennis, A. (2001). Incidence of open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. The Barbados Eye Studies Group. *Arch Ophthalmol* *119*, 89-95.
- Leske, M. C., Heijl, A., Hussein, M., Bengtsson, B., Hyman, L., and Komaroff, E. (2003). Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol* *121*, 48-56.
- Levin, L. A. (2003). Retinal ganglion cells and neuroprotection for glaucoma. *Surv Ophthalmol* *48 Suppl 1*, S21-24.

- Levine, B., and Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-477.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- Liang, C., Lee, J. S., Inn, K. S., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., and Jung, J. U. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 10, 776-787.
- Liang, C. C., Wang, C., Peng, X., Gan, B., and Guan, J. L. (2010). Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *J Biol Chem* 285, 3499-3509.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79, 1431-1568.
- Lipton, S. A., and Rosenberg, P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330, 613-622.
- Liu, Q., Ju, W. K., Crowston, J. G., Xie, F., Perry, G., Smith, M. A., Lindsey, J. D., and Weinreb, R. N. (2007). Oxidative stress is an early event in hydrostatic pressure induced retinal ganglion cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 4580-4589.
- Louzada-Junior, P., Dias, J. J., Santos, W. F., Lachat, J. J., Bradford, H. F., and Coutinho-Netto, J. (1992). Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis. *J Neurochem* 59, 358-363.
- Lucas, D. R., and Newhouse, J. P. (1957a). The effects of nutritional and endocrine factors on an inherited retinal degeneration in the mouse. *AMA Arch Ophthalmol* 57, 224-235.
- Lucas, D. R., and Newhouse, J. P. (1957b). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58, 193-201.
- Luo, S., and Rubinsztein, D. C. (2010). Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ* 17, 268-277.
- Lutjen-Drecoll, E., Shimizu, T., Rohrbach, M., and Rohen, J. W. (1986). Quantitative analysis of 'plaque material' in the inner- and outer wall of Schlemm's canal in normal- and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 42, 443-455.
- Lynch, D. R., and Guttman, R. P. (2002). Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 717-723.
- MacGregor, D. G., Avshalumov, M. V., and Rice, M. E. (2003). Brain edema induced by in vitro ischemia: causal factors and neuroprotection. *J Neurochem* 85, 1402-1411.

- Magnusson, A., Haug, L. S., Walaas, S. I., and Ostvold, A. C. (1993). Calcium-induced degradation of the inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor/Ca(2+)-channel. *FEBS Lett* 323, 229-232.
- Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., *et al.* (2007a). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 26, 2527-2539.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007b). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 741-752.
- Martin, K. R., Levkovitch-Verbin, H., Valenta, D., Baumrind, L., Pease, M. E., and Quigley, H. A. (2002). Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2236-2243.
- Martin, K. R., Quigley, H. A., Zack, D. J., Levkovitch-Verbin, H., Kielczewski, J., Valenta, D., Baumrind, L., Pease, M. E., Klein, R. L., and Hauswirth, W. W. (2003). Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4357-4365.
- Martinez-Vicente, M., and Cuervo, A. M. (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 6, 352-361.
- Masland, R. H. (2001). Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol* 11, 431-436.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., and Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261-263.
- McKernan, D. P., Guerin, M. B., O'Brien, C. J., and Cotter, T. G. (2007). A key role for calpains in retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 5420-5430.
- McKinnon, S. J., Lehman, D. M., Kerrigan-Baumrind, L. A., Merges, C. A., Pease, M. E., Kerrigan, D. F., Ransom, N. L., Tahzib, N. G., Reitsamer, H. A., Levkovitch-Verbin, H., *et al.* (2002). Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1077-1087.
- Meldrum, B., and Garthwaite, J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 11, 379-387.
- Melena, J., and Osborne, N. N. (2001). Voltage-dependent calcium channels in the rat retina: involvement in NMDA-stimulated influx of calcium. *Exp Eye Res* 72, 393-401.
- Mitchell, P., Smith, W., Chey, T., and Healey, P. R. (1997). Open-angle glaucoma and diabetes: the Blue Mountains eye study, Australia. *Ophthalmology* 104, 712-718.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21, 2861-2873.

- Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22, 132-139.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., and Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542-545.
- Morrison, J. C., Johnson, E. C., Cepurna, W., and Jia, L. (2005). Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog Retin Eye Res* 24, 217-240.
- Mortimore, G. E., and Poso, A. R. (1987). Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr* 7, 539-564.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Mukesh, B. N., McCarty, C. A., Rait, J. L., and Taylor, H. R. (2002). Five-year incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Ophthalmology* 109, 1047-1051.
- Murphy, A. N., Fiskum, G., and Beal, M. F. (1999). Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 231-245.
- Nakamura, N., Matsuura, A., Wada, Y., and Ohsumi, Y. (1997). Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* 121, 338-344.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 458-467.
- Nakazawa, T., Nakazawa, C., Matsubara, A., Noda, K., Hisatomi, T., She, H., Michaud, N., Hafezi-Moghadam, A., Miller, J. W., and Benowitz, L. I. (2006). Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 26, 12633-12641.
- Napper, G. A., Pianta, M. J., and Kalloniatis, M. (1999). Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions. *Vis Neurosci* 16, 149-158.
- Nash, M. S., and Osborne, N. N. (1999). Assessment of Thy-1 mRNA levels as an index of retinal ganglion cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1293-1298.
- Naskar, R., Vorwerk, C. K., and Dreyer, E. B. (2000). Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1940-1944.

- Nathans, J. (1999). The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron* 24, 299-312.
- Neal, M. J., Cunningham, J. R., Hutson, P. H., and Hogg, J. (1994). Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J Neurochem* 62, 1025-1033.
- Newman, E. A. (1985). Membrane physiology of retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* 5, 2225-2239.
- Nezis, I. P., Simonsen, A., Sagona, A. P., Finley, K., Gaumer, S., Contamine, D., Rusten, T. E., Stenmark, H., and Brech, A. (2008). Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *J Cell Biol* 180, 1065-1071.
- Nicholls, D., and Attwell, D. (1990). The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 11, 462-468.
- Nichols, B. J., Ungermann, C., Pelham, H. R., Wickner, W. T., and Haas, A. (1997). Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* 387, 199-202.
- Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A., and Cuervo, A. M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 113-122.
- Noda, T., Kim, J., Huang, W. P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. J. (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol* 148, 465-480.
- Novikoff, A. B. (1956). Electron microscopy: cytology of cell fractions. *Science* 124, 969-972.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465.
- Nucci, C., Tartaglione, R., Rombola, L., Morrone, L. A., Fazzi, E., and Bagetta, G. (2005). Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure (IOP)-induced retinal ganglion cell death in rat. *Neurotoxicology* 26, 935-941.
- Ohno, S., Emori, Y., and Suzuki, K. (1986). Nucleotide sequence of a cDNA coding for the small subunit of human calcium-dependent protease. *Nucleic Acids Res* 14, 5559.
- Ohno, S., Minoshima, S., Kudoh, J., Fukuyama, R., Shimizu, Y., Ohmi-Imajoh, S., Shimizu, N., and Suzuki, K. (1990). Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 53, 225-229.

- Oka, T., Walkup, R. D., Tamada, Y., Nakajima, E., Tochigi, A., Shearer, T. R., and Azuma, M. (2006). Amelioration of retinal degeneration and proteolysis in acute ocular hypertensive rats by calpain inhibitor ((1S)-1-(((1S)-1-benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-dioxopropyl)amino)carbonyl)-3-methylbutyl)carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester. *Neuroscience* *141*, 2139-2145.
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* *164*, 719-721.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 552-565.
- Osborne, N. N., Casson, R. J., Wood, J. P., Chidlow, G., Graham, M., and Melena, J. (2004). Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* *23*, 91-147.
- Osborne, N. N., Chidlow, G., Wood, J., and Casson, R. (2003). Some current ideas on the pathogenesis and the role of neuroprotection in glaucomatous optic neuropathy. *Eur J Ophthalmol* *13 Suppl 3*, S19-26.
- Ozawa, S., Kamiya, H., and Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* *54*, 581-618.
- Palczewski, K. (2006). G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem* *75*, 743-767.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* *282*, 24131-24145.
- Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P. D., Wang, C., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Kramvis, I., Sahin, M., and He, Z. (2008). Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* *322*, 963-966.
- Pattingre, S., Bauvy, C., Carpentier, S., Levade, T., Levine, B., and Codogno, P. (2009). Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J Biol Chem* *284*, 2719-2728.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* *122*, 927-939.

- Pease, M. E., McKinnon, S. J., Quigley, H. A., Kerrigan-Baumrind, L. A., and Zack, D. J. (2000). Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 764-774.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 275, 992-998.
- Phillis, J. W., Ren, J., and O'Regan, M. H. (2000). Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res* 868, 105-112.
- Pignataro, G., Gala, R., Cuomo, O., Tortiglione, A., Giaccio, L., Castaldo, P., Sirabella, R., Matrone, C., Canitano, A., Amoroso, S., *et al.* (2004). Two sodium/calcium exchanger gene products, NCX1 and NCX3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. *Stroke* 35, 2566-2570.
- Polson, H. E., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbe, S., Clague, M. J., and Tooze, S. A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 6.
- Pottorf, W. J., 2nd, Johanns, T. M., Derrington, S. M., Strehler, E. E., Enyedi, A., and Thayer, S. A. (2006). Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca²⁺ pump activity in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 98, 1646-1656.
- Pourmaras, C. J., Rungger-Brandle, E., Riva, C. E., Hardarson, S. H., and Stefansson, E. (2008). Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 27, 284-330.
- Pow, D. V., and Barnett, N. L. (1999). Changing patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retinae are mediated by the Muller cell glutamate transporter GLAST. *Cell Tissue Res* 297, 57-66.
- Pow, D. V., and Barnett, N. L. (2000). Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci Lett* 280, 21-24.
- Punzo, C., Kornacker, K., and Cepko, C. L. (2009). Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci* 12, 44-52.
- Quigley, H. A., and Anderson, D. R. (1977). Distribution of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in the primate optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16, 640-644.

- Quigley, H. A., and Broman, A. T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* *90*, 262-267.
- Quigley, H. A., Brown, A. E., Morrison, J. D., and Drance, S. M. (1990). The size and shape of the optic disc in normal human eyes. *Arch Ophthalmol* *108*, 51-57.
- 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.
- Quigley, H. A., and Vitale, S. (1997). Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *38*, 83-91.
- Quinn, G. E., Berlin, J. A., Young, T. L., Ziylan, S., and Stone, R. A. (1995). Association of intraocular pressure and myopia in children. *Ophthalmology* *102*, 180-185.
- Rami, A., Agarwal, R., Botez, G., and Winckler, J. (2000). μ -Calpain activation, DNA fragmentation, and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. *Brain Res* *866*, 299-312.
- Rami, A., and Kriegstein, J. (1993). Protective effects of calpain inhibitors against neuronal damage caused by cytotoxic hypoxia in vitro and ischemia in vivo. *Brain Res* *609*, 67-70.
- Rardon, D. P., Cefali, D. C., Mitchell, R. D., Seiler, S. M., Hathaway, D. R., and Jones, L. R. (1990). Digestion of cardiac and skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles with calpain II. Effects on the Ca^{2+} release channel. *Circ Res* *67*, 84-96.
- Rauen, T., and Kanner, B. I. (1994). Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci Lett* *169*, 137-140.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D. C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* *12*, 747-757.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J., and Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* *36*, 585-595.
- Raviola, E., and Dacheux, R. F. (1987). Excitatory dyad synapse in rabbit retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 7324-7328.
- Ray, K., and Mookherjee, S. (2009). Molecular complexity of primary open angle glaucoma: current concepts. *J Genet* *88*, 451-467.

- Reimertz, C., Kogel, D., Lankiewicz, S., Poppe, M., and Prehn, J. H. (2001). Ca²⁺-induced inhibition of apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: degradation of apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1). *J Neurochem* 78, 1256-1266.
- Rodriguez-Muela, N., Germain, F., Marino, G., Fitze, P. S., and Boya, P. (2011). Autophagy promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy in mice. *Cell Death Differ*.
- Rossi, D. J., Oshima, T., and Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316-321.
- Rothman, J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- Rubinsztein, D. C., Cuervo, A. M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V., Kaushik, S., and Klionsky, D. J. (2009). In search of an "autophagometer". *Autophagy* 5, 585-589.
- Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O., and Klionsky, D. J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 6, 304-312.
- Rudzinski, M., Wong, T. P., and Saragovi, H. U. (2004). Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *J Neurobiol* 58, 341-354.
- Russell, J. M. (2000). Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 80, 211-276.
- Russo, R., Cavaliere, F., Berliocchi, L., Nucci, C., Gliozzi, M., Mazzei, C., Tassorelli, C., Corasaniti, M. T., Rotiroli, D., Bagetta, G., and Morrone, L. A. (2008). Modulation of pro-survival and death-associated pathways under retinal ischemia/reperfusion: effects of NMDA receptor blockade. *J Neurochem* 107, 1347-1357.
- Rusten, T. E., and Stenmark, H. (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? *J Cell Sci* 122, 2179-2183.
- Rylander, N. R., and Vold, S. D. (2008). Cost analysis of glaucoma medications. *Am J Ophthalmol* 145, 106-113.
- Sadasivan, S., Zhang, Z., Larner, S. F., Liu, M. C., Zheng, W., Kobeissy, F. H., Hayes, R. L., and Wang, K. K. (2010). Acute NMDA toxicity in cultured rat cerebellar granule neurons is accompanied by autophagy induction and late onset autophagic cell death phenotype. *BMC Neurosci* 11, 21.
- Saftig, P., Beertsen, W., and Eskelinen, E. L. (2008). LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy* 4, 510-512.

- Sakamoto, Y. R., Nakajima, T. R., Fukiage, C. R., Sakai, O. R., Yoshida, Y. R., Azuma, M. R., and Shearer, T. R. (2000). Involvement of calpain isoforms in ischemia-reperfusion injury in rat retina. *Curr Eye Res* 21, 571-580.
- Sarkar, S., Perlstein, E. O., Imarisio, S., Pineau, S., Cordenier, A., Maglathlin, R. L., Webster, J. A., Lewis, T. A., O'Kane, C. J., Schreiber, S. L., and Rubinsztein, D. C. (2007). Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nat Chem Biol* 3, 331-338.
- Sato, T. K., Rehling, P., Peterson, M. R., and Emr, S. D. (2000). Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion. *Mol Cell* 6, 661-671.
- Schultz, K., and Stell, W. K. (1996). Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. *Neurosci Lett* 211, 191-194.
- Seals, D. F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W. T., and Price, A. (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9402-9407.
- Shah, R., and Wormald, R. (2002). Glaucoma. *Clin Evid*, 589-596.
- Shah, R., and Wormald, R. (2003). Glaucoma. *Clin Evid*, 729-736.
- Shi, C. S., and Kehrl, J. H. (2008). MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J Biol Chem* 283, 33175-33182.
- Shi, C. S., and Kehrl, J. H. (2010). TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal* 3, ra42.
- Shibata, M., Hattori, H., Sasaki, T., Gotoh, J., Hamada, J., and Fukuuchi, Y. (2002). Subcellular localization of a promoter and an inhibitor of apoptosis (Smac/DIABLO and XIAP) during brain ischemia/reperfusion. *Neuroreport* 13, 1985-1988.
- Shibata, M., Lu, T., Furuya, T., Degterev, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., MacDonald, M., Yankner, B., and Yuan, J. (2006). Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem* 281, 14474-14485.
- Shimazawa, M., Suemori, S., Inokuchi, Y., Matsunaga, N., Nakajima, Y., Oka, T., Yamamoto, T., and Hara, H. (2010). A novel calpain inhibitor, ((1S)-1-(((1S)-1-Benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-di-oxopropyl)amino)carbonyl)-3-methylbutyl)carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester (SNJ-1945), reduces murine retinal cell death in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 332, 380-387.

- Shimazawa, M., Yamashima, T., Agarwal, N., and Hara, H. (2005). Neuroprotective effects of minocycline against in vitro and in vivo retinal ganglion cell damage. *Brain Res* 1053, 185-194.
- 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. *J Neurochem* 77, 466-475.
- Sinha, S., and Levine, B. (2008). The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S137-148.
- Siu, A. W., and To, C. H. (2002). Nitric oxide and hydroxyl radical-induced retinal lipid peroxidation in vitro. *Clin Exp Optom* 85, 378-382.
- Sommer, A., Tielsch, J. M., Katz, J., Quigley, H. A., Gottsch, J. D., Javitt, J., and Singh, K. (1991). Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol* 109, 1090-1095.
- Somsel Rodman, J., and Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* 113 *Pt 2*, 183-192.
- Soucy, E., Wang, Y., Nirenberg, S., Nathans, J., and Meister, M. (1998). A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Neuron* 21, 481-493.
- Spencer, B., Potkar, R., Trejo, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Gindi, R., Adame, A., Wyss-Coray, T., and Masliah, E. (2009). Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci* 29, 13578-13588.
- Stefanis, L., Larsen, K. E., Rideout, H. J., Sulzer, D., and Greene, L. A. (2001). Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci* 21, 9549-9560.
- Suzuki, M., Nelson, A. D., Eickstaedt, J. B., Wallace, K., Wright, L. S., and Svendsen, C. N. (2006). Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci* 24, 645-653.
- Tamai, K., Tanaka, N., Nara, A., Yamamoto, A., Nakagawa, I., Yoshimori, T., Ueno, Y., Shimosegawa, T., and Sugamura, K. (2007). Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 721-727.

- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von Figura, K., and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* *406*, 902-906.
- Terlecky, S. R., Chiang, H. L., Olson, T. S., and Dice, J. F. (1992). Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein. *J Biol Chem* *267*, 9202-9209.
- Tezel, G. (2006). Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Prog Retin Eye Res* *25*, 490-513.
- Tezel, G. (2009). The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *50*, 1001-1012.
- Tezel, G., Kass, M. A., Kolker, A. E., and Wax, M. B. (1996). Comparative optic disc analysis in normal pressure glaucoma, primary open-angle glaucoma, and ocular hypertension. *Ophthalmology* *103*, 2105-2113.
- Tezel, G., and Wax, M. B. (2004). The immune system and glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* *15*, 80-84.
- Tielsch, J. M., Katz, J., Quigley, H. A., Javitt, J. C., and Sommer, A. (1995a). Diabetes, intraocular pressure, and primary open-angle glaucoma in the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology* *102*, 48-53.
- Tielsch, J. M., Katz, J., Sommer, A., Quigley, H. A., and Javitt, J. C. (1995b). Hypertension, perfusion pressure, and primary open-angle glaucoma. A population-based assessment. *Arch Ophthalmol* *113*, 216-221.
- Tielsch, J. M., Sommer, A., Katz, J., Royall, R. M., Quigley, H. A., and Javitt, J. (1991). Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *JAMA* *266*, 369-374.
- Uttenweiler, A., Schwarz, H., Neumann, H., and Mayer, A. (2007). The vacuolar transporter chaperone (VTC) complex is required for microautophagy. *Mol Biol Cell* *18*, 166-175.
- Vicencio, J. M., Ortiz, C., Criollo, A., Jones, A. W., Kepp, O., Galluzzi, L., Joza, N., Vitale, I., Morselli, E., Tailler, M., *et al.* (2009). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ* *16*, 1006-1017.
- Volbracht, C., Chua, B. T., Ng, C. P., Bahr, B. A., Hong, W., and Li, P. (2005). The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide. *J Neurochem* *93*, 1280-1292.

- Vosler, P. S., Brennan, C. S., and Chen, J. (2008). Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 38, 78-100.
- Wang, K. K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23, 20-26.
- Wang, L., Harris, T. E., and Lawrence, J. C., Jr. (2008a). Regulation of proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) function by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 283, 15619-15627.
- Wang, Q. J., Ding, Y., Kohtz, D. S., Mizushima, N., Cristea, I. M., Rout, M. P., Chait, B. T., Zhong, Y., Heintz, N., and Yue, Z. (2006). Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci* 26, 8057-8068.
- Wang, T., Lao, U., and Edgar, B. A. (2009). TOR-mediated autophagy regulates cell death in *Drosophila* neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 186, 703-711.
- Wang, X., Tay, S. S., and Ng, Y. K. (2000). An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinæ of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res* 132, 476-484.
- Wang, Y., Han, R., Liang, Z. Q., Wu, J. C., Zhang, X. D., Gu, Z. L., and Qin, Z. H. (2008b). An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy* 4, 214-226.
- Wax, M. B. (2011). The case for autoimmunity in glaucoma. *Exp Eye Res* 93, 187-190.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 30, 678-688.
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., and Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 29, 1792-1802.
- Weinreb, R. N. (2007). Glaucoma neuroprotection: What is it? Why is it needed? *Can J Ophthalmol* 42, 396-398.
- White, R. J., and Reynolds, I. J. (1995). Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 15, 1318-1328.
- Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E. K., Saiki, S., Siddiqi, F. H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., *et al.* (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol* 4, 295-305.

- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., *et al.* (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis* 1, e18.
- Wong, E., and Cuervo, A. M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 13, 805-811.
- Xia, H. G., Zhang, L., Chen, G., Zhang, T., Liu, J., Jin, M., Ma, X., Ma, D., and Yuan, J. (2010). Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy* 6, 61-66.
- Xie, Z., and Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9, 1102-1109.
- Xiong, Z. G., Zhu, X. M., Chu, X. P., Minami, M., Hey, J., Wei, W. L., MacDonald, J. F., Wemmie, J. A., Price, M. P., Welsh, M. J., and Simon, R. P. (2004). Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 118, 687-698.
- Xue, L. P., Lu, J., Cao, Q., Hu, S., Ding, P., and Ling, E. A. (2006). Muller glial cells express nestin coupled with glial fibrillary acidic protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina. *Neuroscience* 139, 723-732.
- Yamada, T., Carson, A. R., Caniggia, I., Umebayashi, K., Yoshimori, T., Nakabayashi, K., and Scherer, S. W. (2005). Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *J Biol Chem* 280, 18283-18290.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 23, 33-42.
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., and Klionsky, D. J. (2006). Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell* 17, 5094-5104.
- Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22, 124-131.
- Yoneda, S., Hara, H., Hirata, A., Fukushima, M., Inomata, Y., and Tanihara, H. (2005). Vitreous fluid levels of beta-amyloid((1-42)) and tau in patients with retinal diseases. *Jpn J Ophthalmol* 49, 106-108.
- Yorimitsu, T., and Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1542-1552.

- Young, A. R., Chan, E. Y., Hu, X. W., Kochl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey, D. W., Lippincott-Schwartz, J., and Tooze, S. A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* *119*, 3888-3900.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H. U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* *8*, 1124-1132.
- Yuan, L., and Neufeld, A. H. (2001). Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *J Neurosci Res* *64*, 523-532.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* *10*, 285-292.
- Zeevalk, G. D., and Nicklas, W. J. (1992). Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem* *59*, 1211-1220.
- Zhang, B., Safa, R., Rusciano, D., and Osborne, N. N. (2007a). Epigallocatechin gallate, an active ingredient from green tea, attenuates damaging influences to the retina caused by ischemia/reperfusion. *Brain Res* *1159*, 40-53.
- Zhang, L., Yu, J., Pan, H., Hu, P., Hao, Y., Cai, W., Zhu, H., Yu, A. D., Xie, X., Ma, D., and Yuan, J. (2007b). Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 19023-19028.
- Zhang, X. D., Wang, Y., Zhang, X., Han, R., Wu, J. C., Liang, Z. Q., Gu, Z. L., Han, F., Fukunaga, K., and Qin, Z. H. (2009). p53 mediates mitochondria dysfunction-triggered autophagy activation and cell death in rat striatum. *Autophagy* *5*, 339-350.
- Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* *11*, 468-476.
- Zhu, C., Wang, X., Xu, F., Bahr, B. A., Shibata, M., Uchiyama, Y., Hagberg, H., and Blomgren, K. (2005). The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* *12*, 162-176.

7. PARTE SPECIALE

7.1 Attività di ricerca svolta durante lo stage all'estero

Nella parte finale del corso di dottorato di ricerca è stato svolto un periodo formativo di tre mesi presso il laboratorio di Neuroinfiammazione e Malattie Infettive del Sanford-Burnham Medical Research Institute (San Diego, La Jolla, CA, USA).

In questo periodo sono stati condotti studi preliminari sul possibile coinvolgimento del processo autofagico in un modello sperimentale di danno cerebrale associato all'infezione da HIV in topi transgenici che over-esprimono la glicoproteina virale gp120.

I soggetti affetti da AIDS manifestano una sindrome neurologica nota con il nome di *HIV associated Dementia* (HAD), che si presenta con disfunzioni cognitive e motorie di entità variabile. La neuroinfiammazione è una condizione patologica comune nei soggetti colpiti da HIV-1 e viene generalmente chiamata encefalite (*HIV-encephalitis*, *HIVE*) caratterizzata da perdita neuronale, astrocitosi e microgliosi reattiva, estesa degenerazione sinaptica e dendritica con infiltrazione di macrofagi e cellule microgliali attivate (Kaul et al., 2001; McArthur, 1987).

Diversi studi hanno dimostrato una correlazione tra lo sviluppo dell'HAD e alcune malattie neurodegenerative come la malattia di Parkinson e di Alzheimer. E' stato, infatti, osservato nel cervello di pazienti colpiti da HIV-1, l'accumulo della proteina β -amiloide, α -sinucleina e la formazione di aggregati ubiquitinati e corpi di Lewy che partecipano alle alterazioni cognitive osservate nel decorso della patologia (Esiri et al., 1998; Khanlou et al., 2009).

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che la neurodegenerazione associata all'HIV-1 si verifica attraverso due meccanismi principali. Il primo è caratterizzato dalla neurotossicità come conseguenza dell'esposizione diretta al virus e ai suoi frammenti

proteici, come per esempio accade per la glicoproteina del capsido gp120, o al danno indiretto mediato da neurotossine rilasciate da microglia e macrofagi infettati o immunostimolati che, a loro volta, stimolano il rilascio di citochine, chemochine e molecole di adesione dalle cellule del sistema nervoso centrale (Giulian et al., 1990).

Il secondo è caratterizzato dall'inibizione del processo di neurogenesi (Okamoto et al., 2007). A livello molecolare, entrambi questi meccanismi sono mediati dai recettori delle chemochine CCR5 e CXCR4 e dalla proteina chinasi attivata dallo stress p38-MAPK (Kaul et al., 2007). Studi recenti suggeriscono come la patogenesi dell'HIV può essere inoltre determinata dalla produzione di interferone- α (INF- α) che deriva dalla reazione delle cellule dendritiche plasmocitoidi al virus stesso. Infatti, sebbene queste sostanze siano importanti per la risposta antivirale, la produzione eccessiva di INF- α nell'infezione da HIV sembra causare una risposta immunitaria alterata che partecipa alla progressione della patologia (Mandl et al., 2008).

I recettori delle chemochine mediano normalmente il *trafficking* dei leucociti, contribuiscono all'organizzazione della risposta infiammatoria e immune, regolano la maturazione di cellule staminali neurali ed ematopoietiche. L'infezione di macrofagi e linfociti causata dal virus dell'HIV si verifica in seguito al legame della glicoproteina del capsido gp120 a questi recettori. Generalmente, le cellule-T, come anche i macrofagi e la microglia, sono infettate tramite il recettore delle α -chemochine CXCR4 o delle β -chemochine CCR5. Diversi studi *in vitro* hanno riportato come il recettore CXCR4 è direttamente coinvolto nel danno neuronale associato all'HIV mentre il recettore CCR5 potrebbe mediare anche un ruolo protettivo (Kaul and Lipton, 1999). La glicoproteina del capsido gp120 del virus HIV-1, rappresenta uno degli agenti eziologici maggiormente

responsabili dello sviluppo e della progressione dell'HAD poiché essa risulta provvista di un elevato potenziale neurotossico sia *in vivo* che *in vitro*.

E' stato osservato in colture di neuroni cerebro-corticali umane e di topo come l'esposizione a concentrazioni pico-molari della proteina o del virus completo induce morte neuronale apoptotica mediata dall'attivazione del recettore CXCR4. Inoltre l'inibizione *in vitro* dell'attivazione di macrofagi e microglia previene la neurotossicità associata all'esposizione della glicoproteina gp120. La morte neuronale innescata *in vitro* dalla gp120 in preparazioni di colture cellulari miste -contenenti neuroni, macrofagi e microglia- sembra essere mediata dall'attivazione del recettore CXCR4 e dovuta alla secrezione, stimolata dalla proteina, di fattori neurotossici quali: citochine, eicosanoidi, eccitotossine e radicali liberi (Hesselgesser et al., 1998; Kaul and Lipton, 1999; Ohagen et al., 1999).

Esiste, inoltre, una serie di evidenze sperimentali a favore di un effetto neurotossico diretto della gp120, poiché la virotossina è in grado di indurre morte neuronale in cellule di neuroblastoma umano anche in assenza di altri tipi cellulari (Corasaniti et al., 1998; Corasaniti et al., 1995; Corasaniti et al., 1996) Inoltre, l'applicazione intra cerebro ventricolare (i.c.v.) subcronica di gp120 produce alterazioni neuropatologiche, quali: selettiva apoptosi neuronale nella neocorteccia (Bagetta et al., 1995; Bagetta et al., 1996) accompagnata da attivazione delle cellule microgliali (Bagetta et al., 1999) aumento dell'espressione della citochina pro-infiammatoria IL-1 β (Corasaniti et al., 2001) e di enzimi coinvolti nel processo infiammatorio come la cicloossigenasi-2 (COX-2) (Bagetta et al., 1998; Corasaniti et al., 2000). Negli anni recenti un crescente interesse è stato rivolto al coinvolgimento del processo autofagico nella neurodegenerazione associata all'HIV.

L'autofagia è un processo evolutivamente conservato attraverso il quale le cellule eucariotiche regolano il turnover delle proteine a lunga vita e gli organuli citoplasmatici (Levine and Kroemer, 2008). Questo processo è fisiologicamente presente a livelli basali in tutte le cellule e rappresenta un processo catabolico adattativo in risposta a varie forme di stress come la deprivazione di fattori di crescita, l'aumento della richiesta bioenergetica, l'ipossia, lo stress del reticolo endoplasmatico e l'accumulo di aggregati proteici (Kourtis and Tavernarakis, 2009; Rubinsztein et al., 2007).

Studi recenti suggeriscono che l'autofagia rappresenta un meccanismo di difesa antimicrobico dell'ospite contro alcuni batteri ed infezioni da virus (Orvedahl and Levine, 2009) e svolge un ruolo protettivo in diverse malattie neurodegenerative (Mizushima et al., 2008).

Studi condotti su colture cerebro-corticali di ratto hanno dimostrato come il trattamento con il supernatante derivato da macrofagi e microglia infettati con il virus da immunodeficienza HIV e SIV inibisce l'attivazione dell'autofagia riducendo, in modo significativo, la sopravvivenza cellulare; questo risultato viene revertito mediante il trattamento con rapamicina (Alirezai et al., 2008). Zhou e collaboratori hanno riportato, mediante studi post-mortem, un'aumentata espressione delle proteine LC3II e Beclin-1 nella corteccia frontale di pazienti colpiti da HIV. Analogamente, il trattamento di colture di neuroblastoma umano SK-N-SH, che esprimono i recettori CXCR4 e CCR5, esposte alla glicoproteina gp120 (HIV_{MN}-X4 oppure HIV_{BAL}-R5) per 6h induce l'autofagia suggerendo che l'alterazione di questo processo potrebbe avere un ruolo importante nella patogenesi dell'HIV (Zhou et al., 2011). Studi condotti da Espert e colleghi hanno, inoltre, dimostrato come l'autofagia è indotta in macrofagi mantenuti in co-cultura con cellule HEK che

esprimono la glicoproteina gp120 (HIV_{MN}-X4 oppure HIV_{BAL}-R5); il trattamento con Bafilomicina-A1 aumenta la produzione delle proteine virali X4 ed R5 infettive suggerendo che l'autofagia è importante per il processo di replicazione virale (Espert et al., 2009).

Nel corso dello stage formativo sono stati condotti esperimenti preliminari al fine di valutare il coinvolgimento del processo autofagico in sezioni cerebrali di topi transgenici che over-esprimono la glicoproteina del capsido gp120 (*Hipex-gp120tg mice*) mediante analisi in immunofluorescenza. Le sezioni coronali cerebrali di topo (30µM) sono state realizzate mediante l'utilizzo di un vibratomo e conservate a -20°C in piastre a 96 pozzetti fino al momento dell'uso, immerse in una soluzione crioprotettiva (30% glicerolo, 30% etilen-glicole/PBS). Le sezioni sono state lavate in PBS, permeabilizzate in PBS/Triton-X100 1% per 30 minuti ed i siti aspecifici bloccati mediante l'incubazione con siero di capra al 10% per 1h a temperatura ambiente. L'incubazione con gli anticorpi primari anti-Beclin-1 (1:100) e anti-LC3 (1:400) (MBL Internatinal), anti-NeuN (1:200) e anti-GFAP (1:500) (Sigma-Aldrich) è stata effettuata per tutta la notte a 4°C in siero di capra al 5%/PBS. Il giorno seguente le sezioni sono state lavate in PBS e incubate al buio per 1h in siero di capra al 5%/PBS con l'anticorpo secondario Alexa Fluor 488 (1:500) (Molecular Probes) e anti-Rodamina (1:200) (Vector Laboratories). Infine, le sezioni sono state incubate con il colorante nucleare Hoechst (1:150) per 5 minuti, montate su vetrino con il mezzo montante Vectashield e le immagini acquisite utilizzando un microscopio a deconvoluzione Carl-Zeiss. I risultati preliminari ottenuti dimostrano, nell'animale transgenico per la glicoproteina gp120 (gp120tg), la presenza di strutture LC3 positive

caratterizzate da un pattern puntinato presente a livello perinucleare e nei prolungamenti assionali dei neuroni corticali rispetto alle sezioni di controllo *wild-type* (wt) che, invece, presentano un segnale citosolico diffuso della proteina LC3, supportando l'ipotesi di un possibile accumulo della forma lipidata della proteina LC3 associata alla membrana dell'autofagosoma (Figura 1).

L'analisi in immunofluorescenza per la proteina Beclin-1, coinvolta nelle fasi iniziali di formazione dell'autofagosoma, dimostra nell'animale transgenico per la gp120 una debole immunoreattività della proteina nei neuroni corticali; è possibile invece osservare un'elevata espressione della proteina Beclin-1 nel compartimento citoplasmatico e nei processi cellulari di astrociti GFAP-positivi (Figura 2).

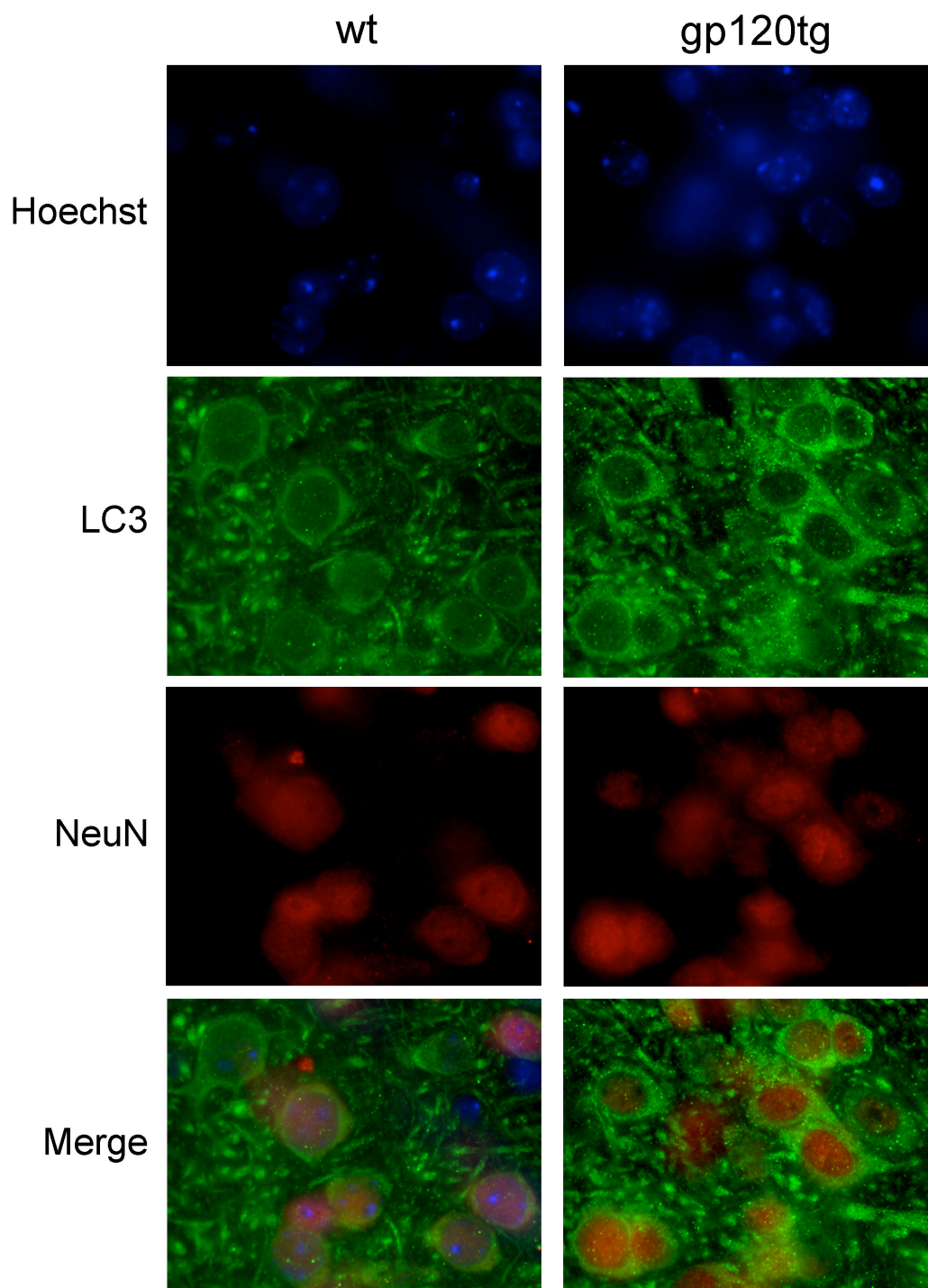


Figura 1 - L'immagine mostra redistribuzione intracellulare dell'immunoreattività per la proteina LC3 caratterizzata dalla presenza di strutture puntiformi a livello perinucleare e dei prolungamenti assionali di neuroni corticali di un topo transgenico per la glicoproteina gp120 rispetto al controllo (wildtype, wt).

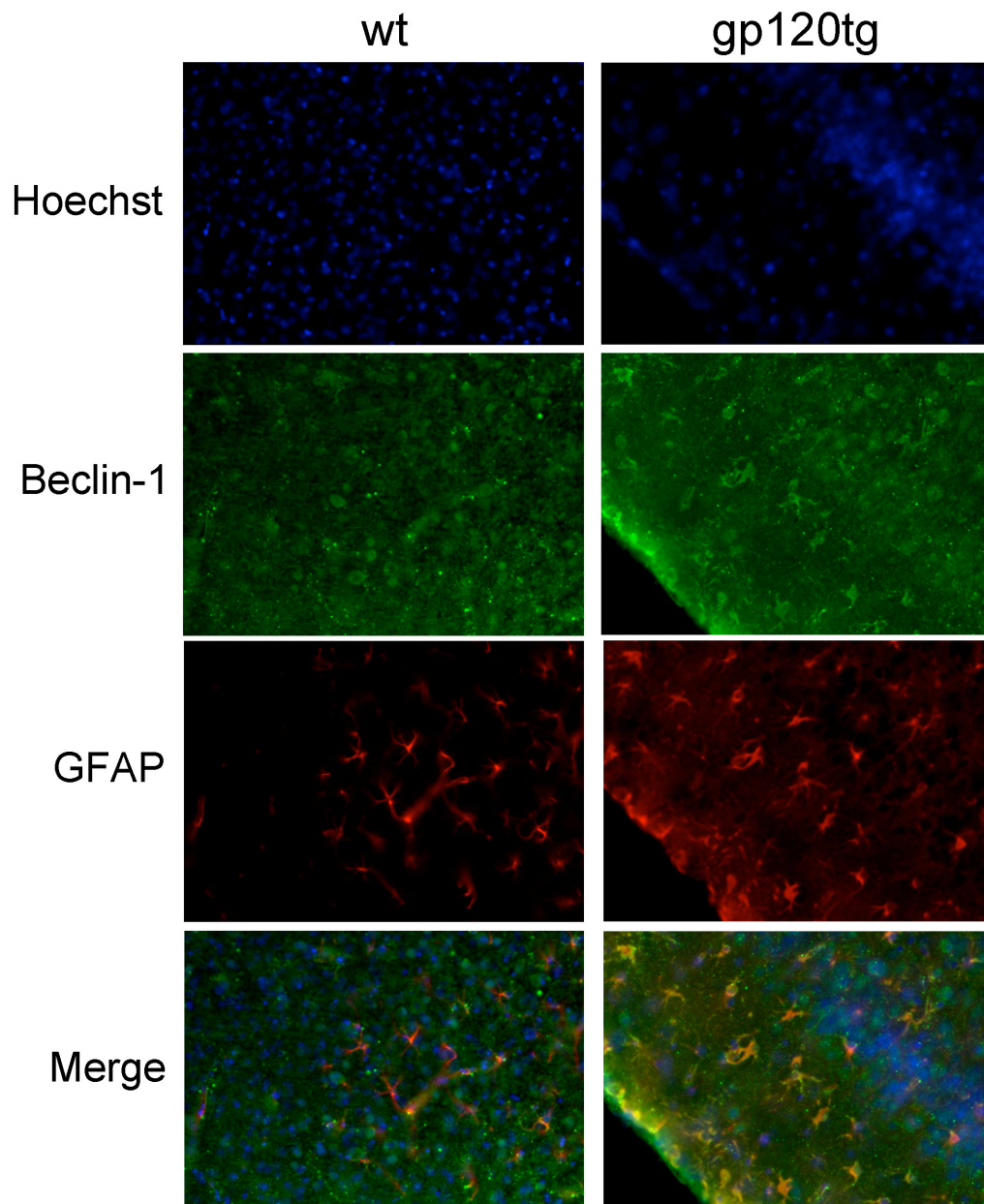


Figura 2 – L'immunofluorescenza mostra la distribuzione specifica della proteina Beclin-1 nel compartimento citoplasmatico e nei prolungamenti cellulari di astrociti GFAP-positivi in sezioni cerebrali di un topo transgenico per la glicoproteina gp120 rispetto al controllo.

Gli studi preliminari condotti in questo periodo formativo dimostrano un'aumentata immunoreattività per la proteina Beclin-1 ed LC3 in sezioni cerebrali di topi transgenici che over-esprimono la glicoproteina del capsido gp120 supportando, nel modello sperimentale considerato, una possibile attivazione del processo autofagico. L'utilizzo di approcci biochimici, farmacologici e di sistemi *in vitro* permetterà in futuro di chiarire il reale coinvolgimento dell'autofagia nei meccanismi di danno neuronale associati all'infezione da HIV.

BIBLIOGRAFIA – Parte Speciale

Alirezaei, M., Kiosses, W. B., Flynn, C. T., Brady, N. R., and Fox, H. S. (2008). Disruption of neuronal autophagy by infected microglia results in neurodegeneration. *PLoS One* 3, e2906.

Bagetta, G., Corasaniti, M. T., Berliocchi, L., Navarra, M., Finazzi-Agro, A., and Nistico, G. (1995). HIV-1 gp120 produces DNA fragmentation in the cerebral cortex of rat. *Biochem Biophys Res Commun* 211, 130-136.

Bagetta, G., Corasaniti, M. T., Berliocchi, L., Nistico, R., Giammarioli, A. M., Malorni, W., Aloe, L., and Finazzi-Agro, A. (1999). Involvement of interleukin-1beta in the mechanism of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) recombinant protein gp120-induced apoptosis in the neocortex of rat. *Neuroscience* 89, 1051-1066.

Bagetta, G., Corasaniti, M. T., Malorni, W., Rainaldi, G., Berliocchi, L., Finazzi-Agro, A., and Nistico, G. (1996). The HIV-1 gp120 causes ultrastructural changes typical of apoptosis in the rat cerebral cortex. *Neuroreport* 7, 1722-1724.

Bagetta, G., Corasaniti, M. T., Paoletti, A. M., Berliocchi, L., Nistico, R., Giammarioli, A. M., Malorni, W., and Finazzi-Agro, A. (1998). HIV-1 gp120-induced apoptosis in the rat neocortex involves enhanced expression of cyclo-oxygenase type 2 (COX-2). *Biochem Biophys Res Commun* 244, 819-824.

Corasaniti, M. T., Bagetta, G., Rotiroti, D., and Nistico, G. (1998). The HIV envelope protein gp120 in the nervous system: interactions with nitric oxide, interleukin-1beta and nerve growth factor signalling, with pathological implications in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol* 56, 153-156.

- Corasaniti, M. T., Bilotta, A., Strongoli, M. C., Navarra, M., Bagetta, G., and Di Renzo, G. (2001). HIV-1 coat protein gp120 stimulates interleukin-1beta secretion from human neuroblastoma cells: evidence for a role in the mechanism of cell death. *Br J Pharmacol* *134*, 1344-1350.
- Corasaniti, M. T., Melino, G., Navarra, M., Garaci, E., Finazzi-Agro, A., and Nistico, G. (1995). Death of cultured human neuroblastoma cells induced by HIV-1 gp120 is prevented by NMDA receptor antagonists and inhibitors of nitric oxide and cyclooxygenase. *Neurodegeneration* *4*, 315-321.
- Corasaniti, M. T., Navarra, M., Catani, M. V., Melino, G., Nistico, G., and Finazzi-Agro, A. (1996). NMDA and HIV-1 coat protein, GP120, produce necrotic but not apoptotic cell death in human CHP100 neuroblastoma cultures via a mechanism involving calpain. *Biochem Biophys Res Commun* *229*, 299-304.
- Corasaniti, M. T., Strongoli, M. C., Piccirilli, S., Nistico, R., Costa, A., Bilotta, A., Turano, P., Finazzi-Agro, A., and Bagetta, G. (2000). Apoptosis induced by gp120 in the neocortex of rat involves enhanced expression of cyclooxygenase type 2 and is prevented by NMDA receptor antagonists and by the 21-aminosteroid U-74389G. *Biochem Biophys Res Commun* *274*, 664-669.
- Esiri, M. M., Biddolph, S. C., and Morris, C. S. (1998). Prevalence of Alzheimer plaques in AIDS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *65*, 29-33.
- Espert, L., Varbanov, M., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Robbins, I., Sanchez, F., Lafont, V., and Biard-Piechaczyk, M. (2009). Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS One* *4*, e5787.
- Giulian, D., Vaca, K., and Noonan, C. A. (1990). Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science* *250*, 1593-1596.
- Hesselgesser, J., Taub, D., Baskar, P., Greenberg, M., Hoxie, J., Kolson, D. L., and Horuk, R. (1998). Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr Biol* *8*, 595-598.
- Kaul, M., Garden, G. A., and Lipton, S. A. (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* *410*, 988-994.
- Kaul, M., and Lipton, S. A. (1999). Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 8212-8216.
- Kaul, M., Ma, Q., Medders, K. E., Desai, M. K., and Lipton, S. A. (2007). HIV-1 coreceptors CCR5 and CXCR4 both mediate neuronal cell death but CCR5 paradoxically can also contribute to protection. *Cell Death Differ* *14*, 296-305.

- Khanlou, N., Moore, D. J., Chana, G., Cherner, M., Lazzaretto, D., Dawes, S., Grant, I., Masliah, E., and Everall, I. P. (2009). Increased frequency of alpha-synuclein in the substantia nigra in human immunodeficiency virus infection. *J Neurovirol* *15*, 131-138.
- Kourtis, N., and Tavernarakis, N. (2009). Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ* *16*, 21-30.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* *132*, 27-42.
- Mandl, J. N., Barry, A. P., Vanderford, T. H., Kozyr, N., Chavan, R., Klucking, S., Barrat, F. J., Coffman, R. L., Staprans, S. I., and Feinberg, M. B. (2008). Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat Med* *14*, 1077-1087.
- McArthur, J. C. (1987). Update on HIV infection. Neurological aspects. *Md Med J* *36*, 32-34.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., and Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069-1075.
- Ohagen, A., Ghosh, S., He, J., Huang, K., Chen, Y., Yuan, M., Osathanondh, R., Gartner, S., Shi, B., Shaw, G., and Gabuzda, D. (1999). Apoptosis induced by infection of primary brain cultures with diverse human immunodeficiency virus type 1 isolates: evidence for a role of the envelope. *J Virol* *73*, 897-906.
- Okamoto, S., Kang, Y. J., Brechtel, C. W., Siviglia, E., Russo, R., Clemente, A., Harrop, A., McKercher, S., Kaul, M., and Lipton, S. A. (2007). HIV/gp120 decreases adult neural progenitor cell proliferation via checkpoint kinase-mediated cell-cycle withdrawal and G1 arrest. *Cell Stem Cell* *1*, 230-236.
- Orvedahl, A., and Levine, B. (2009). Autophagy in Mammalian antiviral immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* *335*, 267-285.
- Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O., and Klionsky, D. J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* *6*, 304-312.
- Zhou, D., Masliah, E., and Spector, S. A. (2011). Autophagy is increased in postmortem brains of persons with HIV-1-associated encephalitis. *J Infect Dis* *203*, 1647-1657.

Publicazioni scientifiche *in extenso*:

RUSSO R. , BERLIOCCI L. , ADORNETTO A. , VARANO G. P. , CAVALIERE F. , NUCCI C., ROTIROTI D. , MORRONE L. A. , BAGETTA G. , CORASANITI M. " Calpain-mediated cleavage of Beclin-1 and autophagy deregulation following retinal ischemic injury in vivo". *Cell Death and Disease*, 2011, pp. e144;- doi: 10.1038/cddis.2011.29.

Partecipazione a congressi nazionali e internazionali:

VARANO G. P., RUSSO R., ADORNETTO A., CAVALIERE F., MORRONE L. A. , BAGETTA G. , CORASANITI M. Deregulation of basal autophagy following retinal ischemic injury. In: 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence –Italy, July 14-18, 2011.

CAVALIERE F, RUSSO R., VARANO G. P., ADORNETTO A., ROMBOLA' L., MORRONE L. A. , BAGETTA G. , CORASANITI M. Calpain-mediated cleavage of Beclin-1 following retinal ischemic injury. In: 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence –Italy, July 14-18, 2011.

RUSSO R. , VARANO G. P. , ADORNETTO A. , CAVALIERE F. , MORRONE L. A. , CORASANITI M. T. , BAGETTA G. "Retinal Ischemia Induces Deregulation of Basal Autophagy". In: ARVO, Annual Meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 1-5 May, 2011.

RUSSO R, CAVALIERE F, VARANO G., BAGETTA G, CORASANITI M, MORRONE L. "The Glutamate Transporter Inhibitor, DL-Threo-Beta-Benzyloxyaspartate (DL-TBOA), Prevents Neurochemical Effects But Not Neurotoxicity Yielded In The Retina By Elevated Intraocular Pressure (IOP)-Induced Ischemia/Reperfusion in Rat.". In: ARVO 2010 Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology". Fort Lauderdale, Florida, May 2-6, 2010.

NUCCI C, RUSSO R, CAVALIERE F, VARANO G., ROMBOLA' L, MORRONE L, BAGETTA G, CORASANITI M. "Involvement of Matrix Metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 in Retinal Ganglion Cells (RGCs) Death Induced by Retinal Ischemia/Reperfusion". In: ARVO 2010 Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology". Fort Lauderdale, Florida, May 2-6, 2010

VARANO G., ADORNETTO A, MORRONE L, BAGETTA G, CORASANITI M, RUSSO R. "Deregulation of basal autophagy induced by retinal ischemia". In: New Perspectives in Neuroscience: Joint Meeting of Young Italian and Japanese Neuroscientists. Naples, September 21, 2010.

RUSSO R, CAVALIERE F, VARANO G., ROMBOLA' L, CORASANITI M, BAGETTA G, MORRONE L. "Role of matrix metalloproteinases in retinal ganglion cells (RGCs) loss

induced by retinal ischemia/reperfusion". In: 34° National Meeting of the Italian Society of Pharmacology. Rimini, October 14-17, 2009.

RUSSO R, CAVALIERE F, VARANO G., ROMBOLA' L, CORASANITI M, BAGETTA G, MORRONE L. "PHARMACOLOGICAL MODULATION OF THE EXTRACELLULAR GLUTAMATE CHANGES INDUCED BY RETINAL ISCHEMIA/REPERFUSION IN RAT: TARGETS TO MINIMIZE RETINAL DAMAGE.". In: 34° National Meeting of the Italian Society of Pharmacology. Rimini, October 14-17, 2009.

CAVALIERE F, RUSSO R, VARANO G., ROMBOLA' L, CORASANITI M, BAGETTA G, MORRONE L. "17beta-estradiol minimizes intravitreal glutamate increase after transient ischemia/reperfusion in rat". In: 34' National Meeting of the Italian Society of Pharmacology. Rimini, October 14-17, 2009.

VARANO G., CAVALIERE F, RUSSO R, CORASANITI M.T, BAGETTA G, MORRONE L.A. Retinal ischemia/reperfusion induced by high intraocular pressure (IOP) modulates PI-3K/Akt pro-survival pathway in rat. In: XII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine. Parghelia (VV) Calabria, Italy, 2009.

VARANO G., CAVALIERE F, RUSSO R, NUCCI C, MAZZEI C, CORASANITI M. T, MORRONE L. A, BAGETTA G. Evidence that high intraocular pressure (IOP)-induced retina ischemia/reperfusion modulates PI-3K/Akt pro-survival pathway in rat. In: Contributo a New Perspective in neuroscience: Research results of Young Italian Neuroscientist. Naples, April 17 2009.

RUSSO R, CAVALIERE F, VARANO G., NUCCI C, BAGETTA G, CORASANITI M. T, MORRONE L. A. Involvement of matrix metalloproteinases in the loss of ganglion cells (RGC) induced by retinal ischemia/reperfusion. XI Workshop On Apoptosis in Biology and Medicine. In: XI Workshop On Apoptosis in Biology and Medicine. Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Japan, September 12-14, 2008.