



*Università degli Studi di Firenze*

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE**

**SPECIALISTICHE**

**DOTTORATO DI RICERCA in**

*"La Chirurgia Conservativa e Riparatrice del Distretto*

*Testa-Collo"*

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. UGO MENCHINI

**VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA ANTI-ANGIOGENICA  
DELL' OLIGONUCLEOTIDE ANTISENSO ANTI-uPAR IN  
MODELLI SPERIMENTALI DI NEOVASCOLARIZZAZIONE  
RETINICA E COROIDEALE**

Settore Scientifico Disciplinare MED/30

**Dottorando**

Dott. VERDINA TOMMASO

**Tutore**

Dott. GIANSAnti FABRIZIO

---

Anni 2010/2012

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	pag 5
---------------------------	-------

## PARTE PRIMA

---

### **1. ANGIOGENESI OCULARE**

<b>1.1 Angiogenesi e sua regolazione</b> .....	7
<b>1.2 Attuali terapie antiangiogeniche</b> .....	13
<b>1.3 Terapie antiangiogeniche in corso di sperimentazione</b> ...	17

### **2. IL SISTEMA uPA/uPAR**

<b>2.1 Generalità</b> .....	21
<b>2.2 Struttura ed espressione di uPAR</b> .....	25
<b>2.3 uPAR ed alterazioni vascolari</b> .....	28

### **3. OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO**

<b>3.1 Cenni di terapia genica in Oftalmologia</b> .....	30
<b>3.2 Oligonucleotidi antisenso (ASO) e loro meccanismo di azione</b> .....	32
<b>3.3 Acidi Nucleici Peptidici (PNA)</b> .....	35
<b>3.4 ASO anti-uPAR</b> .....	38

## **PARTE SECONDA: SPERIMENTAZIONE**

---

<b>4. SCOPO DEL LAVORO.....</b>	<b>39</b>
<b>5. MATERIALI E METODI</b>	
<b>5.1 Esperimento in vitro su cellule endoteliali retiniche umane (HREC) con ASO anti-uPAR</b>	
<b>5.1.1 Colture cellulari e oligonucleotide antisenso.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1.2 Trasfezione, estrazione RNA e retrotrascrizione....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.3 Real time PRC.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.4 Saggio di morfogenesi capillare.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1.5 Saggio di migrazione cellulare.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2 Esperimento in vivo su modello murino di retinopatia indotta dall'ossigeno (OIR) con ASO anti-uPAR</b>	
<b>5.2.1 Modello sperimentale di OIR.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.2 Valutazione della vascolarizzazione retinica.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3 Esperimento in vivo su modello murino di angiogenesi retino-coroideale con PNA anti-uPAR.....</b>	<b>55</b>
<b>5.3.1 Verifica della localizzazione del PNA negli strati retina/coroide.....</b>	<b>58</b>
<b>5.3.2 Valutazione inibizione del gene uPAR.....</b>	<b>60</b>
<b>5.3.3 Valutazione area CNV.....</b>	<b>61</b>

<b>6. RISULTATI</b>	
<b>6.1 Esperimento in vitro su HREC</b>	
<b>6.1.1 Inibizione del gene uPAR.....</b>	<b>63</b>
<b>6.1.2 Inibizione della morfogenesi capillare.....</b>	<b>66</b>
<b>6.1.3 Inibizione della migrazione cellulare.....</b>	<b>68</b>
<b>6.2 Esperimento in vivo su modello murino di OIR.....</b>	<b>71</b>
<b>6.3 Esperimento in vivo su modello angiogenesi retino-         coroideale</b>	
<b>6.3.1 Localizzazione PNA anti-uPAR.....</b>	<b>74</b>
<b>6.3.2 Inibizione del gene uPAR.....</b>	<b>77</b>
<b>6.3.3 Analisi estensione area CNV.....</b>	<b>78</b>
<b>7. DISCUSSIONE.....</b>	<b>80</b>
<b>8. CONCLUSIONI.....</b>	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>87</b>
<b>Ringraziamenti.....</b>	<b>100</b>

## INTRODUZIONE

Il processo di angiogenesi consiste nello sviluppo di nuovi vasi a partire da altri già esistenti. E' un fenomeno complesso, risultato di un equilibrio dinamico tra fattori pro ed anti-angiogenici a favore dei primi e risulta essere alla base di numerosi quadri patologici a livello oculare.

Tra tutti i fattori coinvolti il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) risulta essere quello più conosciuto e studiato e sembra essere l'iniziale e principale responsabile dell'angiogenesi, anche se molti altri fattori giocano un ruolo determinante in questo processo. Il VEGF svolge d'altronde un ruolo importante anche in molti processi fisiologici oculari ed alcuni recenti studi hanno dimostrato come la sua eccessiva soppressione da parte dei farmaci anti-VEGF per via intravitreale possa essere in parte dannosa per i tessuti oculari stessi. (Ford KM et al., 2011; Brar VS et al., 2010; Uhrin P et al., 2013).

Risultano perciò essere di estrema attualità gli studi mirati allo sviluppo di metodiche alternative per bloccare la cascata angiogenica al fine di arrestare i numerosi quadri patologici che ne conseguono.

A tal fine sono stati condotti recentemente numerosi studi per determinare il ruolo dell'attivatore del plasminogeno tipo urochinasi (uPA) e del relativo recettore (uPAR) nel meccanismo di angiogenesi. Il recettore di membrana uPAR, coinvolto nell'attivazione del plasminogeno e delle metalloproteasi e quindi nella proliferazione e migrazione cellulare, è risultato avere un ruolo chiave nel processo di neovascolarizzazione (Uhrin P et al., 2013).

La terapia genica, attraverso il meccanismo di silenziamento genico, è un' interessante metodica di recente introduzione usata per

bloccare l'espressione di uno specifico prodotto genico implicato nella patogenesi di una malattia. Una delle metodiche maggiormente sviluppate in questo senso è quella che prevede l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (*AntiSense Oligonucleotides, ASO*) cioè molecole a DNA dotate di sequenza complementare a quella dell'mRNA del gene target. Tali molecole possiedono un'alta specificità per il gene target ed una volta veicolate all'interno delle cellule, in virtù della loro sequenza, si vanno a complessare con l'mRNA specifico causando la sua degradazione ed andando quindi ad inibire selettivamente l'espressione di tale gene. E' di recente acquisizione inoltre la possibilità di utilizzare anche molecole analoghe a DNA più specifiche in cui i nucleotidi sono legati ad una struttura n-(2-aminoetil)glicinica piuttosto che ad una struttura a desossiribosio-fosfato. Queste ultime innovative molecole chiamate Acidi Nucleici Peptidici (*Peptide Acid Nucleics, PNAs*) risultano essere ancora più efficienti per la loro maggior solubilità nonché specificità di legame.

La proteina di membrana uPAR risulta essere un ottimo target per una terapia genica basata sulla strategia antisenso, volta all'inibizione dell'espressione del suo gene e quindi della neoangiogenesi.

Lo scopo che ci siamo prefissi con questa tesi è stato quello di valutare l'efficacia anti-angiogenica di un oligonucleotide antisenso anti-uPAR, già sperimentato con successo in alcune linee cellulari trasformate, per l'inibizione dell'angiogenesi caratteristica di numerose affezioni corioretiniche. Per far ciò abbiamo condotto dapprima uno studio *in vitro* su cellule retiniche endoteliali umane e successivamente due esperimenti *in vivo* su modelli murini

sperimentali sia di retinopatia proliferativa indotta dall'ossigeno (OIR) che di neovascolarizzazione coroideale (CNV).

## 1

# ANGIOGENESI OCULARE

### 1.2 Angiogenesi e sua regolazione

Con il termine neoangiogenesi (o neovascolarizzazione) s'intende la formazione di nuovi vasi sanguigni a partenza da vasi preesistenti in seguito a proliferazione, migrazione e differenziazione delle cellule endoteliali. Si differenzia dalla vasculogenesi, che consiste invece nel processo di formazione "de-novo" di vasi sanguigni a partire da cellule staminali, quali gli angioblasti, che si verifica nei primi stadi di embriogenesi. (Patan, 2004; Risau et al., 1995)

L'angiogenesi gioca un ruolo importante sia in condizioni fisiologiche, quali la riparazione delle ferite e la vascolarizzazione dell'endometrio, che in condizioni patologiche, come nella crescita di tumori e nelle malattie infiammatorie croniche.

Il processo di angiogenesi è regolato da un complesso insieme di fattori pro ed anti angiogenici, il cui equilibrio determina la formazione dei neovasi (Tab. 1).

<b>Fattori Pro Angiogenici</b>	<b>Fattori Anti Angiogenici</b>
VEGF	PEDF
FGF-1 e 2	TGF-beta
Angiopoietina-1	Angiostatina
TGF-alfa	Endostatina
HGF	TSP-1
PDGF	TIMPs
TNF	PF4
IL-8	Interleuchina-12
Altri	altri

**Tab.1** Fattori endogeni pro ed anti angiogenici.

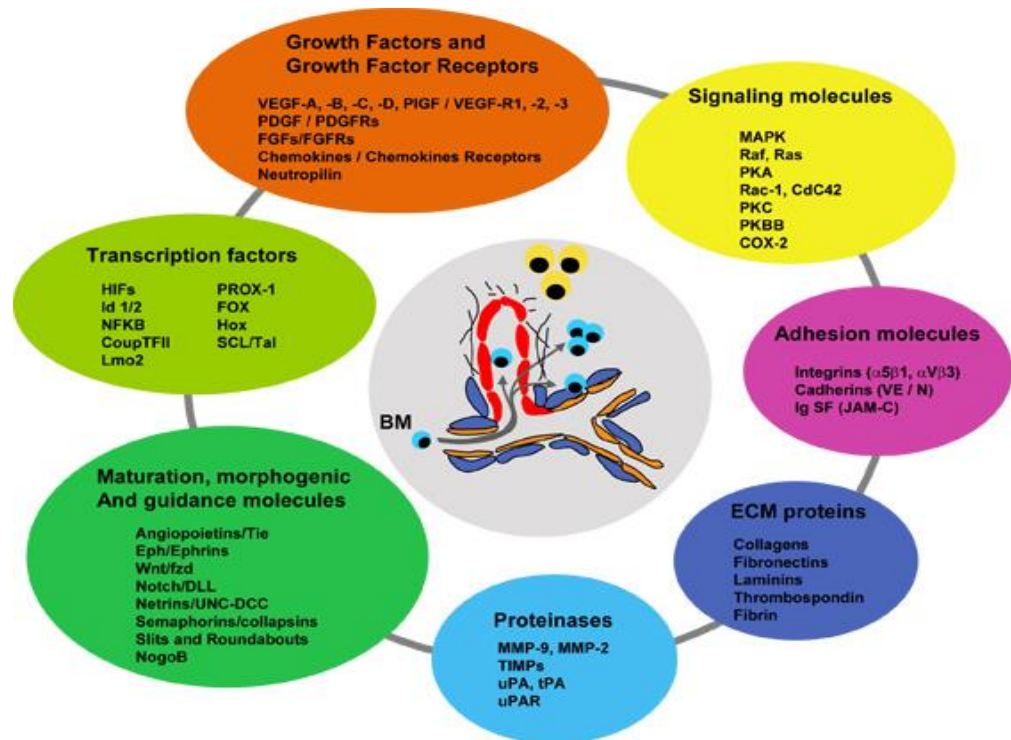
I **fattori pro-angiogenici** includono una serie di sostanze ben studiate come il VEGF-A, il Fibroblast Growth factor (FGF), le angiopoietina-1, il transforming growth factor alpha (TGF-alfa), l'hepatocyte growth factor (HGF), il connective tissue growth factor (CTGF), platelet derived-growth factor (PDGF), il tumor necrosis factor alpha (TNF), l'interleuchina-8(IL-8). I **fattori anti-angiogenici** includono il pigment epithelium-derived growth factor (PEDF), il transforming growth factor beta (TGF-beta), l'angiostatina, l'endostatina, la trombospondina (TSP-1), gli inibitori delle metalloproteasi (TIMPs), il platelet factor-4 (PF-4), l'interleuchina-12.

In condizioni fisiologiche, in cui non avvengono processi di neovascolarizzazione, l'equilibrio tra fattori pro ed anti-angiogenici è spostato a favore di quest'ultimi mentre in particolari situazioni patologiche si attivano i fattori pro-angiogenici (*switch angiogenico*) i quali vanno a promuovere la complessa sequenza che conduce allo sviluppo di nuovi vasi patologici.

Questi fattori sono costituiti da gruppi diversi di proteine con alcune caratteristiche comuni. La maggior parte sono proteine secrete



che legano recettori di membrana su cellule autocrine, paracrine ed endocrine. L'interazione con questi recettori modula le vie intracellulari che regolano la proliferazione, la migrazione e il differenziamento delle cellule che andranno a formare i nuovi elementi vascolari.



**Fig. 1** Diagramma di insieme di tutti i fattori, molecole e recettori coinvolti nel processo di angiogenesi

I meccanismi che portano alla produzione e alla liberazione di fattori pro-angiogenici non sono ancora del tutto chiari. È ormai chiaro tuttavia come l'ipossia e determinate condizioni infiammatorie giochino un ruolo fondamentale nello scatenare il processo di angiogenesi patologica delle malattie neovascolari retiniche.

Tra tutti questi fattori il Vascular Endothelial Growth Factor (**VEGF**) è attualmente quello più studiato e sembra essere l'iniziale e principale responsabile dell'angiogenesi, anche se sicuramente altri

fattori giocano un ruolo determinante in questo processo a livello oculare (Hellstrom et al., 2001; Lindahl et al., 1997).

Esistono quattro isoforme di VEGF (A, B, C, D) che possono legare tre diversi recettori specifici (VEGFR 1, 2, 3). Questi recettori sono stati trovati ad alte concentrazioni sulle cellule endoteliali (CE) oculari. A livello retinico le cellule che formano la parete dei capillari (CE, periciti, cellule muscolari lisce) sono in grado di liberare il VEGF, così come le cellule di Müller e le cellule dell'EPR. Il VEGF liberato può indurre angiogenesi a livello retinico o diffondere verso il segmento anteriore, determinando la formazione di neovasi a livello irideo.

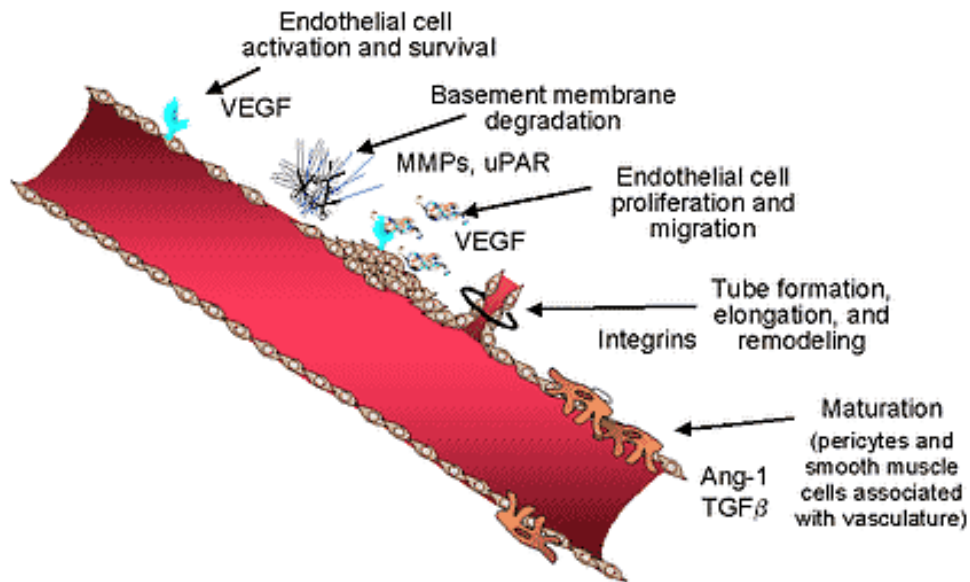
Dal punto di vista biochimico, il VEGF è una proteina glicosilata dimerica a basso peso molecolare (36-46 KD). Nell'uomo sono state isolate diverse isoforme di VEGF, rispettivamente di 121, 165, 189, e 206 amminoacidi. La specie molecolare principale che stimola la crescita neovascolare nella patologica retinica e coroideale è il VEGF165 che si presenta come una glicoproteina omodimerica basica con elevata affinità per l'eparina.

Studi su colture cellulari hanno evidenziato come l'espressione del VEGF sia accresciuta essenzialmente in condizioni di ipossia ed ischemia nonché di stress ossidativo. Studi in vivo ed in vitro hanno dimostrato come ampie aree di ischemia retinica producano una proteina di trascrizione nota come fattore di induzione dell'ipossia (HIF-1, hypoxia inducible factor 1) che stimola una up-regulation della secrezione del VEGF-A. Oltre ad agire nella formazione e sopravvivenza dei vasi, il VEGF aumenta la permeabilità vascolare inducendo la formazione di vasi fenestrati responsabili di edema ed emorragie retiniche.

Il meccanismo dell'angiogenesi è molto complesso in quanto la formazione di un vaso a partire da vasi preesistenti passa attraverso diversi stadi ben definiti, caratterizzati da modificazioni dell'endotelio e della matrice extracellulare. Semplificando si possono riconoscere sommariamente tre fasi principali:

1. **Attivazione delle cellule endoteliali e degradazione della membrana basale.** Alcuni fattori pro-angiogenici inducono attivazione delle cellule endoteliali (CE) dei vasi le quali a loro volta producono enzimi proteolitici (metalloproteasi, serino proteasi) che degradano la sottostante membrana basale e la matrice extracellulare (ECM) circostante.
2. **Migrazione e proliferazione delle CE.** Le CE proliferano e migrano partendo da vasi preesistenti secondo lo stimolo angiogenico verso l'area selettiva di tessuto dove è necessaria la creazione di una rete neovascolare. Nel corso di tale fase vengono liberati vari enzimi proteolitici che alterano la densità della matrice extracellulare allo scopo di facilitare l'attività migratoria delle cellule endoteliali.
3. **Formazione di nuovi vasi.** Le CE si organizzano e formano un lume dando luogo in tal modo ad un nuovo vaso con chemiotassi di cellule di sostegno come periciti e di fibrocellule muscolari lisce e creazione di anastomosi tra capillari con rimaneggiamenti vasali (decorso, calibro, scomparsa di capillari). In questo processo le CE hanno bisogno di specifiche proteine di adesione della ECM (integrine, vitronectine) e molecole stabilizzatrici ad effetto anti-proliferativo come il TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 che portano alla deposizione di tessuto

connettivale (Yancopoulos G D et al. 2000, Bussolino F et al. 1998).



**Fig 2** Rappresentazione schematica delle varie fasi di angiogenesi capillare

Alla luce di questi meccanismi descritti la terapia antiangiogenica dovrebbe mirare ad eliminare lo stimolo che causa la liberazione dei fattori proangiogenici. Pertanto la prima possibilità farmacologica è quella di bloccare i fattori pro-angiogenetici stessi. Data però la moltitudine di fattori che vi prendono parte, l'inibizione di un singolo agente probabilmente non è sufficiente. Un secondo approccio farmacologico all'angiogenesi è quello di inibire la proliferazione e migrazione delle CE interferendo nell'interazione tra le CE e la ECM circostante. Questo può essere raggiunto con l'inibizione delle proteine di adesione delle CE, le integrine o la loro controparte nella matrice extracellulare. Un terzo approccio della terapia antiangiogenica prevede la riattivazione dei fattori locali anti-angiogenici preesistenti, che sono

ipoespressi (vedi capitolo nuove strategie terapeutiche in sperimentazione). Le sempre più approfondite conoscenze sulla formazione dei neovasi e sulle relazioni intercorrenti tra processo angiogenico e risposta retinica al danno tessutale costituiscono le basi razionali per disegnare i nuovi approcci al trattamento farmacologico anti-angiogenico moderno della neovascolarizzazione intraoculare.

### **1.3 Attuali terapie antiangiogeniche**

A livello oculare l'angiogenesi è responsabile di numerose patologie che portano ad un grave calo visivo tra le quali la degenerazione maculare senile essudativa (CNV), la retinopatia diabetica proliferante (PDR), la retinopatia del pretermine (ROP), le occlusioni venose retiniche (OVR), il glaucoma neovascolare.

In quest'ultimo decennio abbiamo assistito all'introduzione di trattamenti rivoluzionari molto selettivi per il trattamento della neovascolarizzazione coroideale (CNV) soprattutto secondaria ad AMD e miopia patologica.

Fino alla fine degli anni novanta l'unica possibilità terapeutica era data dalla fotocoagulazione laser della retina. Nel 2001 la terapia fotodinamica (Photo Dynamic Therapy, PDT) con verteporfina é stata introdotta come terapia di elezione soprattutto nelle forme di CNV subfoveali classiche ed in seguito anche nelle occulte nei quadri di degenerazione maculare senile. Nello studio TAP (Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy) l'analisi a due anni aveva dimostrato come la percentuale di pazienti che andavano incontro a grave perdita visiva fosse minore rispetto al gruppo controllo trattato con placebo (47% versus 62%). Risultati

analoghi erano stati ottenuti anche per forme di neovascolarizzazione occulta, mentre la PDT sembrava non essere efficace nelle lesioni minimamente classiche, nelle quali la componente classica occupa meno del 50% dell'intera area di lesione. Una successiva analisi dei risultati dello studio VIP (Verteporfin in Photodynamic Therapy) e dei successivi VER (Verteporfin Early Retreatment) e VALIO (Verteporfin Therapy with Altered Delayed Light in Occult CNV) hanno invece dimostrato l'inefficacia terapeutica della PDT che quindi ha sostanzialmente perso questa indicazione terapeutica ( Cruess AF et al. 2009).

Dal 2007 il trattamento con iniezioni intravitreali con anti-VEGF è diventato il gold standard della terapia della AMD essudativa e delle principali patologie retiniche da alterazione della permeabilità vascolare.

Le terapie intravitreali anti-VEGF attualmente a disposizione sono le seguenti:

- **Pegaptanib (Macugen®)**: aptamero di acido ribonucleico peghilato prodotto per bloccare in modo selettivo l'isoforma VEGF165 senza interessare la altre isoforme, composto da oligonucleotidi (28-nucleotidi ad RNA) sintetici con proprietà simili agli anticorpi, In tal modo inibisce l'interazione del VEGF con i recettori presenti sulle cellule endoteliali, impedendo gli effetti angiogenici e l'aumento di permeabilità vasale senza tuttavia bloccare gli effetti fisiologici del VEGF nell'occhio come in altri distretti. Approvato dal FDA (Food and Drug Administration) nel 2004.

- **Bevacizumab (Avastin®)**: anticorpo monoclonale murino umanizzato (IgG costituita da sequenza di aminoacidi 93% umani, 7% murini). E' un anti-VEGF non selettivo bloccando tutte le

isoforme del VEGF. Approvato nel 2004 dalla FDA per il trattamento delle metastasi colon-rettali, è impiegato “off-label” in oftalmologia dal 2005.

- **Ranibizumab (Lucentis<sup>®</sup>)**: frammento dello stesso anticorpo monoclonale murino umanizzato che costituisce il bevacizumab; parimenti blocca tutte le isoforme del VEGF. Per il ridotto peso molecolare (48kD) attraversa più rapidamente la retina. La FDA americana ha autorizzato l'utilizzo di ranibizumab in tutti i tipi di lesione da AMD essudativa negli USA dal mese di luglio 2006. L'EMA (European Medicines Agency) ha concesso l'autorizzazione in Europa dal 2007. Lucentis è attualmente registrato assieme a Macugen in Italia come farmaco “on-label” nel trattamento della CNV in corso di degenerazione maculare senile. Il recente studio CATT a due anni non ha messo in evidenza sostanziali differenze di efficacia tra ranibizumab e bevacizumab.

- **Aflibercept VEGF-Trap (Eylea<sup>®</sup>)**: proteina di fusione solubile (110kD) che agisce da recettore capace di bloccare il VEGF con un'affinità 200 volte superiore al ranibizumab (Chappelov AV e Kaiser PK, 2008). Penetra agevolmente attraverso la retina e, oltre ad essere non selettivo per le isoforme del VEGF, blocca anche il PLGF (fattore di crescita placentare) trovato anche esso in quantità elevata nella retina di pazienti affetti da AMD umida. Approvato dal FDA nel 2011, a disposizione in Europa dall'autunno 2012, avrebbe il vantaggio di richiedere meno somministrazioni.

Per tutti questi farmaci ad uso intravitreale è prevista una fase di carico iniziale (“loading phase”, con una iniezione per 3 volte ogni 30 giorni) seguita da tre possibili regimi di somministrazione da considerare secondo il quadro clinico:

- mensile (bimensile per Aflibercept)
- a richiesta (in presenza di segni di attività alla biomicroscopia o all'OCT)
- “tratta ed estendi” (allungando progressivamente l’intervallo dei trattamenti)

Anche se i migliori risultati in termini di acuità visiva sono stati ottenuti con il trattamento continuo mensile, i risultati dei recenti studi multicentrici (PrONTO, SUSTAIN) hanno evidenziato che il trattamento al bisogno consente di ottenere risultati sovrapponibili al trattamento mensile solo se accompagnati ad un monitoraggio stretto del paziente al fine di individuare precocemente eventuali recidive.

L’avvento in questi ultimi anni dei farmaci intravitreali anti-VEGF ha consentito di migliorare notevolmente la prognosi delle malattie neovascolari. Tuttavia uno dei principali obiettivi delle sperimentazioni cliniche è quello di perfezionare la selettività dell’inibizione della neovascolarizzazione patologica attraverso meccanismi che, modulando la regressione dei vasi neoformati, minimizzino la risposta fibrotica e migliorino la ripresa funzionale. Questo anche attraverso la personalizzazione dei protocolli terapeutici e la combinazione di terapie che possano agire anche simultaneamente sui diversi elementi patogenetici della malattia.



### 1.3 Terapie future in corso di sperimentazione

Nuove prospettive terapeutiche antiangiogeniche sono rappresentate da molecole che interferiscono con vie alternative a quella del VEGF.

Tra le molecole antiangiogeniche in via di sperimentazione ricordiamo:

- **Sirolimus**: macrolide meglio conosciuto come Rapamicina. E' efficace in oncologia come inibitore della mTOR (chinasi che occupa un punto chiave nei meccanismi di molte sequenze cellulari favorendo l'infiammazione, l'angiogenesi e l'iperpermeabilità). In particolare blocca il fattore 1-alfa, una proteina che attiva i fenomeni di angiogenesi stimolando la produzione di VEGF. La formulazione del Sirolimus (Macusight) per via oculare prevede una somministrazione per via sottocongiuntivale o intravitreale da solo o in combinazione (Napoli KL et al. 2001, Dutcher JP 2004)

- **Terapia Radiante**. Scopo della terapia radiante è quello di inibire la proliferazione e stabilizzare le cellule endoteliali, i fibroblasti e altre cellule infiammatorie inducendo delle rotture della catena del DNA all'interno dei nuclei cellulari causando così impossibilità della replicazione e divisione delle cellule. Già in passato erano state utilizzate con scarso successo, ma attualmente vengono proposte in modi diversi: come brachiterapia epimaculare con stronzio-90 (NeoVista) e con raggi x con IRay system (Oraya Ther).

- **SiRNA**. Acronimo per small interfering RNA. E' una classe di molecole a doppia catena di RNA che interferisce con l'espressione di geni specifici attraverso interferenza con l'RNA. Bevasiranib (Cand5) è una molecola di 19 nucleotidi di lunghezza, che inibisce in

particolare il gene deputato all'induzione dell'ipossia (gene RTP801) attraverso la mediazione dell'mTOR. I primi studi indicano un'efficacia di tale terapia intravitreale con una bioattività presente nel senso di una stabilizzazione nel 90% dei casi ed un miglioramento nell'11% dei pazienti (Tolentino MJ et al. 2004)

- **Aptamero anti-PDGF (E 10030) + Lucentis (OPH 10001)** Il fattore di crescita indotto dalle piastrine (PDGF) è una proteina che regola la crescita cellulare ed è coinvolto anche nel processo di angiogenesi. Scopo della combinazione è effettuare un rimodellamento vascolare dopo terapia che non avviene con monoterapia con anti-VEGF.

- **Pazopanib collirio** (GSK MD7). Pazopanib è un inibitore tirosin chinasi con la cui attività è rivolta contro molteplici recettori quali tutti quelli per il VEGFR, PDGFR e CD117 (c-Kit). In modelli animali di CNV laser-indotta l'assunzione orale di pazopanib è stata dimostrata arrestare la progressione della malattia, fermare il leakage e indurre la regressione dei neovasi. Soluzioni oftalmiche di pazopanib sotto forma di gocce per uso topico sono state sviluppate ed hanno mostrato effetti simili. Da studi effettuati (Takahashi K et al., 2009) la dose di 5mg/ml è risultata la minima con la quali sono stati registrati effetti positivi. Nuove formulazioni di pazopanib sono attualmente sotto studio a dosi maggiori

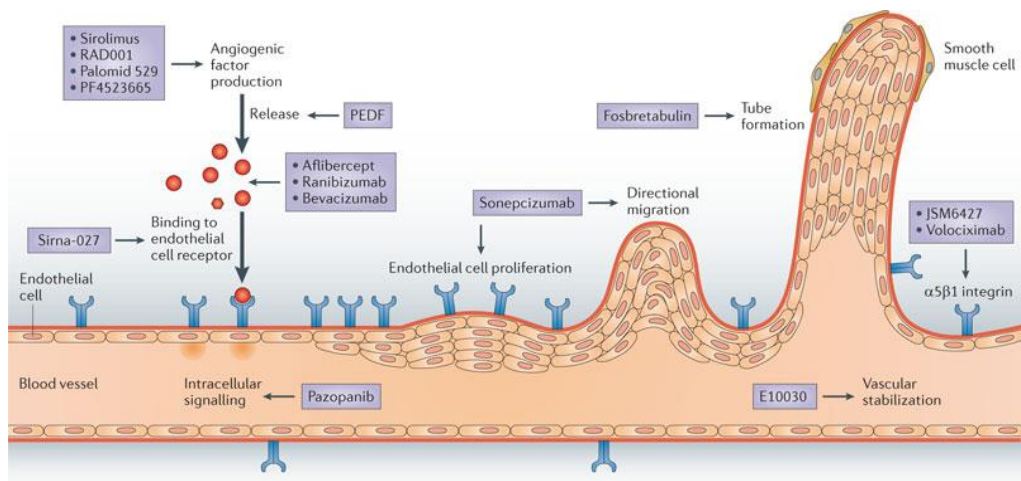
- **Altri inibitori del sito tirosin-chinasico del VEGFR:** quali Vatalanib (PTK787), Sorafenib, Sunitinib, Semaxanib somministrati per via orale. Non distinguono tra i diversi VEGFR, ma inibiscono anche altre tirosin chinasi.

- **Antagonisti delle integrine** (Squalamina lattato, Vitaxin, Volociximab) anticorpi monoclonali chimerici ad alta affinità che

inibiscono l'attività funzionale delle integrine, glicoproteine transmembrinarie eterodimeriche che hanno un ruolo cruciale nei processi di adesione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare ed aumentate nelle cellule endoteliali coinvolte nella formazione di neovasi.

- **Impianti intraoculari di cortisone** quali Ozurdex (desametasone), Retisert, Medidur (fluocilonone acetone).

- **sFLT01**. Nuova proteina anti-VEGF (prodotta da Genzyme) che può essere trasportata da un vettore virale adeno-associato (AAV), lo stesso vettore utilizzato per la terapia genica nell'amaurosi congenita di Leber. La molecola solubile anti-VEGF è una chimera della porzione Fc dell'IgG1 umana e una porzione del recettore umano del VEGF. Il vettore virale è somministrato attraverso una iniezione intravitale analogamente alle terapie anti-VEGF standard. Negli studi effettuati su occhi di scimmie AAV-sFLT01 mantiene livelli di espressione persistenti fino ad un anno. Non sono stati riscontrati effetti secondari in studi effettuati in modelli su roditori e primati. Risulta pertanto essere un metodo alternativo di soppressione VEGF senza la necessità di ripetute iniezioni intraoculari. (Bagley RG et al., 2011)



Nature Reviews | Drug Discovery

Drug	Company	Description	Target	Clinical phase	ClinicalTrials.gov identifiers
Sirolimus (also known as rapamycin)	MacuSight/Santen	Tyrosine kinase inhibitor	mTOR	Phase I/II	NCT01445548
				Phase I/II	NCT00766649
				Phase II	NCT00656643
RAD-001 (everolimus)	Novartis	Tyrosine kinase inhibitor	mTOR	Phase II	NCT00304954
Palomid 529	Paloma	Tyrosine kinase inhibitor	mTOR	Phase I	NCT01033721
				Phase I	NCT01271270
PF-655 (also known as PF-04523655)	Pfizer	Synthetic siRNA	DDIT4	Phase II	NCT01445899
AdGVPEDF.11D	GenVec	Adenovirus vector containing PEDF	Endothelial cells	Phase I	NCT00109499 (completed)
AAV2-sFLT01	Genzyme	Adeno-associated virus (AAV) vector carrying VEGFR	VEGF	Phase I	NCT01024998
Pazopanib	GlaxoSmithKline (United States)	Tyrosine kinase inhibitor	VEGFRs	Phase II	NCT01362348
				Phase II	NCT01134055
PTK787	Novartis	Oral tyrosine kinase inhibitor	VEGFRs	Phase I	NCT00138632 (completed)
AL-39324	Alcon	Tyrosine kinase inhibitor	VEGFRs	Phase II	NCT00992563 (completed)
ATG-3	CoMentis	Eye drop formulation of mecamylamine	Nicotinic acetylcholine receptor	Phase II	NCT00536692 (completed)
				Phase II	NCT00607750 (completed)
iSONEP (sonopizumab)	Lpath	Monoclonal antibody	Sphingosine-1-phosphate	Phase II	NCT01414153
				Phase I	NCT01334255
JSM6427	Jerini Ophthalmic	Monoclonal Antibody	$\alpha 5 \beta 1$ Integrin	Phase I	NCT00536016
Volociximab	Ophthotech Corporation	Monoclonal Antibody	$\alpha 5 \beta 1$ Integrin	Phase I	NCT00782093
Fosbretabulin	OXiGENE	Combrestatin A4 phosphate	Microtubule assembly	Phase II	NCT01423149 (completed)
E10030	Ophthotech Corporation	Pegylated aptamer	Platelet-derived growth factor- $\beta$	Phase II	NCT01089517

DDIT4, DNA damage-inducible transcript 4 protein; mTOR, mammalian target of rapamycin; PEDF, pigment epithelium-derived factor; siRNA, small interfering RNA; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, VEGF receptor.

**Fig. 3** Diagramma schematico con relativa tabella riepilogativa sulle modalità di funzionamento delle diverse strategie terapeutiche antiangiogeniche attualmente in corso di sperimentazione (Zhang K et al. *Nature Reviews Drug Discovery* 2012)

## IL SISTEMA uPA/uPAR

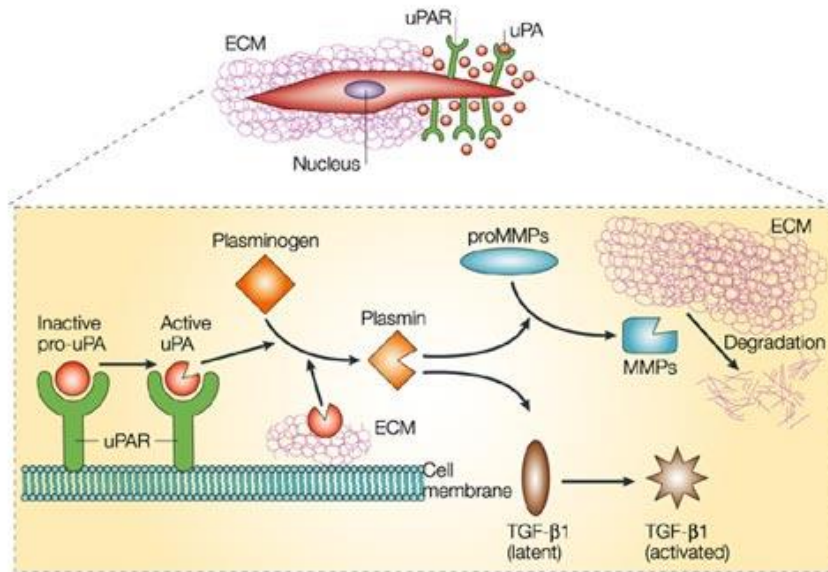
### 2.1 Generalità

Il sistema che fa riferimento all'attivatore del plasminogeno tipo urochinasi (uPA) e al suo recettore (uPAR), e coinvolto attivamente nel processo di angiogenesi, è un insieme di serino-proteasi.

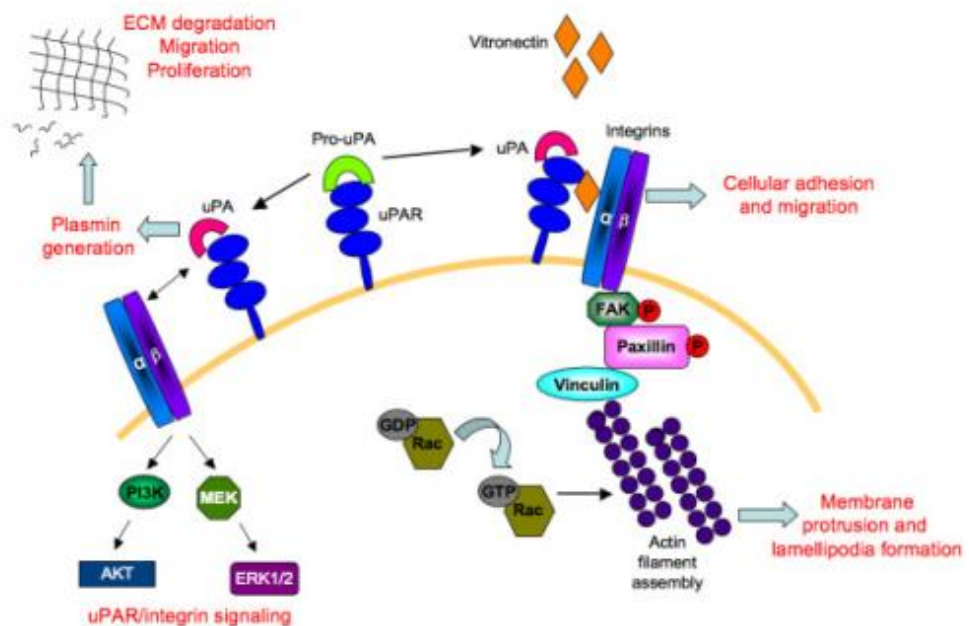
uPAR (chiamato anche CD87) è una glicoproteina ricca in cisteina costituita da 283 aminoacidi e localizzata sul lato esterno della membrana cellulare tramite un'ancora composta da glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI). Ha numerose funzioni conosciute ed è coinvolta in numerosi processi fisiologici tra cui: la proteolisi della matrice extracellulare (EMC), l'interazione fra le cellule e la EMC stessa, la trasduzione intracellulare di segnali provenienti dall'esterno, la regolazione dei livelli di cAMP.

uPAR interagisce con la forma zimogenica dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico (pro-uPA), consentendo la sua attivazione in uPA attraverso la rottura del ponte Lys158-Ile159. In tal modo uPAR localizza pro-uPA e uPA, che possiede attività di serino proteasi, a livello della superficie cellulare.

uPA (urochinasi) è una proteina di 411 residui aminoacidici, consiste di due alfa eliche e due beta anti-parallele. Essa catalizza nei tessuti l'attivazione del plasminogeno in plasmina attraverso la rottura di un legame arginina-valina. La plasmina a sua volta favorisce il rilascio di numerosi enzimi proteolitici incluse le collagenasi, fibronectina, TGF-beta, e attiva alcune metalloproteinasi (MMPs) favorendo quindi l'angiogenesi Fig. 4 (Dass et co. 2007)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

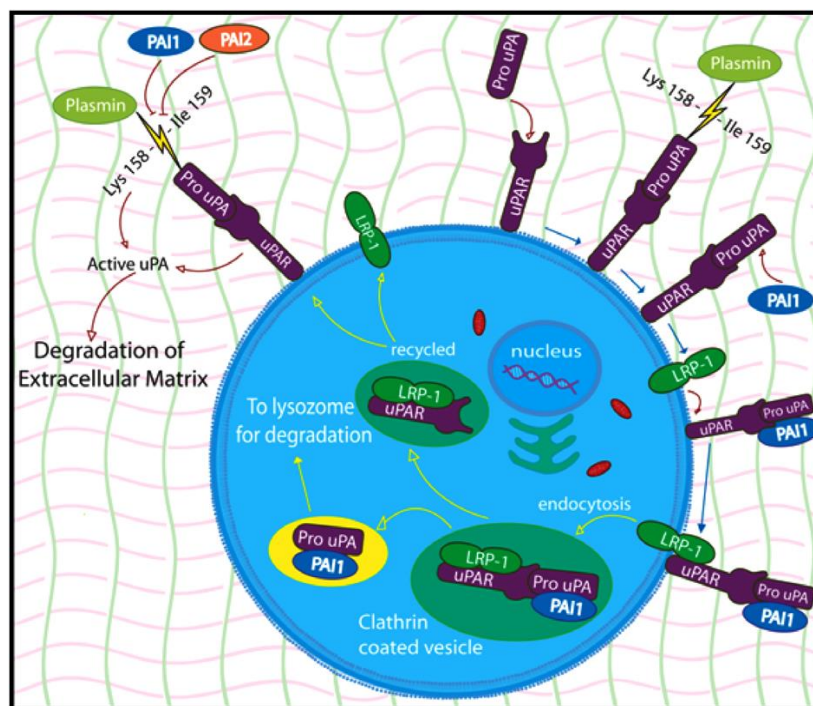


**Fig. 4:** Rappresentazioni schematiche del sistema attivatore del plasminogeno. Sulla superficie della membrana cellulare, a livello dell'estremità rivolta nella direzione di migrazione, uPAR lega l'urochinasi inattiva (pro-uPA), convertendola nella forma attiva (uPA). L'uPA proteoliticamente attiva converte il plasminogeno (inattivo) in plasmina (attiva), che può degradare la matrice extracellulare o attivare alcuni fattori di crescita latenti come il TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor  $\beta$ 1). La plasmina può anche degradare l'ECM indirettamente, attraverso l'attivazione delle pro-MMPs (pro-metalloproteasi della matrice) (Blasi & Carmeliet, 2002). uPA inoltre attraverso l'interazione con la vitronectina e le integrine di membrana catalizza reazioni che portano all'attivazione e proliferazione delle cellule endoteliali stesse.

La plasmina a sua volta cliva ed attiva pro-uPA (Nielsen L.S., 1982). Questo meccanismo a feedback positivo viene amplificato se uPA, pro-uPA, plasminogeno e plasmina sono situati sulla superficie cellulare; uPA e pro-uPA legano uPAR, mentre il plasminogeno e la plasmina vanno a legarsi su molti altri recettori di membrana (Ellis V., 1991).

Il sistema di attivazione del plasminogeno è regolato negativamente da PAI-1 e 2 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 e 2) che inibiscono uPA, e dall' $\alpha$ 2 antitripsina, che inibisce la plasmina. Questi inibitori serino proteasici (chiamati SERPINE) legano covalentemente i loro target, inibendone l'attività proteolitica e portano all'internalizzazione dell'intero complesso uPAR-uPA-PAI-1 per mezzo di un recettore della famiglia delle lipoproteine a bassa densità (LRP-1). Questa interazione lo conduce verso un'endocitosi clatrina-dipendente (Conese M et al, 1995; Czekay RP et al, 2001), che comporta la degradazione lisosomiale di uPA e PAI-1 e il riciclo di uPAR e LRP1, i quali vengono ricondotti sulla superficie cellulare (Czekay R.P., 2001; Nykjaer A., 1997). Fig. 5

Molti studi hanno dimostrato come uPAR, oltre a regolare la proteolisi, trasduca anche segnali all'interno della cellula, promuovendo la motilità, l'invasione, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. La segnalazione di uPAR all'interno della cellula coinvolge numerose vie di segnalazione, i principali membri delle quali sono MAPchinasi, RAS, SRC, JAK, STAT e PI3K (Koshelnick Y., 1997; Lester R.D., 2007; Degryse B., 2005). La trasduzione dei segnali tramite uPAR è indipendente dalla sua attività proteolitica, benché in alcuni casi possa coinvolgere il legame con uPA (Nusrat A. R., 1991).



**Fig. 5** In figura è rappresentato il processo di endocitosi e riciclo di uPAR

In alcune circostanze uPAR si trova dissociato dalla membrana cellulare, ma anche in questa situazione riesce a trasdurre segnali all'interno della cellula cooperando con altri recettori di membrana in particolare con la vitronectina (Vn) e le integrine mediante interazioni laterali sulla membrana cellulare, in particolare integrina  $\beta 2$ , ma anche  $\beta 1$  e  $\beta 3$  (Wei et al., 1996); le integrine sono una grande famiglia di recettori cellulari che interagiscono con la matrice extracellulare e sono le principali proteine implicate nei meccanismi di adesione cellulare e di comunicazione cellula-cellula e cellula-ECM (Smith H., 2008; Madsen C.D., 2007; Smith H.W., 2008; Wei Y. 1996; Chaurasia P., 2006; Zhang F., 2003).



## 2.2 Struttura ed espressione di uPAR

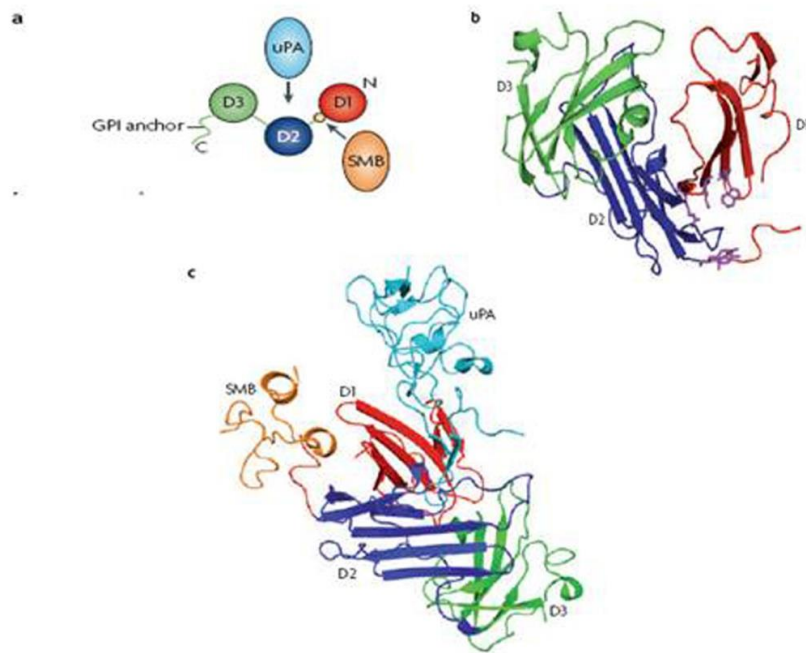
uPAR appartiene alla superfamiglia degli antigeni linfocitari 6 (Ly-6), caratterizzata dal dominio Ly-6 e uPAR (dominio LU). Questi domini si ripiegano in una struttura globulare costituita da 5-6  $\beta$ -foglietti antiparalleli uniti tra loro da 4-5 ponti disolfuro (Dorrell M.I., 2002; Gerhardt H., 2003).

uPAR contiene tre domini LU, chiamati D1, D2 e D3, connessi da piccole giunzioni. Studi recenti hanno dimostrato che questi tre domini si ripiegano per formare una struttura concava (Huai Q., 2008; Huai Q., 2006; Llinas P., 2005) (Fig. 12).

L'ampia superficie della fenditura centrale, contenente residui appartenenti ai tre domini, è il sito di legame per uPA. uPAR lega uPA alla sua estremità amino-terminale del *growth factor domain*.

Il sito di legame per la vitronectina, invece, è situato nel dominio D1 e nella giunzione fra D1 e D2 (Madsen C.D., 2007; Huai Q., 2008; Gardsvoll H., 2007). Sulla vitronectina, il sito di legame per uPAR si trova all'estremità N-terminale del *somatomedin B domain* (Deng G., 1996). Da questo si deduce che, poiché il sito di legame per la vitronectina e per uPA sono differenti, uPAR può legare nello stesso momento entrambi i suoi ligandi (Wei Y., 1994; Huai Q., 2008).

Poiché uPA favorisce la dimerizzazione del recettore e i dimeri di uPAR aumentano l'affinità per la vitronectina, è stato ipotizzato che il legame fra uPA e uPAR aumenti l'affinità del recettore per la vitronectina (Gardsvoll H., 2007; Sidenius N., 2002; Cunningham O., 2003). Tuttavia, studi di struttura non sono stati in grado di dimostrare un'effettiva dimerizzazione di uPAR, ma hanno dimostrato chiaramente che il monomero del recettore può legare contemporaneamente sia uPA che la vitronectina (Gardsvoll H. 2007).



**Fig. 6** Struttura di uPAR con evidenziati i siti di legame per i ligandi e l'ancora GPI.

E' stato dimostrato inoltre che il legame di uPA causa delle modificazioni conformazionali di uPAR, che alterano anche il sito di legame della vitronectina (Wei Y., 1994; Huai Q., 2008).

In condizioni fisiologiche, uPAR ha un'espressione limitata a pochi tipi di tessuto (Solberg H., 2001). Studi su topi e campioni umani hanno evidenziato che l'espressione di uPAR aumenta durante il rimodellamento della matrice extracellulare, ad esempio durante l'annidamento embrionale, lo sviluppo della placenta (Floridon C., 1999; Uszynski M., 2004) e durante la riparazione tissutale nei cheratinociti (Solberg H., 2001). Inoltre stress, ferite e infiammazione inducono l'espressione di uPAR. E' stata per esempio dimostrata sovraespressione di uPAR nelle cellule renali in corso di proteinuria cronica (Wei C., 2008) ed in quelle del sistema nervoso in seguito a danno ischemico o trauma (Beschoner R., 2000).

L'espressione di uPAR è indotta anche durante l'attivazione e la differenziazione dei leucociti, suggerendo quindi un ruolo di uPAR anche nella risposta immunitaria (Plesner T., 1994; Nykjaer A., 1994).

Nel topo, uPAR è espresso anche da una popolazione di cellule staminali e progenitori ematopoietici. Topi che hanno uPAR alterato manifestano un fenotipo coerente con le osservazioni sopra effettuate, cioè mostrano alterazioni nel reclutamento di linfociti in corso di infezione (May A.E., 1998), mostrano un miglioramento dell'infiammazione della proteinuria (Wei C., 2008) e danni minori in corso di ischemia cerebrale (Nagai N., 2008).

uPAR è espresso in molti tumori umani, inclusi tumori solidi, leucemie e linfomi. Tale espressione spesso indica prognosi peggiore e in molti casi è un indice predittivo di invasione e metastasi (Bene M.C., 2004; Rasch M.G., 2008).

Ancora, tuttavia, non è ben chiaro se uPAR svolga una funzione nella progressione del tumore; il frammento D2-D3 potrebbe svolgere un ruolo nella chemiotassi tumorale, mentre la forma solubile non clivata potrebbe impedire le interazioni fra la forma ancorata di uPAR e i co-recettori come le integrine (Tarui T., 2001; Wilhelm O., 1994), sequestrare i ligandi (Wilhelm O., 1994), diminuire l'attivazione del plasminogeno sulla superficie cellulare e inibire la crescita cellulare in topi xenograft (Kruger A., 2000).

L'interesse per lo studio delle attività funzionali di uPAR è cresciuto nell'ultimo decennio proprio dal momento in cui è diventato chiaro il suo ruolo in patologie come il cancro (Bene M., 2004; Jacobsen B. 2008; Rasch M.G., 2008). E' stato pertanto possibile pensare a uPAR come un target per una terapia genica mirata in quanto, inattivandolo, è possibile inibire la cascata di segnali

intracellulari bloccando da un lato la cascata proteolitica che porta all'attivazione della plasmina (con obiettivo l'antiangiogenesi) dall'altro la crescita cellulare maligna incontrollata caratteristica delle forme tumorali.

### **2.3 uPAR ed alterazioni vascolari**

Le alterazioni di barriera vascolare più frequenti sono le alterazioni di permeabilità e quelle legate alla neovascolarizzazione; queste modificazioni sono associate spesso a numerose patologie, come l'invasione tumorale ed in campo oftalmologico patologie quali la retinopatia diabetica proliferante e la degenerazione maculare essudativa. Come conseguenza dell'aumentata permeabilità vascolare, le proteine plasmatiche che hanno raggiunto il tessuto creano un ambiente adatto per favorire la neovascolarizzazione (Dvorak H.F., 1995). L'attivazione del plasminogeno e delle metalloproteasi giocano un ruolo fondamentale in questo processo, probabilmente degradando la matrice extracellulare e rilasciando fattori di crescita, che promuovono la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali. E' stato osservato che il sistema uPA/uPAR coinvolto nell'attivazione del plasminogeno e delle metalloproteasi, non solo promuove la proliferazione e la migrazione cellulare ma svolge un ruolo fondamentale, insieme al VEGF, anche nell'aumentare la permeabilità vascolare. E' possibile ipotizzare che l'aumento della permeabilità indotta dal VEGF si realizzi tramite la distruzione dell'adesione fra le cellule effettuata tramite attività proteolitica iniziata con uPAR sulla superficie cellulare. Questo processo genera una parete endoteliale "debole", che consente alle cellule endoteliali di oltrepassare la

membrana basale e di migrare altrove andando a causare il processo di neoangiogenesi. L'aumento della permeabilità indotta da uPA è rapida e sostenuta, mentre quella indotta dal VEGF mostra un andamento bifasico: una fase precoce e transiente (1-2h) e una fase ritardata e sostenuta (6-24h); tuttavia il meccanismo mediante il quale il VEGF partecipa all'aumento della permeabilità vascolare ancora non è del tutto chiaro. La fase precoce è mediata dalle caveole, mentre quella tardiva, poiché ha un effetto simile a quello realizzato da uPA e poiché è inibita da anticorpi anti-uPA e anti-uPAR, sembra coinvolgere il sistema uPA/uPAR. A differenza dell'aumento della permeabilità vascolare influenzato dalle caveole, quando si ha il coinvolgimento di uPA e uPAR, sia direttamente che indirettamente, le cellule subiscono una redistribuzione nelle proteine di giunzione (Behzadian M. A., 2003). Le giunzioni occludenti sono formate anche da specifiche caderine che, insieme alle integrine, permettono il riconoscimento cellulare durante il rimodellamento tissutale e l'organogenesi embrionale. Il dominio intracellulare delle caderine interagisce con il citoscheletro tramite un gruppo di proteine, fra cui la  $\beta$ -catenina. In condizioni normali, nelle cellule differenziate la  $\beta$ -catenina libera nel citosol viene degradata. Quando, invece, i livelli citoplasmatici della  $\beta$ -catenina aumentano, essa trasloca nel nucleo e promuove la trascrizione del gene di uPAR. I livelli citoplasmatici della  $\beta$ -catenina vengono incrementati anche dal VEGF (Mandriota S.J., 1995).

Altri studi hanno dimostrato che il sistema uPA/uPAR è coinvolto nella formazione dell'edema anche tramite un'altra via; infatti il TGF- $\beta$  favorisce l'aumento della permeabilità vascolare poiché incrementa l'espressione della MMP-9 e del VEGF (in condizioni di ipossia)

(Behzadian M.A., 2001). Il pro-MMP-9 legato alla membrana e il TGF- $\beta$  latente vengono attivati dalla plasmina (Mazzieri R., 1997), che a sua volta è prodotta in seguito al taglio proteolitico effettuato sul plasminogeno ad opera di uPA (Behzadian M.A., 2003).

## 3

### OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO

#### 3.1 Cenni di terapia genica in Oftamologia

Per terapia genica si intende una procedura di sostituzione o modificazione, all'interno delle cellule di un organismo ospite, dell'espressione di uno o più geni la cui deregolazione è alla base di un processo patologico. Tale procedura prevede il veicolamento di materiale transgenico all'interno delle cellule, DNA o RNA, il quale, sfruttando il macchinario trascrizionale, traduzionale e regolativo dell'ospite stesso, porta alla produzione di un agente terapeutico.

Il crescente numero di pubblicazioni scientifiche che descrivono la tecnica di silenziamento genico dimostra l'importanza di questa metodica nella moderna biologia cellulare. Progressi significativi sono stati fatti in questo senso nel campo per il trattamento di patologie umane, in particolare per quelle oculari.

L'occhio possiede caratteristiche peculiari di notevole interesse per l'approccio di terapia genica. Da un punto di vista strettamente anatomico, paragonato ad altri organi, l'occhio è facilmente accessibile. Ciò ha permesso lo sviluppo di numerosi modi di veicolamento genico che possono essere utilizzati per raggiungere

diversi distretti o linee cellulari oculari. Inoltre, la sua compartimentalizzazione e le sue dimensioni ridotte offrono il vantaggio di un veicolamento localizzato dei vettori direttamente a livello di specifici tessuti oculari, in modo da diminuire la quantità necessaria di molecole utile per ottenere l'effetto terapeutico desiderato. La presenza della barriera emato-retinica e di giunzioni serrate fra le cellule dell'epitelio pigmentato retinico (RPE) permette la limitazione della diffusione dell'agente transgenico terapeutico a livello della circolazione sistemica, evitando inoltre l'insorgenza di una possibile risposta immunitaria.

Sono inoltre disponibili numerosi modelli animali (roditori e animali di grandi dimensioni) per numerose patologie oculari umane, sono disponibili tecniche non invasive per il monitoraggio *in vivo* di vari distretti e funzioni oculari.

Non ultimo l'occhio controlaterale rappresenta un controllo sperimentale di rara specificità ed efficacia.

È quindi evidente come, per tutte queste caratteristiche, l'occhio offra vantaggi unici come target della terapia genica.

La sfida principale per un miglioramento delle attuali strategie di terapia genica è lo sviluppo di un metodo di veicolamento degli acidi nucleici, che non sia tossico e abbia effetti collaterali di lieve entità. Tale veicolamento all'interno dei tessuti oculari può essere effettuato con o senza l'utilizzo di vettori virali.

A fronte di una forte promessa applicativa dei vettori virali come sistema di veicolamento nella terapia genica delle patologie oculari umane, i potenziali pericoli di tali vettori potrebbero ostacolare il loro futuro sviluppo. La maggior parte delle patologie oculari non conferiscono pericolo per la vita pertanto l'utilizzo di vettori virali

potenzialmente dannosi suscita questioni etiche estremamente pertinenti.

Sono state sviluppate numerose strategie non-virali per il veicolamento di molecole ad azione terapeutica nella terapia genica oculare. La maggior parte di tali strategie comporta l'utilizzo di molecole non tossiche per i tessuti oculari, la cui sicurezza applicativa è stata ben sperimentata.

### **3.2 Oligonucleotidi antisenso (ASO)**

Una delle strategie maggiormente sviluppate dalla ricerca scientifica che ha come obiettivo quello di inibire l'espressione di un gene, la cui espressione risulta alterata in una patologia, è quella che prevede l'utilizzo di molecole a DNA, per lo più oligonucleotidi, la cui sequenza è complementare a quella dell'mRNA del gene target.

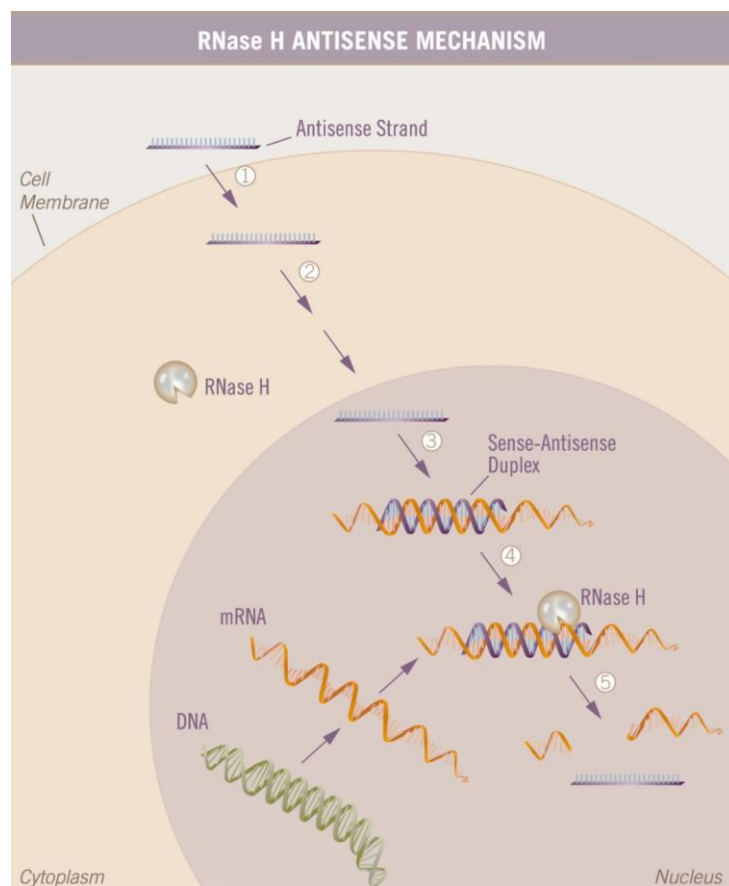
Tali molecole, costituite per lo più da sequenze da 13 a 25 nucleotidi circa, possiedono un'alta specificità per il gene target ed una volta veicolate all'interno delle cellule si vanno a complessare con l'mRNA specifico. In tal modo si viene a formare una struttura eteroduplice, costituita cioè da una molecola di RNA e una di DNA. La cellula risponde alla presenza di tale complesso chimerico attivando una risposta che porta alla degradazione della molecola di RNA: è infatti presente nelle cellule la ribonucleasi-H (*RNase-H*), la quale riconosce le strutture eteroduplici e degrada il filamento di RNA. Tale meccanismo è la risposta che la cellula possiede per un'eventuale infezione da parte di virus a RNA, i quali possono andare a complementare con il DNA genomico (Fig. 7).

La terapia genica che prevede l'utilizzo della "strategia antisenso", mediante il veicolamento all'interno delle cellule di



molecole a DNA complementari a mRNA target, sfrutta quindi un meccanismo cellulare che porta alla distruzione dell'mRNA stesso e, quindi, all'inibizione dell'espressione di tale gene.

Fomivirsen sodico (Vitravene <sup>TM</sup>, Isis Pharmaceuticals, Novartis) è al momento l'unica molecola antisenso approvata e rappresenta la "prima generazione" di questa classe di molecole. E' stata approvata come iniezione intravitale nel 1998 per il trattamento della retinite da citomegalovirus (CMV) il principale virus opportunisto in pazienti immunodepressi (Mulamba GB et al., 1998).



**Fig. 7** Rappresentazione schematica della modalità di funzionamento della strategia antisense per il silenziamento genico.

Da allora sono state create numerose modificazioni a questi composti creando la cosiddetta “seconda generazione” di oligonucleotidi antisense con un notevole miglioramento in termini di potenza, stabilità e tollerabilità. (Hnik et al., 2009) Queste molecole sembrano avere una ridotta tossicità in quanto prive di cariche e dotate di bassa affinità per le proteine extracellulari.

Nonostante il loro potenziale, però, se da un punto di vista farmacodinamico queste molecole presentano peculiari ed impareggiabili vantaggi, come la specificità di bersaglio e di meccanismo d’azione, dal punto di vista farmacocinetico si riscontrano dei limiti, quali il difficile attraversamento delle membrane biologiche e la rapida degradazione *in vivo* ad opera delle nucleasi. La modulazione dell’espressione genica che si ottiene con l’utilizzo di oligonucleotidi a DNA inoltre è spesso limitata ed ostacolata dalla presenza di interazioni non specifiche di questi composti con altri geni (effetto *off-target*)(Stein C.A.,1999).

Viste le innumerevoli e promettenti applicazioni che gli oligonucleotidi possono avere in campo terapeutico, l’attenzione della comunità scientifica si sta incentrando quindi, in misura sempre maggiore negli ultimi anni, sulla ricerca e la sintesi di analoghi oligonucleotidici, chimicamente modificati o nel ponte zuccherofosfato o nelle basi azotate o eventualmente coniugati con molecole, a basso o medio peso molecolare, capaci di conferire al composto ibrido, così ottenuto, una maggiore permeabilità alle barriere biologiche e una maggiore resistenza alle nucleasi cellulari.

Diverse modifiche chimiche quindi sono state apportate negli anni con lo scopo di migliorare le proprietà farmacocinetiche degli oligonucleotidi stessi. La permeabilità attraverso la membrana

cellulare può essere migliorata grazie all'aumento della lipofilia degli oligonucleotidi, che può realizzarsi sostituendo il ponte anionico internucleotidico con alternativi motivi neutri. Inoltre, numerose strategie sono frequentemente impiegate per aiutare il passaggio degli oligonucleotidi nelle cellule; queste includono l'uso di liposomi cationici, microiniezioni e coniugazione a piccoli peptidi.

### **3.3 Acidi Nucleici Peptidici (PNAs)**

Gli Acidi Nucleici Peptidici (*Peptide Nucleic Acids, PNAs*) sono un'innovativa classe di molecole antisense di recente acquisizione utilizzate negli esperimenti di silenziamento genico.

Queste molecole sono analoghi a DNA in cui i quattro nucleotidi (adenina, timina, guanina e citosina) sono legati ad una struttura N-(2-aminoetil)glicinica piuttosto che ad una struttura a desossiribosiofosfato (come nel DNA) (Nielsen PE et al., 1991; Egholm M et al., 1992; Buchardt O et al., 1993).

Nonostante il grosso cambiamento nella struttura chimica di queste molecole, i PNA formano comunque ibridi con il DNA o RNA complementare attraverso il classico appaiamento delle basi di Watson-Crick, e lo fanno con affinità superiore rispetto ai corrispondenti classici oligonucleotidi antisense a DNA. I PNA inoltre hanno ulteriori vantaggi rispetto a quest'ultimi. In primo luogo i PNA non hanno polarità 3' e 5' consentendogli perciò di legare DNA o RNA indifferentemente in orientazione parallela o antiparallela. E' stato dimostrato che i PNA possono legare DNA a doppio filamento invadendo il DNA a doppio filamento e spiazzando un filamento per formare una struttura stabile D-loop (Peffer N.J., 1993). Inoltre i PNA

non sono suscettibili alla degradazione enzimatica dato che risultano essere stabili anche nei fluidi biologici (Norton JC, 1996). I potenziali vantaggi dei PNA “classici” nelle applicazioni biologiche non sono stati però riscontrati concretamente negli studi effettuati fino ad ora soprattutto per i loro principali limiti di applicazione e cioè la loro debole solubilità in acqua e la tendenza ad aggregarsi.

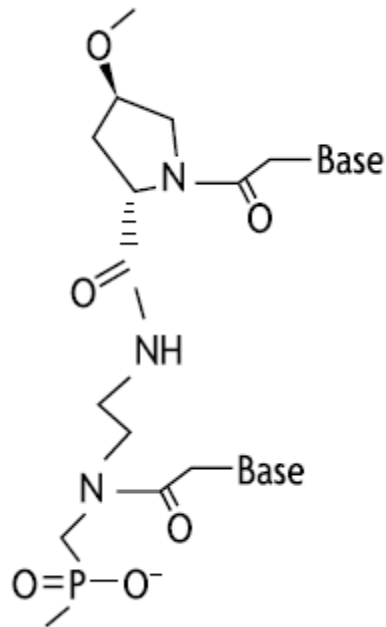
Per cercare di superare queste limitazioni di impiego dei PNA, Efimov et al. hanno ideato una nuova classe di analoghi dei PNA carichi negativamente.

Gli analoghi fosfonati dei PNA (*pPNA*) possiedono come scheletro N-(2-idrossi-etil)fosfonoglicina o N-(2-amino-etil)fosfonoglicina mentre gli analoghi PNA a idrossi-L-prolina (*HypNA*) possiedono trans-4-idrossi-L-prolina come molecola di base. L'introduzione di cariche negative nella struttura del PNA dunque ha portato ad un significativo aumento della loro solubilità preservando l'alta affinità di queste molecole per le catene complementari di RNA e DNA (Efimov VA et al., 1999)

I *GripNA* sono etero-oligomeri costruiti mediante alternanza di monomeri di HypNA e pPNA in una proporzione di 1:1. Questa combinazione mantiene molte delle caratteristiche ideali delle molecole singole dando inoltre una grande specificità di sequenza per l'appaiamento.

L'esatto meccanismo con il quale queste molecole riescono a penetrare all'interno delle cellule non è stato ancora chiarito. Si pensa sia dovuto ad un trasporto attivo che dipende da fattori quali la temperatura, la struttura e la concentrazione del nucleotide stesso nonché dal tipo cellulare coinvolto. Attualmente si pensa che i meccanismi di endocitosi e pinocitosi siano quelli più probabili.

Per il trattamento dei distretti posteriori dell'occhio, in particolare della retina, in relazione al tipo cellulare target della terapia, sono solitamente utilizzate iniezioni intravitreali, tecniche di veicolamento trans-sclerale (iontoforesi) oppure iniezioni sottoretiniche.



**Fig. 8** Molecola di gripNA carica negativamente. Le molecole gripNA sono composte da una struttura composta dall'alternanza di monomeri HypNA e pRNA con attaccate le basi azotate attraverso legami metilen-carbonilici.

### 3.4 ASO anti-uPAR

Come precedentemente descritto, uPAR riveste un ruolo di molto importante nel meccanismo di neoangiogenesi legato alle retinopatie e rappresenta pertanto un ottimo target per una terapia genica basata sulla strategia antisenso volta all'inibizione dell'espressione di tale gene.

A tal proposito, il nostro gruppo di ricerca possiede già una precedente esperienza nella strategia antisenso diretta contro *uPAR* avendo messo a punto alcuni anni fa una molecola antisenso di 18 nucleotidi, con sequenza 5'-CGGCGGGTGACCCATGTC-3', complementare alla regione dell'mRNA di *uPAR* contenente il sito di inizio della traduzione e dimostrando la sua efficacia nell'inibire significativamente l'espressione di uPAR in numerose linee cellulari e nel determinare ottimi effetti fenotipici come possibile agente terapeutico antitumorale (Capaccioli et al.)

Tale invenzione è stata anche oggetto di brevetto (brevetto internazionale numero WO96/03414, del 08/02/1996). L'oligonucleotide antisenso utilizzato è stato stabilizzato mediante la sostituzione del ponte fosfato inter-nucleotidico all'estremità 3' e 5' con residui fosforotioati, al fine di prolungarne l'emivita, sia per le applicazioni *in vitro* che *in vivo*.

## SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo che ci siamo prefissi con questo studio è stato quello di valutare l'efficacia antiangiogenica di un oligonucleotide antisenso (ASO) anti-uPAR sia *in vitro* che *in vivo* in modelli sperimentali.

Esistono, come in precedenza illustrato, numerose evidenze che dimostrano come l'espressione e l'attivazione del recettore per l'urochinasi (uPAR) siano essenziali per lo sviluppo della neoangiogenesi, caratteristica comune di numerose patologie a carico dell'occhio.

Per tale motivo abbiamo ipotizzato una strategia basata sull'utilizzo di un ASO di sequenza complementare all'mRNA di uPAR, già utilizzato in precedenza con successo in altri modelli sperimentali tumorali (Capaccioli et al.), che riduca l'espressione di tale gene.

In questo modo abbiamo cercato di dimostrare che tale inibizione risulti in effetti anti-angiogenici significativi che possano consentire lo sviluppo di tale applicazione come possibile nuova strategia terapeutica per numerose patologie neovascolari corioretiniche caratterizzate da eccessiva o sregolata angiogenesi ed alterazione della permeabilità vascolare.

Il progetto, svolto in collaborazione con il dipartimento di Patologia ed Oncologia Sperimentale dell'Università di Firenze (dir. prof. S. Capaccioli), ha previsto una prima sperimentazione *in vitro* (effettuata utilizzando cellule endoteliali retiniche umane, HREC), alla quale ha seguito una sperimentazione *in vivo* su due

diversi modelli animali murini di neoangiogenesi rispettivamente di Retinopatia indotta dall'ossigeno (OIR) e di CNV.

## 5

### MATERIALI E METODI

#### 5.1 Esperimento *in vitro* su HREC con ASO-uPAR

##### 5.1.1. Colture cellulari e oligonucleotide antisense

Per lo studio *in vitro* effettuato abbiamo utilizzato cellule microvascolari endoteliali retiniche umane (HREC, *Human Retinal microvascular Endothelial Cell*). Tale linea cellulare primaria è stata acquistata presso la Cell Systems Corporation (Kirkland, WA, USA; [www.cell-systems.com](http://www.cell-systems.com)). Le cellule HREC sono state mantenute in Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2; Lonza, USA) al quale sono stati aggiunti 5% siero fetale bovino (FBS) e una miscela di citochine e fattori di crescita specifici per la crescita delle cellule endoteliali microvascolari (Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2, EGM-2MV SingleQuot, Lonza, contenente FBS, idrocortisone, hFGF, VEGF, R3-IGF-1, acido ascorbico e hEGF), in incubatore alla temperatura costante di 37°C in atmosfera controllata di CO<sub>2</sub> al 5%

Per inibire l'espressione del gene uPAR abbiamo utilizzato un oligodesossiribonucleotide antisense (ASO-uPAR), composto di 18 nucleotidi, la cui sequenza 5'-CGGCGGGTGACCCATGTC-3' è complementare ai residui 228-245 della sequenza NM\_002659.2 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) relativa



all'mRNA di uPAR umano. Tale ASO è stato disegnato per complementare la regione dell'mRNA di uPAR contenente il sito di inizio della traduzione. Come controllo negativo abbiamo utilizzato un ASO degenerato (ASO-deg, cioè una miscela di tutte le possibili combinazioni delle basi che compongono l'ASO) della stessa lunghezza dell'ASO-uPAR, cioè 18 nucleotidi.

Per aumentare la stabilità di entrambi gli oligonucleotidi dal taglio enzimatico e proteggerli da parte delle esonucleasi endocellulari è stata effettuata la sostituzione del ponte fosfato internucleotidico all'estremità 3' e 5' con residui fosforotioati. Entrambi gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati e purificati mediante HPLC da Sigma-Aldrich (Italia).

### **5.1.2 Trasfezione , estrazione dell'RNA e retro trascrizione**

Per effettuare la trasfezione delle cellule HREC con gli oligonucleotidi antisenso, abbiamo piastrato 300.000 cellule HREC in 6-well con 2 ml di terreno di coltura, privo di antibiotici. Il giorno dopo la semina, abbiamo effettuato la procedura di trasfezione degli oligonucleotidi antisenso, utilizzando Lipofectamine2000 (Life Technologies, USA) quale agente trasfettante. Abbiamo preparato una miscela di trasfezione di un volume pari a 500 µl, così ripartita: 250 µl provenienti dal campione A e altri 250 µl provenienti dal campione B.

Il campione A contiene terreno OPTI-MEM (GIBCO, USA) con 10 µM di oligonucleotide antisenso (ASO-uPAR o ASO-deg) o, nel non trattato, un volume equivalente di OPTI-MEM. Il campione B contiene 245 µl di terreno OPTI-MEM con 5 µl di Lipofectamine2000 (Invitrogen, USA). Dopo aver unito il campione A al campione B, abbiamo incubato la miscela per 20 minuti a temperatura ambiente; in

questo lasso di tempo si formano i liposomi atti al veicolamento delle molecole di acido nucleico all'interno della cellula. La Lipofectamine, essendo un lipide cationico, permette la formazione di vescicole liposomiali, che contengono DNA o RNA (carico negativamente) e che sono in grado di interagire con la membrana cellulare. Alla fine dei 20 minuti abbiamo aggiunto tale miscela nei well contenenti le cellule e incubato a 37 °C per 4h. Dopo questo tempo, il terreno è stato sostituito con 2 ml di terreno di coltura, privo di antibiotici. Poiché nella strategia antisenso, utilizzando ASO, per ottenere un'efficace inibizione dell'mRNA occorre attendere un tempo superiore alle 48 h e poiché è stato stimato che l'emivita dell'ASO-uPAR è di circa 48 h, abbiamo eseguito la procedura di trasfezione una seconda volta, utilizzando 5 µM di oligonucleotide antisenso, a distanza di 48 h dalla prima. Le cellule sono state utilizzate per i saggi funzionali dopo 24 h dalla seconda trasfezione.

Abbiamo effettuato l'estrazione e purificazione dell'RNA dalle cellule HREC in coltura utilizzando il kit NucleoSpin RNA II (Machery-Nagel, Germania). Tale kit permette di isolare con alta efficienza e con elevato grado di purezza le molecole di RNA lunghe almeno 200 nt, quindi praticamente tutte le molecole di mRNA presenti nelle cellule. In breve, le cellule sono state lisate utilizzando un buffer che contiene l'agente denaturante guanidina isotiocianato, il quale consente l'immediata denaturazione delle RNasi e assicura la purificazione delle molecole di mRNA intatte. Tale lisato viene omogenato utilizzando delle specifiche colonne e successivamente viene aggiunto etanolo in modo da ottenere le appropriate condizioni di legame degli acidi nucleici alla membrana di silice presente nelle colonne dedicate all'isolamento dell'RNA. In tal modo le molecole di

RNA si legano alla membrana, e i contaminanti sono eliminati mediante lavaggio delle membrane stesse. Utilizzando un buffer specifico, infine, le molecole di RNA vengono eluite dalle membrane.

Per eliminare ogni eventuale contaminazione di DNA genomico, abbiamo trattato l'RNA estratto dalle cellule HREC con DNasi, utilizzando il kit DNA-free (Ambion, USA). Abbiamo quantificato l'RNA così ottenuto utilizzando il fluorimetro Qubit (Life Technologies, USA).

Per le reazioni di retrotrascrizione abbiamo utilizzato il kit Improm II Rt kit (Promega, USA). In particolare, per ciascun campione abbiamo sottoposto 120 ng di RNA totale (precedentemente trattato con DNasi) alla reazione di retrotrascrizione. La miscela di reazione è stata preparata seguendo le specifiche del kit: 120 ng RNA sono stati miscelato con 500 ng di random esameri e incubati a 70°C per 5 min e successivamente 0°C per 5 min. Tale procedura permette la denaturazione delle molecole di RNA presenti nel campione. Ai campioni sono stati quindi aggiunti: buffer specifico, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> (1,2 mM), RNasin (inibitore di RNase), Improm II (retrotrascrittasi). Abbiamo incubato le miscele così ottenute in un termociclatore, utilizzando il seguente profilo: 25°C x 5 min (fase di annealing dei random esameri alle molecole di RNA precedentemente denaturate), 42°C x 60 min (fase di trascrizione delle molecole di cDNA), 70°C x 15 min (fase di denaturazione, e quindi inattivazione, della trascrittasi inversa). Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20°C.

### 5.1.3 Real-time PCR

La real-time PCR è una variante della PCR che permette di quantificare l'espressione genica sia in modo assoluto che relativo, rapportando cioè i valori di espressione di un gene tra vari campioni, dei quali uno è scelto come calibratore, e normalizzando tali valori rispetto ai valori di espressione di un gene di riferimento, la cui espressione non varia in relazione al trattamento o stimolo utilizzando nelle procedure sperimentali (gene *housekeeping*). Uno dei principali vantaggi della real-time PCR è il fatto che è possibile misurare nel tempo l'andamento dell'amplificazione della reazione. La metodica utilizzata si basa sull'utilizzo di una sonda fluorescente, nel nostro caso SYBR Green, il quale emette fluorescenza a una lunghezza d'onda di 530 nm quando si intercala al DNA a doppio filamento. Ciò permette di analizzare e quantificare i risultati monitorando l'emissione di fluorescenza durante l'amplificazione, che è direttamente proporzionale all'andamento esponenziale della reazione di PCR. Dopo un numero  $n$  di cicli si raggiunge il ciclo soglia (*threshold cycle*, Ct) nel quale la rivelazione della fluorescenza è significativa rispetto al segnale di fondo. Questo punto è all'inizio della fase esponenziale dell'amplificazione ed è il punto nel quale viene quantificato il DNA. Dal momento che il SYBR Green si intercala in tutte le molecole di DNA a doppio filamento, quindi anche ad esempio ai dimeri di primer che eventualmente si possono formare, è necessario effettuare alla fine della reazione di PCR l'analisi della curva di melting, cioè misurare il valore della temperatura di fusione della doppia elica di DNA, la Temperatura di melting ( $T_m$ ), che, in caso di amplificazione di un unico prodotto specifico, deve essere uguale in tutti i prodotti dei campioni amplificati da una stessa coppia

di primer. Si costruisce quindi una “curva di melting”: si aumenta gradualmente la temperatura al di sopra di quella stimata essere la  $T_m$  dei primer e si misurano continuamente le variazioni di fluorescenza dei prodotti di PCR. Al punto di fusione si avrà la separazione dei due filamenti di DNA e sarà possibile osservare un brusco calo di fluorescenza. Se la reazione di amplificazione si è svolta in condizioni prive di contaminazioni, sarà possibile osservare tra i vari campioni dei picchi di melting sostanzialmente sovrapponibili indicando così l’omogeneità dei prodotti ottenuti; diversamente, in caso di ulteriori picchi, si evidenzia la presenza di un prodotto di amplificazione aspecifico.

I punti da considerare nella valutazione di un esperimento di RT-PCR sono diversi:

- Scelta dell’amplicone: la lunghezza ottimale è sotto le 200bp poiché gli ampliconi corti sono amplificati con maggiore efficienza dei più lunghi e tollerano meglio le condizioni di reazione.

- Progettazione dei primer: un primer a singolo filamento ottimale è di circa 20bp con un contenuto di G/C del 20-70%. Generalmente, i primer sono scelti su due esoni diversi, per distinguere un’amplificazione di cDNA da una contaminazione di DNA genomico.

Abbiamo effettuato le reazioni di real-time PCR amplificando il cDNA relativo al gene uPAR e, come normalizzatore, al gene relativo all’RNA ribosomiale *18S*. Tutte le reazioni sono state effettuate utilizzando la master mix GoTaq (Promega, USA), in accordo con il protocollo fornito dal produttore e eseguite in un volume di 20  $\mu$ l. Tutte le real-time PCR sono state effettuate con il termociclatore 7500 Fast (Applied Biosystem, USA). Per l’amplificazione di uPAR umano

o murino abbiamo utilizzato le coppie di primer specifiche relativa al kit QuantiTect Primer Assay (Qiagen, Germania); per l'amplificazione del *18S* abbiamo utilizzato il primer forward 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' e revers 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'. Il profilo di amplificazione che abbiamo utilizzato è: 95°C x 10' (fase di attivazione dell'enzima); 95°C x 10'' (fase di denaturazione), 54°C x 18'' (fase di annealing dei primer), 72°C x 20'' (fase di estensione del prodotto di PCR).

Il risultato dell'analisi di real-time PCR è stato ottenuto mediante metodo  $\Delta \Delta Ct$ .

#### **5.1.4 Saggio di morfogenesi capillare**

Per valutare la capacità delle cellule HREC di formare strutture tubulari endoteliali, abbiamo allestito un saggio di morfogenesi capillare *in vitro* su Matrigel (Matrigel Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, USA). Il Matrigel è una miscela di composti estratta dal sarcoma di topo di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumore ricco di proteine della matrice extracellulare. I componenti principali del Matrigel sono la laminina, seguita dal collagene IV, dall'entactina e dal proteoglicano eparan-solfato. L'estratto contiene inoltre fattori di crescita che sono presenti naturalmente nel sarcoma di EHS. Il Matrigel viene conservato a -20°C e diventa liquido se mantenuto in ghiaccio. A temperatura ambiente il Matrigel solidifica, consentendo così la realizzazione di una matrice biologicamente attiva che somiglia alla membrana basale delle cellule dei mammiferi. Il Matrigel è una matrice estremamente efficace per consentire l'adesione e la

differenziazione delle cellule epiteliali normali e trasformate, nonché di altri tipi di cellule.

Per il saggio di morfogenesi capillare, abbiamo scongelato il Matrigel a 4°C il giorno prima dell'esperimento, in modo da renderlo liquido. Il giorno dopo, abbiamo dispensato 70 µl di Matrigel tal quale per well in 96-well, mantenendo a freddo le piastre durante tale procedura per evitare al gel di solidificare. Abbiamo incubato le piastre a 37°C per 30' per far solidificare il Matrigel e successivamente abbiamo seminato 30.000 cellule HREC per well in 100 µl di terreno di coltura. Abbiamo incubato le cellule a 37°C per 12 ore, quindi abbiamo osservato e fotografato al microscopio invertito i well. Abbiamo infine quantificato i risultati utilizzando il software Scion Image (<http://www.scioncorp.com>), misurando per ciascuna immagine ottenuta la percentuale dell'area occupata dalla rete capillare. Ciascun esperimento è stato ripetuto tre volte e di ciascun well sono state analizzate tre immagini diverse.

### **5.1.5 Saggio di migrazione cellulare**

Nel 24-well sono stati posizionati i Millicell Cell Culture Inserts (Millipore, USA), contenenti membrane di policarbonato con pori di 8.0 µm e di diametro di 12 mm. La camera superiore è stata incubata per 1 h a 37 °C con 100 µl di PBS contenente 10 µg/ml di fibronectina. La fibronectina ha siti di legami per altri componenti dell' ECM e per recettori cellulari di membrana che legano l'ECM. La funzione della fibronectina è evidente in alcuni processi dinamici, fra i quali il processo di migrazione cellulare, nel quale le cellule seguono percorsi particolari che dipendono direttamente dalla presenza di

specifiche proteine, una delle quali è appunto la fibronectina. Al termine del tempo di incubazione sono stati effettuati due lavaggi con PBS per rimuovere la fibronectina in eccesso. A questo punto, nella camera superiore sono stati aggiunte 100.000 cellule HREC in 400  $\mu$ l di terreno EBM-2 tal quale (privo cioè di fattori di crescita e citochine). Nella camera inferiore, invece, sono stati aggiunti 600  $\mu$ l di terreno EBM-2 tal quale con l'aggiunta di 10 ng/ $\mu$ l di VEGF (SIGMA, USA). Abbiamo incubato le cellule a 37 °C per 24 h.

Al termine delle 24 h, dopo aver opportunamente aspirato il terreno nelle due camere, abbiamo effettuato due lavaggi con PBS; al termine dei lavaggi abbiamo fissato e colorato le cellule rimaste adese alla membrana con il Diff-Quik (Medion Diagnostic, Italia), che è un sistema rapido di fissaggio e colorazione delle cellule. Per effettuare il fissaggio e la colorazione abbiamo utilizzato piastre 12-well, riempiendo un well con il fissativo, un well con il primo colorante, un well con il secondo colorante e tre well con acqua microfiltrata per effettuare i lavaggi alla fine della colorazione. Abbiamo immerso il Millicell Cell Culture Inserts 10 volte, per la durata di un secondo per immersione, in ciascuna delle tre soluzioni. Nel passaggio da una soluzione all'altra abbiamo eliminato l'eccesso di soluzione dai Millicell Cell Culture Inserts con carta. Alla fine del procedimento di fissaggio, colorazione e lavaggio abbiamo eliminato le cellule presenti nella camera superiore con un cotton fioc e poi abbiamo lasciato asciugare il Millicell Cell Culture Inserts per circa 30-40 minuti sotto cappa. Dopo questo tempo, abbiamo reciso le membrane dal supporto di plastica con un bisturi e le abbiamo montate su un vetrino, favorendo l'adesione con una goccia di glicerolo; dopodiché abbiamo applicato un'altra goccia di glicerolo sulle membrane e coperto con un



vetrino copri-oggetto, quindi abbiamo osservato e fotografato al microscopio invertito i vetrini. Per ogni membrana abbiamo scelto di fotografare 5 campi significativi per contare le cellule.

Poiché abbiamo precedentemente eliminato le cellule dalla camera superiore, quelle che riusciamo a contare sono le cellule che effettivamente sono migrate attraverso la membrana e quindi sono risultate positive al test.

## **5.2 Esperimento *in vivo* su modello murino di retinopatia indotta dall'ossigeno con ASO anti-uPAR**

### **5.2.1 Modello sperimentale di retinopatia proliferativa**

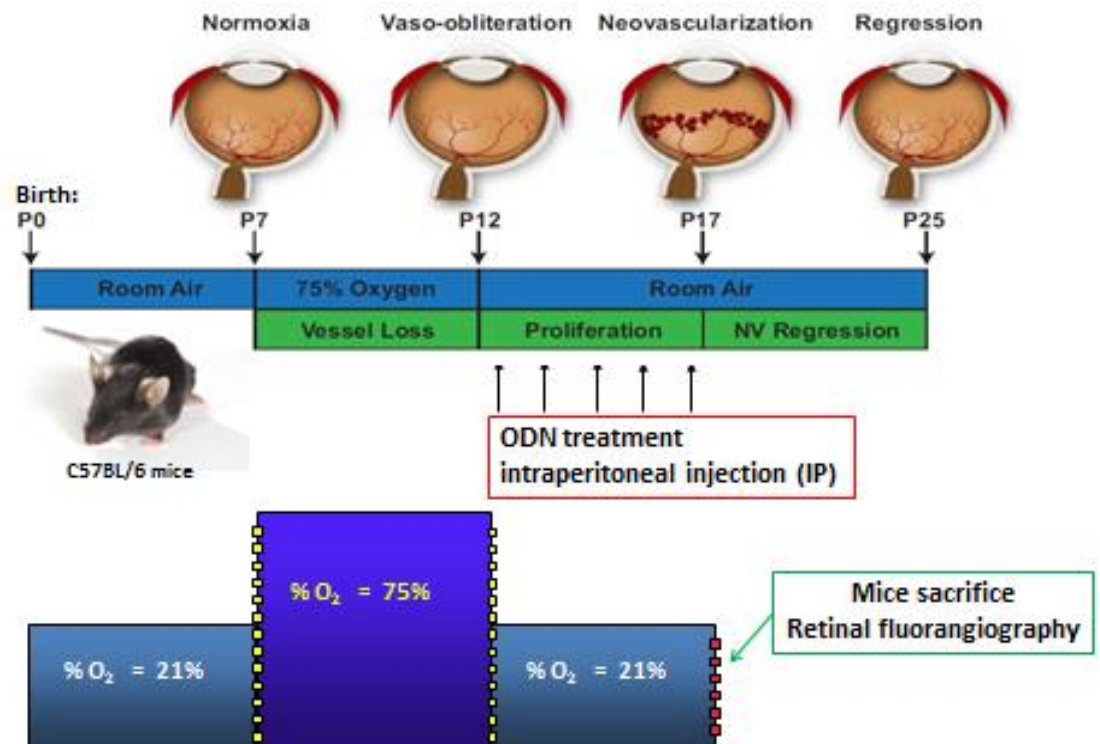
Per questo esperimento ci siamo basati su studi effettuati sul modello sperimentale murino di retinopatia ischemica indotta dall'ossigeno (Oxygen-Induced Retinopathy, OIR) (Smith et al., 1994) nel quale la neovascolarizzazione viene indotta variando il livello di ossigeno presente nell'ambiente in cui vengono allevati gli animali.

In tale modello la neovascolarizzazione che consegue ad ipossia e le anomalie della morfologia dei vasi retinici sono paragonabili a quelle riscontrate nei pazienti pediatrici con ROP e rappresenta un buon modello sperimentale comunemente accettato come modello di retinopatia proliferativa.

Durante lo sviluppo, infatti, la retina va in contro alla maturazione in risposta alla concentrazione locale di ossigeno. Mentre nell'uomo la rete vascolare retinica è solitamente completa alla nascita, nei roditori questo sviluppo avviene nella fase post-natale. In

particolare, nei roditori, nella fase post-natale la rete vascolare primaria scompare rapidamente per venire sostituita da quella secondaria. Se in questa fase post-natale l'animale è sottoposto ad elevate concentrazioni di ossigeno, si verifica un'obliterazione della rete vascolare primaria cosicché, non appena l'atmosfera viene riportata sperimentalmente a condizioni di normossia, si verifica un'insufficienza di ossigeno disponibile per i tessuti poiché la rete vascolare risulta inadeguata. Da ciò consegue una locale condizione d'ischemia/ipossia relativa che va a promuovere la neoangiogenesi (Kociok et al., 2007).

In dettaglio, nel tipico modello di retinopatia indotta dall'ossigeno (vedi Fig. 9) i piccoli roditori vengono esposti fra il settimo giorno dopo la nascita (PD7) e il dodicesimo giorno (PD12) ad una atmosfera contenente il 75% di ossigeno provocando così una interruzione del normale sviluppo dei vasi retinici che porta alla formazione di una zona avascolare al centro della retina. Il ritorno in normossia, percepita dagli animali come ipossia relativa, fino a PD17 determina una incompleta rivascolarizzazione della retina centrale associata ad una marcata neovascolarizzazione tra la retina centrale avascolare e quella periferica vascolarizzata, caratterizzata dalla formazione di grossi ciuffi di vasi che si estendono nel vitreo.



**Fig.9** Schema del modello murino di Retinopatia ischemica indotta dall'ossigeno (Connor KM et al., *Nat Protoc.* 2009)

Nel nostro studio abbiamo utilizzato 25 topi C57BL/6 e somministrato (in 3 diversi gruppi di animali) ASO-deg e NaCl (controlli) e ASO-uPAR da PD12 a PD17 mediante iniezione intraperitoneale una volta al giorno ed alla dose di 50mg/kg previa anestesia effettuata per mezzo di iniezioni di Avertin (1,2% tribromoetano e 2,4% amilene idrato in acqua distillata, in una quantità pari a 0,02 ml/g di peso corporeo).

Al PD17 i topi sono stati sacrificati attraverso una iniezione intraperitoneale doppia di anestetico.

Nel nostro esperimento gli animali sono stati suddivisi nei seguenti 4 gruppi sperimentali nel seguente modo:

- 5 topi usati come controllo senza essere sottoposti ad alcun trattamento farmacologico e sacrificati a PD17 (topi ipossici);
- 5 topi sottoposti a trattamento intraperitoneale con NaCl;
- 5 topi sottoposti a trattamento intraperitoneale con ASO-deg;
- 10 topi sottoposti a trattamento intraperitoneale con ASO-uPAR.

Gli esperimenti sono stati eseguiti sempre allo stesso momento del giorno per escludere possibili influenze circadiane. È stata utilizzata ogni accortezza possibile per ridurre al massimo il numero di animali utilizzati.

### **5.2.2 Valutazione della vascolarizzazione retinica (Retinopathy Score)**

La perfusione dei vasi retinici con fluoresceina isotiocianato coniugata a destrano ad alto peso molecolare è stata eseguita come descritto in precedenza (D'Amato et al., 1993).

Brevemente, gli animali sono stati anestetizzati con etere, è stata eseguita una sternotomia mediana e il ventricolo sinistro è stato perfuso con 2 mL di una soluzione 25-mg/mL di fluoresceina isotiocianato coniugata a destrano (Sigma-Aldrich) disciolta in tampone fosfato 0.15 M. Gli occhi sono stati enucleati, le retine dissezionate e poste su un vetrino per l'osservazione al microscopio. Sono state successivamente osservate con la microscopia a fluorescenza (Eclipse E800; Nikon, Badhoevedorp, The Netherlands), e le immagini acquisite mediante fotocamera DFC320 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) e visualizzate su computer

mediante programma IM50 (Leica microsystems). La neovascolarizzazione è stata valutata utilizzando il Retinopathy Score i cui criteri di valutazione sono riportati in tabella 2 (Higgins et al., 2001)

CRITERI	Punti				
	0	1	2	3	4
<i>Grovigli (Tufts)</i>	Nessuno	0-2 quadranti	3-5 quadranti	6-8 quadranti	9-12 quadr.
<i>Area centrale avascolare</i>	Nessuna	Lieve (parte interna zona1)	Media (tutta zona 1)	Grave (zone 1 e 2)	
<i>Presunta neovasc. extra-retinica</i>	Nessuna	Leggera	Moderata	Marcata	
<i>Emorragia retinica</i>	Assente	Presente			
<i>Tortuosità vasale</i>	Nessuna	<1/3 dei vasi	1/3-2/3 vasi	>2/3 dei vasi	

**Tab. 2.** Parametri di valutazione del Retinopathy Score

Il retinopathy score è il punteggio totale attribuito ad ogni retina che tiene conto di 5 diversi criteri (grovigli, area centrale avascolare, presunta neovascolarizzazione extra-retinica, emorragie e tortuosità), a cui, a loro volta, vengono attribuiti dei valori, come riportato in tabella. Per l'attribuzione dei vari sub score, la retina viene suddivisa in 12 quadranti e in 2 zone concentriche a partire dal centro della retina. Il punteggio viene attribuito in base al numero dei quadranti o delle zone interessate dal singolo fenomeno.

Le zone di neovascolarizzazione e i grovigli rappresentano i vasi neoformati che crescono al di fuori dello strato della retina, protrudendo verso il corpo vitreo.

L'area centrale avascolare si viene a formare quando il topo viene posto in iperossia, a causa dell'inibizione nella produzione di VEGF dovuta alla elevata pressione parziale dell'ossigeno. Quando il topo viene riportato in normossia (ipossia relativa) la riduzione della pressione parziale dell'ossigeno causa un incremento nella produzione di VEGF e, attraverso la stimolazione del processo di neovascolarizzazione, tende a recuperare la zona avascolare centrale che è comunque ancora evidente a PD17.

Le tortuosità sono un'altra caratteristica dei vasi di neoformazione, che si trovano a crescere in una matrice extracellulare più lassa a causa dell'attivazione, da parte dell'ipossia, di una serie di proteasi che la degradano.

L'emorragia è dovuta al fatto che i vasi neoformati non sono stabilizzati da periciti e presentano microaneurismi ed una permeabilità alterata.

Il massimo punteggio di retinopathy score equivale a 14, indicando la massima gravità della retinopatia.

Ciascuna retina è stata sottoposta alla valutazione indipendente di tre osservatori ed è stata fatta successivamente la media dei risultati. L'area avascolare e l'area retinica totale sono state misurate nelle immagini retiniche attraverso un'analisi assistita da computer (Axiovision 4 software; Carl Zeiss Vision GmbH, Munchen-Hallbergmoos, Germany). Per la misurazione dell'area avascolare, i dati sono stati espressi come percentuale dell'area avascolare in relazione all'area totale.

### **5.3 Esperimento *in vivo* su modello murino di angiogenesi retino-coroideale con PNA anti-uPAR**

Per capire il comportamento di questo innovativo strumento terapeutico anche in patologie caratterizzate da angiogenesi coroideale, abbiamo effettuato un secondo esperimento *in vivo* nel quale abbiamo indagato la sua efficacia anche nei confronti di angiogenesi indotta da iniezione intravitreale di VEGF o da fotocoagulazione laser con rottura della membrana di Bruch.

Questo secondo esperimento ci ha permesso inoltre di superare una limitazione del precedente cioè la somministrazione per via intraperitoneale (che eravamo stati obbligati ad usare a causa della chiusura della rima palpebrale dei topini al dodicesimo giorno) cambiando così strumento veicolativo (iniezioni intravitreali) e sperimentando anche un farmaco più innovativo della classe PNA.

Per questo esperimento abbiamo usato un totale di 21 topi tipo C57BL/6 tra le 5 e le 8 settimane di età acquistati dalla Charles River Laboratories Italia (Lecco, ITA) e mantenuti presso il Ce.S.A.L. (Servizio di stabulazione animali da laboratorio) dell'Università di Firenze secondo le linee guida dell' Association for Research in Vision and Ophthalmology per l'uso di animali da laboratorio. È stata utilizzata ogni accortezza possibile per ridurre al massimo il numero di animali utilizzati.

Per effettuare gli esperimenti gli animali sono stati **anestetizzati** mediante iniezione intraperitoneale. Per far ciò abbiamo utilizzato 1 ml di Ketamina alla quale è stata aggiunta 0.25ml di Xilazina. La soluzione ottenuta è stata portata a 10ml aggiungendo 8,75ml di soluzione fisiologica. E' stato utilizzato 0,1ml del composto ottenuto

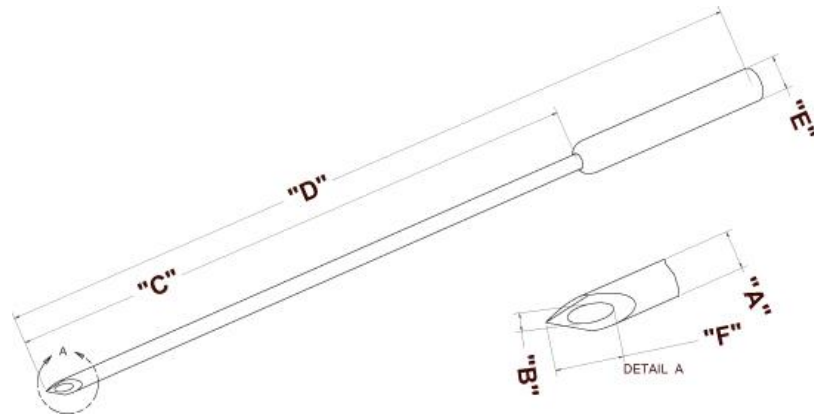
ogni 10 grammi di peso del topo (peso medio 25-30gr percui 0,25-0,30 ml circa di anestetico). L'effetto anestetico è risultato agire in pochi minuti ed avere un effetto di circa un'ora e mezzo.

L'oligonucleotide antisense utilizzato per questo esperimento è stato un gripNA (**PNA anti-uPAR**) con sequenza 5'-CGGCGGGTGACCCATGTG-3' (Active Motif, USA), complementare al sito di inizio della traduzione dell'mRNA di *uPAR* (residui 224-241 della sequenza NM\_002659.3).

Tale PNA è stato inoltre sintetizzato con l'aggiunta, all'estremità 3', di una molecola di fluoresceina isotiocianato (FITC), in modo da valutarne la localizzazione intraoculare mediante analisi di microscopia a immunofluorescenza. La FITC è il più comune derivato della fluoresceina. Essa è una molecola fluorescente dotata di un gruppo isotiocianato (-N=C=S) molto reattivo. Il picco di assorbimento della FITC è circa 495nm mentre quello di emissione in fluorescenza è circa 521nm.

Il PNA è stato veicolato all'interno dell'occhio per via intravitreale. Per effettuare le iniezioni abbiamo usato una microsiringa NanoFil da 10 ul (World Precision Instruments Inc., Sarasota FL , USA) con aghi da 34 e 35 Ga a becco di flauto (Fig. XX).





**Fig. 10** Siringa NanoFil da 10ul con dettaglio degli aghi usati (35 e 35 Ga)

Con la tecnica intravitreale, rispetto alla metodica intraperitoneale, si necessita una quantità minore di farmaco andando così ad abbattere i costi della sperimentazione stessa. Iniettando inoltre direttamente nel sito di interesse si sperimenta un modello più simile a quello che potrebbe essere fatto in futuro su esseri umani. Come svantaggio di questa tecnica però ricordiamo l'elevato rischio di induzione di una cataratta traumatica che può impedire eventuali analisi in vivo da effettuare, tipo visualizzazione del fondo oculare o fluorangiografia retinica.

Il topo, dopo essere stato anestetizzato, è stato posto sotto microscopio ottico ed è stata instillata una goccia di anestetico locale benoxinato (Novesina) nel fornice congiuntivale. L'iniezione è stata effettuata ad una distanza di circa 1mm dal limbus, previa preincisione

con bisturi da 15°, con ago rivolto verso il polo posteriore in modo da cercare di causare il minor traumatismo possibile al cristallino. Immediatamente dopo l'iniezione è stata instillata una goccia di antibiotico topico.

Il nostro esperimento è stato suddiviso in **3 fasi** distinte in successione:

- Fase 1: “Verifica della localizzazione del PNA negli strati retina-coroide”
- Fase 2: “Valutazione inibizione del gene di uPAR”
- Fase 3: “Analisi area CNV mediante fluorangiografia”

### **5.3.1 Verifica della localizzazione del PNA negli strati retina-coroide**

Abbiamo provato a localizzare il nostro PNA su retina e coroide previa induzione di angiogenesi con iniezione intravitreale di VEGF. Secondo precedenti lavori infatti uPAR risulta essere sovraespresso proprio in presenza di stimolo angiogenico (Miyamoto K et al, 2000) e molto ridotto invece nelle cellule endoteliali quiescenti.

Per questo esperimento abbiamo usato un gruppo di animali costituito da 8 topi (16 occhi). Presso il centro di stabulazione degli animali dell'Università di Firenze abbiamo trattato così gli occhi destri con iniezione intravitreale di 1µl di VEGF (Sigma Aldrich, USA, disciolto in PBS alla concentrazione 50 ng/µl), nessuna iniezione è stata effettuata negli occhi sinistri. Dopo 48h (T2) dall'iniezione di VEGF, è stata eseguita iniezione intravitreale di 1µl PNA anti-uPAR marcato (disciolto in PBS alla concentrazione 2 µg/µl) in tutti e due gli occhi. 24 e 48h (T3 e T4) dopo l'iniezione di

PNA i topi sono stati sacrificati mediante iniezione intraperitoneale in dose doppia di anestetico e gli occhi sono stati immediatamente enucleati e immersi per 4h a temperatura ambiente in una soluzione contenente paraformaldeide 3,7%, come fissativo. Gli occhi sono stati poi trasferiti in una soluzione contenente PBS + 30% sucrosio, e incubati 24h a 4°C. Successivamente sono stati congelati alla temperatura di -80°C.

Mediante processamento con il criostato (microtomo contenuto in una cella frigorifera, allo scopo di non scongelare il campione durante il taglio) sono state preparate fette istologiche dello spessore di 10 µm, che sono poi state adagiate su vetrini portaoggetti.

I campioni sono stati analizzati utilizzando Nikon TE2000 Confocal Microscope e EZ-C1 Software (Nikon Corporation, Japan), e registrate digitalmente alla Immunofluorescenza. Al fine di valutare la presenza delle cellule endoteliali nel distretto retinico, le sezioni sono state bloccate con 10% goat serum per 30 minuti ed incubate overnight a 4°C con un anticorpo primario anti-mouse CD31 (Sigma Aldrich, USA). Dopo tre lavaggi con PBS/Tris, le sezioni sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario marcato con Cy3 (Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, PA).

TO	8 OD trattati con IV 1ul VEGF
T2	8 OD + 8 OS trattati con IV 1ul PNA-uPAR/FITC
T3	Enucleazione a 24h di 4 topi
T4	Enucleazione a 48h di 4 topi

**Tab.3** Schema protocollo sperimentale “Localizzazione PNA”

### **5.3.2 Valutazione inibizione del gene di uPAR**

Abbiamo poi cercato di valutare i livelli di espressione di mRNA di uPAR a livello di retina e coroide a seguito di iniezione intravitreale di PNA previa induzione di angiogenesi mediante panfotocoagulazione laser.

Per fare questo abbiamo usato un gruppo di animali costituito da 8 topi (16 occhi). Presso il centro di stabulazione degli animali dell'Università di Firenze abbiamo trattato così tutti gli occhi con panfotocoagulazione laser della retina.

Il modello murino di neovascolarizzazione retinica indotta da laser è stato usato a lungo per studiare la patogenesi ed il possibile trattamento delle neovascolarizzazioni sottoretiniche comunemente associate alla forma umida di AMD. (Aguilar et al., 2008). La procedura da noi utilizzata è stata la stessa riportata in letteratura (Das et al., 2004). La fotocoagulazione è stata effettuata con laser diodo rosso 647nm (Biolitec), presso lo Stabulario, attraverso lampada a fessura utilizzando una lente specifica a contatto (Ocular Instruments) sulla cornea come precedentemente descritto. Abbiamo usato le seguenti impostazioni: dimensione dello spot 100- $\mu$ m, durata 0.1-secondi e 200 mW di potenza. La comparsa di una bolla di vapore durante il trattamento è stata considerata l'obiettivo finale di ogni singola fotocoagulazione indicando questa la rottura della membrana di Bruch.

Immediatamente dopo il trattamento fotocoagulativo è stata eseguita iniezione intravitreale di 1 $\mu$ l PNA anti-uPAR marcato (disciolto in PBS alla concentrazione 2  $\mu$ g/ $\mu$ l) in tutti occhi destri; nessuna iniezione è stata effettuata negli occhi sinistri. Dopo 7 giorni (T7) dall'iniezione di PNA i topi sono stati sacrificati attraverso iniezione

intraperitoneale in dose doppia di anestetico e gli occhi sono stati immediatamente enucleati e sezionati in due parti separando la parte anteriore dell'occhio (cornea e cristallino) da quella posteriore (retina e coroide). Quest'ultima sezione è stata ottenuta per tutti gli occhi e avvolta immediatamente in "carta alluminio" e congelata.

La metodica di RT-PCR utilizzata per l'analisi dell'espressione di mRNA di uPAR è stata effettuata come precedentemente descritto (vedi pag. 44)

TO	8 OD + 8 OS induzione CNV con fotocoagulaz laser 4 OD trattati con IV 1ul PNA-uPAR/FITC
T7	Enucleazione di 8 topi

**Tab 4** Schema protocollo sperimentale "Inibizione del gene di uPAR"

### 5.3.3 Valutazione area CNV

Abbiamo infine cercato di valutare l'estensione dell'area delle CNV in topi trattati con o senza PNA previa induzione di CNV stessa con insulto laser.

Per questo esperimento abbiamo usato un gruppo di animali costituito da 5 topi (10 occhi). Presso il centro di stabulazione degli animali dell'Università di Firenze abbiamo trattato tutti gli occhi con fotocoagulazione laser della retina con laser diodo rosso 647nm (Biolitec). Sono state effettuate tre bruciature laser per ogni occhio ad ore 9, 12 e 3 a circa un diametro di distanza dal nervo ottico con le seguenti impostazioni: dimensione dello spot 100- $\mu$ m, durata 0.1-

secondi e 150-200 mW di potenza. La produzione di una bolla di vapore durante il trattamento laser è stata considerata l'obiettivo finale indicando questa la rottura della membrana di Bruch indice di stimolo proangiogenico coroidale. Dopo 7 giorni dal trattamento è stata effettuata la fluorangiografia di controllo.

La fluorangiografia è stata effettuata con un oftalmoscopio confocale a scansione laser (Heidelberg Retina Angiograph 2, Heidelberg Engineering, Dossenheim, Germany) previa anestesia e successiva somministrazione di 0,1 ml fluoresceina al 10% per via intraperitoneale

TO	5 OD + 5 OS induzione CNV con fotocoagulazione laser 5 OD trattati con IV 1ul PNA-uPAR/FITC
T7	5 OD + 5 OS eseguita fluorangiografia retinica

**Tab.5** Schema protocollo sperimentale “Valutazione area CNV”

.

## 6

# RISULTATI

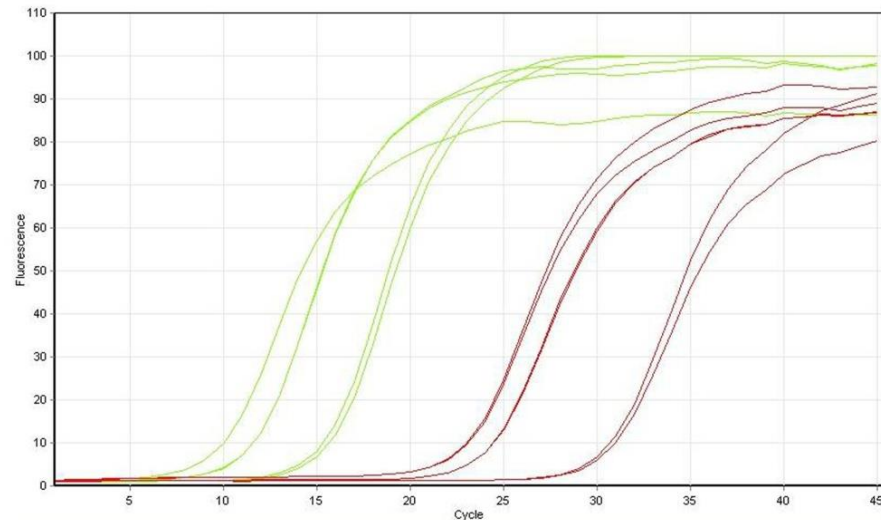
### 6.1 Esperimento *in vitro* su HREC

#### 6.1.1 Inibizione del gene uPAR

Per verificare l'efficacia del trattamento con ASO-uPAR abbiamo analizzato i livelli di espressione dell'mRNA di uPAR in seguito alla procedura di trasfezione.

72 h dopo la prima trasfezione (24 h dopo la seconda) abbiamo quindi estratto l'RNA dalle cellule (non trattate, trasfettate con ASO-deg. e trasfettate con ASO-uPAR), abbiamo trattato l'RNA con DNasi per eliminare eventuali contaminazioni di DNA genomico ed abbiamo infine sottoposto l'RNA a retrotrascrizione. Abbiamo sottoposto il cDNA così ottenuto ad analisi di real-time PCR, scegliendo come strategia l'analisi quantitativa relativa, amplificando specificamente i geni *uPAR* e l'RNA ribosomiale *18S*, che abbiamo utilizzato come gene housekeeping per effettuare la normalizzazione. Per compiere tale esperimento abbiamo utilizzato il termociclatore Rotor-Gene e il software ad esso associato per realizzare l'analisi bioinformatica dei dati ottenuti.

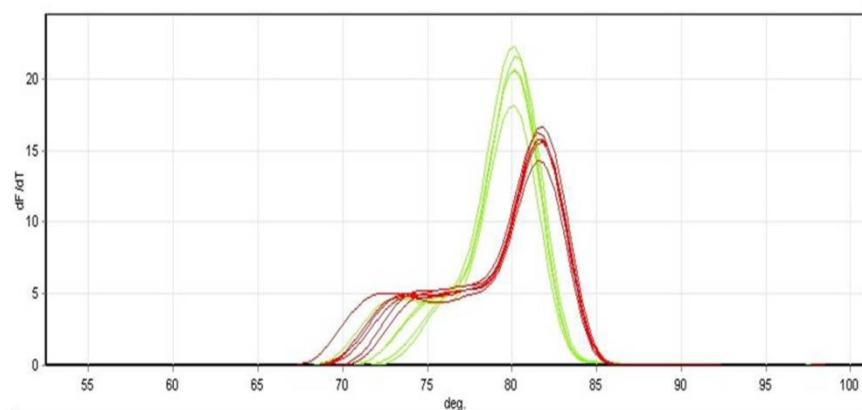
La Fig.11 mostra il profilo di amplificazione dei geni *uPAR* (in rosso) e *18S* (in verde) dei campioni che abbiamo analizzato, da cui risulta evidente come la reazione sia avvenuta con successo.



**Fig. 11** Profilo dell'amplificazione in real-time PCR dei geni *uPAR* (in rosso) e *18S* (in verde)

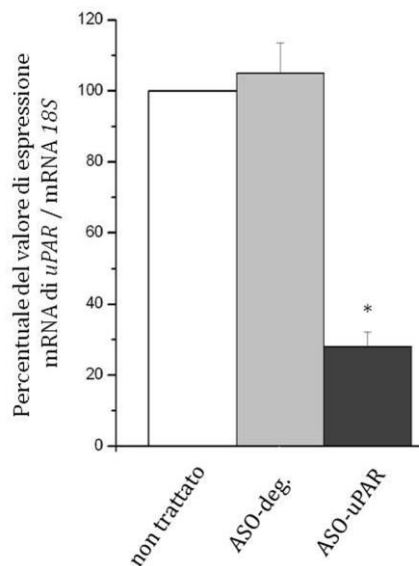
Per verificare che la reazione di PCR avesse portato all'amplificazione di un prodotto specifico (un requisito fondamentale per poter compiere una corretta analisi di real-time PCR), abbiamo effettuato la curva di melting (Fig.12), la quale mostra un unico picco, relativo ad un'unica temperatura di fusione, sia per i campioni relativi all'amplificazione di *uPAR* (in rosso) che del *18S* (in verde). Abbiamo in tal modo verificato di aver amplificato un unico prodotto specifico per ciascun gene, senza la presenza di prodotti aspecifici contaminanti.





**Fig. 12** Curve di melting relative ai prodotti di amplificazione *uPAR* (in rosso) e *18S* (in verde)

Poiché l'amplificazione è risultata corretta, abbiamo effettuato l'analisi dei risultati (Fig.13), dimostrando quindi che la trasfezione con ASO-deg. non ha effetto, come atteso, sui livelli di espressione di *uPAR*, mentre il trattamento con ASO-*uPAR* riduce del  $28\pm 4\%$  i livelli di *uPAR* rispetto alle cellule non trattate.



**Fig. 13** Analisi della real-time PCR effettuata amplificando *uPAR* e *18S* (normalizzatore) in cellule HREC non trattate, trattate con ASO deg. o trattate con ASO-*uPAR*. \*  $p < 0,001$  rispetto a non trattato.

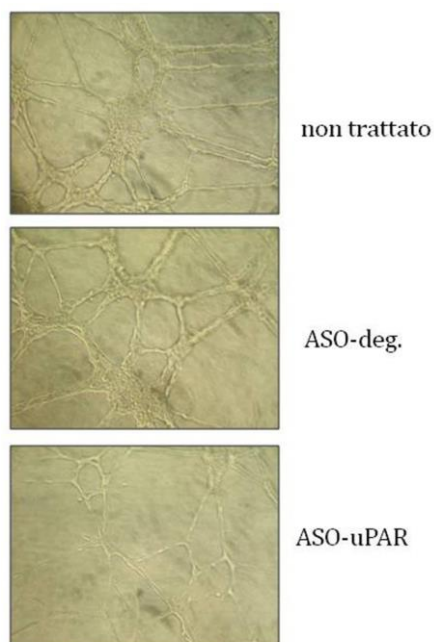
Abbiamo così dimostrato che il trattamento con ASO-uPAR nelle cellule HREC è efficace nell'inibire significativamente l'espressione di *uPAR in vitro*

### **6.1.2 Inibizione della morfogenesi capillare**

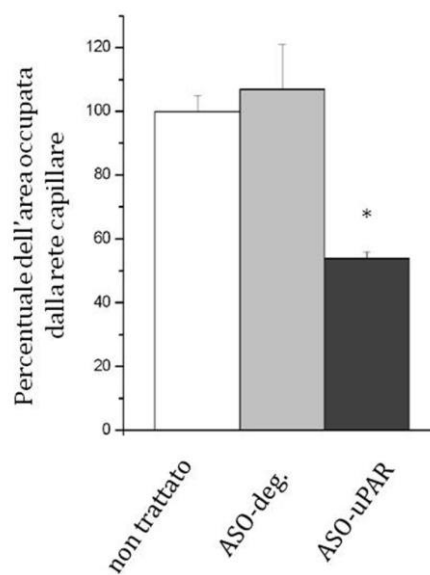
Dopo aver stabilito che il trattamento con ASO-uPAR riduce i livelli di espressione di *uPAR*, siamo andati a effettuare due saggi funzionali, volti allo studio della migrazione cellulare e della capacità delle cellule endoteliali di organizzarsi in strutture tubulari, per verificare che tale trattamento alteri le capacità angiogeniche delle cellule endoteliali retiniche.

Dopo aver trattato le cellule HREC (non trattate, trasfettate con ASO-deg. e trasfettate con ASO-uPAR) abbiamo eseguito il primo test funzionale: il saggio di morfogenesi capillare. Abbiamo utilizzato questa metodica per valutare la capacità delle cellule HREC di formare strutture tubulari endoteliali in seguito all'inibizione dell'espressione di uPAR.

Come dimostrano le immagini in Fig. 14, le cellule HREC piastrate su Matrigel e incubate per 12h si organizzano in strutture tubulari che mimano l'organizzazione fisiologica *in vivo* delle cellule endoteliali (non trattato). Il trattamento con l'ASO-deg. non altera tale processo cellulare, mentre il campione trattato con l'ASO-uPAR manifesta una minor capacità di formare tale organizzazione.



**Fig. 14** Fotografie effettuate al microscopio invertito e acquisite dopo 12h dal piastramento su Matrigel di cellule HREC non trattate, trattate con ASO-deg. o ASO-uPAR.



**Fig. 15** Analisi statistica della percentuale dell'area occupata dalla rete capillare in cellule HREC non trattate, trattate a ASO-deg. o trattate con ASO-uPAR. \*  $p < 0,001$  rispetto a non trattato.

In Fig. 15 è riportata l'analisi statistica effettuata dopo aver quantificato i risultati utilizzando il software Scion Image (<http://www.scioncorp.com>), misurando per ciascuna immagine ottenuta la percentuale dell'area occupata dalla rete capillare.

La differenza fra la superficie occupata nel campione non trattato ( $100\pm 5\%$ ) e nel campione trattato con ASO-deg. ( $107\pm 14\%$ ) non è significativa, mentre il numero di strutture tubulari nel campione trattato con ASO-uPAR ( $52\pm 2\%$ ) risulta essere circa il 46% in meno rispetto al campione non trattato.

Possiamo quindi concludere che il trattamento con l'ASO-uPAR in cellule HREC inibisce significativamente la capacità di tali cellule di creare strutture tubulari vascolari.

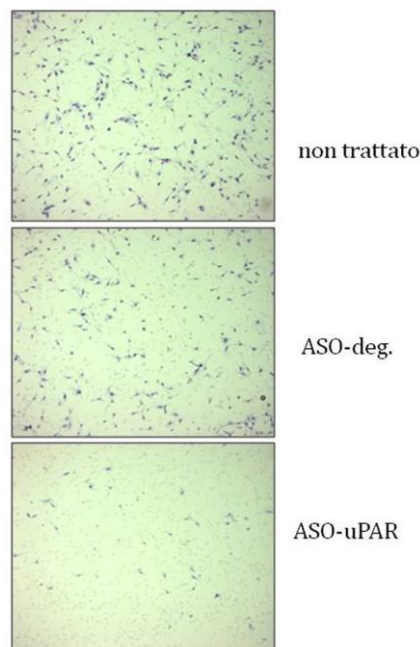
### **6.1.3 Inibizione della migrazione cellulare**

Come già spiegato in precedenza uPAR risulta essere coinvolto nella migrazione delle cellule endoteliali durante il processo angiogenetico, poiché mediante il “signalling intracellulare” stimola il rimodellamento del citoscheletro necessario per la migrazione cellulare. Abbiamo quindi ipotizzato che l'inibizione di uPAR, mediante il trattamento con l'ASO-uPAR, comporti l'inibizione della capacità di migrazione delle cellule HREC.

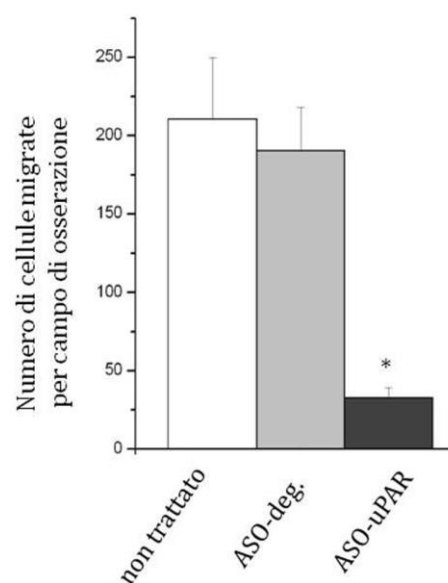
Dopo aver trattato le cellule HREC (non trattate, trasfettate con ASO-deg. o trasfettate con ASO-uPAR) abbiamo eseguito un test di migrazione per verificare che l'utilizzo dell'ASO-uPAR ne inibisca la funzione stessa. Tra i saggi di migrazione esistenti, abbiamo scelto quello basato sull'utilizzo di Millicell Cell Culture Inserts, mediante i quali è possibile quantificare il numero di cellule che migrano

attraverso membrane di policarbonato aventi pori di 8.0  $\mu\text{m}$ . La dimensione dei pori è compatibile con la dimensione delle cellule da noi utilizzate, cioè cellule endoteliali microvascolari.

Come dimostrano le immagini in Fig. 16, le cellule trattate con l'ASO-uPAR hanno minor capacità di migrare rispetto al campione non trattato o trattato con ASO-deg. e di conseguenza sulla membrana ne risultano molte meno.



**Fig. 16** Fotografie effettuate al microscopio invertito e acquisite dopo 24 h dal piastramento in Millicell Cell Culture Inserts di cellule HREC non trattate, trattate con ASO-deg. o ASO-uPAR.



**Fig. 17** Analisi statistica del numero di cellule migrate per campo di osservazione in campioni di cellule HREC non trattate, trattate con ASO-deg. o trattate con ASO-uPAR.  
\*  $p < 0,001$  rispetto a non trattato.

In Fig. 17 è riportata l'analisi statistica che abbiamo effettuato dopo aver analizzato 5 diversi campi di osservazione per ciascun campione.

La differenza fra la migrazione avvenuta nel campione non trattato e nel campione trattato con ASO-deg. non è significativa, mentre il numero di cellule migrate nel campione trattato con ASO-uPAR ( $32,8 \pm 6,2$ ) è circa l'85% in meno rispetto al campione non trattato ( $210,5 \pm 39,2$ ).

Possiamo quindi concludere che il trattamento con l'ASO-uPAR in cellule HREC inibisce significativamente la capacità di tali cellule di migrare.

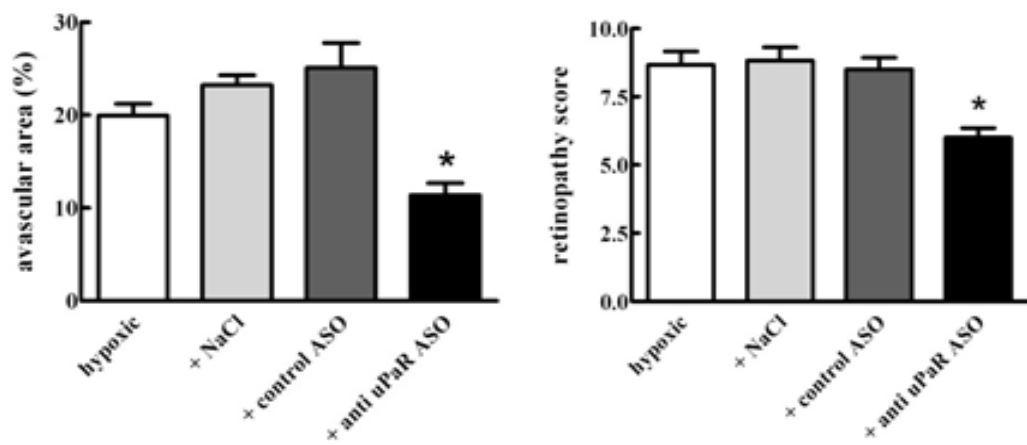
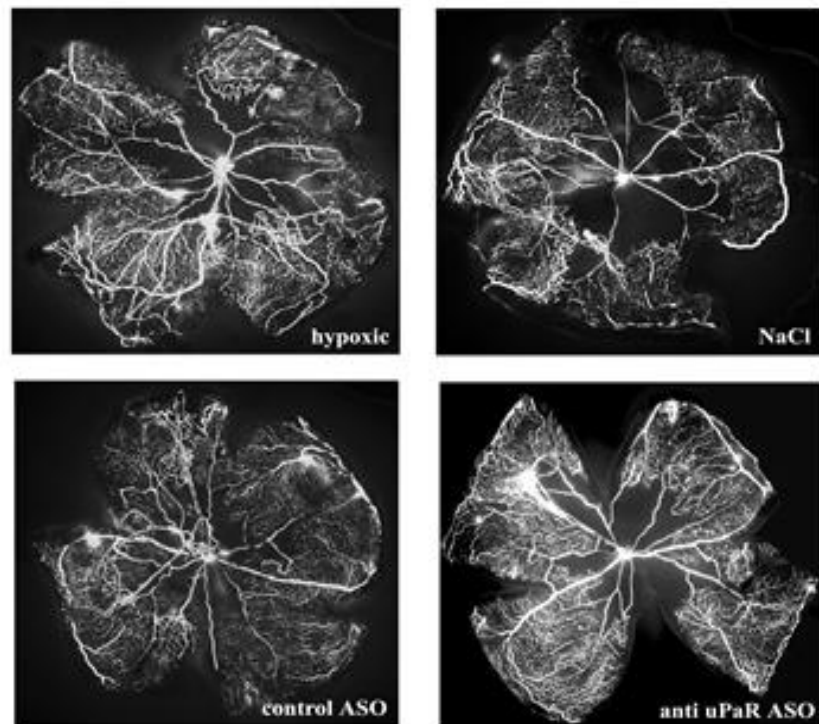
## **6.2 Esperimento *in vivo* su modello murino di retinopatia indotta dall'ossigeno (OIR)**

Per investigare l'efficacia di ASO-uPAR *in vivo* nel ridurre l'angiogenesi retinica, abbiamo trattato i topi OIR con ASO-uPAR per via intraperitoneale e abbiamo analizzato qualitativamente e quantitativamente l'azione del farmaco sulla neovascolarizzazione. Per indagare ciò abbiamo quindi effettuato un'angiografia a fluorescenza ed analizzato i campioni di retina distesa su vetrino in microscopia come descritto a pag. 53.

La figura 18 mostra il pattern vascolare di retine montate su vetrino di topi in condizioni di ipossia (A) e dopo somministrazione, in topi ipossici, di NaCl (B), ASO-deg. (C) ed ASO-uPAR (D).

In accordo con precedenti risultati (Smith et al., 1994), l'esposizione al 75% di ossigeno da PD7 a PD12 determina la scomparsa dei capillari già esistenti nella retina centrale, sebbene la retina periferica rimanga vascolarizzata. Il ritorno ad un'atmosfera normossica fino a PD17 permette l'incompleta rivascolarizzazione della porzione centrale avascolare con associata neovascolarizzazione al confine tra retina centrale avascolare e retina periferica vascolarizzata comprendendo la formazione di grossi grovigli di vasi che si estendono nel vitreo.

Come mostrato in fig. 18, sia i grovigli di vasi che le emorragie retiniche, tipiche delle retine di topi ipossici, e l'estensione dell'area avascolare vengono ridotti dal trattamento con ASO-uPAR ed il retinopathy score si riduce notevolmente. Nessun risultato invece è stato ottenuto con l'iniezione di NaCl o ASO-deg.



**Fig. 18** Immagini di fluorangiografia su retina distesa su vetrino e relative analisi statistiche dei 4 gruppi analizzati



Il primo grafico mostra l'estensione dell'area avascolare alla fluorangiografia nei quattro gruppi. Tale area è stata valutata mediante un software specifico che ci ha permesso di calcolare tale area come percentuale dell'area retinica totale. Notiamo come tale area risulti essere di dimensioni costanti nei tre gruppi di controllo (non trattati 19,8%, NaCl 23,2%, ASO-deg 25,1%) mentre si riduca significativamente nel gruppo trattato con ASO-uPAR (11,4%)

Successivamente abbiamo fatto una valutazione più estesa della retinopatia considerando i cinque parametri del retinopathy score (RS) come precedentemente descritto in precedenti lavori. I punteggi ottenuti sono la somma di cinque parametri ognuno dei quali attribuisce un punteggio come da Tab.2. La somma massima totale dei punteggi risulta essere 14 indicando questa il più alto grado di gravità della retinopatia. Il punteggio ottenuto per ciascun gruppo risulta essere la media dei valori ottenuti.

Come si vede dai diagrammi in fig.18 non c'è nessuna differenza statisticamente significativa del valore del RS tra i primi 3 gruppi di controllo (rispettivamente topi ipossici senza alcun trattamento  $8.39 \pm 0.35$ , NaCl  $8,46 \pm 0.31$ , ASO-deg.  $8.31 \pm 0.33$ ) mentre si segnala una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) del retinopathy score nelle retina del gruppo di topi a cui è stato somministrato con ASO-uPAR ( $6.00 \pm 0.36$ ).

Questo risulta essere un risultato estremamente interessante in quanto ci dimostra l'effettiva efficacia del nostro strumento terapeutico nel ridurre i fenomeni legati all'angiogenesi.

## **6.3 Esperimento *in vivo* su modello murino di CNV**

### **6.3.1 Localizzazione PNA-uPAR su retina/coroide**

Al fine di valutare la localizzazione della molecola PNA-uPAR marcata a livello di retina e coroide, in seguito alla sua iniezione intravitreale, abbiamo condotto una serie di esperimenti su un modello animale murino nel quale abbiamo precedentemente indotto l'angiogenesi mediante iniezione intravitreale di VEGF (Miyamoto K et al., 2000).

In questo lavoro di Miyamoto è stato dimostrato come l'iniezione intravitreale di VEGF in un modello rattino induca velocemente (24-48h) una severa stasi leucocitaria retinica accompagnata da una aumentata permeabilità vascolare e non perfusione capillare con aumento dell'espressione di uPAR negli strati retinici interni e plessiforme interno.

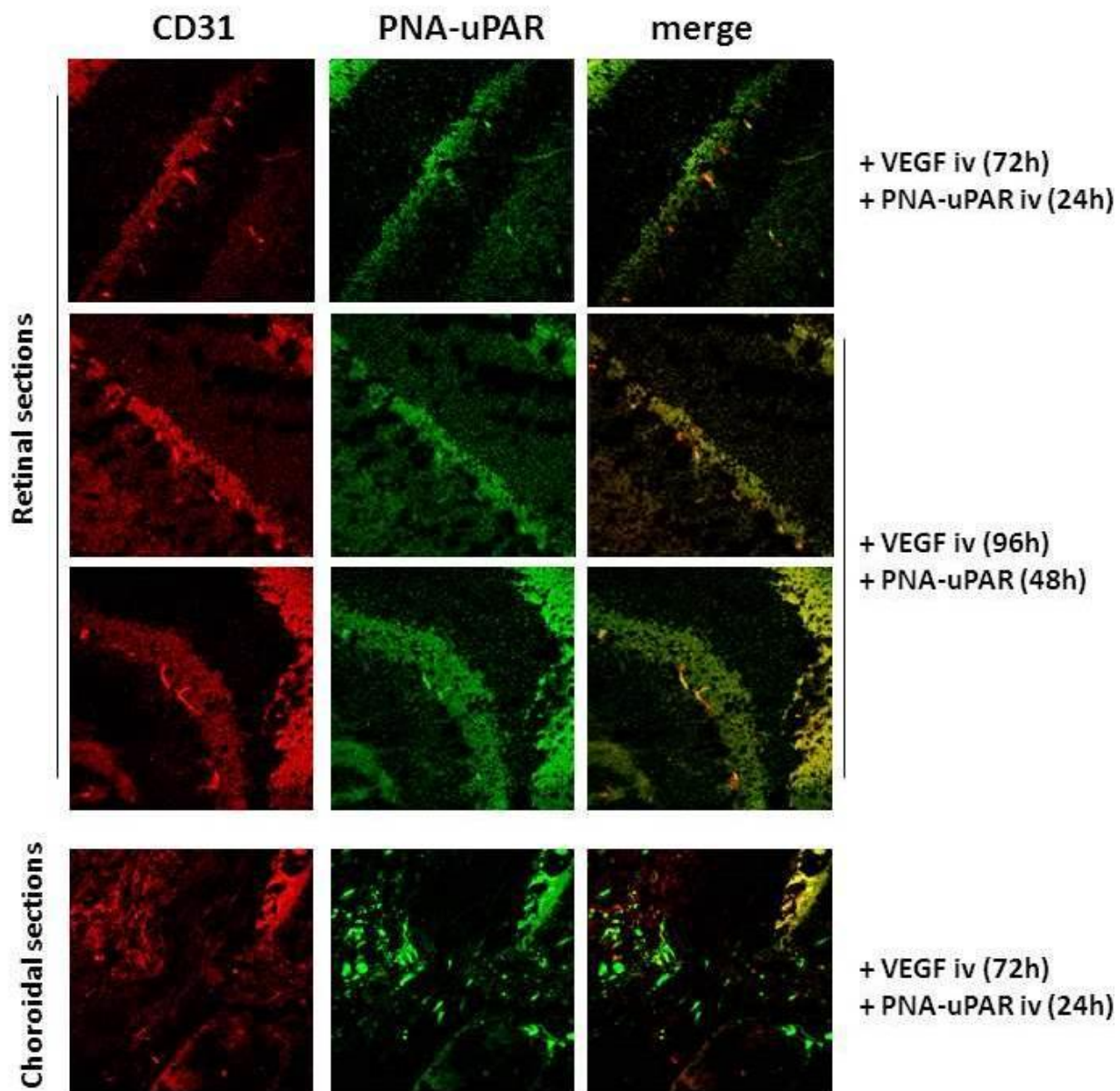
Abbiamo dunque iniettato intravitrealmente VEGF (50ng/occhio) e 48h dopo l'iniezione del VEGF abbiamo iniettato il PNA-uPAR (2 µg). 24 e 48h dopo abbiamo sacrificato i topi, isolato gli occhi e sottoposto questi a processamento al criostato per ottenere sezioni istologiche di 10 µm. Abbiamo effettuato una marcatura delle cellule endoteliali coroideali/retiniche utilizzando un anticorpo anti-CD31. Abbiamo quindi analizzato le sezioni istologiche mediante microscopia confocale a fluorescenza, sfruttando il fluorocromo Cy3 per la rilevazione di CD31, e la fluoresceina coniugata al PNA, per la rilevazione dello stesso.

L'immagine in fig. 19 mostra che, come atteso, l'iniezione intravitreale di VEGF induce angiogenesi nel distretto coroideale/retinico, nel quale risultano essere presenti in maggior

quantità cellule endoteliali CD31-positive (evidenti in rosso intenso, prima colonna). Inoltre, è possibile rilevare la presenza del PNA-uPAR (in verde, colonna centrale) sia a livello coroideale che retinico; in particolare, i profili istologici analizzati mostrano una quasi esclusiva localizzazione del PNA-uPAR a livello delle cellule CD31-positive, quindi colocalizzazione con le CE dei neovasi.

Tale risultato risulta essere in accordo con l'ipotesi che il PNA si accumula nelle cellule dove è presente una più alta quantità di target (cioè dell'mRNA di uPAR) quindi nelle cellule endoteliali indotte all'angiogenesi mediante stimolazione con il VEGF. Queste cellule endoteliali dei neovasi risultano essere localizzate negli strati plessiformi interno ed esterno della retina nonché nella coriocapillare coroideale. Negli occhi sinistri usati come controllo il PNA-uPAR non è stato localizzato in nessuno dei tessuti analizzati.

La valutazione è ancora a livello preliminare; si necessiteranno ulteriori esperimenti per poter definire meglio la quantità e modalità di somministrazione giuste di PNA per poterlo co-localizzare in tutte le cellule marcate con CD 31. Non riusciamo infatti per adesso a capire per quale motivo il PNA si co-localizzi nelle cellule di alcuni neovasi e non in altri.



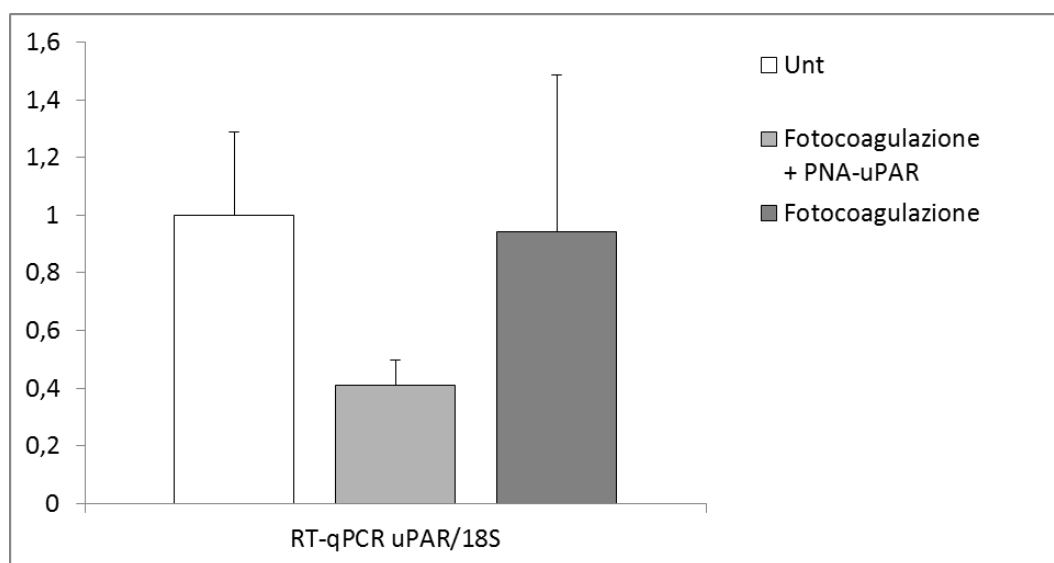
**Fig. 19** Le immagini nella colonna centrale mostrano in verde più intenso la molecola PNA marcata con fluoresceina. Le immagini risultano avere un segnale di intensità limitata non essendo un' immunofluorescenza classica. La forma degli accumuli è indicativa di CE. Abbiamo fatto una contro colorazione con anticorpo CD31 specifico per CE (colonna di sinistra), effettivamente le cellule positive per la fluoresceina sono risultate localizzarsi proprio nelle stesse zone positive anche in rosso per CD31 quindi cellule endoteliali. Nella colonna di destra vediamo le due immagini precedenti unite che mostrano come PNA si co-localizzi proprio nelle cellule dei neovasi dello strato plessiforme interno.

### 6.3.2 Inibizione del gene uPAR

Dopo aver verificato la localizzazione del nostro PNA abbiamo cercato di verificare che questo effettivamente portasse ad un abbattimento dei livelli del nostro target molecolare.

Per far questo abbiamo quindi analizzato gli occhi, precedentemente trattati con panfotocoagulazione laser e trattati o meno con PNA, con tecnica di RT-PCR quantitativa.

I risultati ottenuti evidenziano come il PNA-uPAR abbatta significativamente i livelli di mRNA uPAR nel tessuto retino/coroideale a sette giorni dall'insulto laser (vedi Fig. 20).



**Fig. 20** Metodica di quantificazione relativa di mRNA uPAR mediante RT-PCR con campione di controllo(calibratore). Il grafico mostra i livelli di mRNA uPAR dopo sette giorni dallo stimolo laser. Nel gruppo trattato con PNA-uPAR per via IV vediamo che si ha una notevole riduzione (circa del 60%) dell'espressione di mRNA rispetto al gruppo non trattato.

La valutazione è ancora a livello preliminare, sarà necessario in futuro aumentare i campioni da analizzare e migliorare le modalità di conservazione e trattamento dei campioni stessi perché, come si evidenzia dal grafico, la variabilità, soprattutto nel gruppo non trattato, risulta essere molto elevata; ciò probabilmente dovuto al fatto che molti campioni risultano essere parzialmente degradati.

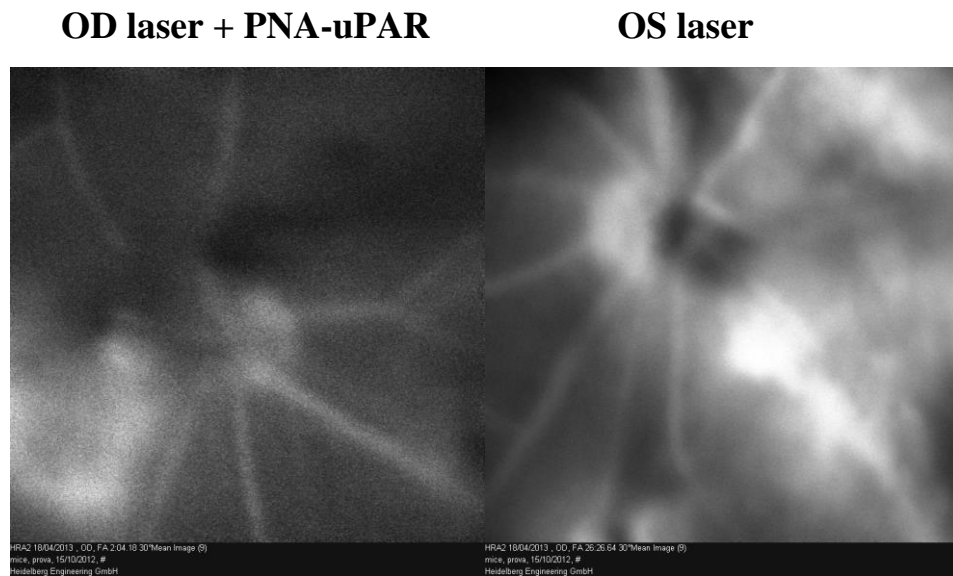
Prospettiamo quindi di continuare lo studio iniziato utilizzando migliori procedure di conservazione dei campioni quali l'immediato congelamento in azoto liquido ed il processamento dei tessuti oculari da esaminare nel minor tempo possibile.

### **6.3.3 Analisi estensione area CNV**

Abbiamo infine cercato di valutare con la fluorangiografia retinica l'estensione della CNV provocata con insulto laser. Abbiamo tuttavia incontrato numerose difficoltà che ci hanno impedito di poter fare una precisa valutazione di questo parametro.

La maggior parte dei topi infatti, a seguito dello stimolo laser e delle iniezioni intravitreali, ha sviluppato un' opacità del cristallino tale da impedirci una sufficiente visualizzazione del fondo oculare. Le poche fluorangiografie che siamo riusciti ad eseguire risultano essere non a fuoco e la valutazione delle aree di CNV peripapillari risulta perciò essere mal effettuabile. L'esecuzione del laser si è inoltre resa difficoltosa per la cattiva visualizzazione del fondo in alcuni topi. Infine la strumentazione per effettuare la fluorangiografia si è rivelata non idonea per esaminare il fondo di animali con occhi di così ridotte dimensioni.

Sicuramente si renderà necessaria per il futuro per la prosecuzione degli esperimenti l'utilizzo di una strumentazione più idonea al tipo di cavie scelte oppure il cambiamento stesso del tipo di animali utilizzati (eventualmente modello su ratti o conigli).



**Fig. 21** Due fluorangiografie effettuate sulle cavie topi C57BL/6 con angiografo HRA2 (Heidelberg Engineering, Dossenheim, Germany) a seguito di CNV indotta con fotocoagulazione laser

## DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi abbiamo studiato l'efficacia antiangiogenica di un oligonucleotide antisenso diretto contro il sistema uPA/uPAR in modelli sperimentali di angiogenesi.

Recenti studi hanno dimostrato l'aumento dell'espressione del complesso serino-proteasico uPA/uPAR in modelli murini di neovascolarizzazione corioretinica ed in membrane neovascolari umane in pazienti con AMD e retinopatia diabetica proliferante. (Das A et al., 1999)

E' stato visto recentemente come modelli murini transgenici, creati con deficienza dei geni relativi a uPA, tPA e plasminogeno, siano risultati essere resistenti allo sviluppo di CNV sperimentali. (Rakic JM et al., 2003).

uPAR inoltre risulta essere uno dei più importanti mediatori attraverso cui il VEGF esplica la sua funzione di citochina pro-angiogenica (Uhrin P et al., 2013).

Questi studi fanno capire l'importanza ed il ruolo centrale del sistema uPA/uPAR nella cascata di eventi che portano sia alla degradazione della matrice extracellulare che all'attivazione e migrazione delle cellule endoteliali nel processo di angiogenesi e giustificano il sempre più crescente interesse della comunità scientifica su di esso per cercare di trovare vie alternative a quella del VEGF per bloccare i fenomeni di neovascolarizzazione patologica.

Da alcuni anni il dipartimento di Patologia ed Oncologia sperimentali dell'Università di Firenze (dir. Prof. S. Capaccioli) ha



sviluppato un oligodesossiribonucleotide antisenso (ASO) specifico per il gene di uPAR, che è stato già dimostrato essere estremamente efficace nel ridurre l'espressione di uPAR stesso in numerose linee cellulari normali e trasformate (Capaccioli S et al, brevetto WO96/03414, 08/02/1996)

Abbiamo ipotizzato che il trattamento con ASO-uPAR determinasse l'inibizione di uPAR anche nelle cellule endoteliali retiniche umane e quindi contribuisse all'inibizione del processo angiogenico caratteristico delle retinopatie proliferative. uPAR infatti in recenti studi è stato riscontrato proprio negli strati ganglionare e plessiforme interno della retina (McGuire PG et al., 2003) in concomitanza con fenomeni di attivazione angiogenica.

Ci siamo perciò focalizzati inizialmente sulla scelta di un appropriato e specifico modello cellulare con il quale compiere analisi molecolari e saggi funzionali *in vitro*. Abbiamo deciso di compiere i nostri studi *in vitro* su una linea cellulare primaria umana microvascolare endoteliale retinica (HREC), acquistata presso una banca americana di linee cellulari primarie, Applied Cell Biology Research Institute (Kirkland, USA). Tali cellule, ottenute direttamente dalle retine di cadaveri, possono essere mantenute in coltura per 10-15 passaggi, senza che esse perdano le loro caratteristiche citologiche, consentendo così sia il loro ampliamento sia la realizzazione di saggi molecolari e funzionali.

Abbiamo cercato di verificare che ASO-uPAR fosse in grado di abbattere l'espressione di uPAR nelle cellule HREC. Abbiamo quindi effettuato una transfezione di ASO-uPAR utilizzando come controllo sperimentale cellule non trattate o cellule trasfettate con un antisenso completamente degenerato (ASO-deg.).

Come riportato in letteratura, l'emivita dell'antisense è di circa 48 h, quindi abbiamo effettuato due trasfezioni consecutive (la prima con la concentrazione di antisense 10  $\mu$ M e la seconda, 48 h dopo, 5  $\mu$ M) in modo da garantirne la presenza in alte concentrazioni per un tempo prolungato all'interno delle cellule.

I risultati sono stati confortanti in quanto abbiamo visto che ASO-uPAR riduce i livelli di espressione di uPAR in vitro in modo significativo del  $28\pm 4\%$  i livelli di uPAR rispetto alle cellule non trattate.

Siamo andati poi ad effettuare due saggi funzionali per verificare che effettivamente tale trattamento alteri le capacità angiogeniche delle cellule endoteliali retiniche. Abbiamo così dimostrato come il trattamento con ASO-uPAR in cellule HREC inibisca significativamente sia la capacità di tali cellule di creare strutture tubulari vascolari (attraverso un saggio di morfogenesi capillare) che la capacità delle stesse cellule di migrare attraverso una membrana porosa se sottoposte ad uno stimolo chemiotattico.

Sostenuti da questi primi incoraggianti risultati in vitro abbiamo deciso così di verificare l'effetto di ASO-uPAR anche *in vivo*. Per far questo abbiamo deciso di indagare la sua efficacia in due modelli sperimentali murini, il primo di retinopatia indotta dall'ossigeno (OIR) ed il secondo di CNV indotta da laser.

Per quanto riguarda il primo esperimento in vivo abbiamo preso come riferimento il lavoro simile di Wilkinsin Berka et al. (2007) che hanno indagato l'utilizzo di un ASO contro il GHr. Nel nostro esperimento in vivo in modello di OIR abbiamo verificato come la somministrazione di ASO-uPAR per via intraperitoneale tra P12 e P17 (come da modello studiato di OIR) riduca l'estensione dell'area

avascolare centrale ed il retinopathy score in modo statisticamente significativo rispetto ai gruppi di controllo dimostrando così l'effettiva efficacia del nostro strumento terapeutico nel ridurre i fenomeni legati all'angiogenesi.

Abbiamo voluto poi cercare di dimostrare l'efficacia di un oligonucleotide di nuova generazione (PNA-uPAR) in un modello di angiogenesi retino-coroideale. Questa molecola innovativa risulta avere maggior specificità e penetrabilità rispetto ai classici ASO.

Das et al. hanno dimostrato come l'inibizione del sistema uPA/uPAR possa essere una strategia interessante per bloccare la cascata antiangiogenica anche in un modello di CNV indotta da laser. Nel loro esperimento per due settimane dopo l'insulto laser le cavie (topi C57BL) sono state trattate con un inibitore peptidico del sistema uPA/uPAR (A6) con iniezioni intraperitoneali. I controlli hanno ricevuto iniezioni intraperitoneali di soluzione salina. Dopo il trattamento gli animali sono stati perfusi con fluoresceina, sacrificati, gli occhi sono stati rimossi e l'area della CNV è stata valutata attraverso analisi microscopica dei campioni di retina-coroide ottenuti e quantificati attraverso un software. La somministrazione sistemica dell'inibitore ha portato ad una riduzione significativa sia dell'espressione di uPAR che della CNV (fino al 94%) rispetto ai controlli e la risposta è risultata essere dose-dipendente.

Shen et al. invece hanno usato un PNA marcato, diretto contro VEGF, iniettato per via intravitreale in modelli murini di retinopatia ischemica (OIR) come precedentemente descritto. Hanno dimostrato come il PNA riduca i livelli di mRNA e VEGF e riduca i fenomeni di angiogenesi in confronto a controlli con iniezione di soluzione salina in specifiche sezioni di retina e coroide.

Studiando la localizzazione della nostra molecola di PNA nel tessuto retina-coroide di topi precedentemente trattati con VEGF intravitreale abbiamo dimostrato, attraverso l'analisi con anticorpo anti CD31 (specifico per le cellule endoteliali) e di PNA marcato con fluoresceina, come il PNA stesso si localizzi selettivamente all'interno delle cellule endoteliali neoformate. Abbiamo dimostrato dunque come l'espressione di uPAR aumenti proprio nelle cellule endoteliali dei neovasi e quindi come il nostro farmaco sembri essere selettivo nel localizzarsi all'interno delle cellule neoformate. Negli occhi in cui non è stata indotta angiogenesi il PNA infatti non è stato ritrovato. Questo risultato è estremamente interessante in quanto dimostra la selettività del farmaco per i neovasi, andando a non localizzarsi nelle cellule circostanti sane. Questo può essere un dato molto importante per una eventuale sperimentazione futura nell'occhio umano.

Dopo aver verificato la localizzazione del PNA nelle cellule dei neovasi, abbiamo cercato di verificare anche l'effettiva riduzione dell'mRNA di uPAR al quale si lega. Per far questo abbiamo creato in un gruppo di topi degli insulti laser su tutto l'ambito retinico per creare delle CNV sperimentali seguiti da iniezione di PNA a 48h di distanza solo negli occhi destri.

I risultati della RT-PCR sono stati interessanti andando a mostrare come gli occhi trattati con PNA abbiano mostrato dei livelli di mRNA significativamente inferiori rispetto agli occhi non trattati. Purtroppo molti campioni analizzati sono risultati essere parzialmente degradati ed i risultati ottenuti hanno mostrato molta variabilità. Saranno necessari altri esperimenti migliorando le tecniche di conservazione e processamento dei campioni.

Infine abbiamo cercato di verificare, mediante fluorangiografia, l'effettiva riduzione dell'area di CNV peripapillari indotte in un gruppo di topi. Purtroppo lo sviluppo di una cataratta traumatica nella maggior parte delle cavie e l'uso di una strumentazione non propriamente idonea per esperimenti su roditori non ci ha permesso di poter fare corrette valutazioni in merito a questo importante parametro.

Indubbiamente, per ovviare alle problematiche riscontrate, sarà opportuno in futuro ripetere gli esperimenti con strumenti più idonei per l'analisi fluorangiografica dei topi o eventualmente scegliere un modello animale diverso (usando per esempio ratti o conigli).

## CONCLUSIONI

In conclusione, da questo lavoro si evince come il blocco del sistema attivatore del plasminogeno, ed in particolare del recettore di membrana uPAR, sembra costituire un'importante strategia terapeutica per arrestare i processi di neovascolarizzazione patologica oculare ponendosi come possibile alternativa ed integrazione alla via del VEGF già ampiamente studiata.

In particolare nel lavoro svolto abbiamo dimostrato come l'oligonucleotide antisense anti-uPAR sia un promettente strumento molecolare per inibire l'espressione del gene uPAR e quindi l'angiogenesi stessa sia *in vitro* in cellule endoteliali retiniche umane che *in vivo* in modelli sperimentali murini.

In prospettiva futura sarà necessario migliorare il modello murino sperimentale di CNV sul quale proseguire gli studi *in vivo* per poter così confermare l'efficacia di questa innovativa tecnica anti-angiogenica.

Sarà inoltre importante ampliare le nostre conoscenze sulle interazioni tra i due sistemi del VEGF e di uPA/uPAR coinvolti nella patogenesi dei fenomeni di neovascolarizzazione oculare per cercare di bloccare così l'angiogenesi su più fronti attraverso nuove strategie terapeutiche.

## BIBLIOGRAFIA

Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT. Therapeutics molecules for modulating stability of VEGF transcripts. *Am. J. Ophthalmol.* 118, 445–450 (1994).

Aguilar E, Dorrell MI, Friedlander D, Jacobson RA, Johnson A, Marchetti V, Moreno SK, Ritter MR, Friedlander M. Chapter 6 Ocular Models of Angiogenesis. *Methods Enzymol* 444: 115-158; 2008

Aguirre Ghiso JA. Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells *in vivo*. *Oncogene* 21: 2513–2524 (2002).

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* 331, 1480–1487 (1994).

Alon T. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med.* 1: 1024–1028 (1995).

An International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. The International Classification of Retinopathy of Prematurity Revisited. *Arch Ophthalmol.* 123:991–999 (2005).

Askari JA, Buckley PA, Mould AP, Humphries MJ. Linking integrin conformation to function. *J. Cell Sci.* 122: 165–170 (2009).

Balsara RD, Merryman R, Virjee F, Northway C, Castellino FJ, Ploplis VA. A deficiency of uPAR alters endothelial angiogenic function and cell morphology. *Vasc Cell.* 2011 May 2;3(1):10.

Bagley RG, Kurtzberg L, Weber W, Nguyen TH, Roth S, Krumbholz R, Yao M, Richards B, Zhang M, Pechan P, Schmid S, Scaria A, Kaplan J, Teicher BA. sFLT01: a novel fusion protein with antiangiogenic activity. *Mol Cancer Ther.* 2011 Mar;10(3):404-15

Bass R. Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82. *J. Biol. Chem.* 280: 14811–14818 (2005).

Behrendt N. A urokinase receptor-associated protein with specific collagen binding properties. *J. Biol. Chem.* 275: 1993–2002 (2000).

Behrendt N. The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence and glycosylation variants. *J. Biol. Chem.* 265: 6453–6460 (1990).

Behzadian MA, Wang XL, Windsor LJ, Ghaly N, Caldwell RB. TGFβ increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 853–859 (2001).

Behzadian MA, Windsor LJ, Ghaly N, Liou G, Nai-tse Tsai, Caldwell RB. VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor. *The FASEB Journal.* 17(6): 752–754 (2003).

Bene MC. CD87 (urokinase-type plasminogen activator receptor), function and pathology in hematological disorders: a review. *Leukemia* 18: 394–400 (2004).

Beschorner R. Lesion-associated accumulation of uPAR/CD87- expressing infiltrating granulocytes, activated microglial cells/macrophages and upregulation by endothelial cells following TBI and FCI in humans. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26: 522–527 (2000).

Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:932–943 (2002).

Brar VS, Sharma RK, Murthy RK, Chalam KV. Bevacizumab neutralizes the protective effect of vascular endothelial growth factor on retinal ganglion cells. *Mol Vis.* 2010 Sep 12;16:1848-53

Buchardt O, Egholm M, Berg RH, Nielsen PE. Peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology. *Trends Biotechnology.* 11: 384–386. (1993)

Busso N, Masur SK, Lazega D, Waxman S, Ossowski L. Induction of cell migration by prourokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells. *J. Cell Biol.* 126: 259–270 (1994).

Bussolino F, Mantovani A, Persico, G. Molecular mechanisms of blood vessels formation. *TIBS* (1998), 22, 251–256.



Capaccioli S, Del Rosso M, Fibbi G, Quattrone A. Antimessenger oligonucleotides and urokinase receptor reversion of the invasive phenotype of transformed human fibroblasts by antimessenger oligonucleotide inhibition of urokinase receptor gene expression. International Patent WO 96/03414, 08/02/1996.

Castellino FJ, Ploplis V. A. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb. Haemost.* 93: 647–654 (2005).

Chaurasia P. A region in urokinase plasminogen receptor domain III controlling a functional association with  $\alpha 5\beta 1$  integrin and tumor growth. *J. Biol. Chem.* 281: 14852–14863 (2006).

Claxton S, Fruttiger M. Role of arteries in oxygen induced vaso-obliteration. *Exp. Eye Res.* 77: 305–311 (2003).

Conese M.  $\alpha$ -2 macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein(LRP)-dependent internalization of the urokinase receptor. *J. Cell Biol.* 131: 1609–1622 (1995).

Connolly SE, Hores TA, Smith LE, D'Amore PA. Characterization of vascular development in the mouse retina. *Microvasc Res.* 36: 275–290 (1988).

Cruess AF, Zlateva G, Pleil AM, Wirostko B. Photodynamic therapy with verteporfin in age-related macular degeneration: a systematic review of efficacy, safety, treatment modifications and pharmacoeconomic properties. *Acta Ophthalmol.* 2009 Mar;87(2):118-32. Epub 2008 Jun 13.

Cunningham O. Dimerization controls the rapid raft partitioning of uPAR/CD87 and regulates its biological functions. *EMBO J.* 22: 5994–6003(2003).

Curatola AM, Moscatelli D, Norris A, Hendricks-Munoz K. Retinal blood vessels develop in response to local VEGF-A signals in the absence of blood flow. *Exp. Eye Res.* 81: 147–158 (2005).

Czekay RP, Kuemmel TA, Orlando RA, Farquhar MG. Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol. Biol. Cell* 12: 1467–1479 (2001).

D'Alessio S. Matrix metalloproteinase 12- dependent cleavage of urokinase receptor in systemic sclerosis microvascular endothelial cells results in impaired angiogenesis. *Arthritis Rheum.* 50: 3275–3285 (2004).

D'Amato R, Wesolowski E, Smith LE. Microscopic visualization of the retina by angiography with high-molecular-weight fluorescein labeled dextrans in the mouse. *Microvasc Res.* 1993;46:135–142.

Darland DC. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* 264: 275–288 (2003).

Das A, Boyd N, Jones TR, Talarico N, McGuire PG. Inhibition of Choroidal Neovascularization by a Peptide Inhibitor of the Urokinase Plasminogen Activator and Receptor System in a Mouse Model. *Arch Ophthalmol.* 122(12):1844-1849; 2004.

Das A, McLamore A, Song W, McGuire PG. Retinal neovascularization is suppressed with a MMP inhibitor. *Arch Ophthalmol.* 1999;117:498-503.

Das A, McGuire PG, Eriqat C, et al. Human neovascular membranes contain high levels of urokinase and metalloproteinase enzymes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:809-813

Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat. Rev.* 34: 122–136 (2008).

Degryse B, Resnati M, Czekay RP, Loskutoff DJ, Blasi F. Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic signaling activity: generation of a new integrin inhibitor. *J. Biol. Chem.* 280: 24792–24803 (2005).

Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, Margheri F, Serrati S. The plasminogen activation system in inflammation. *Front. Biosci.* 13: 4667–4686 (2008).

Demidov VV, Potaman VN, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchardt O, Sonnichsen SH, Nielsen PE. Stability of peptide nucleic acids in serum and cellular extracts. *Biochem. Pharm.* 48: 1310. (1994)

Deng G, Curriden S, Hu G, Czekay R, Loskutoff D. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J. Cell Physiol.* 189: 23–33 (2001).

Dublin E, Hanby A, Patel NK, Liebman R, Barnes D. Immunohistochemical expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in breast carcinoma. Fibroblastic expression has strong associations with tumor pathology. *Am. J. Pathol.* 157: 1219–1227 (2000) Dutcher JP. Mammalian target of rapamycin inhibition. *Clin. Cancer Res* 2004; 10:6382-6387

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 146: 1029-1039 (1995).

Efimov VA, Buryakova AA, Chakhmakhcheva OG. Synthesis of polyacrylamides N-substituted with PNA-like oligonucleotide mimics for molecular diagnostic applications. *NAR* 27: 4416-4426. (1999)

Efimov VA, Choob MV, Buryakova AA, Kalinkina AL, Chakhmakhcheva OG. Synthesis and evaluation of some properties of chimeric oligomers containing PNA and phosphono-PNA residues. *NAR* 26: 566-575. (1998)

Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B, Nielsen PE. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 365: 566-568. (1993)

Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE, Berg RH. Peptide Nucleic Acids, (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895-1897. (1992)

Ford KM, Saint-Geniez M, Walshe T, Zahr A, D'Amore PA. Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Dec 9;52(13):9478-87

Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis.* 10: 77–88 (2007).

Gariano RF, Hu D, Helms J. Expression of angiogenesis related genes during retinal development. *Gene Expr Patterns.* 6: 187–192 (2006)

Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 161: 1163–1177 (2007).

Gyetko MR. Urokinase receptor-deficient mice have impaired neutrophil recruitment in response to pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Immunol.* 165: 1513–1519 (2000).

Han B, Nakamura M, Mori I, Nakamura Y, Kakudo K. Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer. *Oncol. Rep.* 14: 105–112 (2005)

Harvey JC. et al. Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science* 258: 1481-1485. (1992)

Hillig T. A composite role of vitronectin and urokinase in the modulation of cell morphology upon expression of the urokinase receptor. *J. Biol. Chem.* 283: 15217–15223 (2008)

Higgins RD, Yan Y, Tadesse M, Yossuck P. Lack of effect of gender on retinopathy in the mouse. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2001 Oct;29(5):323-6

Hnik P, Boyer DS, Grillone LR, Clement JG, Henry SP, Green EA. Antisense oligonucleotide therapy in diabetic retinopathy. *J Diabetes Sci Technol.* 2009 Jul 1;3(4):924-30.

Hoyer-Hansen G. Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J. Biol. Chem.* 267: 18224–18229 (1992).

Hoyer-Hansen G, Ploug, M, Behrendt N, Ronne E, Dano K. Cell-surface acceleration of urokinase catalyzed receptor cleavage. *Eur. J. Biochem.* 243: 21–26 (1997).

Huai Q. Crystal structures of two human vitronectin, urokinase and urokinase receptor complexes. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15: 422–423 (2008).

Hughes S, Yang H, Chan-Ling, T. Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vision Sci.* 41: 1217–1228 (2000).

Jacobsen B, Ploug M. The urokinase receptor and its structural homologue C4.4A in human cancer: expression, prognosis and pharmacological inhibition. *Curr. Med. Chem.* 15: 2559–2573 (2008).

Kjoller L, Hall A. Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *J. Cell Biol.* 152:1145–1158 (2001).

Kozulin P, Natoli R, O'Brien KM, Madigan MC, Provis JM. Differential expression of anti-angiogenic factors and guidance genes in the developing macula. *Mol Vis* . 15: 45–59(2009).

Lester RD, Jo M, Montel V, Takimoto S, Gonias SL. uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J. Cell Biol.* 178: 425–436 (2007).

Liu D, Aguirre Ghiso J, Estrada Y, Ossowski L. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for *in vivo* growth of a human carcinoma. *Cancer Cell* 1: 445–457 (2002).

Llinas P. Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO J.* 24: 1655–1663 (2005).

Madsen CD, Ferraris GMS, Andolfo A, Cunningham O, Sidenius, N. uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *J. Cell Biol.* 177: 927–939 (2007).

Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, Mignatti P, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270: 9709-9716 (1995).

McGuire PG, Jones TR, Talarico N, Warren E, Das A. The urokinase/urokinase receptor system in retinal neovascularization: inhibition by Å6 suggests a new therapeutic target. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 6 vol.44: 2736-2742(2003)

Miyamoto K et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Induced Retinal Vascular Permeability Is Mediated by Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). *American Journal of Pathology*, Vol. 156, No. 5, May 2000

Moller LB, Pollanen J, Ronne E, Pedersen N, Blasi F. *N*-linked glycosylation of the ligand-binding domain of the human urokinase receptor contributes to the affinity for its ligand. *J. Biol. Chem.* 268: 11152–11159 (1993).

Mulamba GB, Hu A, Azad RF, Anderson KP, Coen DM. "Human Cytomegalovirus Mutant with Sequence-Dependent Resistance to the Phosphorothioate Oligonucleotide Fomivirsen (ISIS 2922)". *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42 (4): 971–3

Napoli KL, Taylor PJ. From beach to bedside: history of the development of sirolimus. *Thee Drug Monit* 2001;23:559-586 ; Dutcher JP. Mammalian target of rapamycin inhibition. *Clin. Cancer Res* 2004; 10:6382-6387

Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine substituted polyamide. *Science* 254: 1497-1500. (1991)

Norton JC, Piatyszek MA, Wright WE, Shay JW, Corey DR. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nature Biotech.* 14: 615-619. (1996)

Nykjaer A. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA: serpin complexes. *EMBO J.* 16: 2610–2620 (1997).

Nykjaer A. Urokinase receptor. An activation antigen in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 152: 505–516 (1994).

Online U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health. San Francisco: FDA approves fomivirsen, famciclovir, and thalidomide. Food and Drug Administration; 1998

Orum H., Nielsen PE, Jorgensen M, Larsson C, Stanley C, Koch T. Sequence specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection. *BioTechniques* 19: 472-480. (1995)

Ozaki H. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 156: 697–707 (2000).

Paysse EA. Retinopathy of prematurity. UpToDate Online. Available at <http://www.uptodate.com/home/index.html>. Accessed November 3, 2009.

Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 27: 331–371 (2008).

Peffer NJ, Hanvey JC, Bisi JE, Thomso SA, Hassman CF, Noble SA, Babiss LE. Strand invasion of duplex DNA by peptide nucleic acid monomers. *PNAS* 90: 10648-10652. (1993)

Pierce E.A., Avery R. L., Foley E. D., Aiello L. P. & Smith L. E. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse

model of retinal neovascularization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92: 905–909 (1995).

Plesner T. Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue. *Am. J. Clin. Pathol.* 102: 835–841 (1994).

Prager G. W. Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor. *Circ. Res.* 94: 1562–1570 (2004).

Prasad P.S., Schwartz S.D., Hubschman J.P. Age-related macular degeneration: Current and novel therapies. *Maturitas.* 66:46-50 (2010).

Provis J. M. Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression. *Exp. Eye Res.* 65: 555–568 (1997).

Rakic JM, Lambert V, Munaut C, et al. Mice without uPA, tPA, or plasminogen genes are resistant to experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1732-1739.

Rasch M. G., Lund I. K., Almasi C.E., Hoyer-Hansen G. Intact and cleaved uPAR forms: diagnostic and prognostic value in cancer. *Front. Biosci.* 13: 6752–6762 (2008).

Resnati M. The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99: 1359–1364 (2002).

Romer J. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is expressed by keratinocytes at the leading edge during re-epithelialization of mouse skin wounds. *J. Invest. Dermatol.* 102: 519–522 (1994).

Sandercoe T.M., Geller S.F., Hendrickson A.E., Stone J., Provis J.M. VEGF expression by ganglion cells in central retina before formation of the foveal depression in monkey retina: evidence of developmental hypoxia. *J Comp Neurol.*; 462: 42–54 (2003).

Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fukikado T. Simultaneous analyses of vitreous levels of 27 cytokines in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology.* 116:2165–2169 (2009).

Schiller HB, Szekeres A, Binder BR, Stockinger H, Leksa V. Mannose 6-phosphate/ insulin-like growth factor 2 receptor limits cell

invasion by controlling  $\alpha V\beta 3$  integrin expression and proteolytic processing of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Mol. Biol. Cell* 20: 745–756 (2009).

Shen J, Xie B, Hatara CM, Hackett SF, Campochiaro PA. Vegf or EphA2 antisense polyamide-nucleic acids; vascular localization and suppression of retinal neovascularization. *Mol Ther.* 15(11):1924-30 (2007).

Shetty S. Regulation of urokinase receptor mRNA stability by hnRNP C in lung epithelial cells. *Mol. Cell Biochem.* 272: 107–118 (2005).

Siddiqui MA, Keating GM. Pegaptanib: in exudative age-related macular degeneration. *Drugs.* 65(11):1571-7 (2005).

Sidenius N, Andolfo A, Fesce R, Blasi F. Urokinase regulates vitronectin binding by controlling urokinase receptor oligomerization. *J. Biol. Chem.* 277: 27982–27990 (2002).

Sidenius N, Sier CF, Blasi F. Shedding and cleavage of the urokinase receptor (uPAR): identification and characterisation of uPAR fragments *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett.* 475: 52–56 (2000).

Sitrin RG, Todd RF, Albrecht E, Gyetko MR. The urokinase receptor (CD87) facilitates CD11b/CD18-mediated adhesion of human monocytes. *J. Clin. Invest.* 97: 1942–1951 (1996).

Smith HW, Marra P, Marshall CJ. UPAR promotes formation of the p130Cas-CRK complex to activate Rac through DOCK180. *J. Cell Biol.* 182: 777–790 (2008).

Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR. *Molecular cell biology.* 11: 23-36 (2010)

Solberg H. Identification and characterization of the murine cell surface receptor for the urokinase-type plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.* 205: 451–458 (1992).

Solberg H, Ploug M, Hoyer-Hansen G, Nielsen BS, Lund LR. The murine receptor for urokinase-type plasminogen activator is primarily expressed in tissues actively undergoing remodeling. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 237–246 (2001).

Stein CA. Keeping the biotechnology of antisense in context. *Nature Biotech.* 17: 209(1999)



Stone J, Maslim J. Mechanisms of Retinal Angiogenesis. *Prog. Retinal Eye Res.* 16: 157–181 (1997).

Stone J. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J. Neurosci.* 15: 4738–4747 (1995).

Sturge J, Wienke D, East L, Jones GE, Isacke CM. GPI-anchored uPAR requires Endo180 for rapid directional sensing during chemotaxis. *J. Cell Biol.* 162: 789–794 (2003).

Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y, King AG, Levin R, Campochiaro PA. The Multi-targeted Kinase Inhibitor Pazopanib Causes Suppression and Regression of Choroidal Neovascularization. *Arch Ophthalmol.* 2009 April; 127(4): 494–499.

Tang CH, Hill ML, Brumwell AN, Chapman HA, Wei Y. Signaling through urokinase and urokinase receptor in lung cancer cells requires interactions with  $\beta$ 1 integrins. *J. Cell Sci.* 121: 3747–3756 (2008).

Tarui T, Mazar AP, Cines DB, Takada Y. Urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87) is a ligand for integrins and mediates cell-cell interaction. *J. Biol. Chem.* 276: 3983–3990 (2001).

The International Classification of Retinopathy of Prematurity Revisited (ICROP). An International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. *Arch Ophthalmol.* 123: 991–999 (2005).

Tolentino MJ, Brucker AJ, Fosnot J, Ying GS, Wu IH, Malik G, Wan S, Reich SJ. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina.* 2004 Feb;24(1):132-8

Tran H, Maurer F, Nagamine Y. Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7177–7188 (2003).

Uhrin P, Breuss JM. uPAR: a modulator of VEGF-induced angiogenesis. *Cell Adh Migr.* 2013 Jan-Feb;7(1):23-6

Uszynski M, Perlik M, Uszynski W, Zekanowska E. Urokinase plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in gestational tissues:

Measurements and clinical implications. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 114: 54–58 (2004).

Van der Laan AC, Stomberg R, van Boom JH, Kuyl-Yeheskiely, Efimov VA, Chakhmakheva OG. An approach towards the synthesis of oligomers containing a N-2-Hydroxethyl-aminomethylphosphonate backbone: A novel PNA analogue. *Tetrahedron Lett.* 37: 7857-7860. (1996)

Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization—verteporfin in photodynamic therapy report 2. *Am J Ophthalmol.* 131: 541–60 (2001).

Wahlberg K, Hoyer-Hansen G, Casslen B. Soluble receptor for urokinase plasminogen activator in both full-length and a cleaved form is present in high concentration in cystic fluid from ovarian cancer. *Cancer Res.* 58: 3294–3298 (1998).

Wang Y. Identification of a novel nuclear factor- $\kappa$ B sequence involved in expression of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Eur. J. Biochem.* 267: 3248–3254 (2000).

Webb DJ, Nguyen DH, Gonias SL. Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion. *J. Cell Sci.* 113: 123–134 (2000).

Wei C. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nature Med.* 14: 55–63 (2008).

Wei Y. Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J. Biol. Chem.* 269: 32380–32388 (1994).

Wei Y. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 273: 1551–1555 (1996).

Wei Y., Yang X., Liu Q., Wilkins J.A., Chapman H.A. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J. Cell Biol.* 144: 1285–1294 (1999).

Wilhelm O. Recombinant soluble urokinase receptor as a scavenger for urokinase-type plasminogen activator (uPA). Inhibition of proliferation and invasion of human ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* 337: 131–134 (1994).

Wilhelm O.G. Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J. Cell Physiol.* 180: 225–235 (1999).

Yancopoulos G.D. Clinical Application of Therapies Targeting VEGF. *Cell.* 143: 13-16 (2010).

Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., Holash, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407, 242-248 (2000)

Zhang K, Zhang L, Weinreb RN. Ophthalmic drug discovery: novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma. *Nature Reviews Drug Discovery* 11, 541-559 (2012)

## **Ringraziamenti**

Ringrazio il Dott. Fabrizio Giansanti per avermi guidato nell'impostazione di questa tesi ed il Professor Ugo Menchini per avermi dato l'opportunità di fare questa ricerca sperimentale.

Desidero ringraziare il Dott. Matteo Lulli per il fondamentale aiuto nella realizzazione degli esperimenti e di parte della tesi nonché Prof. Sergio Capaccioli per la collaborazione effettuata.

Ringrazio inoltre la d.ssa Irene Ponzuoli e il dott. Massimo Dal Monte per il loro importante contributo nella realizzazione di parte degli esperimenti.

Un grazie particolare al dott. Edoardo Nassini per avermi aiutato nelle complesse procedure per la realizzazione e messa a punto del modello murino di CNV.

Grazie a tutti coloro che hanno lavorato al mio fianco in questi tre anni di dottorato.