

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

**Scuola Di Dottorato in Biomedicina**

CICLO: XXIII

***STUDIO DI POLIMORFISMI IN GENI COINVOLTI IN  
PATOLOGIE OCULARI ANGIOPROLIFERATIVE***

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Giorgio Palù

**Supervisore :**Ch.mo Prof. Carlo Foresta

**DOTTORANDA :** Genny Buson

*Ai miei genitori ...*

---

## RIASSUNTO

Le patologie oculari angioproliferative sono malattie multifattoriali, tutte caratterizzate da una progressiva degenerazione delle cellule della regione maculare della retina, quella che permette la visione centrale e distinta. Ciò comporta che le persone affette da queste patologie perdano gradualmente la visione ad “alta definizione” garantita dalla macula.

La causa più frequente di degenerazione maculare è la patologia detta *degenerazione maculare legata all'età (AMD)* che interessa solitamente persone al di sopra dei 50 anni ed è la principale causa di cecità legale nella popolazione anziana. La macula può essere interessata da patologia anche nell'ambito della retinopatia diabetica (DR); la presenza di essudati e l'accumulo di liquido che fuoriesce dai capillari, determinando una condizione chiamata edema maculare, costituiscono la più comune causa di perdita della funzione visiva nei pazienti diabetici.

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ed il recettore KDR (kinase insert domain receptor) regolano l'angiogenesi e quindi sono considerati importanti fattori coinvolti nel processo patologico che porta all'insorgenza delle patologie oculari di origine angioproliferative.

Nella prima parte dello studio è stato eseguito un'analisi di associazione tra polimorfismi presenti nei geni VEGF ed il suo recettore KDR e insorgenza di patologie angioproliferative come l'AMD e DR.

Per questo scopo abbiamo analizzato 16 polimorfismi (11 sul gene VEGF e 5 sul gene KDR) in una popolazione di 226 pazienti affetti da AMD, una popolazione di 177 pazienti affetti da DR e una popolazione di controllo di 240 soggetti sani.

L'analisi dei polimorfismi è stata effettuata mediante GenomeLab SNPstream (Beckman Coulter) che permette una genotipizzazione su larga scala.

I risultati ottenuti in questa prima parte hanno evidenziato una forte associazione tra alcuni polimorfismi di VEGF-A e, per la prima volta, KDR con la suscettibilità all'insorgenza alle patologie oculari di origine neovascolare.

Uno studio recente ha dimostrato che il CCR3 (C-C chemokine receptor type 3) e i corrispettivi ligandi eotassina 1,2,3 sono espressi a livello oculare solo in soggetti affetti da AMD di tipo neovascolare (AMD-CNV) e non in altri tipi di patologie oculari e in soggetti sani. Pertanto, nella seconda parte dello studio abbiamo analizzato, per la prima volta, se polimorfismi a singolo nucleotide nei geni CCR3 ed eotassina 1 (CCL11), eotassina 2 (CCL24), eotassina 3 (CCL26) sono associati all'insorgenza di AMD e DR.

---

Per questo scopo abbiamo analizzato 46 polimorfismi (14 sul gene CCR3, 8 sul gene CCL11, 4 sul gene CCL26, 11 sul gene VEGF-A e 4 sul gene KDR) in 283 pazienti affetti da AMD, 175 pazienti affetti da DR e una popolazione di controllo di 262 soggetti sani.

L'analisi dei polimorfismi è stata effettuata mediante BeadXpress di Illumina, un sistema high-throughput a scansione laser dual-color che consente di analizzare un'ampia varietà di saggi in multiplex sviluppati usando la tecnologia digitale a microbeads VeraCode.

Quest'ultima tecnologia è stata inoltre utilizzata per confermare l'associazione del pathway VEGF-KDR con l'AMD e DR ampliando il numero di SNP studiati in questi due geni.

L'analisi delle frequenze alleliche e genotipiche dei geni CCR3, eotassine 1,2,3 tra i gruppi dei pazienti AMD e DR ed il gruppo di controllo non ha evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa.

Questi risultati portano ad ipotizzare che il pathway CCR3/eotassina 1,2,3, svolga un ruolo secondario nei processi fisiopatologici che portano all'insorgenza delle patologie oculari angioproliferative.

Abbiamo invece confermato nuovamente l'associazione del pathway VEGF/KDR allargando le attuali conoscenze sul ruolo di questo fattore di crescita nella fisiopatologia di tali patologie e dimostrando un contributo genetico nella suscettibilità all'insorgenza dell'AMD e DR.

L'approfondita conoscenza di tali meccanismi potrebbe costituire la base per poter determinare il rischio di sviluppare la patologia e comprenderla nel suo insieme per permettere l'identificazione e la sintesi di farmaci innovativi.

Infatti soggetti portatori di alleli di rischio o non di rischio potrebbero rispondere in maniera diversa alla terapia o potrebbero essere necessarie diverse quantità di farmaco anti-VEGF (attualmente utilizzato nella terapia di queste patologie) per aumentarne l'efficacia.

---

## ABSTRACT

The ocular angioproliferative diseases are multifactorial diseases, characterized by a progressive degeneration of cells in the macular region of the retina which permit distinct and central vision. This means that people with these diseases gradually lose their "high definition" vision guaranteed by the macula.

The most frequent cause of macular degeneration is the age-related macular degeneration (AMD), which usually affects people older than 50 years and is the leading cause of legal blindness in the elderly population. The macula may also be affected by pathology in diabetic retinopathy (DR); the presence of exudates and accumulation of fluid leaking from the capillaries, causing a condition called macular edema, are the most common cause of loss of visual function in diabetic patients.

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and the receptor KDR (kinase insert domain receptor) regulate angiogenesis and therefore considered important factors involved in the pathological process that leads to the onset of ocular angioproliferative disease.

In the first part, an association study between polymorphisms in the VEGF and its receptor KDR genes and onset of ocular diseases such as AMD and DR, has been performed.

For this purpose we analyzed 16 polymorphisms (11 in the VEGF gene and 5 on the gene KDR) in a population of 226 patients with AMD, 177 patients with diabetic retinopathy and a control population of 240 healthy subjects.

All the SNPs were analyzed by GenomeLab SNPStream DNA microarray technology (Beckman Coulter) that allows a large-scale genotyping.

The results obtained in this first part showed a strong association between some polymorphisms of VEGF-A and, for the first time, KDR with susceptibility to the onset of ocular angioproliferative disease.

A recent study showed that the CCR3 (CC chemokine receptor type 3) and corresponding ligands eotaxin 1,2,3 are expressed only in the endothelial cells lining the abnormal blood vessels of CNV from people with wet AMD and not in choroidal endothelium from people without AMD, or from those with dry AMD or other types of choroidal or retinal disorder.

Therefore, in the second part of the study we have analyzed, for the first time, if single nucleotide polymorphisms in the genes CCR3 and eotaxin 1 (CCL11), eotaxin 2 (CCL24), eotaxin 3 (CCL26) are associated with the onset of AMD and DR.

---

For this purpose we selected 46 polymorphisms (14 in the CCR3 gene, 8 in the gene CCL11, 4 in the CCL26 gene, 11 in the VEGF-A gene and 4 in the KDR gene) in 283 patients with AMD, 175 patients with diabetic retinopathy and control population of 262 healthy subjects.

Genotyping analysis was performed using the Illumina BeadXpress, a high-throughput, dual-color laser detection system that enables scanning of a broad range of multiplexed assays developed using the VeraCode digital microbead technology.

This technology was also used to confirm the association of VEGF-KDR pathway with AMD and DR extending the number of SNPs studied in these two genes.

The analysis of allele and genotype frequencies of the CCR3 and eotaxins genes between groups of patients AMD and DR and the control group did not show any statistically significant difference.

Instead, we again confirmed the importance of VEGF / KDR pathway, expanding the current knowledge on the role of this growth factor in pathophysiology of these diseases and demonstrating a genetic contribution in susceptibility to the onset of AMD and DR.

The in-depth knowledge of these mechanisms could provide the basis to determine the risk of developing the disease and understand its entirety to allow the identification and synthesis of new drugs.

In fact, carriers of risk alleles or non-risk may respond differently to therapy or may require different amounts of anti-VEGF (currently used in the treatment of these diseases) to increase its effectiveness.

## INDICE

INTRODUZIONE I .....	1
DEGENERAZIONE MACULARE LEGATA ALL'ETA' (AMD) .....	1
Definizione .....	1
Cause, incidenza e fattori di rischio.....	1
Sintomi .....	2
Evoluzione e prognosi .....	2
RETINOPATIA DIABETICA (DR) .....	3
Definizione .....	3
Cause, incidenza e fattori di rischio.....	3
Sintomi .....	3
L' ANGIOGENESI.....	5
Angiogenesi fisiologica e patologica.....	5
Fattori angiogenici .....	5
Mediatori diretti dell'angiogenesi: il VEGF .....	6
Recettori del VEGF .....	6
Angiogenesi patologica in oftalmologia.....	8
CORRELAZIONE TRA POLIMORFISMI NEL PATHWAY .....	10
VEGF/KDR E PATOLOGIE OCULARI ANGIOPROLIFERATIVE.....	10
SCOPO DELLA TESI I.....	12
MATERIALI E METODI I .....	13
Selezione della casistica .....	13
Estrazione del DNA genomico da sangue intero.....	13
Selezione dei polimorfismi.....	14
Disegno dei primers.....	15
Multiplex PCR e Clean-up .....	17
Reazione di estensione.....	18
Reazione di ibridazione .....	19
Analisi della piastra .....	20
Analisi statistica.....	21
RISULTATI I .....	22
DISCUSSIONE I.....	26

INTRODUZIONE II.....	28
CHEMOCHINE .....	28
Caratteristiche strutturali .....	28
Funzioni .....	29
Caratteristiche strutturali e trasduzione del segnale .....	30
Recettore per le chemochine CCR3.....	31
Il CCR3 potrebbe essere considerato come nuovo target associato alle patologie oculari angioproliferative?.....	32
SCOPO DELLA TESI II .....	34
MATERIALI E METODI II.....	35
Selezione della casistica .....	35
Selezione dei polimorfismi.....	35
Progettazione dell'OPA (Oligo Pool Assay).....	37
Biotinilizzazione del DNA genomico .....	37
Immobilizzazione del DNA biotinilato e annealing con l'OPA.....	38
Reazione di estensione e di ligazione .....	39
Reazione di PCR.....	39
Reazione di ibridazione .....	40
Analisi della piastra .....	40
Analisi statistica.....	41
RISULTATI II.....	42
DISCUSSIONE II.....	45
REFERENCES .....	48



## **INTRODUZIONE I**

### **DEGENERAZIONE MACULARE LEGATA ALL'ETA' (AMD)**

#### **Definizione**

Malattia degenerativa, tipica dell'età avanzata, che interessa la parte centrale della retina chiamata macula, deputata alla visione distinta degli oggetti. <sup>(1)</sup>

#### **Cause, incidenza e fattori di rischio**

La degenerazione maculare legata all'età è, nei paesi industrializzati, la principale causa di cecità legale nei soggetti con età superiore a 50 anni.

Non esiste una causa specifica di questo tipo di lesione, anche se i processi di invecchiamento, i danni prodotti dall'esposizione alla luce ed alterazioni vascolari e circolatorie concorrono alla formazione delle lesioni tipiche di questa malattia. <sup>(2)</sup>

Sono state classificati due principali tipi di degenerazione maculare senile:

- forma secca o atrofica
- forma umida o essudativa o neovascolare

\* La manifestazione clinica più precoce è rappresentata dalle drusen: presenza di piccoli depositi rotondeggianti giallastri di sostanze derivate da un alterato metabolismo delle cellule retiniche. La vista nella maggioranza dei casi rimane buona ma può peggiorare se evolve verso una delle due principali forme di maculopatia.

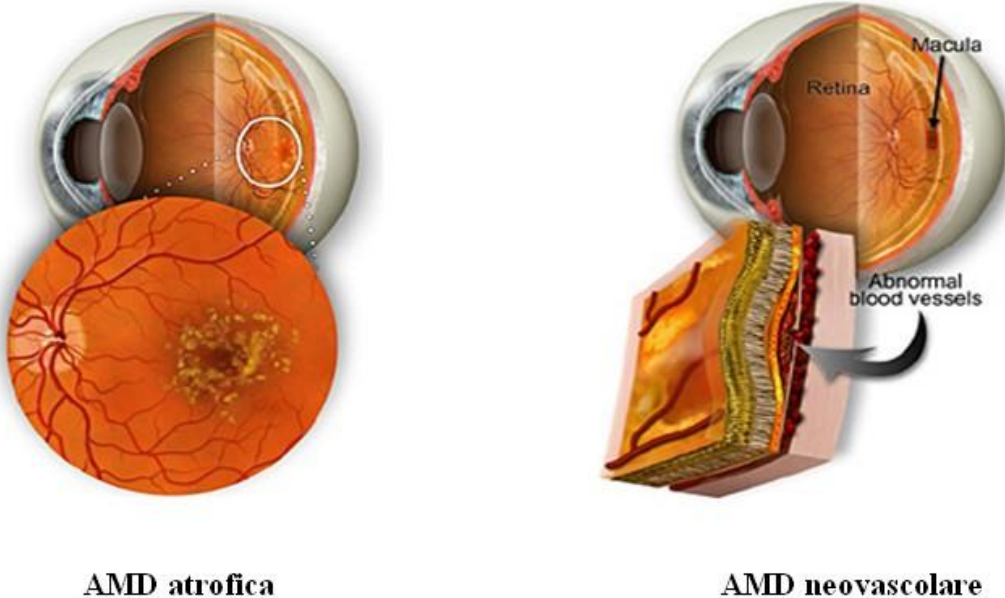
Quindi, la forma non essudativa o atrofica; è il tipo più comune di degenerazione maculare legata all'età. Si forma un'area circolare biancastra per atrofia dell'epitelio pigmentato (strato di cellule che riveste esternamente la retina con funzione di regolazione del nutrimento e di rinnovo della stessa) e della coriocapillare (importante struttura vascolare che fornisce nutrimento alla retina). La funzionalità visiva è relativamente conservata e l'evoluzione è lenta.

\* La forma essudativa è caratterizzata dalla neovascolarizzazione coroideale: quest'ultima è la formazione di vasi anomali, che provengono dalla coriocapillare, al di sotto dell'epitelio pigmentato della retina. I neovasi determinano essudazione (fuoriuscita di liquido negli spazi extravasali) o emorragie con gravi conseguenze per la vista, che può ridursi in modo grave ed improvviso (Fig.1). <sup>(3)</sup>

## Sintomi

I sintomi principali sono:

- \* **Metamorfopsie:** sono distorsioni delle immagini dovute al sollevamento della retina per l'essudazione e/o la proliferazione dei neovasi;
- \* **Riduzione visiva o comparsa di scotomi:** la riduzione visiva può essere di vario grado e più o meno rapida a seconda del tipo di lesione e della sua sede; gli scotomi sono aree in cui la visione è molto ridotta o assente (di solito il paziente percepisce una macchia scura più o meno densa in posizione centrale o paracentrale).



**AMD atrofica**

**AMD neovascolare**

**Fig.1:** (sinistra) Le drusen, che consistono in depositi giallastri distribuiti al di sotto della retina, rappresentano comunemente dei segni precoci della degenerazione maculare di tipo atrofico (destra) la forma neovascolare è caratterizzata da una neovascolarizzazione sottoretinica a partenza coroideale associata o meno ad un distacco sieroso dell'epitelio pigmentato.

## Evoluzione e prognosi

Le drusen sono un reperto molto frequente quando si osserva la retina di una persona anziana; nella maggior parte dei casi rimangono stazionarie e la vista è buona o solo lievemente ridotta.

Talvolta possono evolvere nelle due forme di maculopatia: quella atrofica evolve molto lentamente e lascia una visione relativamente buona, mentre quella essudativa può evolvere velocemente e la vista risulta essere compromessa. <sup>(4)</sup>

## **RETINOPATIA DIABETICA (DR)**

### **Definizione**

La retinopatia diabetica è una patologia retinica causata dalle alterazioni dei piccoli vasi ematici a cui vanno incontro i pazienti affetti da diabete, sia nelle forme di diabete non insulino-dipendente (tipo 2), sia nel diabete insulino-dipendente (tipo 1) nelle quali le complicanze oculari sono frequenti e potenzialmente gravi.<sup>(5)</sup>

### **Cause, incidenza e fattori di rischio**

L'incidenza della retinopatia è andata crescendo in relazione all'aumento della durata media della vita del diabetico ed è passata dal 15% di 50-60 anni fa al 50% e più degli ultimi anni. I pazienti diagnosticati come diabetici prima dei 30 anni di età presentano una retinopatia diabetica nel 50% dei casi dopo 10 anni e ben del 90% dopo 30 anni. Il rischio di cecità è di circa 25 volte maggiore nei diabetici rispetto ai non diabetici.

L'instaurazione e l'evoluzione della retinopatia sono secondarie alle anomalie endocrino-metaboliche della malattia, legate alla componente genetica e ad altri fattori di rischio: superalimentazione, obesità, ipertensione arteriosa, anemia, vita sedentaria, etc.

La malattia diabetica produce alterazioni delle pareti dei capillari retinici, con fuoriuscita di liquido dalle pareti alterate (formazione di edema retinico: accumulo di liquidi nello spessore della retina), ed alterazioni occlusive, con conseguente sofferenza dei tessuti per ridotto apporto ematico (ischemia retinica).<sup>(6)</sup>

### **Sintomi**

La retinopatia diabetica (RD) si può schematicamente suddividere in:

- RD non proliferante
- RD proliferante

La RD non proliferante è caratterizzata da varie lesioni retiniche che nella fase iniziale della malattia costituiscono la cosiddetta "retinopatia diabetica "background":

\* microaneurismi (piccole dilatazioni dei vasi retinici);

\* emorragie retiniche;

\* essudati duri (piccoli depositi lipidici giallastri secondari all'edema retinico).

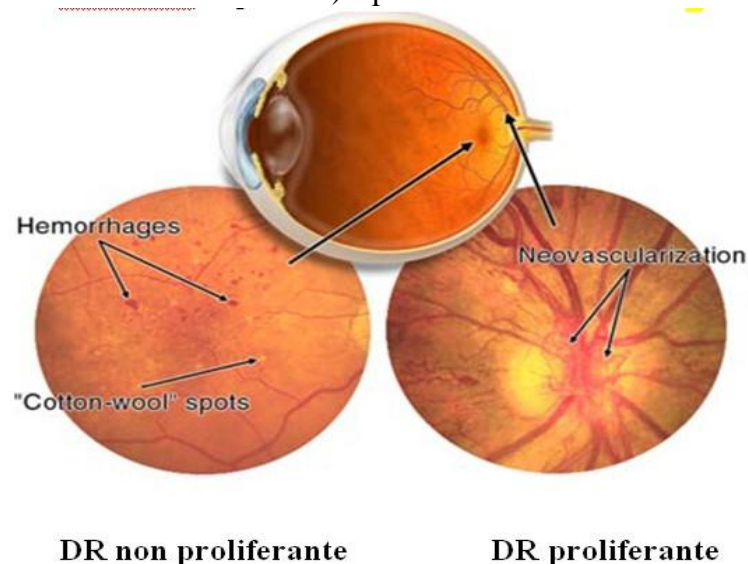
In questa fase si possono avere alterazioni della regione maculare (la parte centrale della retina, molto importante per la visione), che causano una riduzione visiva più o meno grave.

Quando le alterazioni ischemiche si fanno più accentuate si ha la cosiddetta "retinopatia diabetica pre-proliferante" caratterizzata da:

- \* noduli cotonosi: detti anche essudati molli, rappresentano alterazioni ischemiche delle fibre nervose retiniche;
- \* anomalie microvascolari intraretiniche: dilatazioni anomale dei capillari retinici;
- \* alterazioni venose: vene di calibro irregolare;
- \* assottigliamento e occlusione delle arteriole;
- \* infarti emorragici: caratterizzati da emorragie retiniche rotondeggianti di colore scuro.

L'ischemia retinica porta alla produzione di sostanze che stimolano la crescita di vasi anomali (neovasi): la RD proliferante è caratterizzata dalle seguenti alterazioni:

- \* neovascolarizzazione: i neovasi, che possono essere retinici e/o papillari (cioè formarsi a livello della testa del nervo ottico, che è detta papilla) sono fragili e possono sanguinare o formare delle aderenze tenaci con il corpo vitreo ed esercitare una trazione sul delicato tessuto retinico;
- \* emorragie vitreali: il sanguinamento dei neovasi può essere improvviso e abbondante causando un rapido e grave calo della vista;
- \* distacco retinico: le trazioni esercitate sulla retina dal tessuto fibrovascolare che avvolge i neovasi e dai coaguli vitreali, producono sollevamenti del tessuto retinico (distacco retinico trazionale) e possono lacerare la retina stessa (Fig. 2).<sup>(7)</sup>



**Fig.2:** (sinistra) I vasi alterati presentano zone di indebolimento, con dilatazione della parete (microaneurismi) e possono sanguinare producendo emorragie retiniche. Successivamente possono crearsi edema e/o ischemia.  
(destra) Nella fase proliferativa i capillari anomali si sviluppano, stimolati dalla occlusione dei piccoli vasi retinici. A questo punto si possono verificare emorragie, anche gravi, per rottura dei capillari neoformati, e la formazione di tessuto fibroso che contraendosi può esercitare una trazione sulla retina fino a distaccarla.

Le patologie oculari angioproliferative sono considerate malattie multifattoriali in cui interagiscono sia fattori ambientali sia genetici.

Sebbene il rischio di sviluppare AMD o RD aumenta in presenza di diversi fattori di rischio come l'ipertensione, i dismetabolismi, l'obesità e il fumo di sigaretta, esistono numerose indicazioni che suggeriscono che l'occorrenza o la progressione di queste malattie dipendono anche da fattori genetici. <sup>(8), (9)</sup>

## **L' ANGIOGENESI**

L'angiogenesi si riferisce al processo di rimodellamento del tessuto vascolare caratterizzato dalla diramazione di un nuovo vaso sanguigno da un vaso preesistente. Essa è una tappa di fondamentale importanza in molti processi sia fisiologici - come la normale crescita e differenziazione di un tessuto nell'embriogenesi e nello sviluppo fetale - sia patologici - come nella riparazione di un danno tissutale e nel processo di guarigione cicatriziale delle ferite. Il core della complessa biologia cellulare dell'angiogenesi è custodito nella cellula endoteliale che prolifera e si differenzia sotto l'azione regolatoria del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) che è il principale induttore diretto dell'angiogenesi insieme ad altri cofattori di crescita solubili alcuni dei quali hanno effetti biologici ancora poco chiari. <sup>(10)</sup>

### **Angiogenesi fisiologica e patologica**

L'angiogenesi e l'attivazione dell'endotelio possono avvenire in condizioni fisiologiche e patologiche. L'angiogenesi fisiologica, mediata dal VEGF, è un fenomeno naturale che regola proliferazione, rigenerazione e fenestrazione dell'endotelio vascolare; essa avviene durante lo sviluppo embrionale e fetale, nella vita adulta dove nelle donne è attiva durante l'ovulazione e la formazione del corpo luteo, e nel processo di cicatrizzazione delle ferite in cui è fondamentale il ruolo sia del VEGF che del FGF-2.

L'angiogenesi patologica invece comporta la crescita incontrollata di microvasi in differenti tessuti affetti da malattia (tumori, flogosi cronica, psoriasi, arteriosclerosi, e artrite reumatoide). <sup>(11)</sup>

### **Fattori angiogenici**

Sono state identificate, in diversi modelli *in vivo* ed *in vitro*, numerose molecole coinvolte nell'induzione dell'angiogenesi: il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), l'Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF), il basic FGF (bFGF), il Transforming Growth Factor (TGF)- $\alpha$ , il TGF- $\beta$ , l'Hepatocyte Growth Factor (HGF),

il Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ , l'angiogenina, l'interleuchina-8 (IL-8), ed altri. Tuttavia per alcuni di questi fattori non è stato possibile dimostrare una correlazione diretta con processi fisiologici e/o fisiopatologici, ma solo un'azione indiretta sul rilascio di sostanze ad attività angiogenica intrinseca.<sup>(11)</sup>

### **Mediatori diretti dell'angiogenesi: il VEGF**

Sono stati identificati 7 geni strutturalmente correlati a VEGF i cui prodotti sono conosciuti come PlGF (Placental Growth Factor), VEGF-A (o VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F. La proteina più importante di questa categoria è il VEGF-A, in origine chiamato VEGF prima della scoperta delle altre proteine di questa famiglia.

Le differenze strutturali che caratterizzano le diverse isoforme della proteina VEGF-A sono il risultato di uno splicing alternativo dell'mRNA trascritto da un singolo gene composto da 8 esoni. Il trascritto viene codificato col termine VEGF<sub>xxx</sub>: a seconda del numero di amminoacidi. La ricombinazione dei suoi 8 esoni può portare alla strutturazione di proteine simili ma ognuna con peculiari caratteristiche e funzioni, come la regolazione dell'attività pro e antiangiogenetica e l'interazione con altre macromolecole (eparan solfato, proteoglicani, ecc.).

Tra le diverse isoforme di VEGF-A, rispettivamente di 206, 189, 165 e 121 aminoacidi, la forma VEGF<sub>165</sub> è presente in tutte le cellule che producono VEGF e rappresenta la specie molecolare predominante. Inoltre è l'isoforma maggiormente implicata nella neovascolarizzazione sottoretinica.<sup>(12)</sup>

### **Recettori del VEGF**

L'angiogenesi è controllata da segnali paracrini rappresentati per la maggior parte da ligandi proteici che si fissano, modulandone l'attività, su recettori tirosin-kinasi trans membrana.

Il VEGF umano ha una forte affinità di legame con 3 classi di recettori della famiglia delle tirosin-kinasi identificati sulle membrane delle cellule endoteliali, il cui legame condiziona la cascata pro-angiogenica. Come membri della famiglia delle tirosin-kinasi ciascun recettore è organizzato in tre domini, una regione extracellulare costituita da sette domini extracellulare simili alle immunoglobuline (Ig-like), una regione transmembrana ad una regione intracellulare responsabile dell'attività tirosin kinasica.

Le tre classi di recettori del VEGF sono riassunte in Tab. 1

RECETTORE	ATTIVITA'	LIGANDI	ESPRESSIONE
<b>VEGFR-1</b> (Flt-1)	Stimola lo sviluppo angiogenetico a livello embrionale e migrazione di periciti, fibrocellule muscolari lisce necessari per l'assemblaggio e la maturazione di un neovascolo stabile.	VEGF-A (VEGF) VEGF-B PlGF	periciti fibrocellule muscolari lisce endoteliali
<b>VEGFR-2</b> (Flk-1/KDR)	Media la maggior parte degli effetti angiogenetici in seguito al legame con VEGF.	VEGF-A VEGF-C VEGF-D VEGF-E	cellule endoteliali, tumorali e nei monociti
<b>VEGFR-3</b> (o Flt-4)	Promuove la linfangiogenesi.	VEGF-C VEGF-D	Cellule endoteliali linfatiche e

**Tab.1:** Le tre classi di recettori del VEGF.

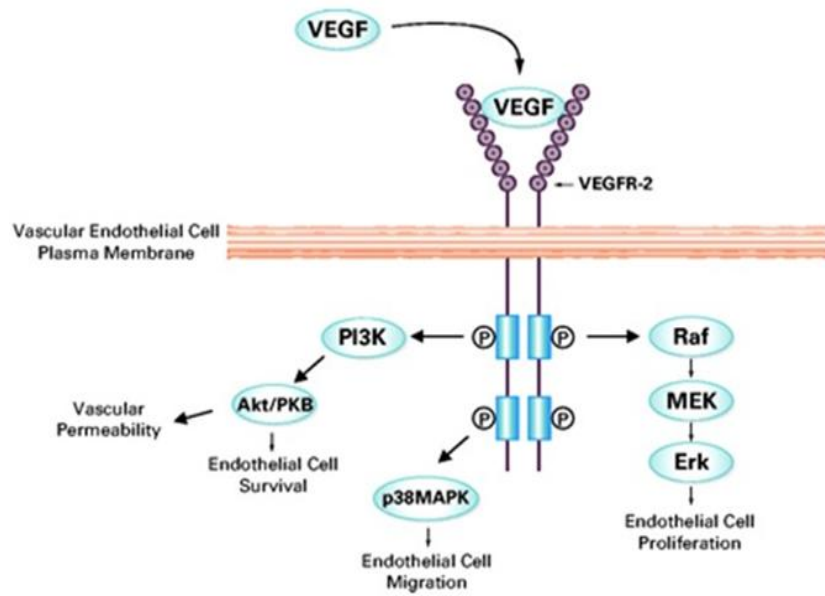
Gli effetti biologici di VEGF sono diversi a seconda del tipo di recettore con il quale interagisce. I tre recettori, benché fortemente omologhi, attivando vie di trasduzione distinte, trasmettono infatti segnali diversi alle cellule endoteliali.

Recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 sono associate con angiogenesi e VEGFR-3 è invece associato con la linfangiogenesi.

L'interazione del VEGF-A con il KDR (Kinase insert Domain Receptor) è fondamentale per mediare l'azione angiogenica ed è seguita da proliferazione delle cellule endoteliali, mentre nessun effetto mitogeno scaturisce dal legame del VEGF con VEGFR1 che invece sembra determinare una migrazione di periciti e fibrocellule muscolari lisce necessari per l'assemblaggio e la maturazione di un neovascolo stabile.

In particolare, interazione VEGF-A/KDR provoca permeabilità microvascolare, proliferazione (Raf pathway), sopravvivenza (PI3K pathway) e migrazione (p38MAPK pathway) delle cellule endoteliali. <sup>(13)</sup> Tutti questi segnali intracellulari potrebbero promuovere l'angiogenesi tumorale. (Fig. 3)

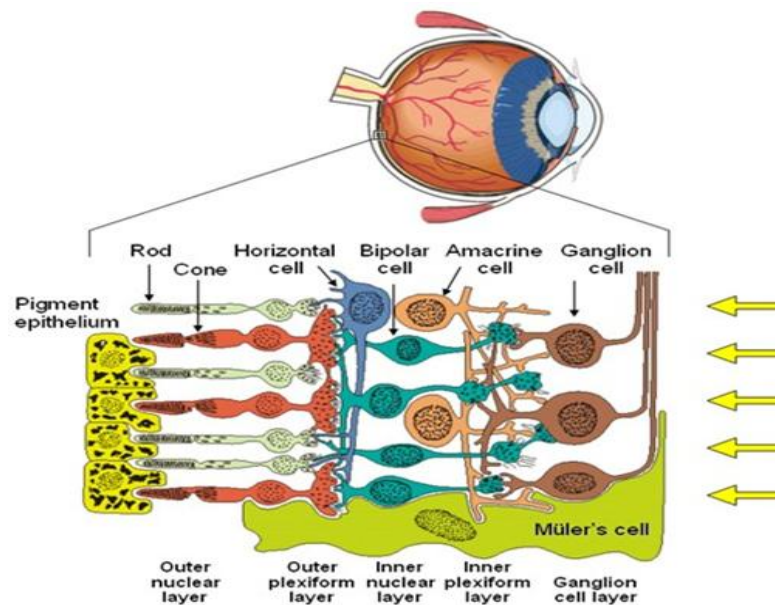




**Fig.3:** In seguito al legame del VEGF al recettore VEGF (KDR) si verifica la dimerizzazione e l'autofosforilazione della porzione intracellulare del recettore tirosin-chinasico. Il legame porta all'attivazione di vie alternative di trasduzione del segnale, in particolare dei seguenti pathway: Akt/PKB; p38MAPK, Erk.

### Angiogenesi patologica in oftalmologia

VEGF è importante per la salute della retina, perché è coinvolto nello sviluppo, la sopravvivenza dei nuovi vasi retinici e nel mantenere stabili i vasi maturi. VEGF e suoi recettori sono presenti entrambi nella retina in condizioni normali. Infatti almeno cinque tipi di cellule retiniche producono e secernono VEGF. Questi includono l'epitelio pigmentato retinico, astrociti, cellule di Müller, endotelio vascolare e gangli. I recettori VEGFRs sono distribuiti nella vascolarizzazione retinica, negli elementi neuronali (cellule Müller e cellule amacrine) e nell'endotelio della coriocapillare a contatto con l'epitelio pigmentato (Fig. 4).<sup>(14)</sup>



**Fig. 4:** VEGF e KDR sono espressi in molti tipi di cellule retiniche.



Il processo dell'angiogenesi è regolato da un complesso insieme di fattori angiogenetici ed anti-angiogenetici, il cui equilibrio determina o meno la formazione di neovasi. I meccanismi che portano alla produzione e liberazione dei fattori angiogenetici non sono ancora del tutto chiari.

È noto che l'ipossia e determinate condizioni infiammatorie possono liberare il VEGF. Studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che ampie aree di ischemia retinica producono una proteina di trascrizione nota come fattore di induzione dell'ipossia (HIF-1, Hypoxia Inducible Factor 1) che stimola una up-regolazione della secrezione del VEGF-A.

Il processo angiogenetico a livello oculare può essere schematizzato, come descritto in Fig. 5:

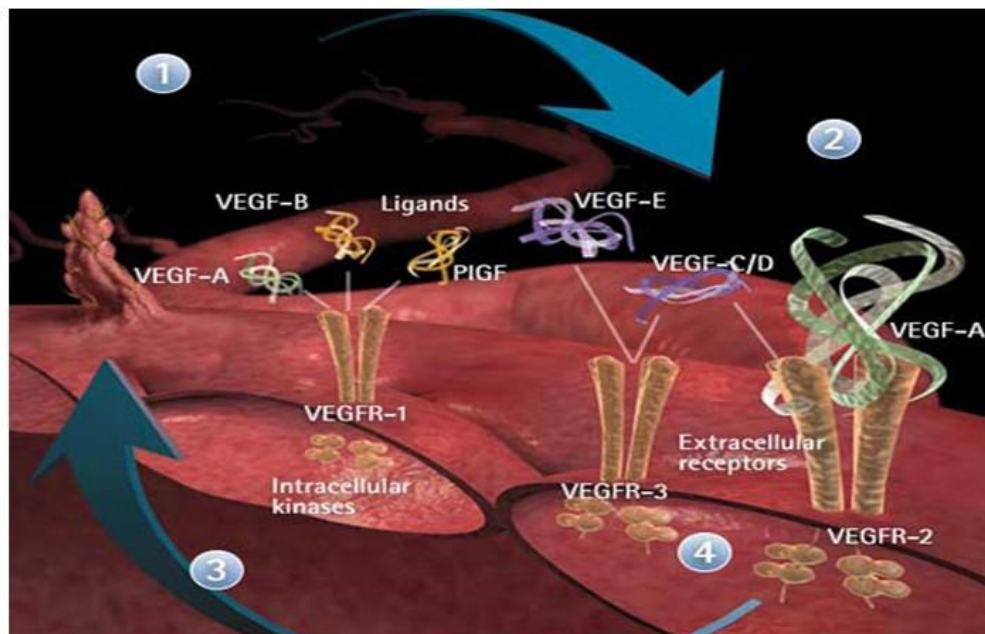


Fig. 5: Principali stadi del processo angiogenetico.

- 1- Molecole attivatrici, presenti nella matrice extracellulare, prodotte in condizioni di l'ipossia e determinate condizioni infiammatorie, stimolano la produzione del VEGF;
- 2- VEGF lega il recettori presenti nelle cellule endoteliali;
- 3- l'angiogenesi è fortemente attivata con l'interazione del VEGF-A/KDR;
- 4- l'interazione delle altre molecole di VEGF con VEGFR1 e VEGFR3 giocano un ruolo secondario in questo processo.

Nelle condizioni in cui i tessuti oculari esprimono elevate quantità di VEGF si assiste ad una neovascolarizzazione patologica responsabile di numerose patologie oculari che portano ad un grave calo visivo, quali:

- retinopatia diabetica proliferante (RDP),
- retinopatia del prematuro (ROP),
- glaucoma neovascolare,
- degenerazione maculare legata all'età (AMD).

Per tutte queste ragioni il VEGF e KDR vengono considerati geni candidati per la predisposizione alle patologie oculari angioproliferative.<sup>(15) (16) (17)</sup>

Il VEGF in particolare è da sempre riconosciuto essere un regolatore chiave dell'angiogenesi che interviene nella patogenicità di molte patologie oculari.

Questo ha portato allo sviluppo di farmaci costituiti da anticorpi anti-VEGF per bloccare l'azione angioproliferativa a livello intraoculare<sup>(18)</sup>.

Questi trattamenti hanno drasticamente migliorato la capacità visiva nei pazienti affetti da patologie angioproliferative, tuttavia, la risposta alla terapia non risulta uniforme, in quanto alcuni pazienti mostrano resistenza al trattamento farmacologico e la ragione rimane ancora sconosciuta.

## **CORRELAZIONE TRA POLIMORFISMI NEL PATHWAY VEGF/KDR E PATOLOGIE OCULARI ANGIOPROLIFERATIVE**

Le variazioni a singola base che avvengono nel DNA di un organismo sono comunemente chiamate polimorfismi a singolo nucleotide o SNPs. In media l'organismo umano contiene uno SNP ogni 100-300 basi, rendendo così gli SNPs la forma più abbondante di polimorfismi, e una forma ideale di marcatori genetici per lo studio delle correlazioni tra genotipi e fenotipi.

Diversi studi caso-controllo hanno dimostrato una associazione tra polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nel gene VEGF e diverse patologie, come ad esempio tumore al seno, patologie renali, tumore del cavo orale e cancro alla prostata, dove si osserva una alterazione del processo angiogenico.<sup>(19) (20)</sup>

Lo studio dei polimorfismi genetici si sono dimostrati interessanti anche nell'ambito oftalmologico. Le variazioni genetiche all'interno del gene del VEGF possono portare ad una disregolazione dell'espressione della proteina stessa, responsabile dell'insorgenza di molte patologie oculari.

In letteratura sono presenti diversi lavori, che hanno indagato sulle possibili associazioni tra polimorfismi a singolo nucleotide nel gene VEGF e la suscettibilità all'insorgenza dell'AMD<sup>(17),(21), (22) (23), (24), (25)</sup> e della DR<sup>(26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35), (36)</sup>.

Sebbene questi studi sostengono il ruolo dell'influenza genetica del VEGF nell'AMD e nella DR, la maggior parte degli studi elaborano dati conclusivi non uniformi e non concordanti tra loro.

Questo potrebbe essere dovuto alla diversa origine etnica dei casi e dei controlli, le dimensioni del campione limitato e/o il numero limitato dei polimorfismi analizzati al fine di garantire un risultato statisticamente valido.

Recentemente alcuni studi hanno dimostrato la relazione tra i polimorfismi del gene KDR e neoangiogenesi o malattie cardiovascolari, ma nessuno, fin'ora, ha esaminato la possibile relazione tra questi polimorfismi con le patologie oculari angioproliferative.<sup>(37), (38), (39)</sup>

L'analisi genotipica del pathway VEGF e del suo recettore KDR, maggiormente implicato nella risposta angiogenica, potrebbe aumentare la nostra comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo della malattia e consentire una previsione dei marcatori considerati "a rischio" nella popolazione generale.

Queste scoperte potrebbero avere una importante applicazione nell'ambito della farmacogenomica che si occupa di indagare sugli effetti di un determinato farmaco in base al genotipo dell'individuo. Infatti ogni individuo reagisce in modo diverso a un determinato farmaco a seconda degli SNP presenti nel suo aplotipo.

Questo consentirebbe di personalizzare e ottimizzare l'efficacia della terapia farmacologica.

## **SCOPO DELLA TESI I**

Lo scopo di questo studio è determinare se polimorfismi a singola base (SNPs) presenti nel gene VEGF-A e, nel recettore KDR sono associati all'insorgenza delle seguenti patologie oculari angioproliferative:

AMD (maculopatia degenerativa legata all'età) e

DR (retinopatia diabetica)

In particolare, questo progetto si è focalizzato sull'identificazione di un genotipo/aplotipo distintivo associato con i due diversi tipi di patologie oculari e di un possibile aplotipo comune alle due patologie.

## **MATERIALI E METODI I**

- **Selezione della casistica**

Tutti i partecipanti allo studio sono stati reclutati in modo prospettico a partire da gennaio 2007 a dicembre 2008 con l'approvazione del Comitato Etico dell'Ospedale Sant'Antonio di Padova. Il consenso informato è stato ottenuto da ciascun soggetto dopo spiegazione completa dello scopo e della natura di tutte le procedure utilizzate. Lo studio è stato condotto in conformità con le linee guida nella Dichiarazione di Helsinki.

In questa prima parte lo studio si compone di una casistica totale di 651 individui, suddivisi nei seguenti gruppi:

- 248 controlli sani
- 226 individui con AMD
- 177 individui con DR

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad un esame oftalmico dettagliato presso l'Unità Operativa di Oculistica dell'ospedale Sant'Antonio di Padova diretto dal Dott. Galan. Mediante l'esame del fundus dilatato, le fotografie del fondo oculare e la fluorangiografia, l'AMD è stata classificata come neovascolare (n=107) e non neovascolare (n=119) a seconda che i pazienti presentassero evidente neovascolarizzazione coroideale o presenza di drusen.

L'età media dei pazienti AMD è di  $66,2 \pm 5,3$  anni, l'età media dei pazienti DR è di  $51,4 \pm 4,8$  e l'età media dei controlli è di  $61,3 \pm 5,7$  anni.

I casi DR sono stati classificati come retinopatia diabetica non-proliferativa (NPDR, n=128) e retinopatia diabetica proliferante (PDR, n=49) in base alle stesse valutazioni oftalmiche.

I controlli sono rappresentati da soggetti sani sottoposti ad una valutazione medico oculista standard. La percentuale di maschi/femmine è risultata simile tra casi e controlli. Tutti i casi e controlli sono di origine Caucasica, provenienti del Nord-Est d'Italia.

- **Estrazione del DNA genomico da sangue intero**

A tutti i partecipanti è stato effettuato un prelievo ematico, da cui è stato ricavato il DNA genomico mediante l'uso di un kit commerciale di estrazione DNA: QIAamp DNA blood kit (Qiagen, Germany).

In breve, il sangue, fresco o scongelato, è versato con attenzione in un tubo da 50 ml contenente 500 µl di Proteasi Qiagen, e lisato con 6 ml di buffer di lisi (AL).

I campioni sono agitati e vortexati 3 volte per 5 secondi, quindi incubati per almeno 10 minuti a 70°C. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente si aggiungono 5 ml di etanolo assoluto, si vortexano i campioni tre volte per 5 secondi, e il lisato è versato nel tubo contenente la colonna Qiamp. Dopo aver centrifugato per 3 minuti a 3000 rpm si butta via il filtrato e si aggiungono 5 ml di buffer di lavaggio (AW1) e si centrifuga per 2 minuti a 4000 rpm. Senza buttare via il filtrato, si aggiungono 5 ml di buffer di lavaggio (AW2), si centrifuga 20 minuti a 4000 rpm, si sposta la colonna in un tubo da 50 ml pulito e si aggiungono successivamente 600 µl di buffer di eluizione (AE). Si lascia avvenire l'eluizione per 5 minuti a temperatura ambiente, quindi si centrifuga 10 minuti a 4000 rpm. Il DNA eluito viene quindi messo in un tubo sterile da 1.5 ml, e quantificato allo spettrofotometro, con determinazione dell'assorbanza a 260 nm. L'integrità del DNA genomico è verificata tramite elettroforesi su gel di agarosio.

Tutti i campioni sono stati analizzati mediante il sistema GenomeLab SNPStream DNA microarray technology (Beckman Dickinson). Questo strumento utilizza un metodo proprietario chiamato SNP Identification Technology per la rivelazione del segnale fluorescente di sonde marcate specifiche per un dato polimorfismo; è un metodo non radioattivo, basato su una semplice reazione di primer-extension che può essere ottenuta in una varietà di metodi. Si basa sulla capacità del DNA di incorporare dei terminatori marcati per distinguere i genotipi.

- **Selezione dei polimorfismi**

In questa prima parte dello studio, sono stati selezionati un totale di 16 polimorfismi, dei quali 11 nel gene VEGF-A e 5 nel gene KDR come mostrato in Tab. 2.

Gene	Gene name	Chromosomal location	Nucleotide change	dbSNP ID	Minor allele frequency
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	6p12	IVS7-919C>T	rs3025035	0.11
			IVS2+398G>A	rs833068	0.40
			IVS2+450T>C	rs833069	0.21
			IVS6-180C>T	rs3025024	0.02
			IVS5+716C>T	rs3025007	0.40
			Ex8+259C>T	rs3025039	0.12
			IVS2+1378C>T	rs3024994	0.03
			-613G>A	rs1570360	0.00
			-649A>G	rs13207351	0.38
			-160C>T	-160	0.00
			-172C>T	-172	0.50
<i>KDR (VEGFR-2)</i>	Kinase insert domain receptor (vascular endothelial growth factor receptor 2)	4q11-q12	Ex21+36G>A	rs13129474	0.12
			Ex8+69G>A	rs1824302	0.00
			-604C>T	rs2071559	0.37
			Ex9+82G>A	rs2034964	0.00
			Ex16+48G>A	rs1062832	0.00

**Tab. 2:** Valore del MAF (Minor Allele Frequency) per ogni SNP (polimorfismi in singola base)

Il gene del VEGF-A è localizzato sul cromosoma 6 (6p12), è costituito da 9 esoni di cui sono note 7 varianti splicing, mentre il gene per il recettore di VEGF (KDR) è localizzato sul cromosoma 4 (4q11-q12) ed è costituito da 30 esoni.

La scelta dei polimorfismi si è basata in prima battuta sulla valutazione dei lavori presenti in letteratura in cui alcuni polimorfismi del VEGF-A hanno confermato un'associazione con diverse patologie come il cancro alla mammella, cancro al rene, cancro alla prostata, infarto miocardico, aterosclerosi, e in particolare anche nelle retinopatie nel diabete (DR) di tipo I e II e degenerazione maculare legata all'età (AMD).

Per diversi polimorfismi del gene VEGF-A non è stato possibile l'identificazione con rs#, in quanto non sono stati ancora depositati all'NCBI, perciò la numerazione fa riferimento alla sequenza depositata in Human Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

Per quanto riguarda la scelta dei polimorfismi del recettore KDR sono stati presi in considerazione due lavori principali dove è stato studiato la correlazione di questi con le patologie coronariche e cancro alla mammella (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Di questi polimorfismi uno solo è localizzato a livello promotoriale mentre gli altri portano tutti ad una variazione aminoacidica.

Idealmente, sono stati selezionati solo SNPs con una Frequenza Allelica Minore (MAF)  $\geq 0.05$  (dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), ma sono stati inclusi nello studio anche alcuni SNP con MAF  $< 0.05$  perché precedentemente associati a malattie di interesse.

Inoltre sono stati considerati polimorfismi che implicano una variazione dell'attività funzionale del gene stesso, specialmente nella popolazione di origine Caucasica.

- **Disegno dei primers**

Una volta scelti i marker da includere nello studio si procede al disegno dei primer per la multiplex PCR e dei primer di extension.

La Beckman Coulter fornisce un programma, Autoprimer ([www.autoprimer.com](http://www.autoprimer.com)), che raccoglie i diversi SNPs in gruppi, detti pannelli, a seconda degli alleli e delle caratteristiche della regione circostante. Il file contenente le sequenze di ciascun polimorfismo viene sottoposto ad Autoprimer che fornisce le sequenze dei primer forward e reverse, per la reazione PCR e dei primer di extension o probe per la reazione di extension (Tab. 3).

In questo modo si riesce a disegnare dei primer per cui le condizioni di PCR sono comuni, i frammenti si possono amplificare in formato multiplex e ottenere frammenti di lunghezza tra le 100 e le 150 bp.

<b>SNP ID (rs)</b>	<b>PRIMER SEQUENCE</b>
VEGF-rs3025035-F	AATTTTGGAAACTGATATTCCCA
VEGF-rs3025035-R	TTTTTAGGTGATTATTCTGCTGATG
VEGF-rs3025035-probe	CGACTGTAGGTGCGTAACTCGCTTGGGGGTGGGTAAAGGTATTG
VEGF-rs833068-F	AGGGGAGAGTGGACATTTAGT
VEGF-rs833068-R	AAAGGAATGCAAACCAGG
VEGF-rs833068- probe	GTGATTCTGTACGTGTCGCCGACATGTCCCATTTGTGGGAACTGT
VEGF-rs833069-F	AACATAGTCAAATGGGGTTTCT
VEGF-rs833069-R	TGTGTGAGCTGGAGGCAC
VEGF-rs833069- probe	GGCTATGATTTCGCAATGCTTAGGAATGCAAACCAGGGAAAGGGAGG
VEGF- rs3025024 -F	AGGATCCGAGCGCTACAG
VEGF- rs3025024 -R	CTGTGCCCGCCTCTTCCT
VEGF- rs3025024- probe	GCGGTAGGTTCCCCGACATATAAGACAGAGAGAGCGGGCGGAAAGAG
VEGF- rs3025007-F	AAGAGGCAAGGGTTGAG
VEGF- rs3025007-R	AAAGAGAGACTGAGAGAGAGCAC
VEGF- rs3025007- probe	GGATGGCGTTCCGTCCTATTGGGGCTTCAATGTCCGCACAGCACT
VEGF- rs3025039-F	TGATTTAGCAGCAAGAAAAATAAA
VEGF- rs3025039-R	ACTTTGGGTCCGGAGGGC
VEGF- rs3025039- probe	AGATAGAGTCGATGCCAGCTGGCGAATCCAATTCCAAGAGGGACC
VEGF- rs3024994-F	TATTTCTTTTATCCAGACCACCA
VEGF- rs3024994-R	TAGTCTCGTTCACTCTTTTGTATG
VEGF- rs3024994- probe	GTGATTCTGTACGTGTCGCCGGGCACAGAATCCTTCTCTACCCAC
VEGF- rs1570360-F	AGGCTTCACTGAGCGTCC
VEGF- rs1570360-R	ACTTTTAAAAAAAAAAGGGGGG
VEGF- rs1570360- probe	CGTGCCGCTCGTGATAGAATAGCCCGGGCCCGAGCCGCTGTGGA
VEGF- rs13207351-F	TCGAGCTTCCCCTTCATT
VEGF- rs13207351-R	TCAGCCCTTCCACACGCG
VEGF- rs13207351- probe	GGATGGCGTTCCGTCCTATTGCGGGCTGCGGGCCAGGCTTCACTG
VEGF-160-F	TCAGCCCTTCCACACGCG
VEGF-160-R	TAATTTTCAGGCTGTGAACCTT
VEGF-160- probe	GCGGTAGGTTCCCCGACATATCCGGGCTCTGCGGACGCTCAGTGAA
VEGF-172-F	TCAGCCCTTCCACACGCG
VEGF-172-R	TAATTTTCAGGCTGTGAACCTT
VEGF-172- probe	AGGGTCTCTACGCTGACGATGACGCTCAGTGAAGCCTGGCCCCGA
KDR- rs2071559-F	TTAAAAAGCTGAATCTGGTTGC
KDR - rs2071559-R	TCAAACCTGGAGCCGCCA
KDR - rs2071559- probe	CGTGCCGCTCGTGATAGAATGAAAACGCACTTGCCAGTTCGCCA
KDR- rs1062832-F	TGCCAGGAAAAGACGAA
KDR - rs1062832-R	AGGATGATGACAAGAAGTAGCC
KDR -rs1062832- probe	GGCTATGATTTCGCAATGCTTGGAATCATTATTCTAGTAGGCACG



<b>SNP ID (rs)</b>	<b>PRIMER SEQUENCE</b>
KDR- rs2034964-F	AATTAAGCGGGGCATGT
KDR - rs2034964-R	TTTGAAATGGGATTGGTAAGG
KDR - rs2034964- probe	GACCTGGGTGTCGATACCTAGACGATTATGGAAGTGAGTGAAAGA
KDR- rs1824302-F	AGTGGCATGGAATCTCTGG
KDR - rs1824302-R	TTTTATTTCTGGGGTGGG
KDR -rs1824302- probe	GACCTGGGTGTCGATACCTAGAAGCCACGGTGGGGGAGCGTGCA
KDR- rs13129474-F	TATTCAAGGAGTTTGTTCCT
KDR - rs13129474-R	ATGCTGTCCAAGCGCCGT
KDR -rs13129474- probe	AGAGCGAGTGACGACTAACCATTCCGTCAAGGGAAAGACTACII

**Tab.3:** *Elenco delle sequenze oligonucleotidiche dei primer Forward e Reverse e delle relative probe ottenuti con il software Autoprimer.*

- **Multiplex PCR e Clean-up**

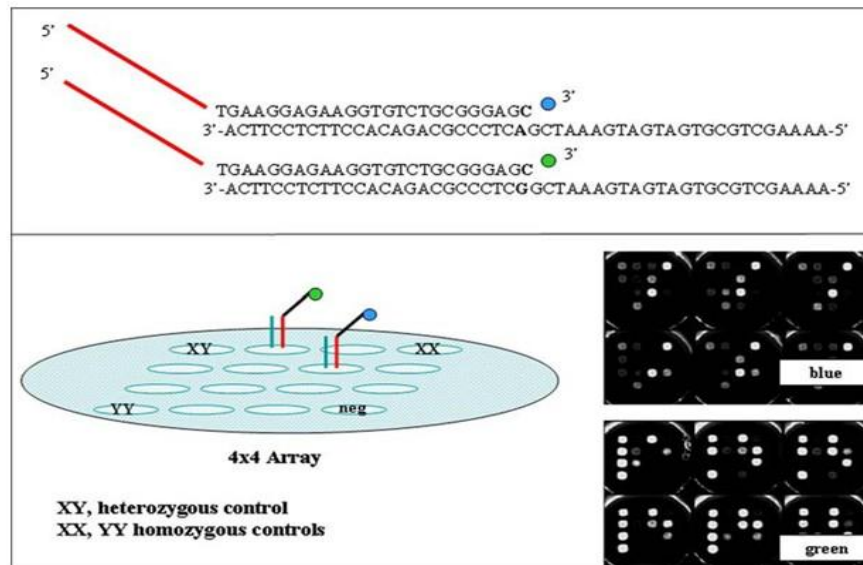
La reazione di amplificazione multiplex PCR è stata eseguita in termociclatore (MJ Research, Waltham, MA) seguendo le indicazioni del produttore.

Le condizioni di amplificazione sono: un ciclo di denaturazione a 94°C per 1 minuto, 40 cicli con denaturazione a 94°C per 1 minuto, annealing a 55°C per 30 secondi, ed estensione 72°C per 1 minuto, seguito da estensione finale a 72°C per 1 minuto. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µl con 10 ng di DNA genomico; i reagenti utilizzati secondo le indicazioni del costruttore sono: 75 µM dNTPs mix, 50 nM primer pool, 5 mM MgCl<sub>2</sub> e 0.5U Taq polimerasi (Amplitaq Gold, Applied Biosystems) in PCR 1 × buffer.

Gli amplificati prodotti sono stati purificati con Exo-Sap (0.67U Exonuclease I and 0.33U Shrimp alkaline phosphatase in 3µl mix volume), eseguita in un termociclatore Applied Biosystems per degradare i primers non incorporati e i dNTPs (USB Corp., Cleveland), seguendo le indicazioni del produttore: primo step a 37°C per 30 minuti e incubazione finale a 96°C per 10 min.

• **Reazione di estensione**

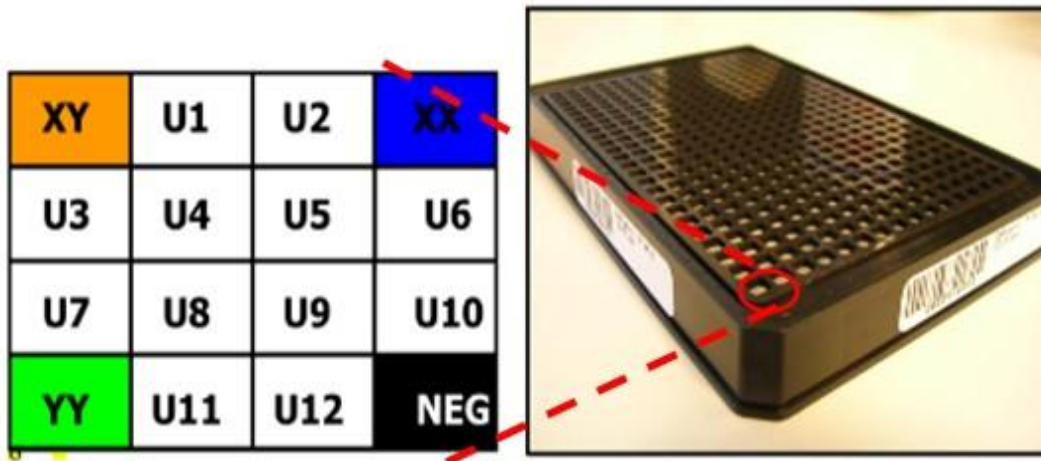
La reazione di primer extension è una reazione che permette di discriminare gli alleli di un polimorfismo grazie all'incorporazione di un dideossinucleotide fluorescente in corrispondenza dello SNP. Il protocollo di estensione utilizzato si basa su un mix appropriato di TAMRA e Bodipy-fluorescein labeled dideoxynucleotides (ddNTPs) e un pool di 12 primer marcati allele-specifici con dideossinucleotidi. (Fig. 6)



**Fig. 6:** (sopra) I primer extension caratterizzati dalla presenza di un tag all'estremità 5' hanno una sequenza complementare al sito adiacente allo SNP. I tagged primer extension vengono riconosciuti dagli oligonucleotidi localizzati in posizione specifiche nell'array 4X4. (sotto) l'array 4X4 è costituito da 4 controlli e da 12 probe per l'analisi di 12 SNP e l'immagine di scansione dei due laser (blu/verde) sono mostrate sulla destra.

I tagges extension primer marcati per estensione possono essere indirizzati verso una localizzazione specifica in ogni pozzetto che contiene fino a 16 oligonucleotidi (4 × 4 oligonucleotide array) su una piastra SNPware da 384 pozzetti, grazie alla presenza di un tag al 5' terminale degli extension primer che risulta essere complementare agli oligonucleotidi presenti nel pozzetto.

La porzione al 3' terminale del primer di estensione è complementare alla sequenza adiacente al polimorfismo di interesse. Quindi, la reazione di estensione consente l'incorporazione di dideossinucleotidi marcati al terminale 3' dei tagged extension primer. In ogni array ci sono tre controlli positivi e uno negativo, che assicurano l'accuratezza della genotipizzazione. (Fig. 7)



**Fig. 7:** “TagPlate”. Questa piastra è costituita da una superficie di vetro, divisa in 384 pozzetti (Immagine a destra). In ogni pozzetto sono fissati, in posizioni specifiche, gli oligonucleotidi complementari al tag dei primer di SNE. In questo modo i diversi SNP vengono distinti in base alla loro posizione nel pozzetto. Ai quattro angoli di ciascun  $4 \times 4$  oligonucleotide array si trovano i controlli. (Immagine a sinistra)

La reazione di estensione è stata eseguita in un termociclatore MJ in accordo con le indicazioni del produttore: un ciclo a  $96^{\circ}\text{C}$  per 3 minuti, 44 cicli con un primo step di  $94^{\circ}\text{C}$  per 20 secondi, e un secondo a  $40^{\circ}\text{C}$  per 11 secondi e un blocco finale a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La reazione è stata portata a termine con un volume finale di  $15\mu\text{l}$  con  $0.04\mu\text{l}$  di SNP extension mix,  $5.6\mu\text{l}$  SNPware Extension Dilution Buffer,  $0.3\mu\text{l}$  SNP 20  $\times$  extension mix, e  $0.03\mu\text{l}$  SNPware DNA polymerase (Beckman Coulter, Fullerton, CA). La soluzione SNP 20 $\times$  extension mix contiene i dye-labeled dideossinucleotidi, usati nella reazione di primer extension, e i self-annealing oligonucleotidi che sono estesi con terminatori dye-labeled; questi campioni servono come controlli positivi in ogni pozzetto.

- **Reazione di ibridazione**

Il prodotto ottenuto dall'estensione è stato trasferito in una piastra da 384 pozzetti precedentemente lavata 3 volte con 1X SNPware Wash Buffer I (WB I) fornito con il kit di analisi, in questo modo ogni extension primer si può ibridare in modo specifico con la sonda specifica posizionata nella piastra. Si aggiunge in ogni pozzetto della piastra un volume di  $12\mu\text{l}$  di hybridization mix e si procede con l'incubazione per 2 ore a  $42^{\circ}\text{C}$  in camera umida. In seguito si procede al lavaggio della piastra con SNPware wash buffer II (WB II) per altre tre volte al fine di eliminare le sonde non legate.

• **Analisi della piastra**

Prima di effettuare la scansione, è necessario creare il disegno della piastra, in modo che, nella successiva analisi i vari programmi riconoscano la posizione dei campioni. Il disegno della piastra viene fatto con Plate Explorer, uno dei programmi forniti nel pacchetto SNPstream Genotyping System Software Suite, insieme ad altri (Image, GetGenos, SNP Admin, Report), che permettono l'analisi e l'interpretazione dei risultati della scansione.

Le piastre di array sono state analizzate mediante lo strumento Genome Lab SNPStream array imager. Utilizzando due laser blu e verde a lunghezza d'onda di 488 e 532 nm, rispettivamente, lo strumento è in grado di rilevare il segnale fluorescente di ogni base estesa per ogni spot. Il software di gestione dello strumento, GetGenos, provvede ad effettuare l'analisi di immagine assegnando il genotipo ad ogni SNP spot in base alla intensità della relativa fluorescenza. Per assegnare un corretto allineamento della griglia di lettura il programma usa il self annealing degli stessi oligonucleotidi legati al fondo del pozzetto; il tutto è eseguito basandosi sulla presenza di 4 controlli fissi nella griglia dati da oligonucleotidi in eterozigosi, omozigosi per il blu e omozigosi per il verde, più un bianco.

Nell'analisi del genotipo possono presentarsi tre possibilità di segnale, divise in tre cluster: una rappresenta il segnale di omozigosi per XX, omozigosi per YY ed eterozigosi per XY (Fig. 8).

I dati finali sono inseriti in un foglio di calcolo in formato excel o plottati in grafico dallo stesso software di analisi come da immagine seguente.

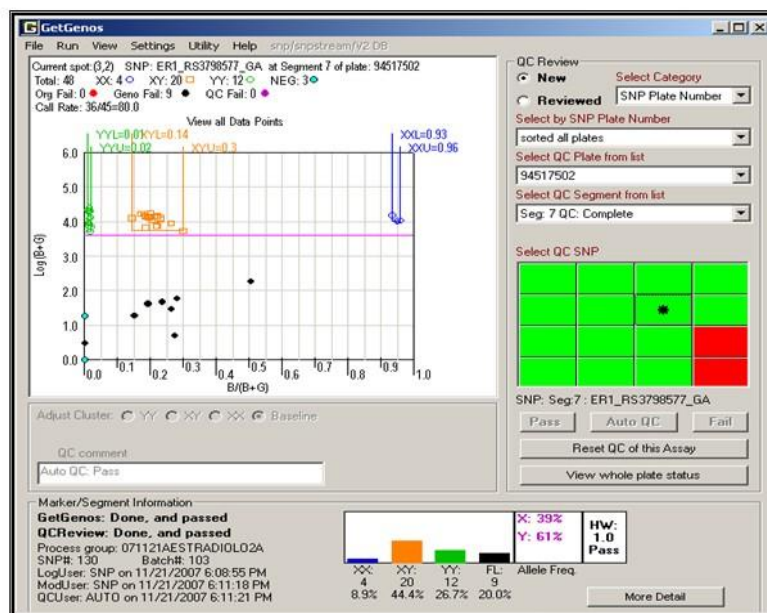


Fig. 8: Grafico elaborato dal software di analisi GetGenos che permette una visualizzazione immediata dei clusters genotipici: omozigoti per XX, omozigoti per YY ed eterozigoti per XY.

- **Analisi statistica**

Il test per l'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) è stato eseguito per ogni SNP sia per i controlli sia per i casi mediante il test del Chi-Quadro.

Il Linkage Disequilibrium (LD) tra SNP è stato quantificato utilizzando il valore Lewontin  $D'$  e il coefficiente di correlazione  $r^2$ : valori di  $D' > 0.8$  ed  $r^2 < 0.5$  sono considerati indicatori di linkage.

Le differenze di distribuzione degli alleli e dei genotipi tra casi e controlli sono state testate con l'uso di Cochran-Armitage trend test.

L'odds ratio (OR) è definito come il rapporto fra il numero di individui portatori del fattore di rischio che sviluppano la patologia e il numero di individui portatori che invece non hanno la malattia. Un valore di OR superiore ad 1 con un intervallo di confidenza (CI) al 95% che non comprende l'1, indica l'associazione del fattore di rischio alla patologia. Tanto maggiore è l'odds ratio, maggiore sarà l'effetto del fattore di rischio nel causare la patologia. Se il valore è inferiore ad 1, al contrario, significa che la variabile presa in considerazione ha un effetto protettivo nei confronti della malattia.

Tutti i valori di  $p$  riportati sono stati corretti per tenere conto di confronti multipli utilizzando il sistema di correzione False Discovery Rate (FDR) (Benjamin and Hemberg 1995). Valori di  $p < 0,05$  sono considerati statisticamente significativi.

Le correlazioni tra genotipi/aplotipi diversi e dati clinici sono state condotte con SAS Version 9.1.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## RISULTATI I

In questo studio sono stati considerati 226 pazienti affetti da AMD, 177 pazienti affetti da DR e 248 controlli sani e tipizzati per 16 marcatori polimorfici. La Tab. 2 mostra i valori delle frequenze dell'allele minore (MAF) di ciascun polimorfismo presente nella popolazione di controllo. Dei 16 marcatori selezionati, 5 (rs1570360 e VEGF-160 di VEGF-A e rs1824302, rs2034964 e rs1062832 in KDR) hanno una frequenza dell'allele minore pari a 0, in quanto tutti i soggetti sono omozigoti per l'allele wild-type. Il valore del MAF per gli stessi marcatori risulta nullo anche per i soggetti affetti per entrambe le patologie analizzate e per questo motivo sono stati esclusi dall'analisi statistica. Degli altri 11 SNP, 5 (rs3025035, rs3025024, rs13207351 e VEGF-172 di VEGF-A e rs13129474 in KDR) non risultano in equilibrio di HW, sia nei controlli, sia nei casi e pertanto anch'essi non sono stati considerati per ulteriori analisi. I restanti 6 SNPs (5 nel gene VEGF ed 1 nel gene KDR) risultano informativi e sono stati quindi considerati per le differenze alleliche e la distribuzione dei genotipi tra casi e controlli. L'analisi di Linkage Disequilibrium (LD) non ha mostrato alcuna correlazione tra questi marcatori.

La Tab. 4 mostra la distribuzione allelica e del genotipo nei casi AMD e nei controlli per i 6 marcatori informativi.

Gene	SNP		Controls (n=248)	AMD (n=226)
VEGF-A	rs833068	Allele A/G	201 (0.41)/295 (0.59)	166 (0.37)/286 (0.63)
		Genotype AA/AG/GG	38 (0.15)/125 (0.50)/85 (0.35)	30 (0.13)/106 (0.47)/90 (0.40)
		p for trend raw p for trend adjusted		0.224 0.3361
	rs833069	Allele A/G	391 (0.79)/105 (0.21)	311 (0.69)/141 (0.31)
		Genotype AA/AG/GG	149 (0.60)/93 (0.38)/6 (0.02)	108 (0.48)/95 (0.42)/23 (0.10)
		p for trend raw p for trend adjusted		<b>0.0004</b> <b>0.0011</b>
	rs3025007	Allele C/T	294 (0.59)/202 (0.41)	240 (0.53)/212 (0.47)
		Genotype CC/CT/TT	90 (0.36)/114 (0.46)/44 (0.18)	58 (0.26)/124 (0.55)/44 (0.19)
		p for trend raw p for trend adjusted		0.0530 0.1059
	rs3025039	Allele C/T	434 (0.87)/62 (0.13)	398 (0.88)/54 (0.12)
		Genotype CC/CT/TT	190 (0.77)/54 (0.22)/4 (0.01)	175 (0.77)/48 (0.21)/3 (0.02)
		p for trend raw p for trend adjusted		0.7950 0.8070
rs3024994	Allele C/T	482 (0.97)/14 (0.03)	438 (0.97)/14 (0.03)	
	Genotype CC/CT/TT	234 (0.94)/14 (0.06)/0	213 (0.94)/12 (0.05)/1 (0.01)	
	p for trend raw p for trend adjusted		0.8070 0.8070	
KDR	rs2071559	Allele C/T	314 (0.63)/182 (0.37)	214 (0.47)/238 (0.53)
		Genotype CC/CT/TT	106 (0.43)/102 (0.41)/40 (0.16)	47 (0.21)/120 (0.53)/59 (0.26)
		p for trend raw p for trend adjusted		< <b>0.0001</b> < <b>0.0001</b>

**Tab. 4:** Distribuzione allelica e del genotipo nei casi AMD e nei controlli per i 6 SNP informativi



Abbiamo riscontrato un'associazione significativa tra i polimorfismi rs833069 nel gene VEGF-A, rs2071559 nel gene KDR e l'AMD con un  $p$  for trend di 0.0011 e un  $p$  for trend  $< 0.0001$ , rispettivamente.

In particolare, si osserva un aumento del numero di omozigoti GG per il polimorfismo rs833069 (VEGF) e del numero di omozigoti TT ed eterozigoti CT per il polimorfismo rs2071559 (KDR) nei pazienti AMD rispetto ai controlli.

Dal calcolo dell'OR è emerso che il rischio di AMD aumenta di 1.7 volte per copia dell'allele minore G per il polimorfismo rs833069 nel gene VEGF-A (OR = 1.688, 95% CI = 1.259-2.264). Inoltre, il rischio di AMD aumenta di 2 volte per copia dell'allele minore T per il polimorfismo rs2071559 nel gene KDR (OR = 1.919, 95% CI = 1.480-2.488) come mostrato in Tab. 5.

SNP	Genotype count <sup>a</sup>		Per allele	OR (95% CI)	
	Controls	Cases		Heterozygote <sup>b</sup>	Homozygote <sup>c</sup>
rs833069 (VEGF-A)	6/93/149	23/95/108	1.688 (1.259-2.264)	1.409 (0.965-2.057)	5.288 (2.082-13.430)
rs2071559 (KDR)	40/102/106	59/120/47	1.919 (1.480-2.488)	2.653 (1.720-4.091)	3.326 (1.961-5.640)

**Tab.5:** Associazione tra gli SNP rs833069 nel gene VEGF-A (con allele di rischio G) e rs2071559 nel gene KDR (con allele T di rischio) con la patologia AMD.

<sup>a</sup> Numero di individui genotipizzati come: omozigoti per l'allele di rischio / eterozigoti per l'allele di rischio / omozigoti per l'allele non di rischio.

<sup>b</sup> OR per eterozigoti portatori dell'allele di rischio rispetto agli omozigoti portatori dell'allele non di rischio.

<sup>c</sup> OR per omozigoti portatori dell'allele di rischio rispetto agli omozigoti portatori di allele non di rischio.

L'analisi delle frequenze genotipiche evidenzia che gli omozigoti portatori dell'allele di rischio G hanno un rischio di oltre 5 volte superiore di sviluppare la patologia AMD (OR = 5.288, 95% CI = 2.082-13.430) rispetto ai soggetti omozigoti per l'allele non di rischio A. Nel caso del polimorfismo rs2071559 (KDR), i soggetti omozigoti per l'allele di rischio T hanno un rischio maggiore di tre volte di sviluppare l'AMD (OR = 3.326, 95% CI = 1.961-5.640) rispetto ai portatori omozigoti dell'allele non di rischio C, come mostrato in Tab. 5.

Interessante notare che l'analisi aplo-tipica per entrambi i marcatori polimorfici rs833069 (VEGF) e rs2071559 (KDR) rivela che i soggetti portatori di entrambi gli alleli di rischio (VEGF-A rs833069-G e KDR rs2071559-T) hanno un rischio di insorgenza dell'AMD di ben 6 volte maggiore (OR = 6.239, 95 % CI = 3.301-11.792) rispetto ai soggetti portatori di entrambi gli alleli non di rischio (VEGF-A rs833069-A e KDR rs2071559-C) come mostrato in Tab. 6.

L'aumento del rischio è risultata simile tra AMD neovascolare e non neovascolare (dati non mostrati).

<i>VEGF-A</i> rs833069- <i>KDR</i> rs2071559	Controls (n=496) n (%)	Cases (n=452) n (%)	OR (95% CI)
G-T	14 (2.8%)	47 (10.4%)	6.239 (3.301 - 11.792)
G-C	58 (11.7%)	41 (9.1%)	1.314 (0.831 - 2.075)
A-T	135 (27.2%)	138 (30.5%)	1.900 (1.373 - 2.62)
A-C	223 (45.0%)	120 (26.5%)	reference
Undefined (double heterozygotes)	66 (13.3%)	106 (23.5%)	2.985 (2.043 - 4.360)

**Tab.6:** *Analisi dell'aplotipo per gli SNP: rs833069-A nel gene VEGF-A e rs2071559-C nel gene KDR*  
Odds Ratios (OR) sono calcolati rispetto ai portatori per entrambi gli alleli non di rischio (VEGF-A rs833069-A e KDR rs2071559-C)

La Tab. 7 mostra la distribuzione allelica e del genotipo nei casi DR e nei controlli per gli stessi 6 marcatori risultati informativi per entrambe le patologie oculari.

Gene	SNP		Controls (n=248)	DR (n=177)	
<i>VEGF-A</i>	rs833068	Allele A/G	201 (0.41)/295 (0.59)	127 (0.36)/227 (0.64)	
		Genotype AA/AG/GG	38 (0.15)/125 (0.50)/85 (0.35)	26 (0.15)/75 (0.42)/76 (0.43)	
				<i>P</i> for trend raw	0.1714
				<i>P</i> for trend adjusted	0.2572
	rs833069	Allele A/G	391 (0.79)/105 (0.21)	249 (0.70)/105 (0.30)	
		Genotype AA/AG/GG	149 (0.60)/93 (0.38)/6 (0.02)	97 (0.55)/55 (0.31)/25 (0.14)	
				<i>P</i> for trend raw	<b>0.0061</b>
				<i>P</i> for trend adjusted	<b>0.0182</b>
	rs3025007	Allele C/T	294 (0.59)/202 (0.41)	199 (0.56)/155 (0.44)	
		Genotype CC/CT/TT	90 (0.36)/114 (0.46)/44 (0.18)	51 (0.29)/97 (0.55)/29 (0.16)	
				<i>P</i> for trend raw	0.3684
				<i>P</i> for trend adjusted	0.4420
rs3025039	Allele C/T	434 (0.87)/62 (0.13)	293 (0.83)/61 (0.17)		
	Genotype CC/CT/TT	190 (0.77)/54 (0.22)/4 (0.01)	118 (0.67)/57 (0.32)/2 (0.01)		
			<i>P</i> for trend raw	0.0467	
			<i>P</i> for trend adjusted	0.0935	
rs3024994	Allele C/T	482 (0.97)/14 (0.03)	345 (0.97)/9 (0.03)		
	Genotype CC/CT/TT	234 (0.94)/14 (0.06)/0(0.00)	168 (0.95)/9 (0.05)/0 (0.00)		
			<i>P</i> for trend raw	0.8012	
			<i>P</i> for trend adjusted	0.8012	
<i>KDR</i>	rs2071559	Allele C/T	314 (0.63)/182 (0.37)	152 (0.43)/202 (0.57)	
		Genotype CC/CT/TT	106 (0.43)/102 (0.41)/40 (0.16)	31 (0.18)/90 (0.51)/56 (0.32)	
			<i>P</i> for trend raw	<0.0001	
			<i>P</i> for trend adjusted	<0.0001	

**Tab 7:** *Distribuzione allelica e del genotipo nei casi DR e nei controlli per i 6 SNP informativi*

Abbiamo constatato un'associazione significativa tra il polimorfismo rs833069 nel gene VEGF-A e rs2071559 nel gene KDR e la retinopatia diabetica (DR) con un *p* for trend di 0.0182 e un *p* for trend < 0.0001, rispettivamente.

Anche per la retinopatia diabetica, si osserva un incremento del numero di omozigoti GG per il polimorfismo rs833069 (VEGF) e del numero di omozigoti TT ed eterozigoti CT per il polimorfismo rs2071559 (KDR) nei pazienti DR rispetto ai controlli.



Il rischio di DR aumenta di 1.6 volte per copia dell'allele minore G per il polimorfismo rs833069 nel gene VEGF-A (OR = 1.570, 95% CI = 1.147-2.149).

Il rischio di DR aumenta di oltre 2 volte per copia dell'allele minore T per il polimorfismo rs2071559 nel gene KDR (OR = 2.293, 95% CI = 1.735-3.029) come mostrato in Tab. 8.

SNP	Genotype count <sup>a</sup>		Odds Ratio (95% Confidence Interval)		
	Controls	Cases	Per allele	Heterozygote <sup>b</sup>	Homozygote <sup>c</sup>
rs833069 (VEGF-A)	6/93/149	25/55/97	1.570 (1.147-2.149)	0.908 (0.597-1.383)	6.400 (2.533-16.172)
rs2071559 (KDR)	40/102/106	56/90/31	2.293 (1.735-3.029)	3.017 (1.848-4.927)	4.787 (2.707-8.464)

**Tab.8:** Associazione tra gli SNP rs833069 nel gene VEGF-A (con allele di rischio G) e rs2071559 nel gene KDR (con allele T di rischio) con la patologia DR.

<sup>a</sup> Numero di individui genotipizzati come: omozigoti per l'allele di rischio / eterozigoti per l'allele di rischio / omozigoti per l'allele non di rischio.

<sup>b</sup> OR per eterozigoti portatori dell'allele di rischio rispetto agli omozigoti portatori dell'allele non di rischio.

<sup>c</sup> OR per omozigoti portatori dell'allele di rischio rispetto agli omozigoti portatori di allele non di rischio.

L'analisi delle frequenze genotipiche evidenzia che gli omozigoti portatori dell'allele di rischio G per lo SNP rs833069 (VEGF) sono associati ad un rischio di oltre 6 volte superiore di sviluppare la patologia DR (OR = 6.400, 95% CI = 2.533-16.172) rispetto ai soggetti omozigoti per l'allele non di rischio A. Nel caso del polimorfismo rs2071559 (KDR), i soggetti omozigoti per l'allele di rischio T hanno un rischio maggiore di cinque volte di sviluppare la DR (OR = 4,787. 95% CI = 2.707-8.464) rispetto ai portatori omozigoti dell'allele non di rischio C, come mostrato in Tab.8 .

Importante notare che l'analisi dell'aplotipo per entrambi i marcatori polimorfici rs833069 (VEGF) e rs2071559 (KDR) rivela che i soggetti portatori di entrambi gli alleli di rischio (VEGF-A rs833069-G e KDR rs2071559-T) hanno un rischio di insorgenza della DR di oltre 7 volte maggiore (OR = 7.879, 95 % CI = 4.132-15.021) rispetto ai soggetti portatori di entrambi gli alleli non di rischio (VEGF-A rs833069-A e KDR rs2071559-C) come mostrato in Tab. 9.

L'aumento di rischio è risultata simile tra la DR proliferativa e la forma non proliferativa (dati non mostrati).

VEGF-A rs833069-KDR rs2071559	Controls (n=496), n (%)	Cases (n=354), n (%)	Odds Ratio (95% Confidence Interval)
G-T	14 (2.8)	46 (13.0)	7.879 (4.132-15.021)
G-C	58 (11.7)	32 (0.0)	1.323 (0.807-2.170)
A-T	135 (27.2)	129 (35.4)	2.291 (1.628-3.225)
A-C	223 (45.0)	93 (26.3)	Reference
Undefined (double heterozygotes)	66 (13.3)	54 (15.3)	1.962 (1.272-3.026)

**Tab.9:** Analisi dell'aplotipo per gli SNP: rs833069-A nel gene VEGF-A e rs2071559-C nel gene KDR. Gli Odds Ratios (OR) sono calcolati rispetto ai portatori per entrambi gli alleli non di rischio (VEGF-A rs833069-A e KDR rs2071559-C).

## **DISCUSSIONE I**

Questo studio ha esaminato la possibile associazione tra polimorfismi nei geni VEGF e KDR e lo sviluppo di gravi patologie oculari angioproliferative come l'AMD e la DR.

Dalla selezione di 16 polimorfismi distribuiti in questi due geni, abbiamo scoperto che due marker, uno nel gene VEGF e l'altro nel recettore KDR, sono significativamente associati al rischio di insorgenza per entrambe le patologie oculari prese in esame. In modo particolare, i nostri risultati evidenziano che soggetti portatori degli alleli di rischio per entrambi i marcatori (VEGF-A rs833069-G e KDR rs2071559-T) hanno un rischio, rispettivamente, di 6 volte maggiore di sviluppare l'AMD e quasi 8 volte di manifestare la DR, rispetto ai soggetti portatori dell'aplotipo protettivo (VEGF-A rs833069-A e KDR rs2071559-C).

L'AMD e la DR, sono chiaramente delle patologie complesse multifattoriali in cui interagiscono sia fattori ambientali, sia genetici.<sup>(8), (9)</sup>

Un alterato segnale del VEGF sembra giocare un ruolo importante nella patogenesi di queste patologie oculari angioproliferative. Il VEGF è coinvolto nel processo di formazione di nuovi vasi sanguigni ed è stato dimostrato che livelli di VEGF sono elevati nel fluido intraoculare nei pazienti affetti da AMD e DR<sup>(40), (16)</sup>.

Il marcatore rs833069, con il quale abbiamo ottenuto una significativa associazione, è localizzato nell'introne 2 del gene VEGF-A.<sup>(41)</sup> In letteratura non sono noti studi sull'analisi funzionale per questo polimorfismo ma sembra che questa regione intronica sia ricca di potenziali siti di legame per fattori di trascrizione. La presenza di polimorfismi nell'introne 2 potrebbe quindi influenzare il livello di espressione del gene stesso.<sup>(35)</sup>

Tuttavia, prima d'ora il marcatore rs833069 non è mai stato preso in considerazione in studi di associazione con patologie oculari angioproliferative.

Anche se questi dati dovrebbero essere confermati con altri studi e in altre popolazioni, la forte associazione trovata nel nostro studio sottolinea un ruolo nella predisposizione genetica alle patologie oculari prese in esame, legate ad una variazione nel gene VEGF-A.

Per la prima volta, abbiamo analizzato anche polimorfismi nel gene KDR, il recettore che media la maggior parte degli effetti angiogenici del VEGF-A.

I dati più interessanti e originali del nostro studio riguardano l'associazione tra il polimorfismo rs2071559 del gene KDR e le patologie oculari angioproliferative.<sup>(41)</sup>

Il marker rs2071559 si trova nella regione del promotore (posizione -604), ed è stato precedentemente associato al rischio di patologie cardiache.<sup>(39)</sup>

Inoltre, studi funzionali hanno evidenziato che la presenza dell'allele T in posizione -604 a livello del promotore genico del KDR provoca un sensibile aumento dell'attività trascrizionale rispetto alla presenza dell'allele A.

Pertanto, possiamo ipotizzare che l'aumento dell'attività funzionale del KDR, sia correlata ad un incremento del segnale del VEGF che causa una eccessiva permeabilità microvascolare, aumento della proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali verso l'area di tessuto oculare dove è necessaria la creazione di una rete neovascolare anarchica. Questo porta alla formazione di lesioni tipiche dell'AMD neovascolare e la DR proliferativa.

Alla luce di queste scoperte, possiamo supporre che l'insorgenza e la progressione di queste patologie oculari sembrano verificarsi in pazienti suscettibili alla variabilità genetica presente nei geni VEGF-A e del recettore KDR. Le conoscenze sul ruolo del VEGF nelle patologie angioproliferative ha portato allo sviluppo di terapie farmacologiche basate sull'azione di anticorpi anti-VEGF che hanno notevolmente migliorato l'outcome visivo nei pazienti affetti da AMD e DR.<sup>(41), (43)</sup>

Quindi, trovare una predisposizione genetica all'AMD e DR, suggerisce un beneficio in termini di efficacia della terapia farmacologica.

Infatti una terapia basata su un background genetico individuale permetterebbe di testare una terapia personalizzata in fase precoce in modo da arrestare tempestivamente la comparsa delle lesioni oculari.

Inoltre, soggetti portatori di alleli di rischio o non di rischio potrebbero rispondere in maniera diversa alla terapia o potrebbero essere necessarie diverse quantità di farmaco anti-VEGF per aumentarne l'efficacia.

In conclusione, abbiamo trovato associazione tra polimorfismi nel VEGF-A e per la prima volta, nel gene KDR, con le patologie oculari angioproliferative (AMD, DR), allargando le attuali conoscenze sul ruolo del pathway del VEGF nella fisiopatologia di queste patologie e dimostrando un contributo genetico nella suscettibilità all'insorgenza dell'AMD e DR.

## INTRODUZIONE II

### CHEMOCINE

Le Chemochine (dal greco-*KINOS*, movimento) sono una famiglia di piccole citochine, o proteine, secrete dalle cellule. Il nome deriva dalla loro capacità di indurre direttamente la chemiotassi delle cellule responsive circostanti e quindi definite citochine a funzione prevalentemente chemiotattica.

L'appartenenza a questa classe di molecole si basa su criteri principalmente strutturali e, secondariamente genetici. Le chemochine, infatti, nonostante il loro alto numero costituiscono un gruppo omogeneo di piccole proteine che presentano un peso molecolare variabile da 8 a 12kD.

La loro struttura è caratterizzata dalla presenza all'estremità aminoterminale di un gruppo di cisteine, in posizioni altamente conservate all'interno della sequenza aminoacidica, che formano ponti disolfuro essenziali per la loro conformazione e funzionalità. Proprio il numero di questi aminoacidi contenenti zolfo e la presenza di residui aminoacidici che separano tra loro le prime cisteine della sequenza, vengono utilizzati per distinguere le chemochine in quattro principali sottofamiglie come vedremo in seguito.<sup>(44)</sup>

#### Caratteristiche strutturali

La famiglia delle chemochine può essere distinta in quattro sottofamiglie caratterizzate dalla presenza da due a quattro residui cisteinici. Le due famiglie principali di chemochine sono rappresentate dalle  $\alpha$ -chemochine (o CXC-chemochine) che hanno i due residui cisteinici NH<sub>2</sub>-terminali tra loro separati da un aminoacido non conservato (X), mentre la famiglia delle  $\beta$ -chemochine (o CC-chemochine) presenta due residui cisteinici giustapposti.

La famiglia delle  $\gamma$ -chemochine (o C-chemochine) contiene un solo residuo cisteinico in posizione NH<sub>2</sub>-terminale, mentre la famiglia delle  $\delta$ -chemochine (o CX<sub>3</sub>C-chemochine) mostra i due residui cisteinici tra loro separati da tre residui aminoacidici. La maggior parte delle chemochine umane appartiene alla famiglia delle  $\alpha$ -chemochine e  $\beta$ -chemochine. (Fig. 9)

Dal punto di vista strutturale le chemochine presentano delle sequenze aminoacidiche altamente omologhe e mostrano una struttura secondaria e terziaria simile. La dimerizzazione è sicuramente importante nella funzione di queste molecole perché questa è necessaria per il legame funzionale con il recettore.<sup>(44)</sup>

## Funzioni

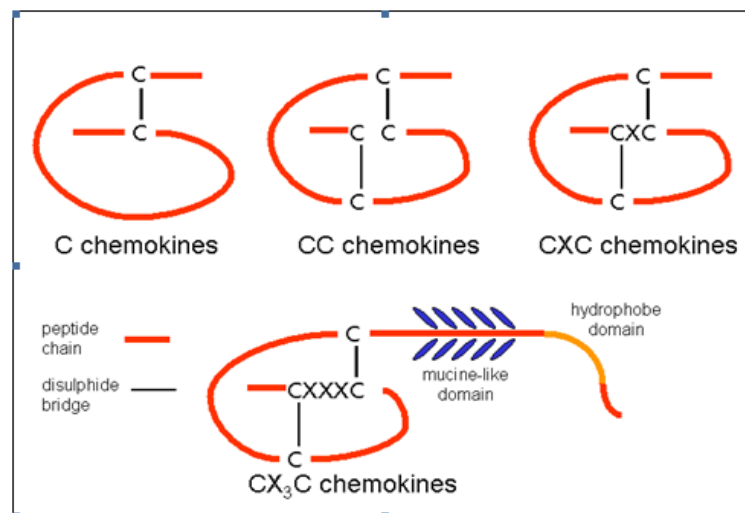
Le chemochine esprimono svariate funzioni, molte delle quali largamente sovrapposte, e sono prodotte da una grande varietà di tipi cellulari generalmente coinvolti nelle risposte flogistiche.

Come abbiamo già accennato, le chemochine sono molecole in grado di stimolare la motilità leucocitaria (chemiocinesi) e la locomozione cellulare (chemiotassi).

Il movimento di queste cellule avviene grazie alla formazione di un gradiente da parte delle chemochine (gradiente chemiotattico) a livello tissutale.

Attualmente si tende a suddividere le chemochine anche in base al loro ruolo funzionale: le chemochine infiammatorie e sono quelle responsabili dell'attivazione e del traffico leucocitario attraverso diversi compartimenti anatomici dovuto a fenomeni patologici. Altre sono considerate omeostatiche perché sono coinvolte nel controllo della migrazione delle cellule durante i processi di sviluppo e mantenimento dei tessuti. Inoltre possono anche promuovere l'attività angiogenica/angiostatica, lo sviluppo tumorale, l'apoptosi, la differenziazione delle cellule T, l'attività dei fagociti e sono inoltre capaci di modulare l'espressione genica.

Queste proteine esercitano il loro effetto biologico attraverso l'interazione con recettori transmembrana accoppiati con proteine G, chiamati recettori per le chemochine, che si trovano selettivamente sulla superficie delle loro cellule bersaglio.<sup>(45)</sup>



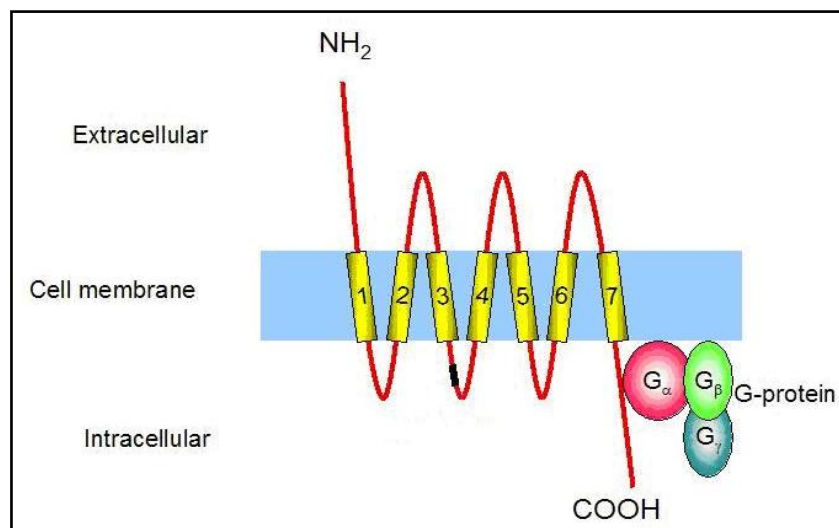
**Fig.9:** Struttura delle classi di chemochine.

## RECETTORI DELLE CHEMOCHINE

### Caratteristiche strutturali e trasduzione del segnale

I recettori per le chemochine sono classificati in diverse famiglie, recettori per CXC, per CC, per XC e per CX3C chemochine che corrispondono alle quattro distinte sottofamiglie di chemochine che essi sono in grado di legare.<sup>(46)</sup> I recettori per le chemochine sono recettori accoppiati a proteine G caratterizzate da sette  $\alpha$ -eliche che attraversano la membrana plasmatica e si trovano principalmente sulla superficie dei leucociti. L'attacco del ligando al dominio extracellulare di questi recettori induce una modificazione conformazionale che permette al dominio citosolico del recettore di legarsi ad una proteina  $G_{\alpha\beta\gamma}$ , una proteina associata alla faccia interna della membrana in grado di legare il GTP e di catalizzarne l'idrolisi a GDP. Questa interazione determina lo scambio del GDP con GTP da parte della proteina G, causandone la dissociazione della subunità $_{\alpha}$  dalle subunità $_{\beta\gamma}$ .

Nel lasso di tempo che intercorre tra la dissociazione delle due porzioni della proteina e l'idrolisi del GTP da parte della subunità $_{\alpha}$ , queste sono in grado di interagire con i propri target molecolari e innescare, all'interno della cellule, la cascata di trasduzione del segnale. (Fig. 10).<sup>(47)</sup>



**Fig.10:** Tipica struttura di un recettore per le chemochine, a sette domini transmembrana. I recettori per le chemochine sono recettori accoppiati a proteine G.

### Recettore per le chemochine CCR3

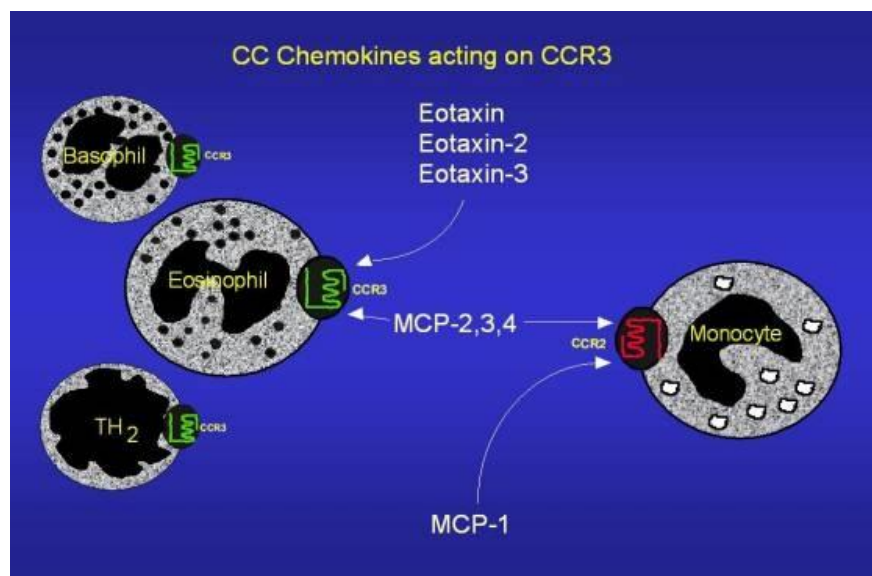
CCR3 è in un CC recettore in grado di legare differenti tipi di  $\beta$ -chemochine. Alcune di queste includono: MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, Eotassina 1 (CCL11), Eotassina 2 (CCL24), Eotassina 3 (CCL26).

L'eotassina ha ricevuto molta attenzione nello studio degli effetti del CCR3 nell'asma e nelle allergie. Questa  $\beta$ -chemochina è prodotta dai monociti, dai linfociti T, nell'endotelio e a livello dell'epitelio parietale.<sup>(48)(49)(50)</sup>

La chemochina eotassina riconosce il recettore CCR3 che è espresso principalmente nei linfociti Th2 e negli eosinofili e basofili. Le eotassine svolgono importanti ruoli nella regolazione degli eosinofili nel sangue e del loro accumulo nei siti di flogosi durante le reazioni allergiche (Fig. 11).

Infatti, nei soggetti asmatici il CCR3 e le eotassine sono altamente espresse nelle vie respiratorie in correlazione alla gravità della malattia, compromettendo la funzione delle vie aeree.<sup>(51)</sup>

CCR3 è importante anche nella regolazione basale degli eosinofili nella mucosa del tratto intestinale e a livello polmonare.<sup>(52)</sup>



**Fig.11:** Esempio di chemochine che agiscono sul CCR3. In figura è mostrato la caratteristica struttura trans-membrana di CCR3, costituito da un dominio intracellulare ed extracellulare.



### **Il CCR3 potrebbe essere considerato come nuovo target associato alle patologie oculari angioproliferative?**

Il pathway CCR3/Eotassina ha ricevuto molta attenzione in un recente studio pubblicato su *Nature*.<sup>(53)</sup>

La degenerazione maculare legata all'età (AMD) viene generalmente classificata in una forma "secca" o atrofica a carattere cronico, lento e progressivo ed in una forma essudativa o "umida", più rapida ed aggressiva, altamente invalidante e caratterizzata, in modo distintivo, dalla presenza di una neovascolarizzazione coroideale (CNV).

Takeda *et al.* hanno individuato un nuovo ruolo per CCR3 e i ligandi eotassina 1,2,3, nella crescita dei vasi sanguigni anomali che caratterizza la forma grave dell'AMD CNV.

In questo studio emerge che CCR3 e le eotassine sono espresse in modo specifico nelle cellule endoteliali che rivestono i vasi sanguigni anomali della coroide esclusivamente nei pazienti affetti dalla degenerazione maculare associata alla neovascolarizzazione coroideale (CNV).

Infatti, il pathway CCR3/eotassina non viene espresso dall'endotelio coroidale in soggetti sani o in pazienti affetti da AMD "secca" o atrofica o in altri tipi di disturbi che colpiscono la coroide o la retina.

Tale scoperta suggerisce che l'espressione e l'azione di queste  $\beta$ -chemochine svolgono un ruolo funzionale nella patologia oculare di origina angioproliferativa.

L'aspetto interessante è che il CCR3 e le eotassine non sembrano contribuire alla patogenesi attraverso il reclutamento di eosinofili o mastociti, in quanto queste cellule non sono presenti nella coroide dei pazienti affetti da AMD CNV. (Fig. 12)

Takeda e collaboratori hanno dimostrato sperimentalmente su un modello murino che l'attivazione del CCR3 può promuovere diversi step dell'angiogenesi a livello coroidale piuttosto che un effetto indiretto attraverso la modulazione delle cellule infiammatorie.

In letteratura è presente un unico lavoro che attribuisce un ruolo diretto dell'eotassina 1 nell'angiogenesi.<sup>(54)</sup> Il possibile coinvolgimento del CCR3 nell'insorgenza dell'AMD CNV, potrebbe suggerire un approccio farmacologico alternativo nel target anti-angiogenico per un migliore trattamento della diagnosi precoce della patologia.

Oggi, il trattamento farmacologico consiste in agenti che bloccano il VEGF-A, noto fattore coinvolto nella formazione di nuovi vasi sanguigni. Tuttavia, solo un terzo dei pazienti traggono beneficio da tali trattamenti.<sup>(42)</sup>

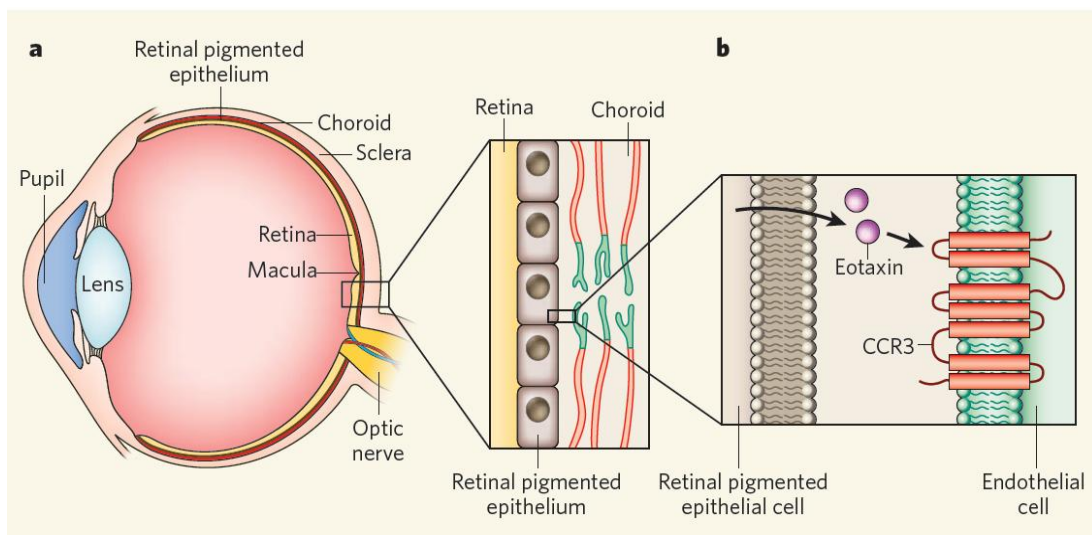


Takeda e colleghi affermano che topi affetti da AMD CNV rispondono in maniera più efficace al trattamento con anticorpi neutralizzanti il CCR3, rispetto alla terapia con agenti anti-VEGF-A. <sup>(53)</sup>

Alla luce di queste importanti scoperte, il targeting CCR3 sembra essere una strada promettente per migliorare l'attuale standard di cura per AMD.

Infine, questi studi portano a pensare che il CCR3 potrebbe essere definito come un nuovo marcatore di angiogenesi patologica e come gene funzionale nello sviluppo dell'AMD neovascolare.

Pertanto, questi risultati ci hanno incoraggiato a ricercare polimorfismi genetici nei geni CCR3 ed eotassina 1, 2, 3, in pazienti affetti da AMD e di ampliare l'indagine in altre malattie oculari angioproliferative come la retinopatia diabetica (DR).



**Fig.12:** Espressione del CCR3 nella degenerazione maculare.

**a:** nella forma umida dell'AMD, i vasi sanguigni proliferano nella coroide in un processo chiamato neovascolarizzazione coroideale (CNV). I neovasi della coroide (in verde) producono un essudato o emorragie nella retina sottostante, danneggiando la regione centrale della macula.

**b:** Takeda et al. mostrano che CCR3 è espresso sulla superficie delle cellule endoteliali dei neovasi coroidali ma non sulle cellule quiescenti. Il legame del CCR3 con le eotassine, secreti dalle cellule epiteliali pigmentate della retina, suggeriscono un ruolo funzionale nello sviluppo dell'AMD CNV.

## **SCOPO DELLA TESI II**

Ad oggi, CCR3 è conosciuto soprattutto per la sua espressione sugli eosinofili.

Gli eosinofili stimolati dalle eotassine, i ligandi del CCR3, sono in genere attratti dal sito di infiammazione, per esempio, nelle vie aeree in caso di asma o reazioni allergiche.

Per questa ragione, in letteratura sono disponibili molti studi che indagano sulla correlazione tra polimorfismi CCR3/eotassina 1, 2, 3 come fattori di suscettibilità per l'insorgenza di malattie autoimmuni allergiche come asma, dermatite, celiachia e artrite reumatoide. <sup>(55), (56), (57), (58), (59), (60), (61), (62), (63), (64), (65), (66), (67).</sup>

Fino ad ora, nessuno ha esaminato la possibile relazione tra questi polimorfismi con le malattie oculari angioproliferative.

Lo scopo, in questa seconda parte dello studio è determinare, per la prima volta, se polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nei geni CCR3 ed eotassina 1, 2, 3 sono associati a patologie oculari angioproliferative (AMD, DR).

Inoltre, ai fini dell'analisi abbiamo eseguito la completa messa a punto di un nuovo metodo high-throughput di genotipizzazione con ausilio dello strumento BeadXpress (Illumina).

Quest'ultima tecnologia è stata inoltre utilizzata per confermare l'associazione del pathway VEGF/KDR con l'AMD e DR (vedi prima parte dello studio) ampliando il numero di SNP studiati in questi due geni.

## **MATERIALI E METODI II**

### **• Selezione della casistica**

Tutti i partecipanti allo studio sono stati reclutati in modo prospettico per questo studio a partire da gennaio 2007 a dicembre 2010 con l'approvazione del Comitato Etico dell'Ospedale Sant'Antonio di Padova. Il consenso informato è stato ottenuto da ciascun soggetto dopo spiegazione completa dello scopo e della natura di tutte le procedure utilizzate. Lo studio è stato condotto in conformità con le linee guida nella Dichiarazione di Helsinki.

In questa prima parte lo studio si compone di una casistica totale di 720 individui, suddivisi nei seguenti gruppi:

- 262 controlli sani
- 148 individui con AMD atrofica
- 135 individui con AMD neovascolare
- 127 individui con DR non proliferante
- 48 individui con DR proliferante

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad un esame oftalmico dettagliato presso l'Unità Operativa di Oculistica dell'ospedale Sant'Antonio di Padova, come descritto nella prima parte del lavoro.

L'età media dei pazienti AMD è  $66,2 \pm 5,3$  anni rispettivamente. L'età media dei pazienti e dei controlli DR è  $51,4 \pm 4,8$  e  $61,3 \pm 5,7$  anni rispettivamente.

I controlli sono rappresentati da soggetti sani sottoposti ad una valutazione medico oculista standard. La percentuale di maschi/femmine è risultata simile tra casi e controlli. Tutti i casi e controlli sono di origine Caucasica, provenienti del Nord-Est d'Italia.

A tutti i partecipanti è stato effettuato un prelievo ematico, da cui è stato ricavato il DNA genomico mediante l'uso di un kit commerciale di estrazione DNA (QIAamp DNA blood kit, Qiagen, Germany) come precedentemente descritto.

### **• Selezione dei polimorfismi**

I criteri di selezione dei polimorfismi scelti in questa seconda parte sono gli stessi utilizzati nella prima parte.

Brevemente, la selezione si è basata inizialmente su una vasta ricerca bibliografica per includere quei polimorfismi genetici che sono coinvolti nell'insorgenza delle patologie di interesse. Tutti gli SNP devono avere un valore del (MAF)  $\geq 0,05$  e sono

stati inclusi in modo particolare quelli che causano un'alterazione dell'attività funzionale del gene, nella popolazione di origine Caucasica.

In questa seconda parte dello studio, sono stati selezionati un totale di 46 polimorfismi, dei quali 14 nel gene CCR3, 8 nel gene CCL11 (eotassina1), 4 nel gene CCL24 (eotassina 2), 5 nel gene CCL26 (eotassina 3), 11 nel gene VEGF-A e 4 nel gene KDR come mostrato in Tab 10.

Il sistema utilizzato per la tipizzazione degli SNPs è quello della tecnologia Illumina. Illumina BeadXpress Reader è un sistema high-throughput a scansione laser dual-color che consente di analizzare un'ampia varietà di saggi in mutiplex sviluppati usando la tecnologia digitale a microbeads VeraCode. Tale tecnologia si basa sull'utilizzo di microbeads, cioè cilindri di vetro ognuno dei quali è associato ad un codice a barre olografico che identifica lo SNP da analizzare. Quando eccitato dal laser, ogni microbead emette un segnale fluorescente che discrimina l'allele specifico per lo SNP.

Questa tecnologia permette di analizzare da 1 a 384 biomarkers contemporaneamente per soggetto con un sistema rapido ed efficiente di multiplexing. Ogni microbead viene scansionata singolarmente e la sua presenza in molteplice copia garantisce risultati affidabili e accurati. L'analisi dei dati è semplificata poi dall'uso di software Illumina dedicati che permettono di leggere i dati in semplici tabelle.

LOCUS NAME	CHR	MAF CAUCASIAN	GENE SYMBOL	LOCATION	LOC. REL. GENE
rs3091312	3	0.333	CCR3	flanking3'UTR	-310
rs9854964	3	0.1298	CCR3	intron	-8799
rs3091311	3	0.1336	CCR3	intron	-163
rs3091309	3	0.217	CCR3	intron	-572
rs9853223	3	0.1947	CCR3	intron	-64
rs6441948	3	0.4	CCR3	intron	-7979
rs9811301	3	0.1298	CCR3	intron	-3208
rs9842716	3	0.388	CCR3	flanking5'UTR	-1514
rs17217831	3	0.1458	CCR3	intron	-1198
rs3091250	3	0.379	CCR3	intron	-509
rs1491962	3	0.4	CCR3	intron	-772
rs4987053	3	0.067	CCR3	coding	[50/1017]
rs13073976	3	0.067	CCR3	intron	-2634
rs12636651	3	0.0878	CCR3	flanking5'UTR	-1297
rs17809012	17	0.5	CCL11	flanking 5'UTR	-243
rs4795895	17	0.158	CCL11	flanking 5'UTR	-1241
rs4795896	17	0.108	CCL11	flanking 5'UTR	-435
rs1860184	17	0.254	CCL11	intron	-229
rs3815341	17	0.067	CCL11	intron	-179
rs1019109	17	0.258	CCL11	3' UTR	[410/79]
rs3744508	17	0.175	CCL11	coding	[66/9]

LOCUS NAME	CHR	MAF CAUCASIAN	GENE SYMBOL	LOCATION	LOC. REL. GENE
rs17736027	17	0.4792	CCL11	flanking3'UTR	-352
rs2302004	7	0.39	CCL24	intron	-106
rs2302005	7	0.23	CCL24	intron	-18
rs11465315	7	0.45	CCL24	flanking3'UTR	-6
rs11465295	7	0.15	CCL24	intron	-217
rs2302009	7	0.2292	CCL26	3' UTR	[156/12]
rs2240478	7	0.225	CCL26	intron	-4
rs10275464	7	0.2292	CCL26	intron	-534
rs7787623	7	0.217	CCL26	intron	-3189
rs10236735	7	0.217	CCL26	intron	-4957
rs3025007	6	0.2826	VEGFA	intron	-716
rs3025039	6	0.0965	VEGFA	3' UTR	[170/1688]
rs3024994	6	0.083	VEGFA	intron	-1378
rs2010963	6	0.2	VEGFA	5' UTR	[397/93]
rs699947	6	0.408	VEGFA	flanking5'UTR	-1564
rs3025021	6	0.3478	VEGFA	intron	-530
rs833061	6	0.2786	VEGFA	flanking5'UTR	-467
rs2146323	6	0.321	VEGFA	intron	-111
rs735286	6	0.3864	VEGFA	intron	-585
rs25648	6	0.1455	VEGFA	coding	[533/72]
rs10434	6	0.37	VEGFA	3' UTR	[846/1012]
rs10020464	4	0.25	KDR	intron	-401
rs2305948	4	0.067	KDR	coding	[87/90]
rs7692791	4	0.4375	KDR	intron	-54
rs7667298	4	0.2214	KDR	5' UTR	[270/31]

*Tab.10: Elenco dei 46 SNPs selezionati. Ogni polimorfismo è caratterizzato da un valore identificativo "rs", posizione cromosomica, valore del MAF nella popolazione Caucasica, il simbolo genico e la posizione all'interno del gene.*

• **Progettazione dell'OPA (Oligo Pool Assay)**

Per ogni SNP da analizzare vengono disegnati due oligonucleotidi allele specifici (ASO: Allele-Specific Oligonucleotides) e un oligonucleotide locus specifico (LSO: Locus Specific Oligonucleotides) circa 20 bp a valle dell'oligonucleotide allele specifico.

Illumina fornisce un servizio *on-line* Assay Design Tool (ADT; Illumina), che permette di raccogliere i diversi SNPs in gruppi, detti pannelli, a seconda degli alleli e delle caratteristiche della regione circostante. Infine l'OPA viene sintetizzato e spedito direttamente in laboratorio.

• **Biotinilizzazione del DNA genomico**

Il DNA genomico viene inizialmente biotinilato attraverso un'attivazione chimica ad alte temperature ( 95°C) per 30 minuti.

Il DNA biotinilato viene precipitato con sali d'ammonio e ripulito con isopropanolo in modo da eliminare i reagenti di biotinizzazione in eccesso.

I vari steps della metodica sono illustrati in Fig. 13.

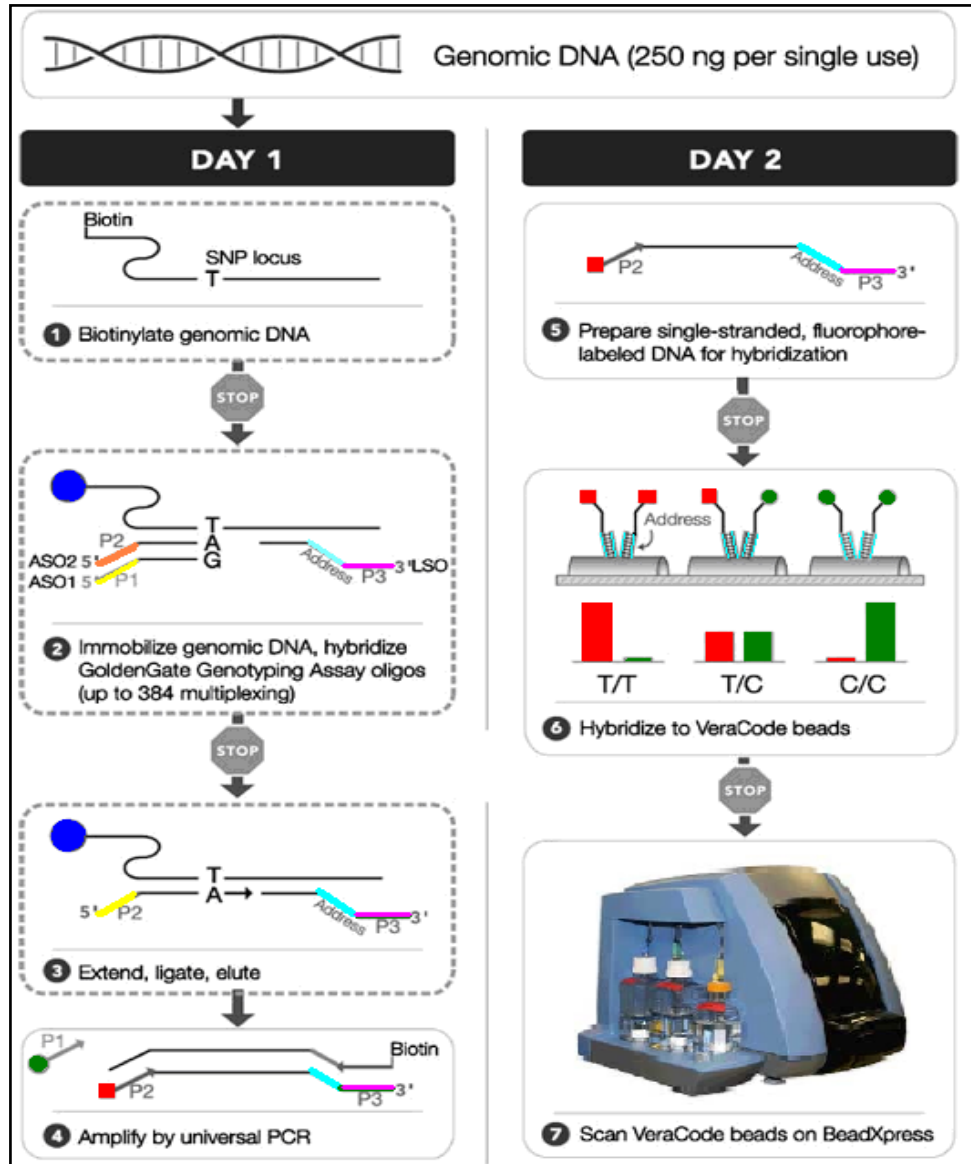


Fig.13: Schema del saggio Illumina (tecnologia digitale a microbeads VeraCode).

- **Immobilizzazione del DNA biotinilato e annealing con gli Oligo Pool Assay (OPA)**

Il DNA genomico biotinilato viene attivato coniugandolo ad un supporto solido (particelle sferiche paramagnetiche contenenti streptavidina).

Per ogni SNP da analizzare vengono impiegati due oligonucleotidi allele specifici (ASO: *Allele-Specific Oligonucleotides*) e un oligonucleotide locus specifico (LSO: *Locus Specific Oligonucleotides*). Ogni ASO termina al 3' con una base che si

ibridizza (in modo allele specifico) al DNA genomico in corrispondenza dello SNP, mentre al 5' contiene una regione complementare ad un primer universale per la PCR (P1 o P2 coniugati ad una cianina: Cy3 o Cy5 a seconda dell'allele). L' LSO, invece, è costituito da tre regioni: al 5' c'è una sequenza locus-specifica per lo SNP, nella porzione centrale una sequenza indirizzo complementare ad una delle molteplici sonde presenti nelle microbeads, e al 3' una sequenza complementare ad un primer universale (P3). (Fig. 13)

L'annealing dei diversi primer viene favorita da un gradiente di temperatura da 70°C iniziale fino a scendere 30°C finale che diminuisce gradualmente nell'arco di due ore. Quindi in seguito al passaggio per l'annealing degli oligonucleotidi disegnati per il saggio di specifici SNPs di interesse, sono necessari diversi lavaggi per eliminare gli oligonucleotidi che non si sono legati e che potrebbero interferire con gli steps successivi.

- **Reazione di estensione e di ligazione**

Si utilizza una polimerasi in grado di effettuare l'estensione di un oligonucleotide che si ibridizza perfettamente al 3' con la sequenza del DNA target. In questo modo viene riempito il gap fra ogni ASO e LSO generando un substrato allele specifico per la reazione di PCR.

Il frammento sintetico prodotto in seguito alla contemporanea reazione di estensione e ligazione viene raccolto e separato dal DNA genomico coniugato con sfere paramagnetiche con l'ausilio di una piastra magnetica.

- **Reazione di PCR**

La reazione di amplificazione multiplex PCR è stata eseguita in termociclatore (C100 Thermal Cycler, BioRad) seguendo le indicazioni del produttore.

Le condizioni di amplificazione sono: un ciclo di denaturazione a 95°C per 3 minuti, 34 cicli con denaturazione a 95°C per 35 secondi, annealing a 56°C per 35 secondi, ed estensione a 72°C per 2 minuti, seguito da estensione finale a 72°C per 10 minuti. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 50 µl con 250 ng di DNA.

La mix da utilizzare per la reazione di PCR è fornita direttamente dal produttore, aggiungendo 64 µl di enzima TITANIUM Taq DNA polimerasi 50 X (Clontech). Durante la PCR, ogni template sintetico è amplificato con uno dei due primers universale marcato con fluoroforo (P1 o P2), a seconda della variante allele presente e con un primer universale biotinilato (P3).



- **Reazione di ibridazione**

La reazione di ibridazione avviene incubando la piastra dell'array per tre ore, a 45°C, al buio e in continua agitazione (850 rpm).

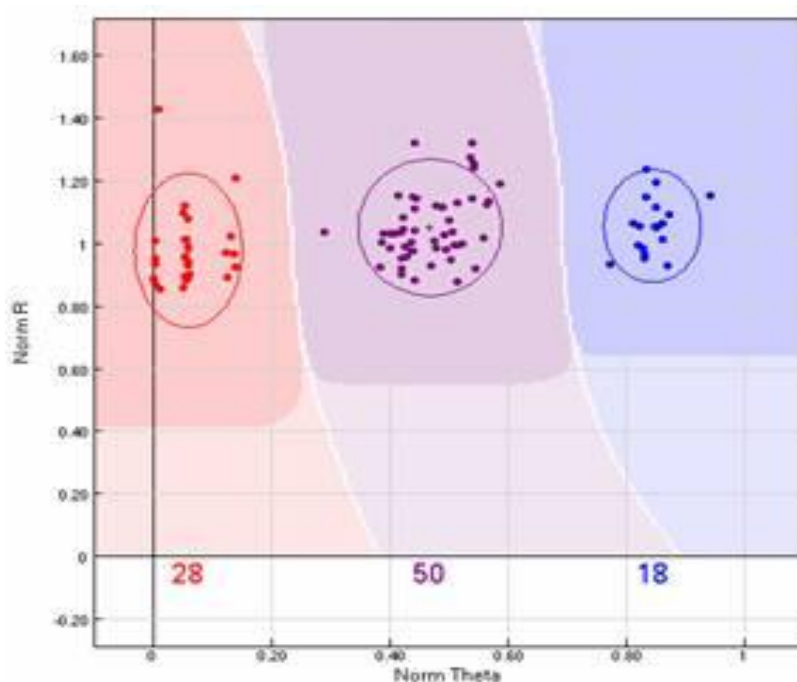
I prodotti di PCR, infine, si ibridano alle sonde presenti sulla superficie delle microbeads di vetro tramite la sequenza indirizzo.

Come precedentemente spiegato, ad ogni SNP è assegnata una sequenza indirizzo contenuta nell' LSO, complementare ad una sola sonda presente nella microbeads.

Diversi lavaggi finali, permettono di eliminare i prodotti che non si sono legati alle microbeads e che potrebbero interferire durante la lettura del segnale fluorescente.

- **Analisi della piastra**

Prima di eseguire la scansione, bisogna creare il disegno della piastra, in modo che, nelle successive analisi i vari programmi riconoscano la posizione dei campioni. Il disegno della piastra viene impostato con Genome Studio, uno dei programmi forniti nel pacchetto Illumina Genotyping System Software, insieme a VeraScan Software che permettono l'analisi e l'interpretazione dei risultati della scansione.



**Fig.14:** Rappresentazione grafica dei risultati forniti dal sistema Illumina per il genotyping di uno SNP. I tre cluster sono formati in base ai segnali di fluorescenza, ottenuti per individui omozigoti AA (rosso), eterozigoti AB (viola), omozigoti BB (blu).

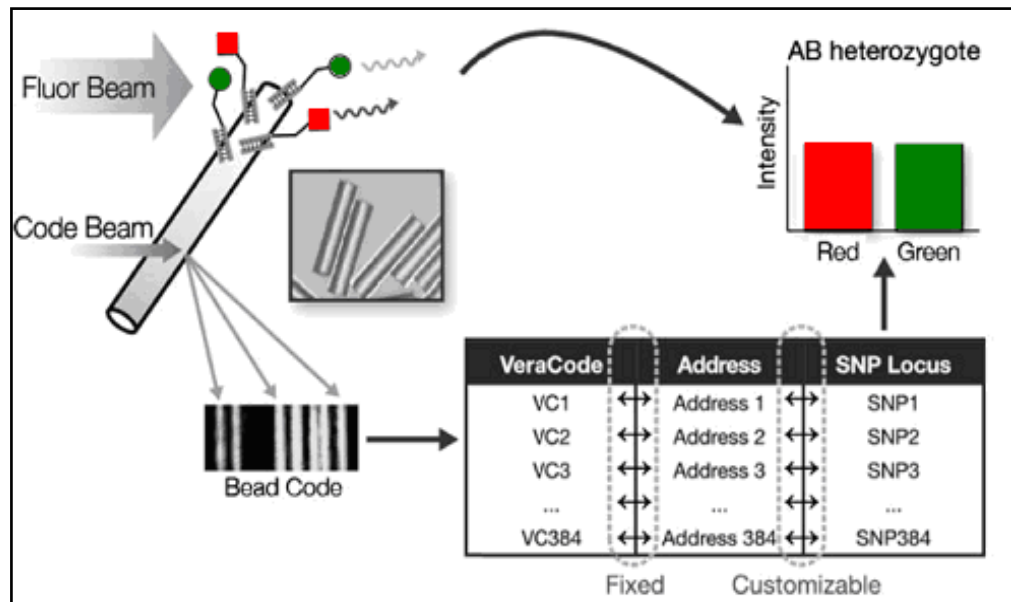
Grafico elaborato dal software di analisi Genome Studio.



La tecnologia Illumina è basata su due elementi distintivi e peculiari.

Il primo è un codice olografico inscritto in ciascuna microbead di forma cilindrica con dimensioni di 28x240 micron. Le microbeads sono fatte di silice e quindi la loro superficie risulta ottimale come supporto per le analisi molecolari.

La seconda caratteristica è il lettore BeadXpress, uno strumento di rilevazione a due laser. Il primo è adatto a captare il segnale fluorescente emesso dai fluorofori Cy3 e a Cy5 presente in prossimità del sito polimorfico. Quindi nel caso di un campione omozigote per un dato SNP, il rilevatore osserva un solo tipo di fluorescenza (o quella dipendente dal primer P1 coniugato alla Cy3 o dal primer P2 coniugato alla Cy5), invece in presenza di un campione eterozigote verranno rilevate entrambi i tipi di fluorescenza (Cy3 e Cy5). Di conseguenza il rapporto dei segnali relativi alle due diverse fluorescenze identifica il genotipo come AA, AB, o BB. (Fig. 14)



**Fig.15:** La tecnologia VeraCode che si basa sulle microbeads, consente un'immediata associazione dei segnali di fluorescenza allele-specifici per i loci polimorfici grazie alla presenza di due laser in grado di captare l'intensità di fluorescenza "fluorbeam" e l'identità del polimorfismo attraverso il codice olografico "code beam".

Invece, il secondo laser è in grado di identificare ciascuna microbead e quindi quel dato polimorfismo, attraverso il codice olografico. In questo modo lo strumento BeadXpress Reader è in grado di identificare entrambi gli alleli dei diversi loci polimorfici per un massimo di 96 campioni per volta. (Fig. 15)

- **Analisi statistica**

I campioni sono stati analizzati con gli stessi test statistici utilizzati nella prima parte dello studio.

## RISULTATI II

In questa seconda parte dello studio tutti i 283 pazienti affetti da AMD, i 175 pazienti affetti da DR e 262 controlli sani sono stati tipizzati per 46 marcatori polimorfici. La tabella 10 mostra i valori delle frequenze dell'allele minore (MAF) di ciascun polimorfismo nella popolazione di controllo.

Dei 46 marcatori selezionati 5 (rs13073976 nel gene CCR3, rs3744508 nel gene CCL11, rs11465295 nel gene CCL24, rs10236735 nel gene CCL26, rs25648 nel gene VEGF) sono falliti durante l'analisi e quindi eliminati dalla casistica. Degli altri 41 SNP, 4 (rs3091309 di CCR3, rs3815341, rs4795895 di CCL11 e rs3024994 di VEGF-A) non risultano in equilibrio di HW e pertanto non sono stati considerati per ulteriori analisi.

I restanti 37 SNPs (12 nel gene CCR3, 5 nel gene CCL11, 3 nel gene CCL24 e 4 nel gene CCL26, 9 nel gene VEGF-A e 4 nel gene KDR) risultano informativi e quindi considerati per le differenze alleliche e la distribuzione dei genotipi tra casi e controlli. L'analisi di Linkage Disequilibrium (LD) non ha mostrato alcuna correlazione tra questi polimorfismi.

L'analisi delle frequenze alleliche e genotipiche dei geni CCR3, eotassine 1,2, 3 tra i gruppi dei pazienti AMD e DR ed il gruppo di controllo, non ha evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa.

D'altra parte abbiamo riscontrato un'associazione significativa tra il polimorfismo rs3025021 nel gene VEGF-A e l'AMD con un  $p$  for trend di  $<0.0001$ .

Il calcolo dell'OR evidenzia che l'allele di rischio per questo polimorfismo è G ed il rischio di AMD aumenta di 3 volte per questo allele (OR= 3.326, 95% CI=2.594-4.266) rispetto all'allele non di rischio A, come mostrato in Tab. 11.

SNP	Genotype count <sup>a</sup>		Per allele	OR (95% CI)	
	Controls	Cases		Heterozygote <sup>b</sup>	Homozygote <sup>c</sup>
rs3025021 (VEGF-A)	63/50/149	110/135/38	3.265 (2.463-4.330)	10.587 (6.539-17.140)	6.846 (4.270-10.976)

**Tab.11:** Associazione tra gli SNP rs3025021 nel gene VEGF-A (con allele di rischio G) con la patologia AMD.

<sup>a</sup> Numero di individui genotipizzati come: omozigoti per l'allele di rischio /eterozigoti per l'allele di rischio /omozigoti per l'allele non di rischio.

<sup>b</sup> OR per eterozigoti portatori dell'allele di rischio rispetto agli omozigoti portatori dell'allele non di rischio.

<sup>c</sup> OR per omozigoti portatori dell'allele di rischio rispetto agli omozigoti portatori di allele non di rischio.

In particolare, si osserva un aumento del numero di eterozigoti AG e omozigoti GG per il polimorfismo rs3025021 (VEGF) nei casi AMD rispetto ai controlli.

Infatti, la sola presenza di un allele di rischio G per questo SNP è sufficiente ad incrementare il rischio di insorgenza della patologia con un OR maggiore di 10 (OR=10.587, 95% CI=6.539-17.140) per gli eterozigoti AG e con un OR di 6 per gli omozigoti GG (OR=6.846, 95% CI=4.270-10.976), rispetto ai soggetti omozigoti AA. (Tab. 11).

L'aumento del rischio è risultata simile tra AMD neovascolare e non neovascolare (dati non mostrati).

Per quanto riguarda la patologia DR abbiamo notato un'associazione significativa con i polimorfismi rs3025021 nel gene VEGF-A e rs7667298 nel gene KDR con un *p* for trend di <0.0001 e un *p* for trend di 0.009, rispettivamente.

In particolare, per questa patologia oculare si osserva un incremento del numero di eterozigoti AG e omozigoti GG per il polimorfismo rs3025021 (VEGF-A) e un aumento del numero di omozigoti GG per il polimorfismo rs7667298 (KDR) nei pazienti DR rispetto ai controlli.

Anche in questo caso, il calcolo dell'OR evidenzia che l'allele di rischio per il polimorfismo rs3025021 (VEGF-A) è G ed il rischio di DR aumenta di 3 volte per tale allele (OR= 3.265, 95% CI=2.463-4.330) rispetto all'allele non di rischio A, come mostrato in Tab. 12.

Come per l'AMD, anche per la DR, la sola presenza di un allele di rischio G per questo SNP è sufficiente ad incrementare il rischio di insorgenza della patologia con un OR maggiore di 8 (OR=10.587, 95% CI=6.539-17.140) per gli eterozigoti AG e con un OR di 6 per gli omozigoti GG (OR=6.846, 95% CI=4.270-10.976), rispetto ai soggetti omozigoti AA. (Tab. 12).

SNP	Genotype count <sup>a</sup>		Per allele	OR (95% CI)	
	Controls	Cases		Heterozygote <sup>b</sup>	Homozygote <sup>c</sup>
rs3025021 (VEGF-A)	63/50/149	70/78/27	3.265 (2.463-4.330)	8.607 (5.004-14.805)	6.131 (3.598-10.445)
rs7667298 (KDR)	65/139/58	70/82/23	1.644 (1.246-2.169)	1.487 (0.854-2.590)	2.715 (1.506-4.894)

**Tab. 12:** Associazione tra gli SNP rs3025021 nel gene VEGF-A (con allele di rischio G) e rs7667298 nel gene KDR (con allele G di rischio) con la patologia DR.

<sup>a</sup> Numero di individui genotipizzati come: omozigoti per l'allele di rischio / eterozigoti per l'allele di rischio / omozigoti per l'allele non di rischio.

<sup>b</sup> OR per eterozigoti portatori dell'allele di rischio rispetto agli omozigoti portatori dell'allele non di rischio.

<sup>c</sup> OR per omozigoti portatori dell'allele di rischio rispetto agli omozigoti portatori di allele non di rischio.

Nel caso del polimorfismo rs7667298 (KDR), l'analisi delle frequenze alleliche per quest'ultimo marcatore ha invece evidenziato che la presenza di un solo allele di rischio G non è sufficiente per aumentare il rischio di insorgenza della DR, infatti il valore dell'OR non risulta statisticamente significativo (OR=1.487, 95% CI=0.854-2.590), come mostrato in Tab.12.

D'altra parte, l'analisi delle frequenze genotipiche evidenzia che gli omozigoti portatori dell'allele di rischio G sono associati ad un rischio di quasi 3 volte superiore di sviluppare la patologia DR (OR=2.715, 95% CI=1.506-4.894) rispetto ai soggetti omozigoti per l'allele non di rischio A (Tab. 12).

L'analisi aplotipica per entrambi i marcatori polimorfici rs7667298 (KDR) e rs3025021 (VEGF-A) rivela che i soggetti portatori per entrambi gli alleli di rischio (KDR rs7667298-G e VEGF-A rs3025021-G) hanno un rischio di insorgenza della DR di ben 7 volte maggiore (OR=7.34, 95% CI = 4.612-11.683) rispetto ai soggetti portatori di entrambi gli alleli non di rischio (KDR rs7667298-A e VEGF-A rs3025021-A), come mostrato in Tab. 13.

<i>KDR</i> rs7667298 - <i>VEGF-A</i> rs3025021	Controls (n=524) n (%)	Cases (n=342) n (%)	OR (95% CI)
G-G	72 (13.7%)	126 (36.8%)	7.34 (4.612-11.683)
A-G	78 (14.8%)	60 (17.5%)	2.089 (1.369-3.187)
G-A	171 (32.6%)	64 (18.7%)	1.57 (0.988-2.495)
A-A	151 (28.8%)	36 (10.5%)	reference
Undefined (double heterozygotes)	64 (12.2%)	52 (15.2%)	5.162 (3.082-8.647)

**Tab.13:** *Analisi dell'aplotipo per gli SNP: rs7667298-G nel gene KDR e rs3025021-G nel gene VEGF-A.*

*Odds Ratios (OR) sono calcolati rispetto ai portatori per entrambi gli alleli non di rischio (KDR rs7667298-A e VEGF-A rs3025021-A).*

L'aumento del rischio è risultata simile tra la DR proliferativa e la forma non proliferativa (dati non mostrati).

## DISCUSSIONE II

Il pathway CCR3/Eotassina ha ricevuto molta attenzione in un recente studio pubblicato su *Nature*.<sup>(53)</sup> Takeda *et al.* hanno evidenziato che il CCR3 e i ligandi eotassina 1,2,3 hanno un ruolo diretto nell'angiogenesi e quindi in grado di stimolare la crescita dei vasi sanguigni anomali che caratterizza la forma grave dell'AMD CNV.<sup>(53)</sup>

Pertanto, questi risultati ci hanno incoraggiato a ricercare polimorfismi genetici nei geni CCR3 ed eotassina 1,2,3 in pazienti affetti da AMD e di ampliare l'indagine in altre malattie oculari angioproliferative come la retinopatia diabetica (DR). Entrambe queste patologie oculari, infatti, sono caratterizzate da una eccessiva neovascolarizzazione che colpisce la regione maculare della retina con progressiva perdita della visione.

L'analisi genotipica dei 24 polimorfismi distribuiti uniformemente nei geni CCR3 ed eotassina 1,2,3, non ha evidenziato nessuna associazione significativa al rischio di insorgenza per entrambe le patologie oculari prese in esame. Infatti, nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata nella distribuzione delle frequenze genotipiche tra i gruppi di pazienti ed il gruppo del controllo.

Ad oggi, CCR3 è conosciuto soprattutto per la sua espressione sugli eosinofili.

Per questa ragione, in letteratura sono disponibili soltanto studi che indagano sulla correlazione tra polimorfismi del CCR3/eotassina 1, 2, 3 come fattori di suscettibilità per l'insorgenza di malattie autoimmuni allergiche come asma, dermatite, celiachia e artrite reumatoide.<sup>(55),(56),(57),(58),(59),(60),(61),(62),(63),(64),(65),(66),(67)</sup>

Inoltre, in letteratura è disponibile soltanto un unico lavoro, oltre a quello di Takeda *et al.*, che attribuisce all'eotassina 1 un ruolo diretto nell'angiogenesi.<sup>(54)</sup>

Nell'insieme questi risultati portano ad ipotizzare che il pathway CCR3/eotassina 1,2,3 svolga un ruolo secondario nei processi fisiopatologici che portano all'insorgenza delle patologie oculari.

Nelle patologie multifattoriali infatti alcuni geni non sarebbero causa di malattia ma piuttosto ne influenzerebbero o determinerebbero particolari aspetti, comportandosi come geni modificatori.

Inoltre, ai fini dell'analisi abbiamo eseguito la completa messa a punto di un nuovo metodo high-throughput di genotipizzazione con ausilio dello strumento BeadXpress (Illumina). Questi sistemi permettono di sviluppare studi caso-controllo, prendendo in considerazione un numero considerevole di loci di suscettibilità o di geni associati alla patologia di interesse.

Quest'ultima tecnologia è stata inoltre utilizzata per confermare l'associazione del pathway VEGF/KDR con l'AMD e DR ampliando il numero dei marcatori polimorfici.

Dalla selezione di 13 polimorfismi distribuiti in questi due geni, abbiamo scoperto che un marker nel gene VEGF è significativamente associato al rischio di insorgenza dell'AMD e DR ed inoltre per quest'ultima patologia abbiamo trovato anche una significativa correlazione con un marker polimorfico del gene KDR.

In particolare, per entrambe le patologie oculari angioproliferative si osserva un incremento del numero di eterozigoti AG e omozigoti GG per il polimorfismo rs3025021 (VEGF-A) rispetto agli omozigoti AA.

Infatti, la sola presenza di un allele di rischio G per questo marcatore è sufficiente ad incrementare notevolmente il rischio di insorgenza delle patologie angioproliferative (AMD, DR) nei soggetti eterozigoti AG e negli omozigoti GG, rispetto ai soggetti omozigoti per l'allele non di rischio A.

Di fatto, l'analisi delle frequenze genotipiche evidenzia che i soggetti eterozigoti AG per il marcatore rs3025021 (VEGF-A) hanno un valore di OR maggiore rispetto ai soggetti portatori per entrambi gli alleli di rischio G.

Nel caso del polimorfismo rs7667298 (KDR), l'analisi delle frequenze alleliche per quest'ultimo marcatore ha evidenziato che la presenza di un solo allele di rischio G non è sufficiente per aumentare il rischio di insorgenza della DR, infatti il valore dell'OR non risulta statisticamente significativo (OR=1.487, 95% CI=0.854-2.590).

D'altra parte, l'analisi delle frequenze genotipiche evidenzia che gli omozigoti portatori dell'allele di rischio G sono associati ad un rischio di quasi 3 volte superiore di sviluppare la patologia DR (OR=2.715, 95% CI=1.506-4.894) rispetto ai soggetti omozigoti per l'allele non di rischio A.

Infine, l'analisi aplo-tipica per entrambi i marcatori polimorfici rs7667298 (KDR) e rs3025021 (VEGF-A) rivela che i soggetti portatori per entrambi gli alleli di rischio (KDR rs7667298-G e VEGF-A rs3025021-G) hanno un rischio di insorgenza della DR di ben 7 volte maggiore (OR=7.34, 95% CI = 4.612-11.683) rispetto ai soggetti portatori di entrambi gli alleli non di rischio (KDR rs7667298-A e VEGF-A rs3025021-A).

Il marcatore rs3025021 è localizzato nell'introne 6 del gene VEGF-A. In letteratura non sono noti studi sull'analisi funzionale per questo polimorfismo ma altri lavori hanno evidenziato la stessa associazione con le patologie oculari.<sup>(21), (32), (35), (68)</sup>

L'altro marcatore rs7667298, con il quale abbiamo ottenuto una significativa associazione con la patologia DR, è localizzato a livello del 5' UTR del gene KDR.

In bibliografia, questo polimorfismo è stato associato con l'insorgenza della fase acuta della sarcoidosi e cancro ai polmoni, nelle quali il pathway VEGF/KDR svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo di queste patologie.<sup>(38),(69)</sup>

In letteratura è riportato un unico lavoro sullo studio dell'analisi funzionale per questo polimorfismo ma non ha evidenziato differenze significative nell'espressione della proteina KDR associata ad un particolare genotipo.<sup>(38)</sup>

La nostra ricerca ha focalizzato quindi l'attenzione sul VEGF, in quanto mediante il suo recettore KDR, è noto essere il più potente induttore dell'angiogenesi durante lo sviluppo ed è implicato nell'adulto in numerosi processi patologici, quali proliferazione tumorale, fenomeni infiammatori, ed ischemici.

L'espressione del VEGF aumenta rapidamente e significativamente in risposta a diminuzioni minime della pressione parziale di ossigeno. A livello oculare, queste condizioni causano una neovascolarizzazione patologica responsabile di numerose patologie oculari che portano ad un grave calo visivo, come nell'AMD e nella DR.

Questo suggerisce che in generale una regolazione anomala della trascrizione del gene del VEGF, dovuta alla presenza di siti polimorfici in specifiche zone della sequenza del gene, possono essere considerati fattori predisponenti allo sviluppo di patologie oculari di origine angioproliferative. Nell'insieme questo studio sottolinea l'importanza della predisposizione genetica alle patologie oculari prese in esame, legate alle variazioni, non solo del gene VEGF-A ma anche del suo recettore KDR.

In conclusione la prima parte dello studio ha permesso l'identificazione di nuovi marker polimorfici nel gene VEGF-A e per la prima volta nel gene KDR, potenzialmente implicati nell'insorgenza dell'AMD e DR. Altri studi saranno necessari per comprendere come agiscono questi polimorfismi. Nell'ultima parte abbiamo confermato nuovamente l'associazione del pathway VEGF/KDR allargando le attuali conoscenze sul ruolo del pathway del VEGF nella fisiopatologia di queste patologie e dimostrando un contributo genetico nella suscettibilità all'insorgenza dell'AMD e DR. Inoltre, per la prima volta abbiamo escluso il coinvolgimento diretto del pathway CCR3/eotassina 1,2,3 nello sviluppo delle patologie oculari angioproliferative. L'approfondita conoscenza di tali meccanismi sarà la base per poter determinare il rischio di sviluppare la patologia e comprenderla nel suo insieme per permettere l'identificazione e la sintesi di farmaci innovativi. Infatti soggetti portatori di alleli di rischio o non di rischio potrebbero rispondere in maniera diversa alla terapia o potrebbero essere necessarie diverse quantità di farmaco anti-VEGF (attualmente utilizzato nella terapia di queste patologie) per aumentarne l'efficacia.



---

**REFERENCES**

1. Fine SL, Berger JW, Maguire MG, Ho AC. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2000 e 342:483-492.
2. Arch, Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. e 122:598-614.
3. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1995 e 39:367-374.
4. Hogg RE, Chakravarthy U. Visual function and dysfunction in early and late age-related maculopathy. *Prog Retin Eye Res* 2006 e 25:249-276.
5. DS Fong, LP Aiello, FL Ferris 3rd and R Klein, Diabetic retinopathy, *Diabetes Care* 27 (2004), pp. 2540–2553.
6. R Klein, Epidemiology of Diabetic Retinopathy. In: E Duh, Editor, *Diabetic Retinopathy*, Humana Press, Totowa (2008).
7. CP Wilkinson, FL Ferris 3rd and RE Klein et al., Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales, *Ophthalmology* 110 (2003), pp. 1677–1682.
8. S.C. Sacca, C. Bolognesi, A. Battistella, A. Bagnis and A. Izzotti. Gene–environment interactions in ocular diseases. *Mutat Res.* 2009 Jul 10 e Review, 667(1-2):98-117.
9. Patel S, Chen H, Tinkham NH, et al. Genetic susceptibility of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2008 e 8:257-262.
10. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001 e 106:148–156.
11. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997 e 18:4–25.
12. T. Tammela, B. Enholm, K. Alitalo, et al. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research* (2004) 65: 550-563.
13. Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003 Jun e Review., 9(6):669-76.
14. Sreekumar, P.G., Kannan, R., et al., 2006. Thiol regulation of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
15. Slomiany MG, Rosenzweig SA. Hypoxia-inducible factor-1-dependent and -independent regulation of insulin-like growth factor-1-stimulated vascular endothelial growth factor secretion. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Aug e 318(2):666-75.
16. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994 e 450., 118:445–450.
17. Haines JL, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S, et al. Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR, and LRP6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 e 47:329-35.
18. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006 e 355:1419-1431.
19. Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet.* 2003 e 73:1162–1169.
20. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001 e 68:978–989.
21. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2006 e 15:2955-61.
22. Richardson AJ, Islam FM, Guymer RH, et al. A tag-single nucleotide polymorphisms approach to the vascular endothelial growth factor-A gene in age-related macular degeneration. *Mol Vis* 2007 e 13:2148-52.



23. Lin JM, Wan L, Tsai YY, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2008 e 145:1045-1051.
24. Boekhoorn SS, Isaacs A, Uitterlinden AG, et al. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and risk of age-related macular degeneration: the Rotterdam Study. *Ophthalmology* 2008 e 115:1899-903.
25. McKay GJ, Silvestri G, Orr N, et al. VEGF and age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2009 e 116:1227.e1-3.
26. Awata T, Inoue K, Kurihara S, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002 e 51:1635-1639.
27. Ray D, Mishra M, Ralph S, et al. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes* 2004 e 53:861-864.
28. Awata T, Kurihara S, Takata N, et al. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 e 333:679-685.
29. Szaflik JP, Wysocki T, Kowalski M, Majsterek et al. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008 e 246:39-43.
30. Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, et al. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2006 e 12:336-341.
31. Monika Buraczynska, Piotr Ksiazek, Iwona Baranowicz-Gaszczyk, et al. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007 e 22:827-832.
32. Al-Kateb H, Mirea L, Xie X, Sun et al. Multiple variants in vascular endothelial growth factor (VEGFA) are risk factors for time to severe retinopathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC genetics study. *Diabetes* 2007 e 56:2161-2168.
33. Errera FI, Canani LH, Silva ME, et al. Functional vascular endothelial growth factor -634G>C SNP is associated with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study in a Brazilian population of European ancestry. *Diabetes Care* 2007 e 30:275-279.
34. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, et al. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009 e 247:21-26.
35. Amanda J. Churchill, James G. Carter, Conor Ramsden, et al. VEGF Polymorphisms Are Associated with Severity of Diabetic Retinopathy *Ophthalmol. Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008 e 49:3611-3616.
36. Petrovic MG, Korosec P, Kosnik M, et al. Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2008 e 14:1382-1387.
37. Försti A, Jin Q, Altieri A, Johansson R, Wagner K, et al. Polymorphisms in the KDR and POSTN genes: association with breast cancer susceptibility and prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Jan e 101(1):83-93.
38. An SJ, Chen ZH, Lin QX, Su J, Chen HJ, Lin JY, Wu YL. The -271 G>A polymorphism of kinase insert domain-containing receptor gene regulates its transcription level in patients with non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2009 May 12 e 9:144.
39. Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y, et al. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Aug 21 e 50(8):760-7.
40. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994 e 331:1480-1487.
41. Galan A, Ferlin A, Caretti L, et al. Association of Age-related Macular Degeneration with Polymorphisms in Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor. *Ophthalmology* 2010 May 13.
42. Jorge R, Costa RA, Comt DC, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE Study). *Retina* 2006 e 26:1006-1013.

43. Ng EWM, Adamis AP. Anti-VEGF aptamer (pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006 e 1082:151–171.
44. Laing KJ, Secombes Chemokines. *CJ. Dev Comp Immunol.* 2004 May 3 e Review., 28(5):443-60.
45. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol.* 2007 e Review., 25:787-820.
46. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, et al. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52:145–76.
47. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95, 2000 (10): 3032–43.
48. Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkowitz L, Sirotna A, Springer MS. Cloning expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med.* 1996 e 183:2349.
49. Ugucioni M, Mackay CR, Ochensberger B, et al .High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils: role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest.* 1997 e 100:1137.
50. Gerber BO, Zanni MP, Ugucioni M, et al. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr Biol.* 1997 e 7:836.
51. Williams T. Mechanisms Underlying Eosinophil Accumulation in the Asthmatic Lung.” Faculty of Medicine. 2002, Imperial College of Science.
52. Pease JE. Asthma, allergy and chemokines. *Curr Drug Targets.* 2006 Jan e Review., 7(1):3-12.
53. Takeda, A. et al.. CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature* 2009.460,225–230.
54. Salcedo, R., et al.. "Eotaxin (CCL 11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3 + endothelial cells” *J. immunol.* 2001. 166,7571-7578.
55. Dema B, Martínez A, et al. (2009)." Association of IL18RAP and CCR3 with coeliac disease in the Spanish population”. *J Med Genet* e 46(9):617-9.
56. Romanos J, Barisani D, et al. (2009)."Six new coeliac disease loci replicated in an Italian population confirm association with coeliac disease”. *J Med Genet* e 46(1):60-3.
57. Lee JH, Moore JH, et al. (2008)." Genetic interactions model among Eotaxin gene polymorphisms in asthma”. *J Hum Genet* e 53(10):867-75.
58. Lee JH, Chang HS, et al. (2007)." Genetic effect of CCR3 and IL5RA gene polymorphisms on eosinophilia in asthmatic patient” . *J Allergy Clin Immunol.* e 120(5):1110-7.
59. Wang TN, Chiang W , et al. (2007)." The polymorphisms of Eotaxin 1 and CCR3 genes influence on serum IgE, Eotaxin levels and mild asthmatic children in Taiwan” *Allergy.* e 62(10):1125-30.
60. Nakamura H, Higashikawa F, et al. (2007). " Genotypes and haplotypes of CCR2 and CCR3 genes in Japanese cedar pollinosis”. *Int Arch Allergy Immunol.* e 142(4):329-34.
61. Blanchard C, Wang N, et al. (2006)." Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene-expression profile in eosinophilic esophagitis” . *J Clin Invest.* e 116(2):536-47.
62. Clark VJ, Dean M. “Haplotype structure and linkage disequilibrium in chemokine and chemokine receptor genes”. *Hum Genomics.* e 1(4):255-73.
63. Tsunemi Y, Sekiya T, et al. (2003)."Lack of association of CCR3 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis in Japanese population”. *J Derm. Sci* e 33(2):130-3.
64. Shin HD, Kim LH, et al. (2003)." Association of Eotaxin gene family with asthma and serum total IgE“. *Hum Mol Genet* e 12(11):1279-85.
65. Fukunaga K, Asano K, et al. (2001)." Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British asthmatics”. *Eur Respir J.* e 59-63, 17(1):.
66. Zimmermann N, Bernstein JA, et al. (1998)."Polymorphisms in the human CC chemokine receptor-3 gene”. *Biochim Biophys Acta.* e 1442(2-3):170-6.
67. Raby BA, Van Steen K, et al. (2006)." Eotaxin polymorphisms and serum total IgE levels in children with asthma”. *J Allergy Clin Immunol.* e 117(2):298-305.

68. Abhary S, Burdon KP, Gupta A, Lake S, Selva D, Petrovsky N, Craig JE. Common sequence variation in the VEGFA gene predicts risk of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Dec e 50(12):5552-8.
69. Pabst S, Karpushova A, Diaz-Lacava A et al. VEGF gene haplotypes are associated with sarcoidosis. *Chest.* 2010 Jan e 9., 137(1):156-63. Epub 2009 Sep.