

# Effetti precoci dell'alto glucosio sui segnali di fosforilazione in un modello retinico *in vitro*

Marika Villa

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze  
Istituto Superiore di Sanità

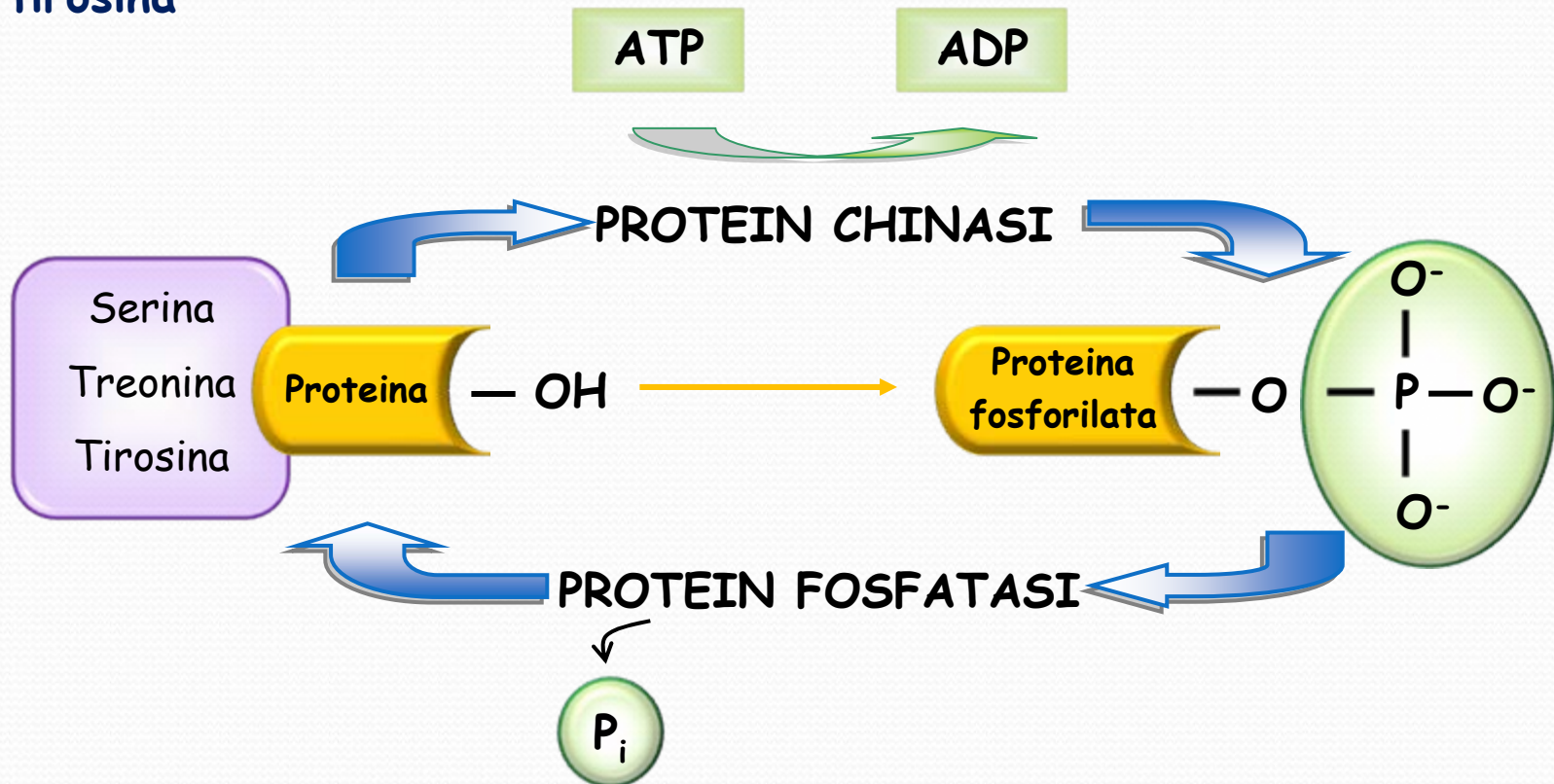


# Background

- ❖ Il diabete altera la funzione e la struttura di tutti i tipi cellulari retinici, coinvolgendo sia il comparto **vascolare**, sia le componenti **neurogliali**
- ❖ La funzione neuroretinica sembra compromessa in una fase molto **precoce**, ancora prima dell'insorgenza di lesioni retiniche vascolari clinicamente evidenti
- ❖ Il metabolismo del glucosio in eccesso è in grado di indurre l'attivazione di diverse **vie intracellulari di trasduzione** del segnale correlate fra loro e in grado di potenziarsi a vicenda

# Fosforilazione delle proteine

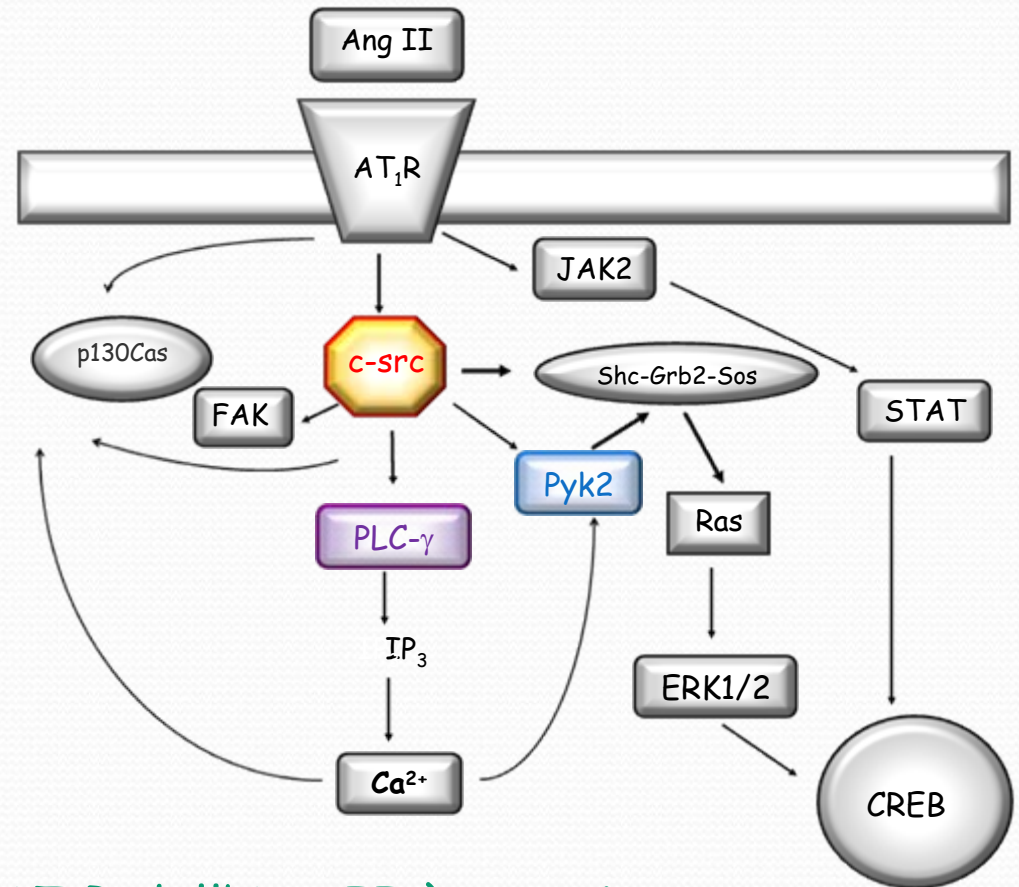
- **meccanismo regolatorio importante** nella trasduzione del segnale intracellulare
- processo reversibile
- avviene su diversi residui aminoacidici; i più comuni sono **serina**, **treonina** e **tirosina**





# Sistema Renina-Angiotensina (RAS)

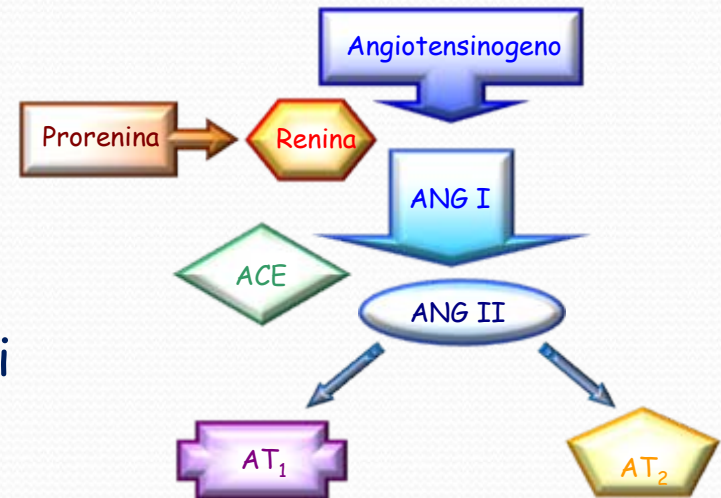
- ▶ Fosforilazione residui in tirosina
- ▶ Attivazione fosfolipasi
- ▶ Attivazione MAPK



L'attivazione dell'AT<sub>1</sub>R dell'Ang II è associata ad un aumento della fosforilazione di residui tirosinici in specifiche proteine

# Sistema Renina-Angiotensina (RAS) e retinopatia diabetica

- RAS è **attivato** nella Retinopatia Diabetica (RD) sia in modelli sperimentali sia nell'uomo
- il blocco di RAS conferisce **retino-protezione** sia in modelli sperimentali di diabete sia nei pazienti
- i componenti di **RAS** sono presenti a livello tutti i **citotipi** retinici





# Scopo

Analizzare gli effetti precoci dell'alto glucosio

sui segnali di fosforilazione in tirosina

in particolare

correlati al Sistema Renina Angiotensina,

in un modello sperimentale di Retinopatia Diabetica

# Disegno sperimentale

## Protocollo sperimentale

Culture tissutali di retina di ratto in DMEM per 48 ore:

❖ *Normale Glucosio*

(NG: 5.5 mM)

❖ *Alto Glucosio*

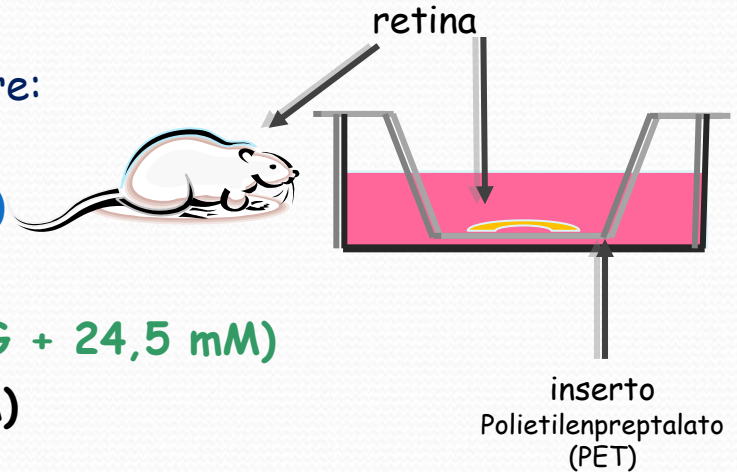
(HG: 30 mM)

❖ *Mannitolo*

(M: 5,5 mM G + 24,5 mM)

± ACE-inibitore (*Enalaprilat*)

(EPR: 200  $\mu$ M)



## Parametri

❖ *Fosforilazione in Tyr*

pTyr  
c-src (Tyr 416)  
pPLC $\gamma$ 1 (Tyr783)  
pPyK2 (Tyr 402)

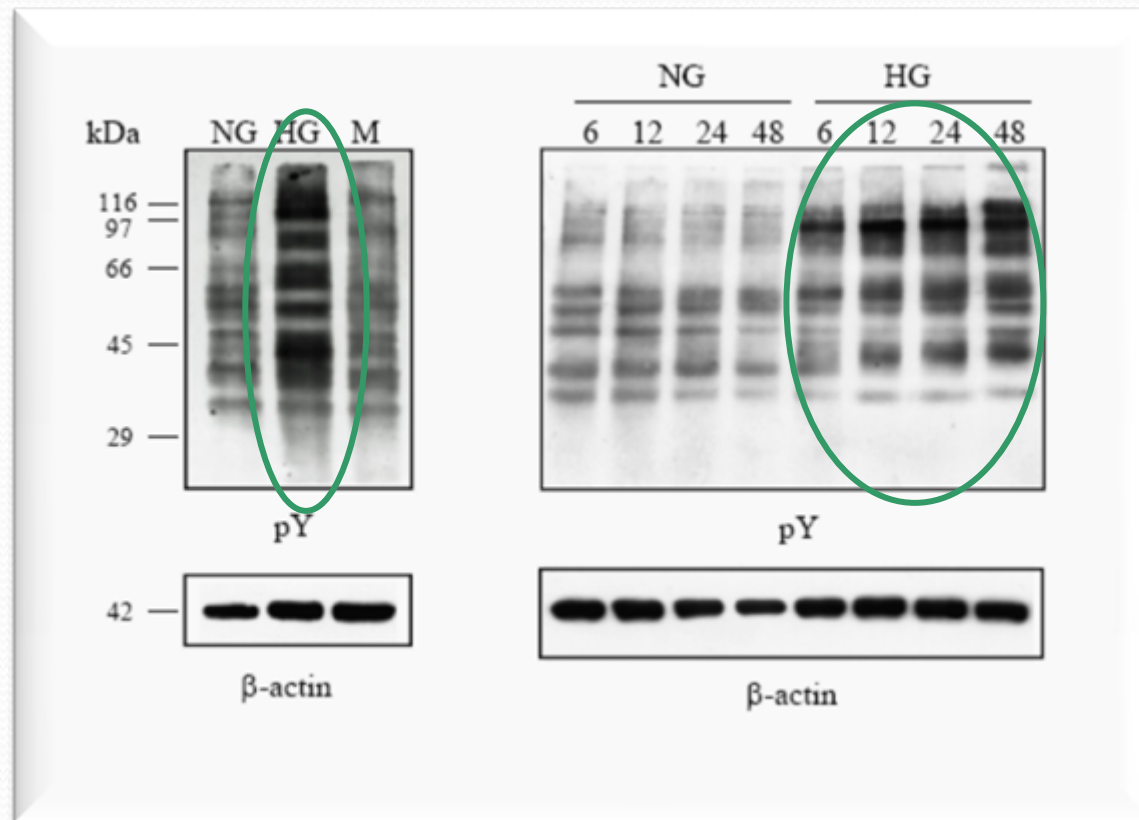
*Western blot*  
*attività chinasica*  
*immunoistochimica*

❖ *Fosfatasi in Tyr*

*saggio enzimatico*

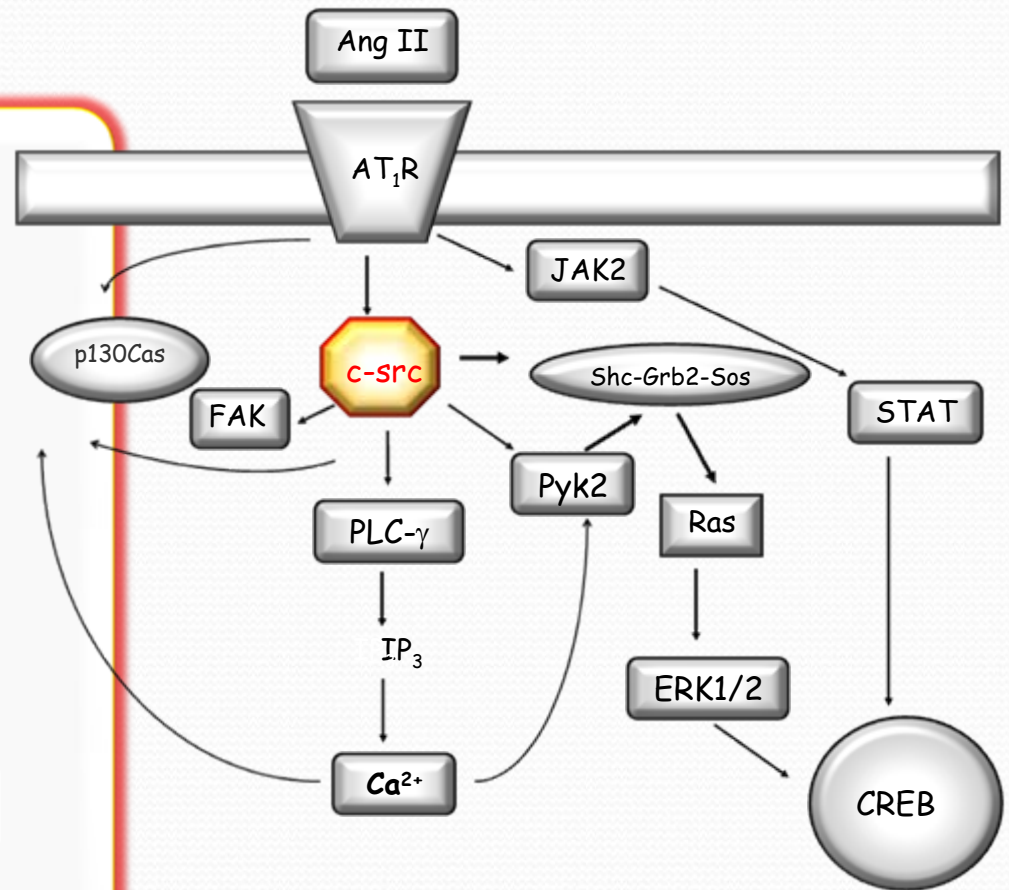
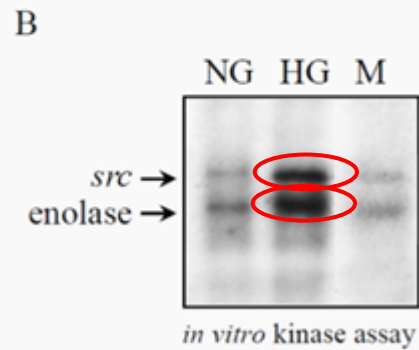
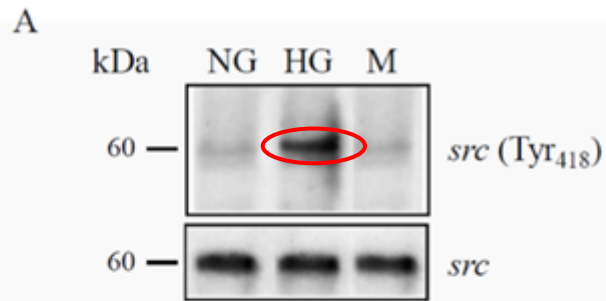


# Effetto dell'HG sulla fosforilazione in Tyr delle proteine

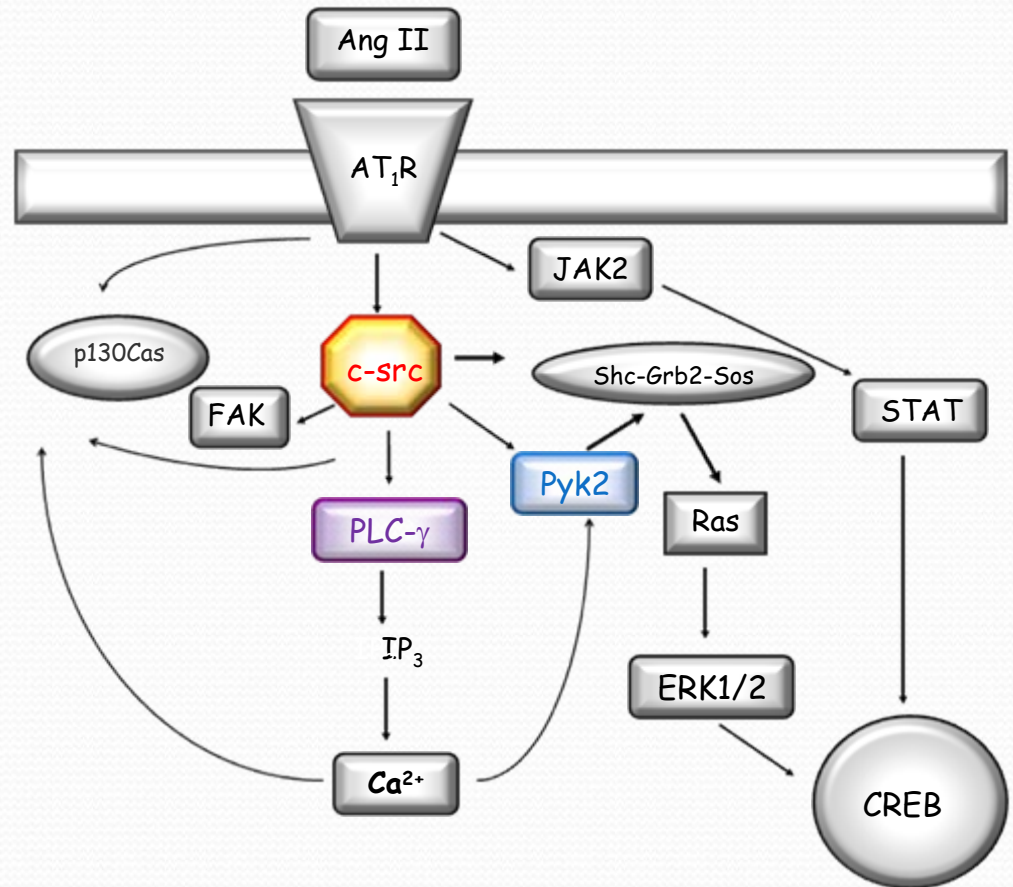
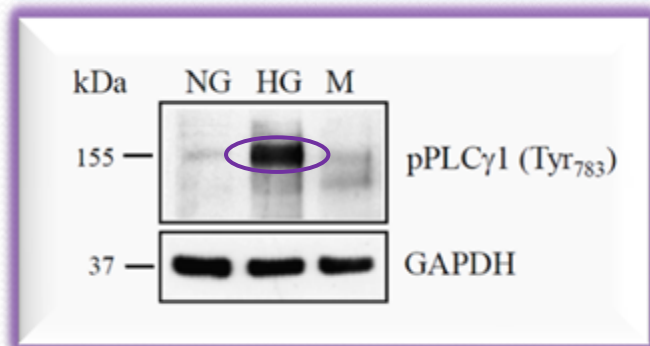
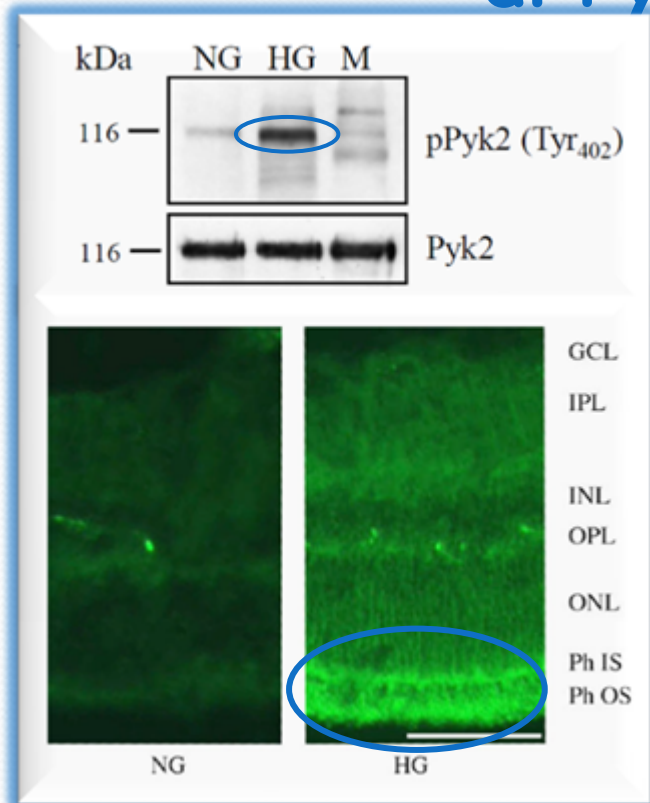




# Effetto dell'HG sull'attività di *src*



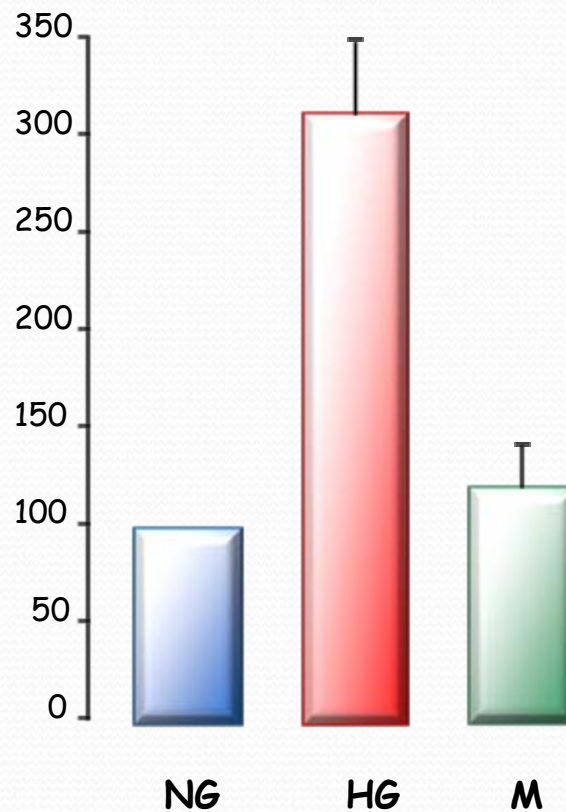
# Effetto dell'HG sulla fosforilazione di Pyk2(Tyr402) e di PLCγ1(Tyr783)



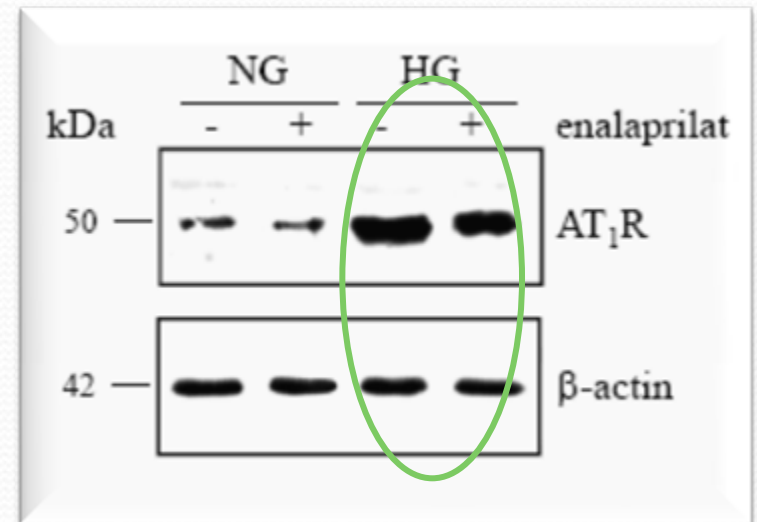
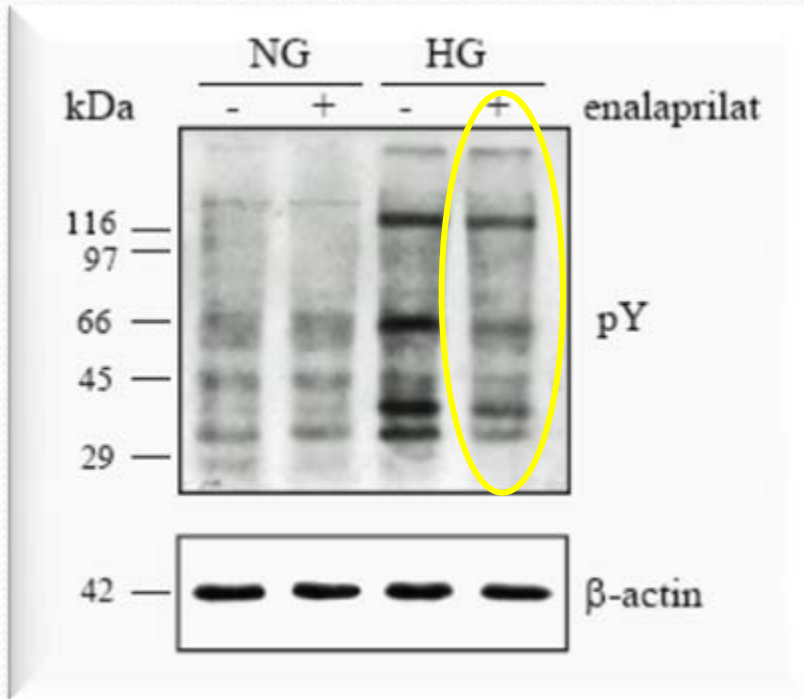


# Effetto dell'HG sull'attività delle fosfatasi in Tyr

Attività fosfataseica  
(% di controllo) n=4

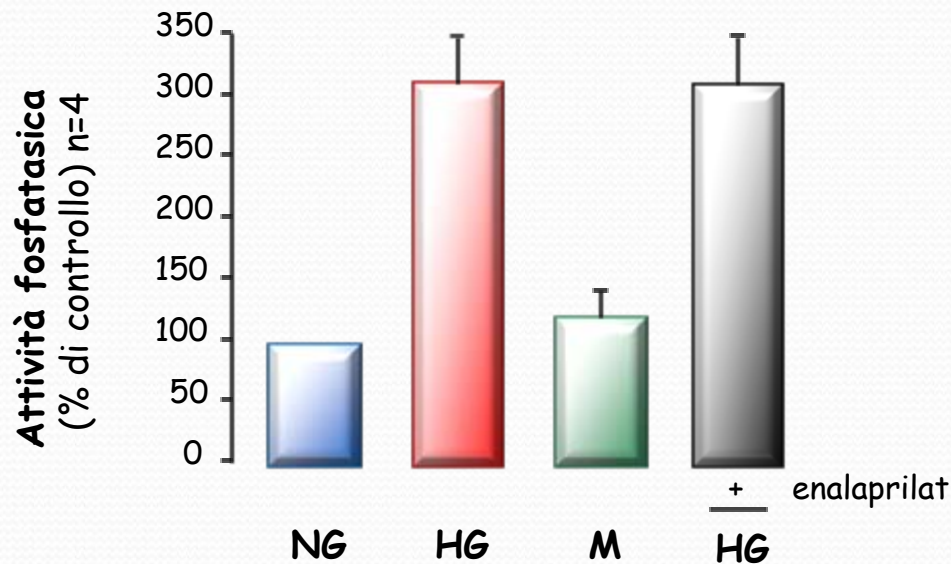
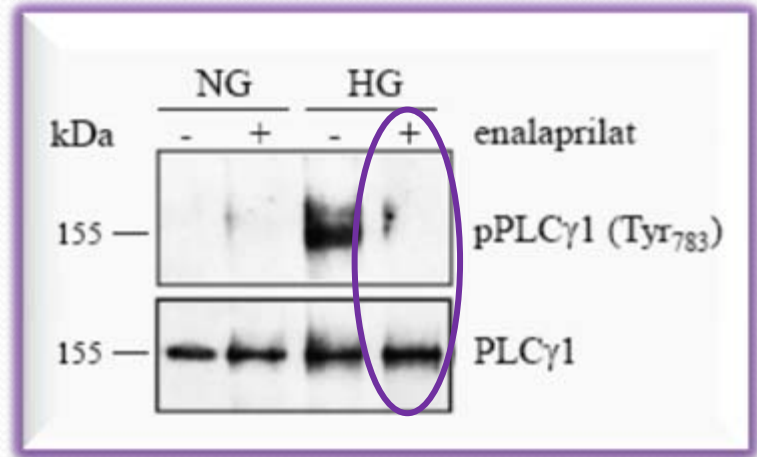
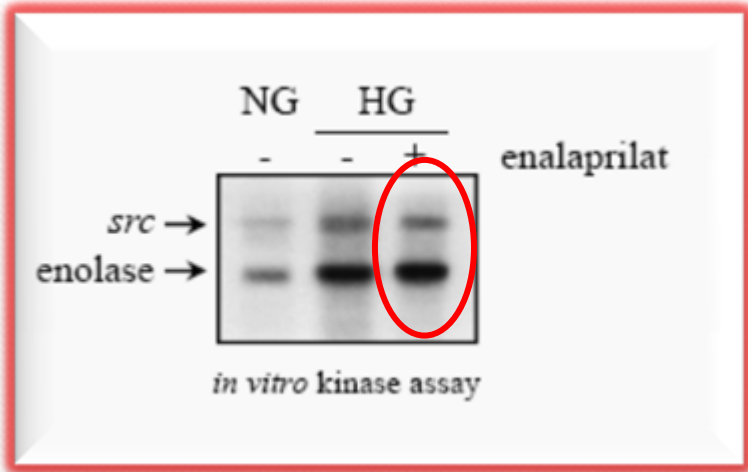


# Effetto dell'*enalaprilat* sulla fosforilazione in Tyr delle proteine e sull'espressione dell' $AT_1R$





# Effetto dell'*enalaprilat* sull'attivazione di *src*, PLC $\gamma$ 1 e fosfatasi in Tyr



# Sommario

Retine esposte ad alto glucosio **per tempi brevi** mostrano aumento dei segnali di **fosforilazione in tirosina**:

## ✓ RAS correlate

- Aumento di proteine fosforilate in tirosina
- Aumento di fosforilazione di PLC $\gamma$ 1
- Aumento dell' espressione del recettore AT $_1$

## ✓ RAS indipendenti

- Attivazione e incremento dell'attività di *src*,
- Aumento di fosforilazione di Pyk2
- Incremento dell'attività delle tirosin-fosfatasi



# Conclusioni

Questi risultati suggeriscono un coinvolgimento del signaling intracellulare di RAS nel danno retinico in corso di diabete.

Il modello sperimentale descritto potrebbe essere utilizzato per studiare gli eventi precoci indotti dal *milieu* diabetico, al fine di identificare possibili interventi terapeutici contro le alterazioni della funzione visiva in corso di diabete.