Novità cliniche e sperimentali della Glicogenosi Tipo 3 e caratterizzazione del modello sperimentale

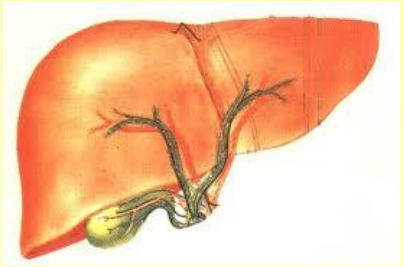
Gianna Ulzi, Sabrina Lucchiari, Serena Pagliarani, Giacomo P. Comi
"Centro D. Ferrari", Dip. di Patofisiologia e Trapianti,
U.O. Neuroscienze
Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico

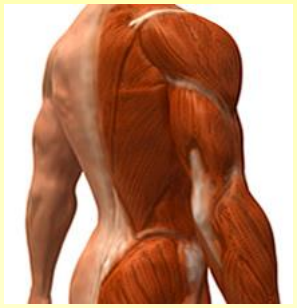
Congresso Associazione Italiana Glicogenosi,
Roma, 7-8 Dicembre 2013

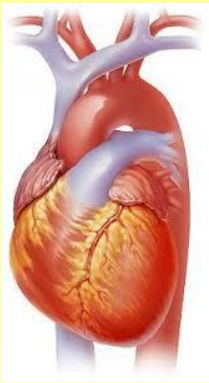
Che cos'è la Glicogenosi di tipo III

- La Glicogenosi di tipo III è una malattia da accumulo di **glicogeno** causata dal deficit dell'enzima deramificante, uno degli enzimi deputati alla degradazione del glicogeno a glucosio.

- Il glicogeno si accumula in:







diminuendo così la disponibilità di glucosio per l'intero organismo e formando vacuoli nelle cellule.

Diagnosi

La Glicogenosi di tipo III si manifesta nei **bambini** di pochi mesi con:

- epatomegalia e disfunzionalità epatica:

  pts 2aa: 63% ipercolesterolemia; 85% ipertrigliceridemia (GPA Smit, NL, Heidelberg)

- crisi ipoglicemiche a digiuno
- ritardo di crescita
- aumento di CK
- aumento delle transaminasi epatiche

Evoluzione clinica

Adolescenza :

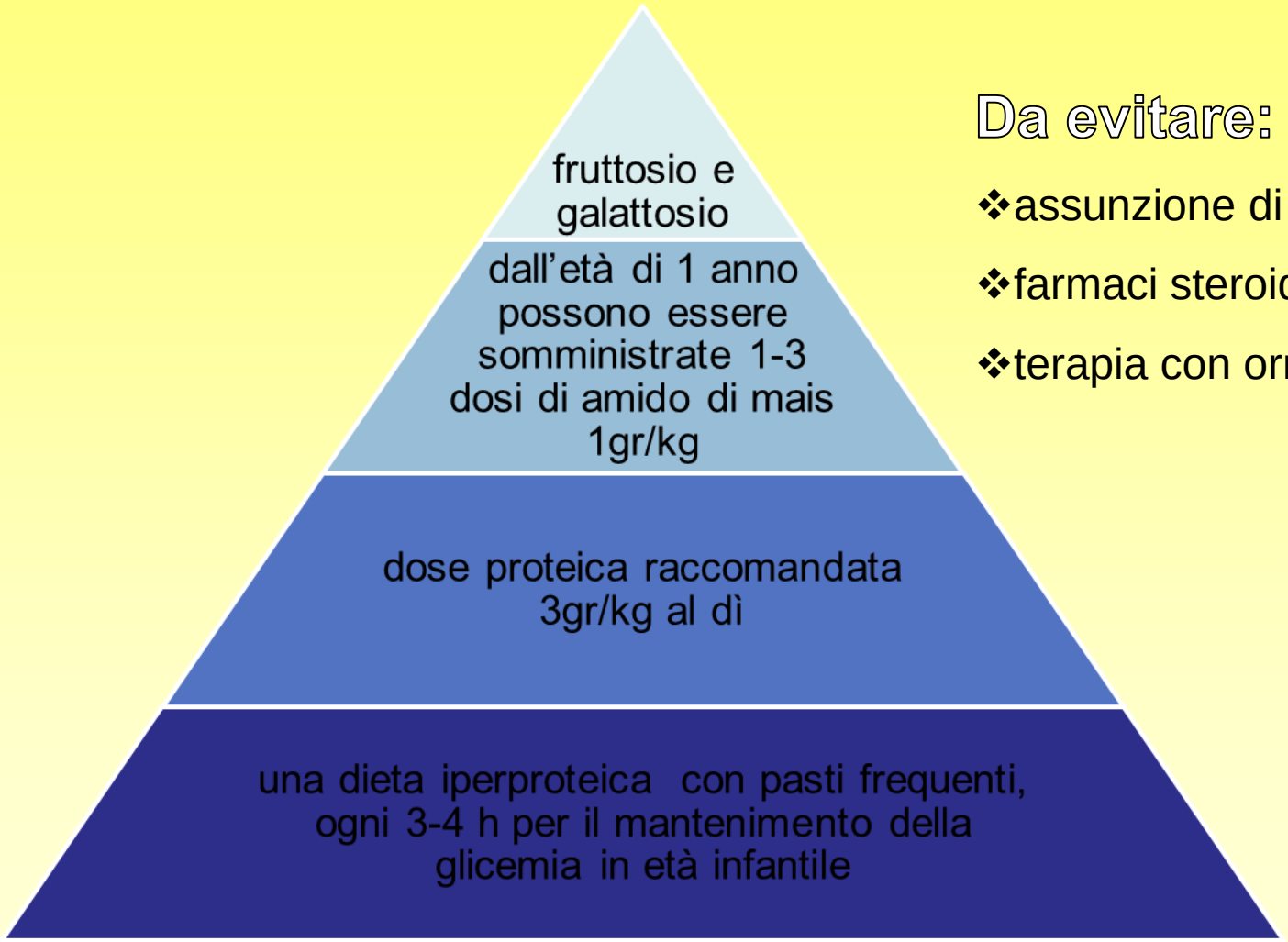
- I **sintomi epatici** tendono a normalizzarsi, sebbene persista il danno a livello delle cellule epatiche ⟹ possibile **cirrosi** e sviluppo di **adenomi epatici**
  - In alcuni casi comparsa dei primi segni di miopatia

Età Adulta:

- la **miopatia** diventa importante nella II-III-IV decade di vita e si manifesta come una debolezza progressiva che coinvolge i muscoli prossimali; la miopatia è lentamente progressiva
  - la **cardiopatia** clinica non è frequente, sebbene strumentalmente dimostrabile in quasi tutti i pazienti
    - riduzione della **massa ossea** in concomitanza con la riduzione della massa muscolare

n.b.: 10% pts < 10aa fratture per diminuzione densità ossea (GPA Smit, NL, Haidelberg)

Trattamento sintomatico



Da evitare:

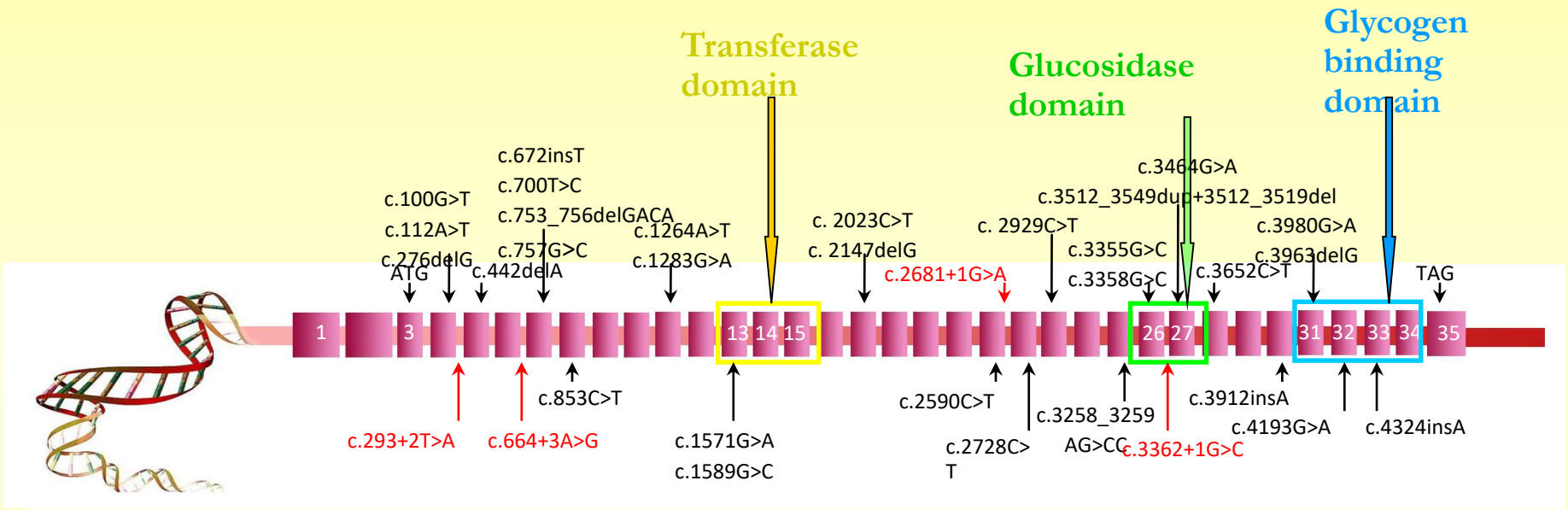
- ❖assunzione di zuccheri semplici
- ❖farmaci steroidei
- ❖terapia con ormone della crescita

Gene *AGL* umano

Malattia autosomica recessiva causata dalla deficenza dell'enzima debranching del glicogeno o amilo-1,6-glucosidasi, 1,4-α-glucantransferasi (**GDE**).

Gene *AGL* :	cromosoma 1p21 85 kb 35 esoni, 7.0 kb mRNA, cdr 4596 bp
Proteina :	1532 aminoacids, MW 165kDa

Mutazioni nella Popolazione Italiana



Scopo del progetto

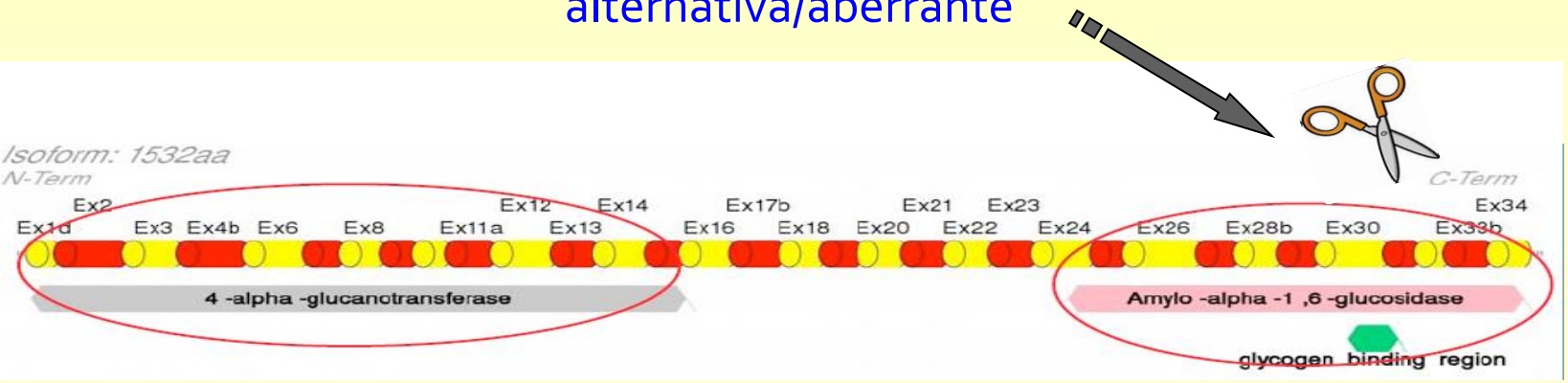
1. Costruzione di un **modello murino** con alterazione "costitutiva" del gene *Agl* tale da riprodurre la malattia in ogni tessuto/organo e periodo di vita dell'animale

2. Individuare **nuove terapie**

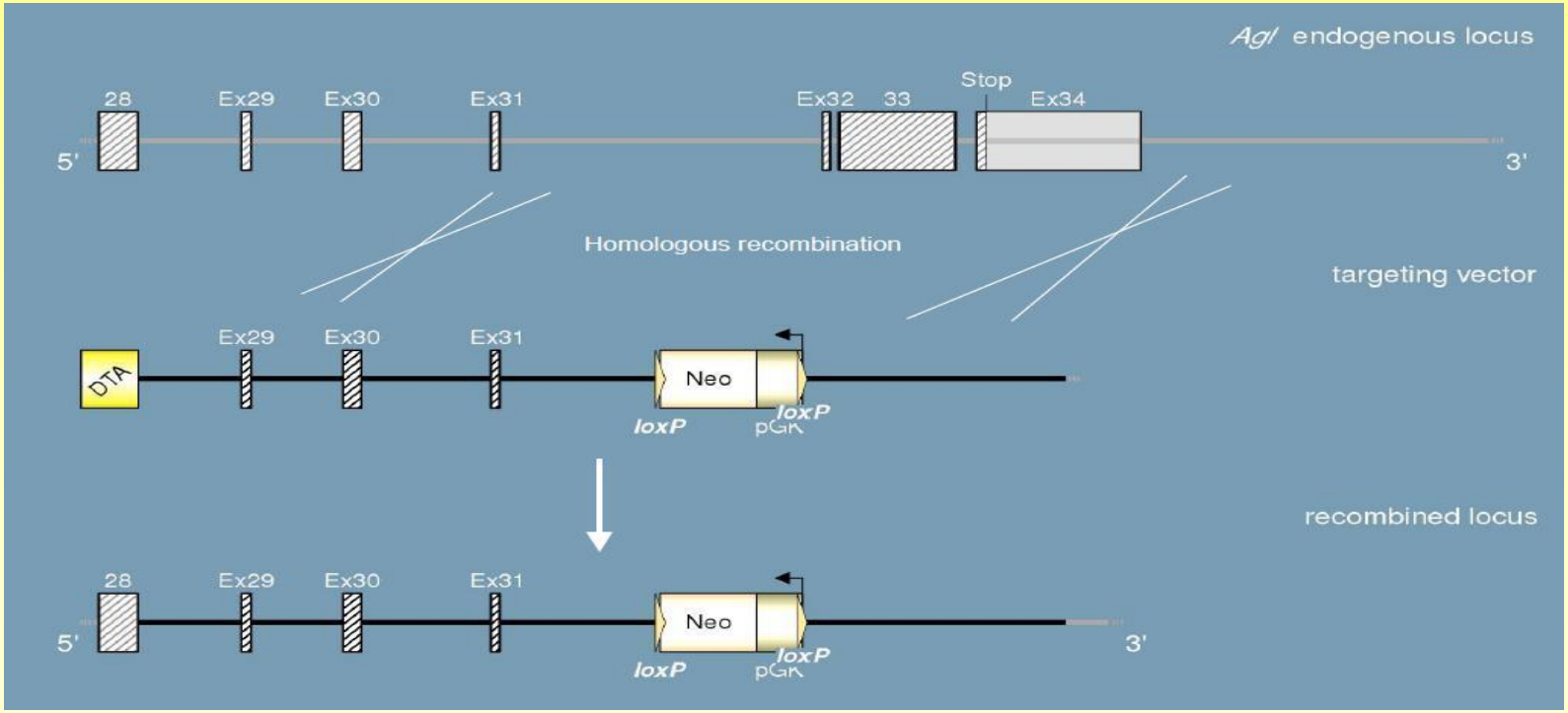
Gene *Agl* nel topo e suo trascritto

- 34 esoni
- ATG (inizio proteina) esone 1, TGA (fine) esone 34
- Alto grado di omologia (similitudine) tra gene umano e murino

n.b.: esistono più punti d'inizio che potrebbero attivarsi dando una proteina alternativa/aberrante



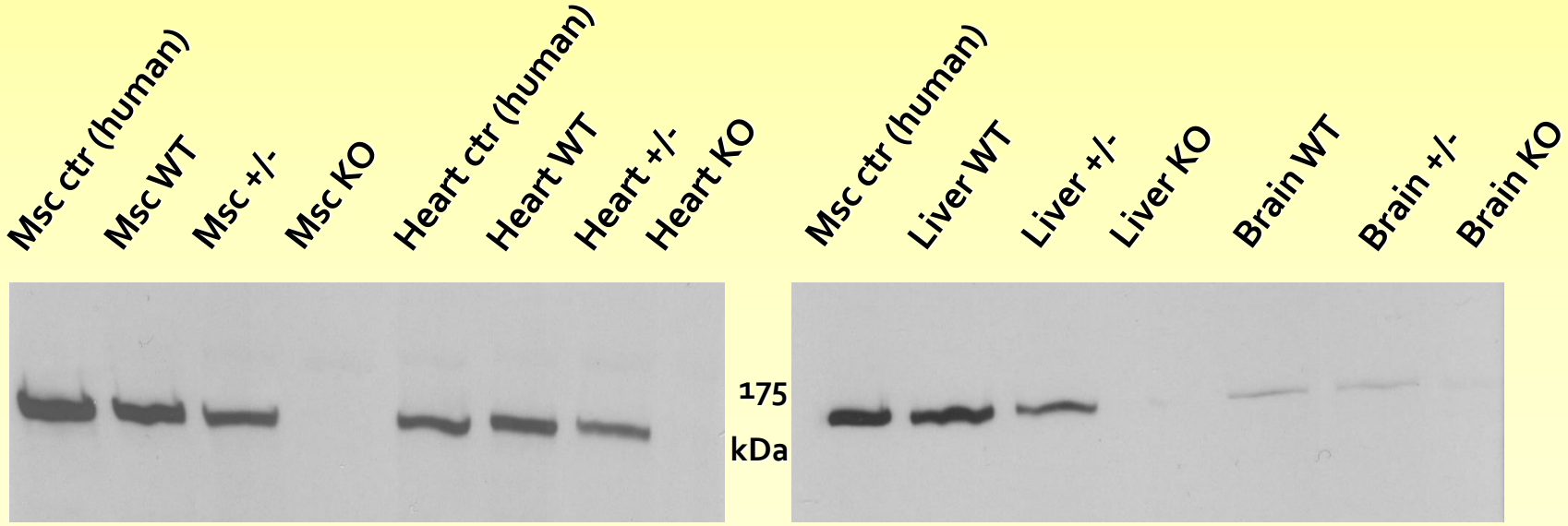
Gene ingegnerizzato



Biochimica 1

Western Blot

Topo WT, +/-, KO: 3 gg;
Topo ctr adulto



(The in vivo experiments were approved by the University of Milan and Ministry of Health review boards, in agreement with US NIH guidelines)

Caratteristiche macroscopiche:

- Taglia
- Peso
- Camminata

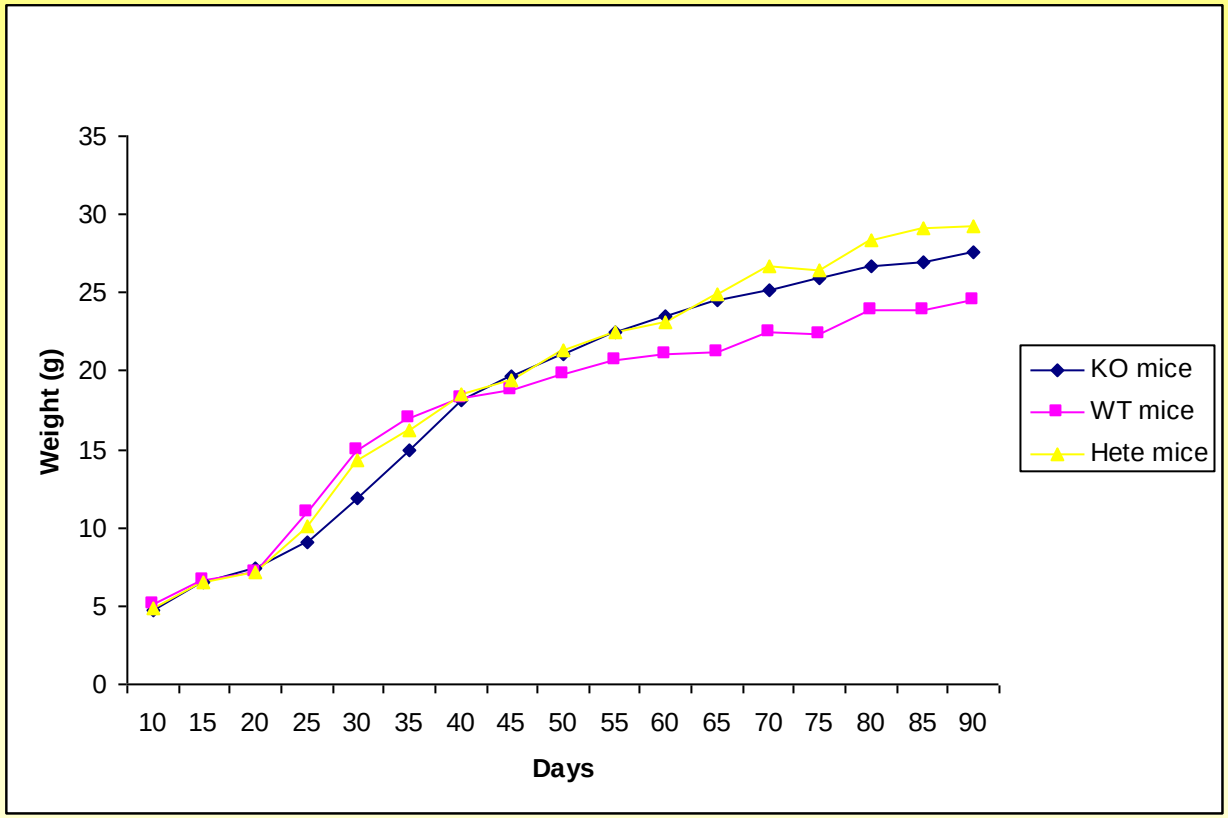
Wild Type -
Heterozygote -
Knockout -

Age: 4 days

Age: 3 mo

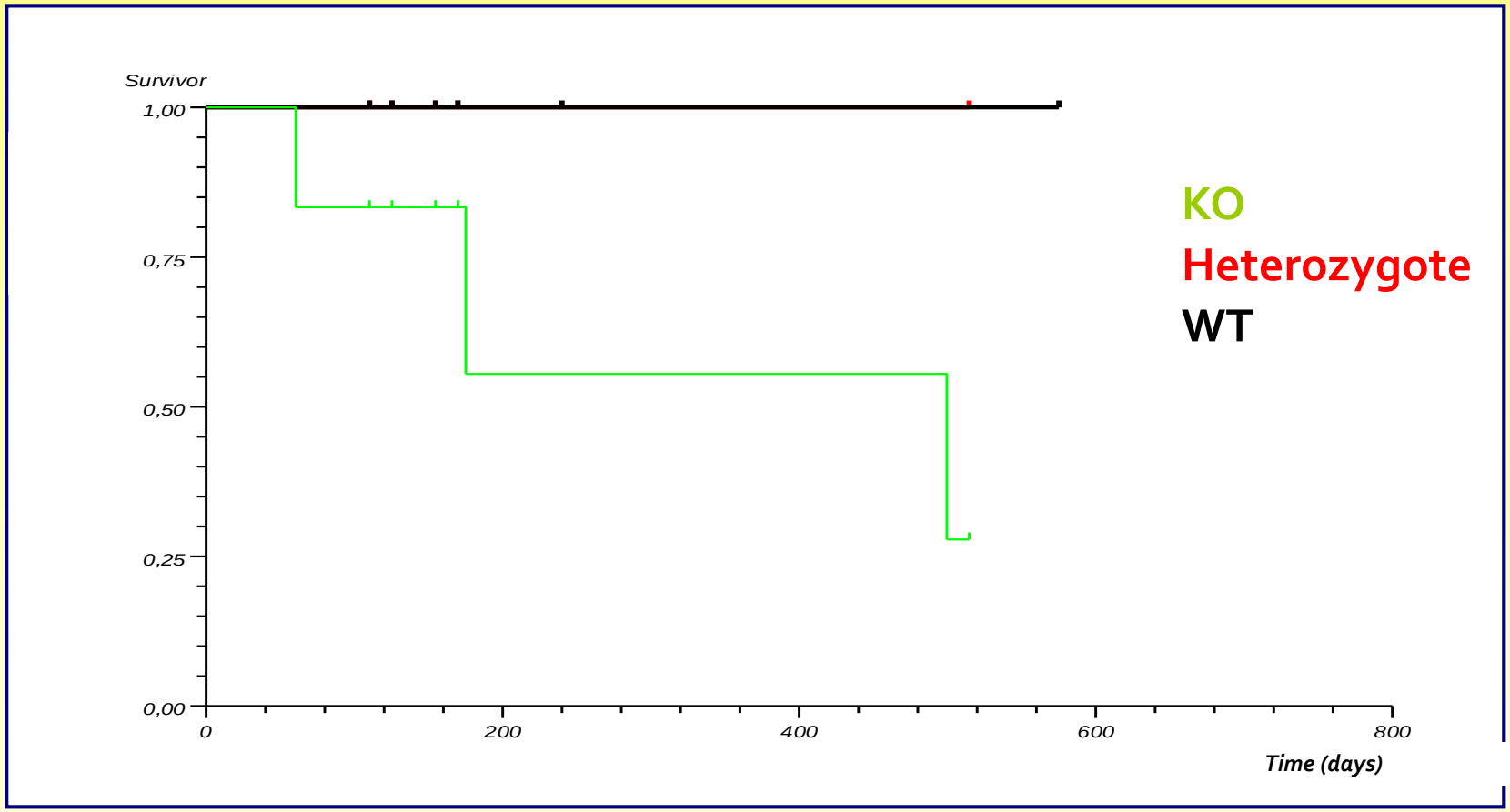
I topi KO non sembrano diversi in dimensioni dai topi normali ed eterozigoti sia alla nascita che durante la crescita

Peso



Mean weight calculated on 6 mice between day 10-90.

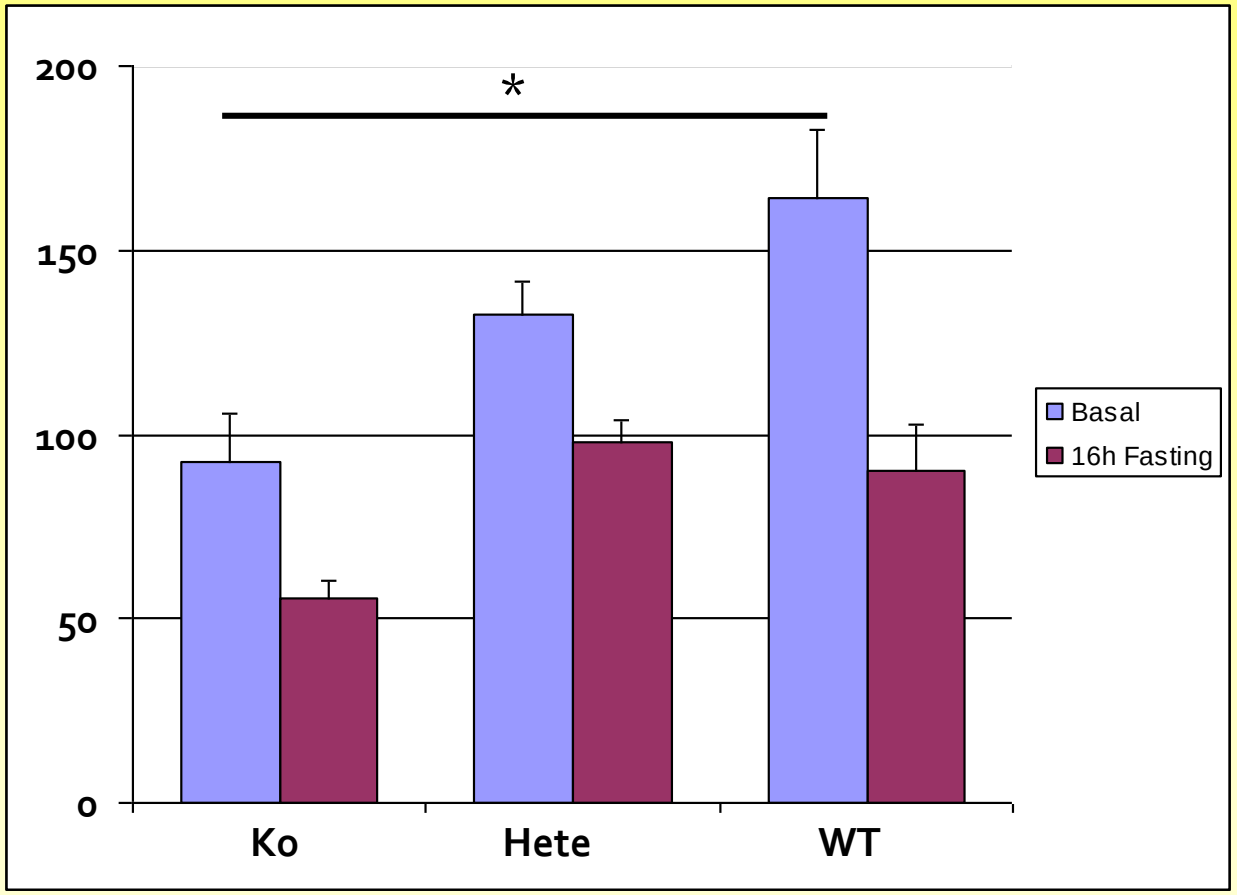
Curva di sopravvivenza



N = 10 for each genotype

Glicemia

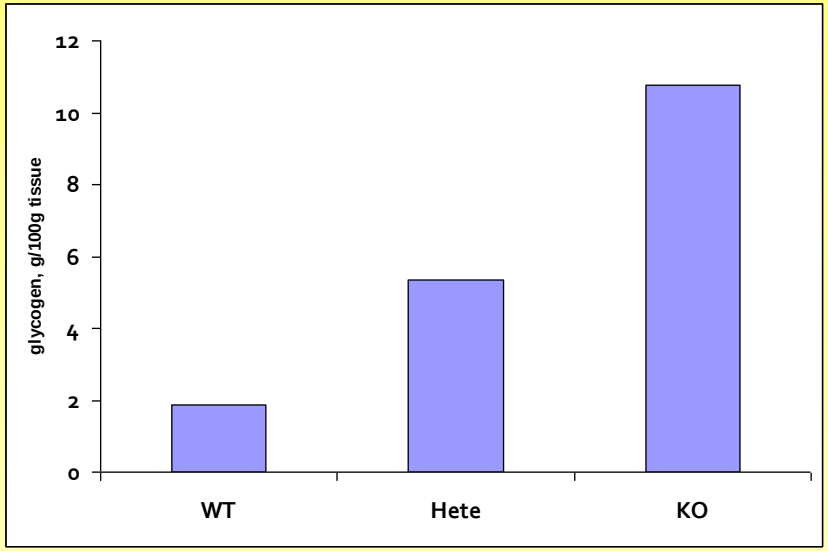
Età: 6 mesi



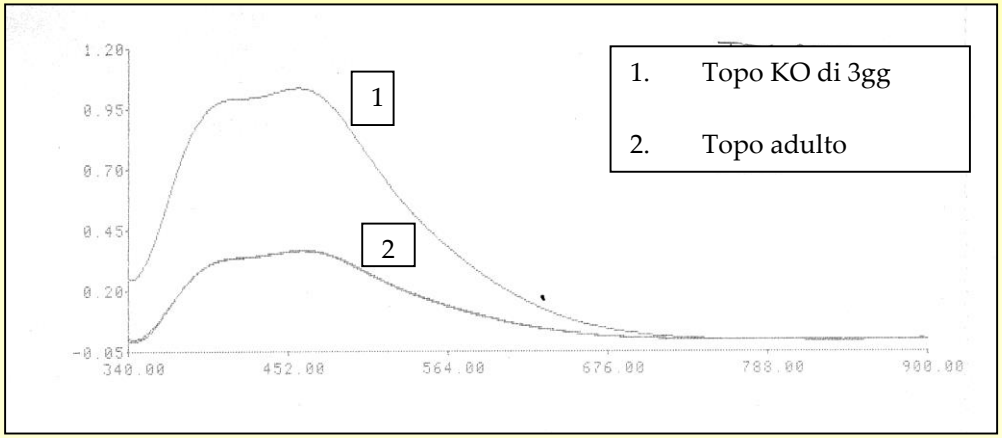
* P<0,0001

	KO	HETE	WT
Basal (n=5)	92 ± 13 mg/dl	132 ± 9 mg/dl	164 ± 18 mg/dl
16h Fasting (n=2)	55 ± 5	98 ± 6	90 ± 13

Contenuto di glicogeno nel fegato di topi adulti



Age: 4 months



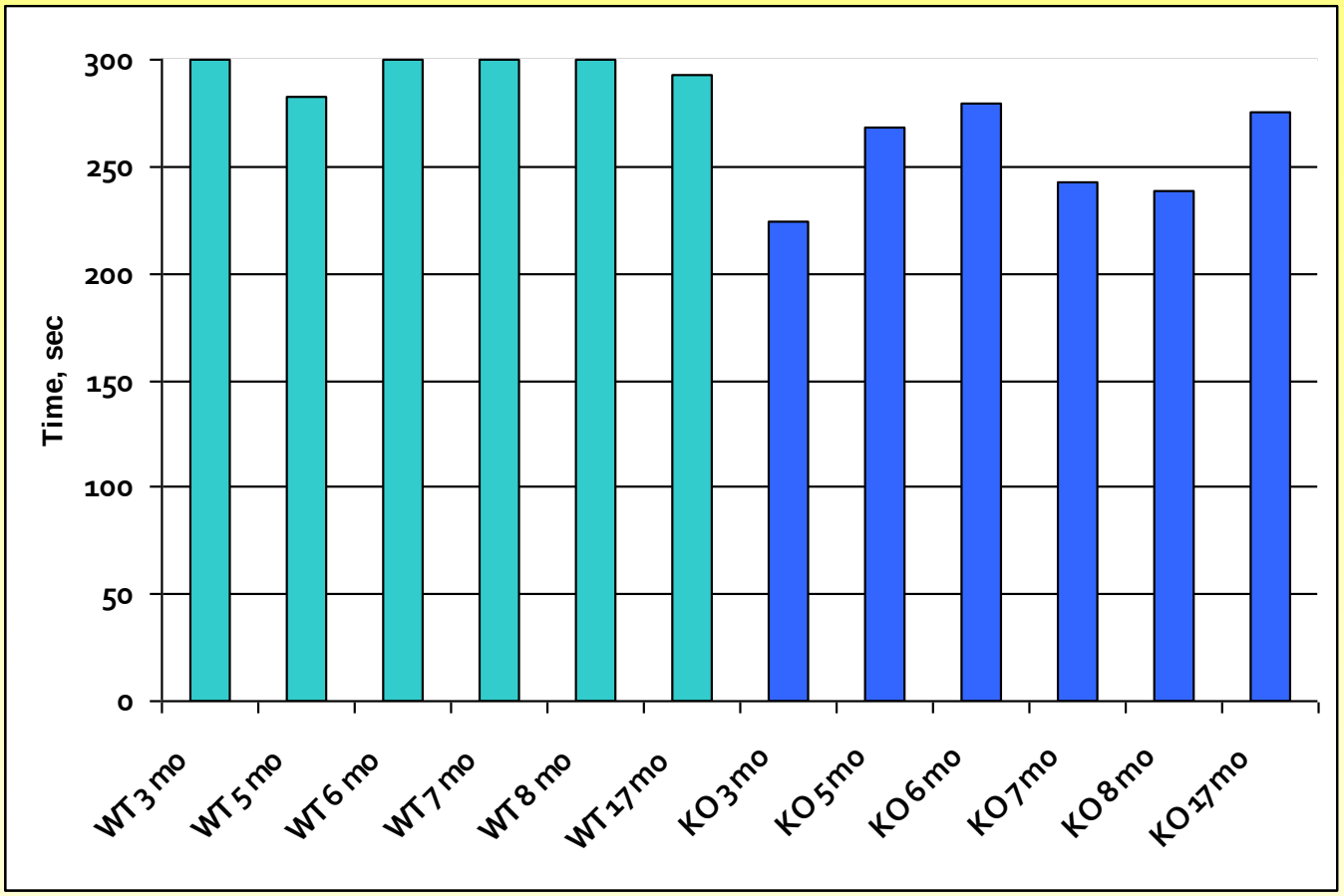
Contenuto di glicogeno nel fegato del topo KO: 8,3 g/100 g tessuto (WT adulto 2,4 g/100g tessuto)

Test di deambulazione

Test rappresentativo su topi adulti di 3 mesi. I topi KO mostrano una camminata a zampe divaricate indice di debolezza alla muscolatura degli arti

Test funzionale sulla ruota (Rotarod):

tempo prima della caduta

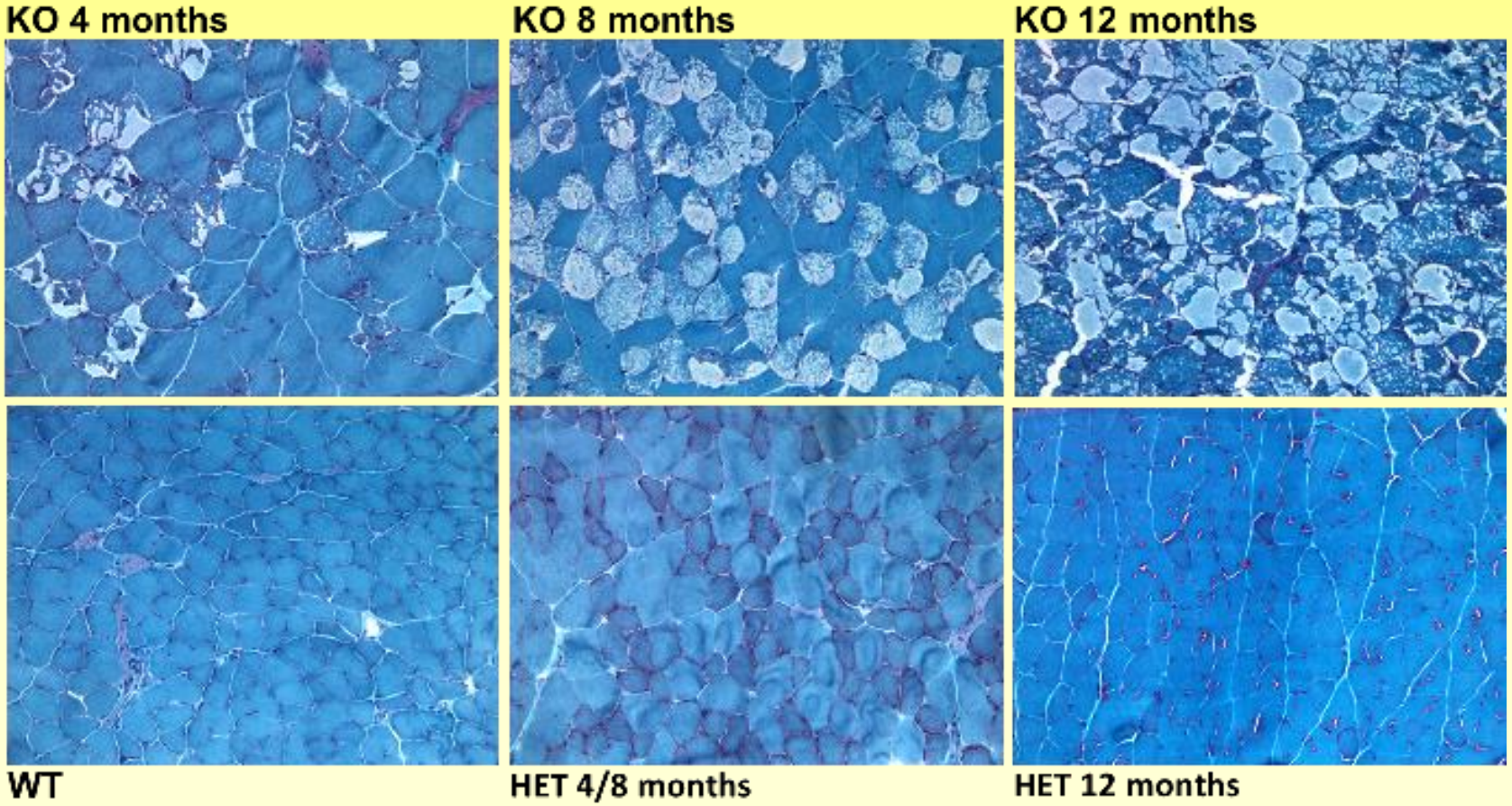


Protocollo: acc 5-20 rpm for 5 min

Caratteristiche istologiche

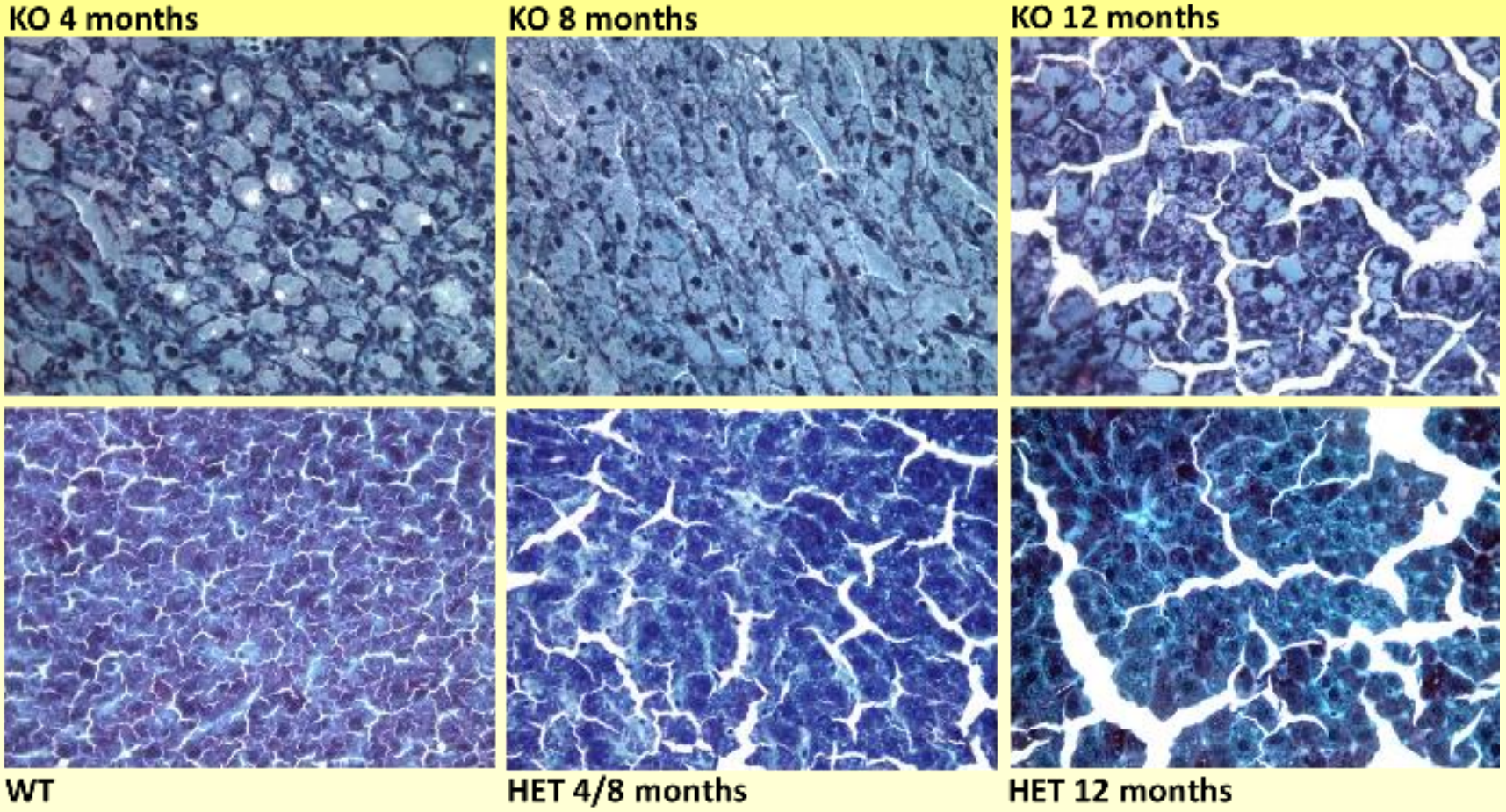
MUSCOLO

✓ Il contenuto di glicogeno aumenta con l'età nei topi malati. Nei topi eterozigoti le alterazioni morfologiche compaiono a 12 mesi



FEGATO

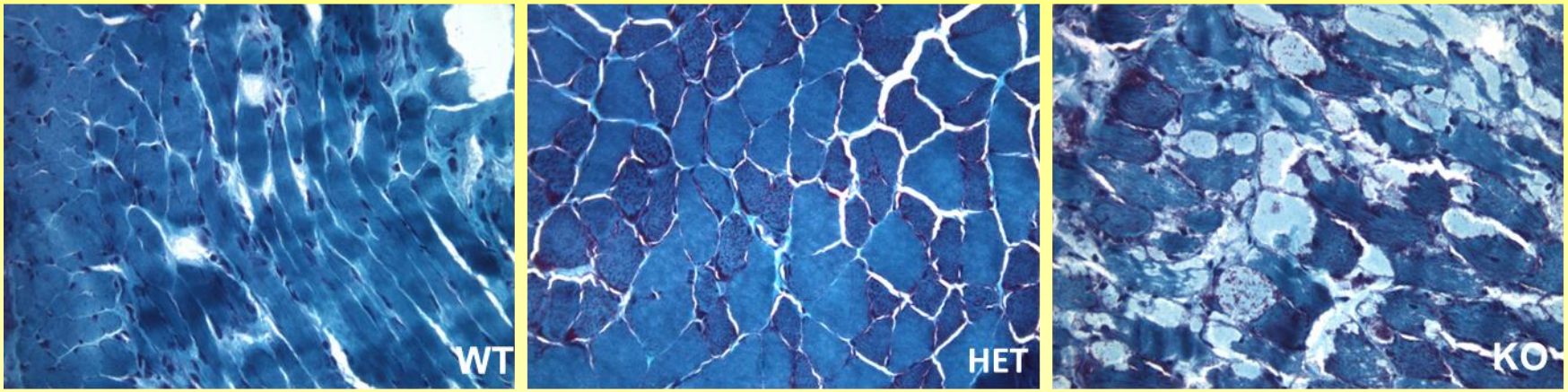
✓ Accumuli di glicogeno significativi sono presenti nelle **cellule del fegato** dei topi KO a tutte le età, mentre gli etero non mostrano nessun cambiamento



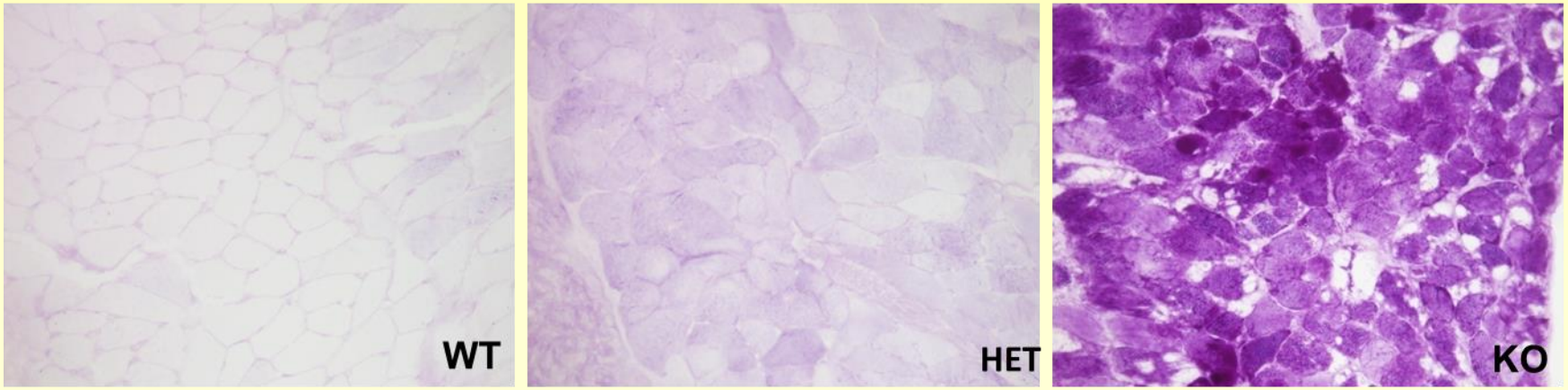
DIAFRAMMA (12 mesi)

✓ Il **diaframma** mostra un accumulo importante nei topi KO a 12 mesi

TG

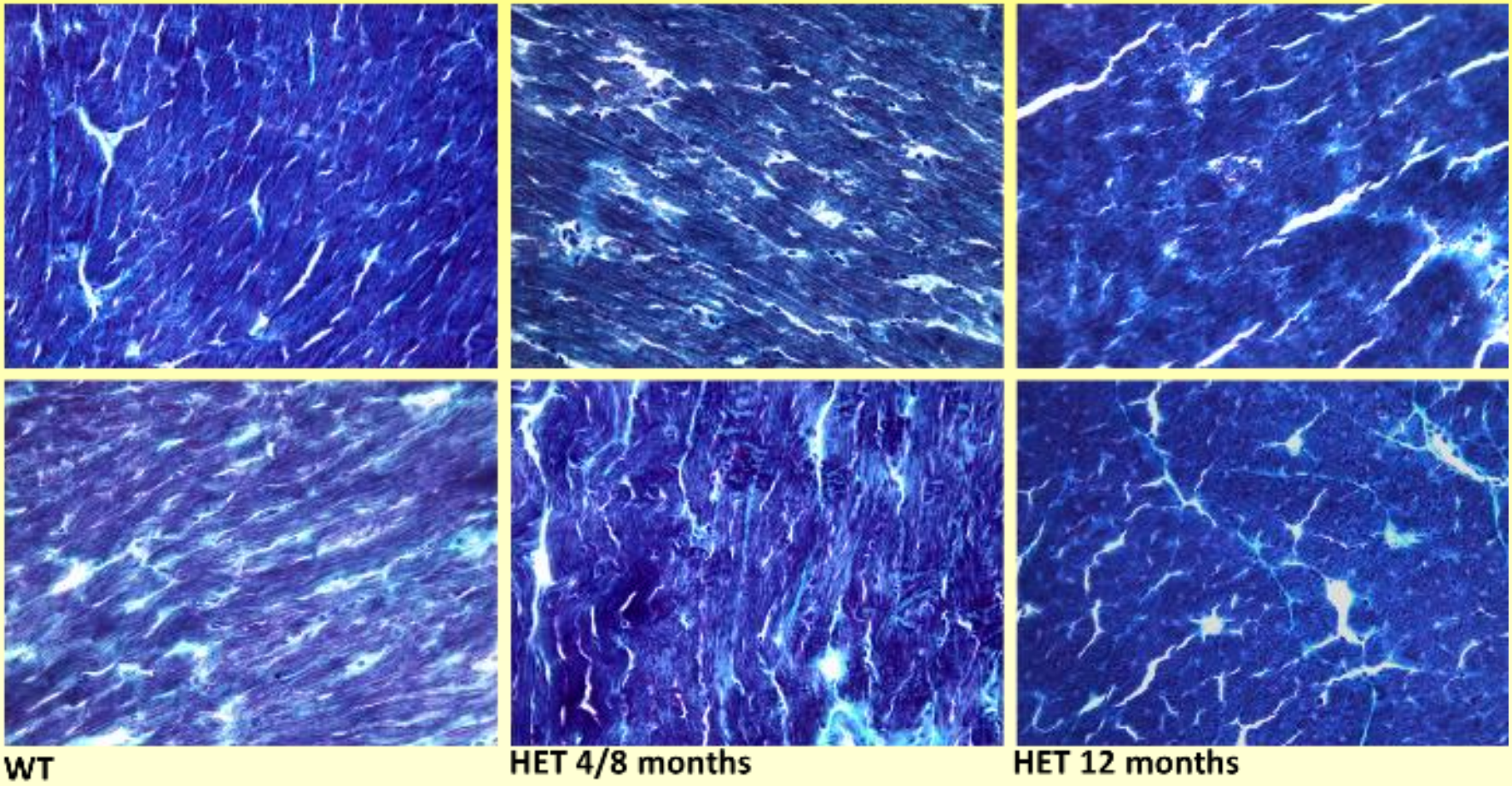


PAS



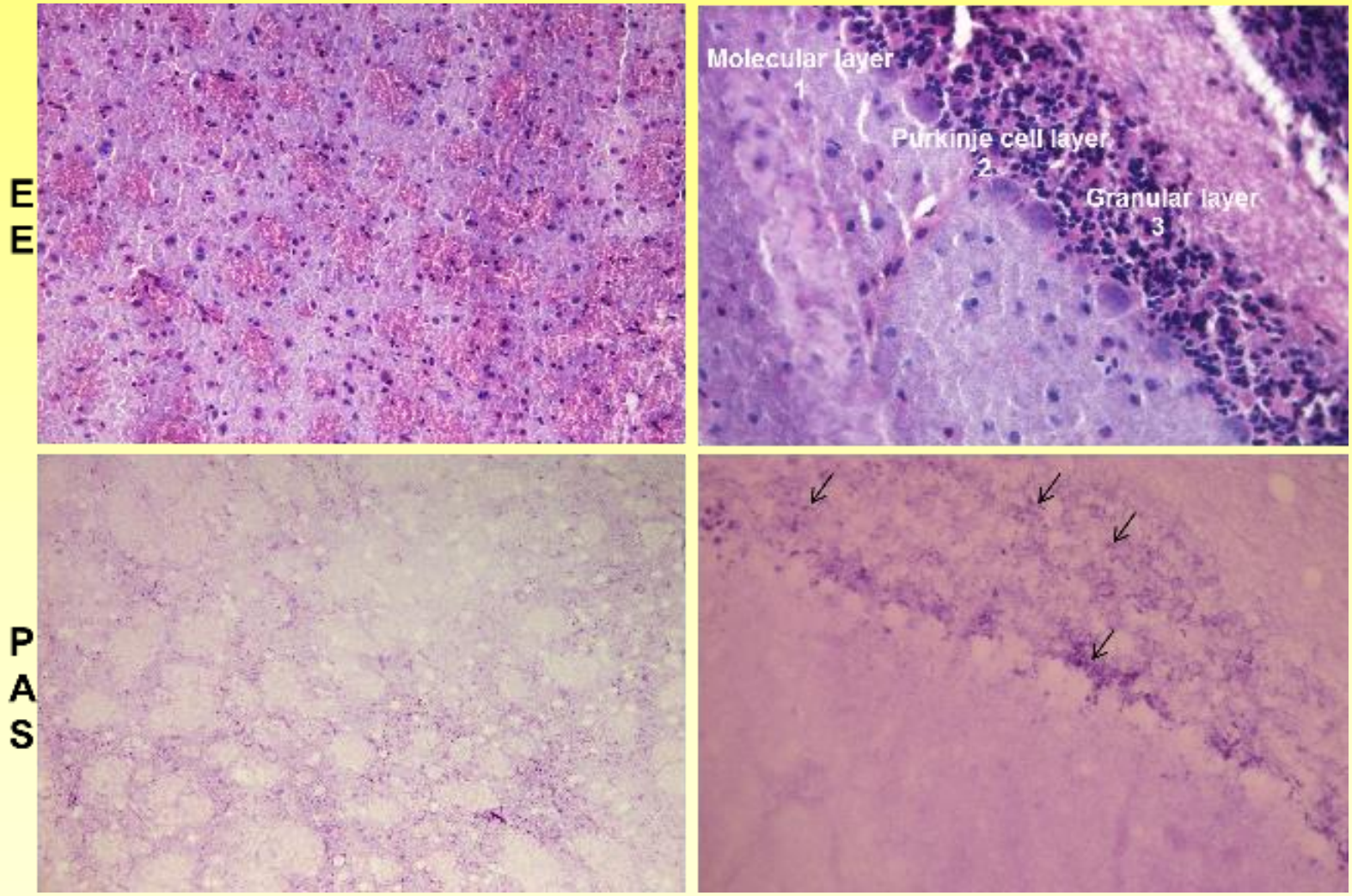
CUORE

✓ Il **tessuto cardiaco** presenta alterazioni minime nei KO a tutte le età



CERVELLO CERVELLETTO

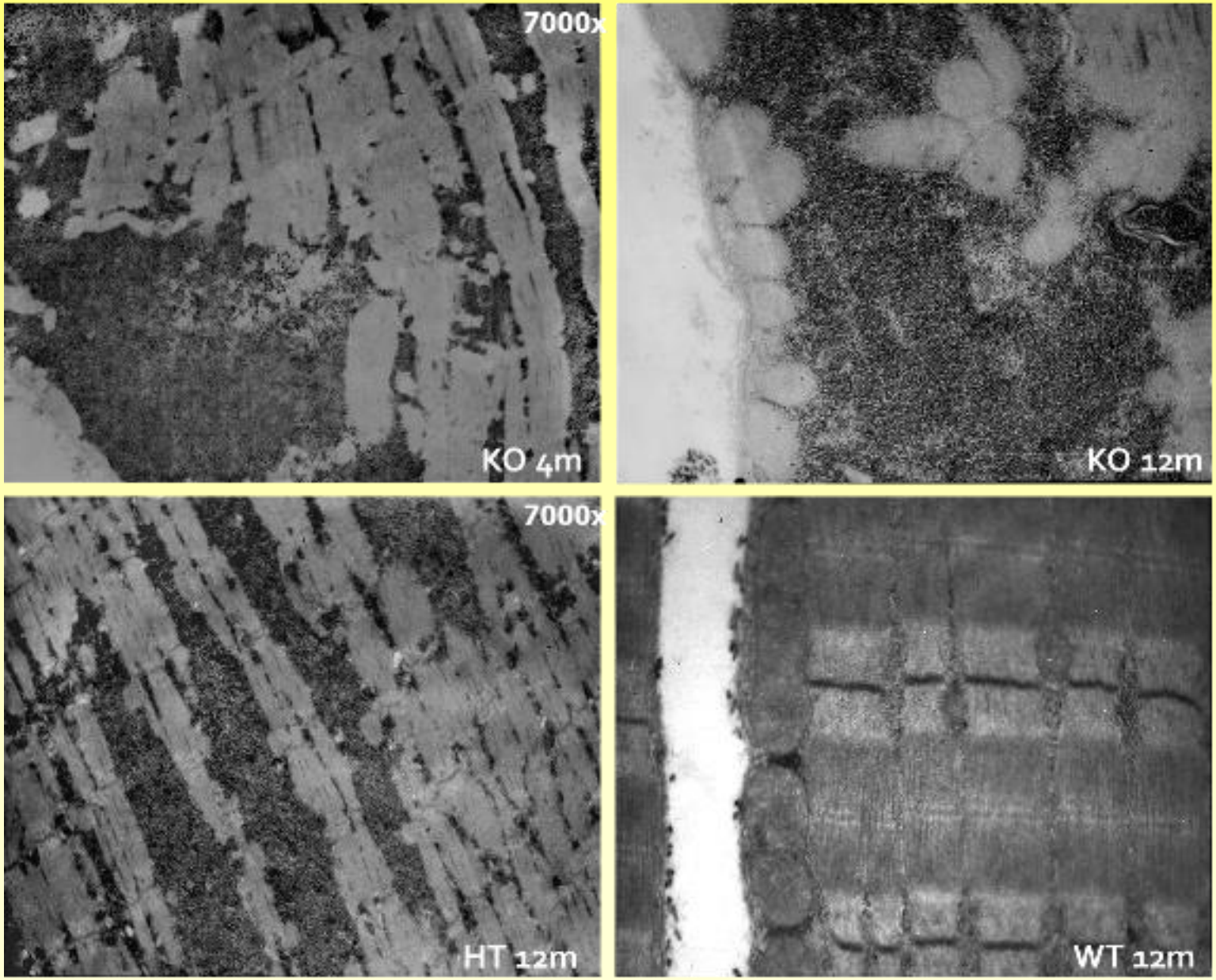
✓I topi KO di 12 mesi mostrano accumuli di glicogeno nel **cervello** e in alcune aree del **cervelletto**



KO 12 mesi

Microscopia elettronica

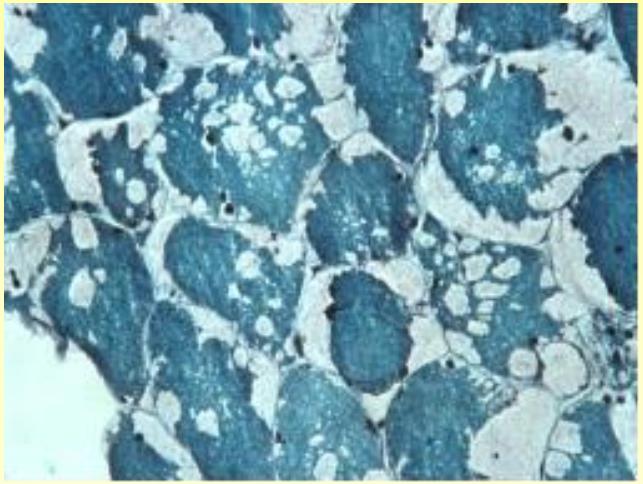
MUSCOLO



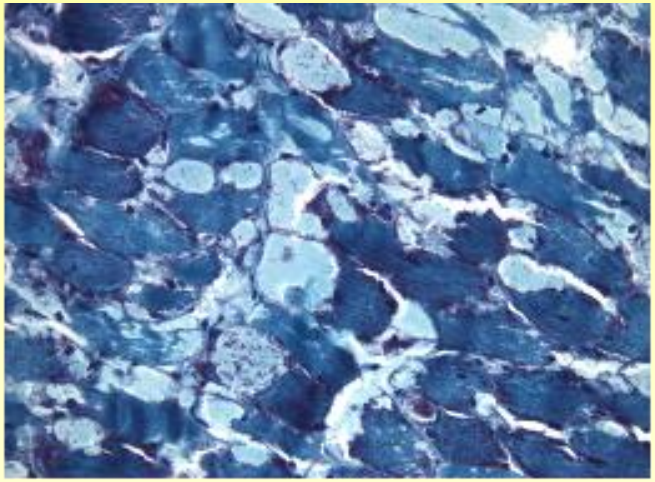
Conclusioni

Questi dati indicano che il topo malato è un modello affidabile della glicogenosi di tipo III

L'accumulo di glicogeno nel fegato e nel muscolo è simile a quello osservato nei tessuti umani



Uomo



Topo KO

(dati in pubblicazione marzo-aprile 2014)

Sviluppo del progetto

Nel prossimo anno:

propedeutici allo sviluppo di terapie

- **Messa a punto di test funzionali per la misurazione delle performance muscolari (protocollo ad hoc su Rotarod per topi *Agl*; tapi roulant)**
- **Validazione di marker sierologici per il monitoraggio biochimico**
- **Pannello di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo/catabolismo degli zuccheri**

- Alternative dietetiche: dieta iperproteica alle prossime cucciolate
  - Gene therapy (cDNA in AAV)
    - Terapia enzimatica sostitutiva (contatti in corso con Genzyme)

Telethon Grant Proposal

Gennaio 2014:

permetterebbe di disporre di:

- camera per la misurazione delle funzioni vitali
- test radiodiagnostici (MOC, RMN)
- camera per la misurazione dei disturbi del movimento-comportamento

Grazie a:

Unità Operativa Dipartimentale - Diagnostica Malattie Neuromuscolari

FONDAZIONE IRCCS
CÀ GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE
POLICLINICO

Prof. Maurizio Moggio

Dr. Michela Ripolone

Dr. Raffaella Violano

Lab. Biochimica e Genetica – Università degli Studi di Milano

Prof. Giacomo P. Comi

Dr. Sabrina Lucchiari

Dr. Serena Pagliarani

Dr. Gianna Ulzi

Dr. Andreina Bordoni

Dr. Stefania Corti

Dr. Monica Nizzardo

Dr. Chiara Simone

Dino Ferrari Center

Biochemistry and Genetics

University of Milan

Clinics and genetics of a woman affected by Glycogen Storage Disease type III: hypothesis of a large genetic rearrangement in *AGL* gene

G.P. Comi[1], G. Ulzi[1], L. Morandi[2], A. Bordoni[1], M Mora[2], S. Gerevini[3], S. Lucchiari[1]

[1] Dino Ferrari Center, Department of Pathophysiology and Transplantation (DEPT), University of Milan, Neurology Unit, IRCCS Foundation Ca'Granda Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy ; [2]UO Patologia Muscolare-Neuroimmunologia Fondazione Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milan, Italy; [3]Dip.Neuroradiologia, Ospedale San Raffaele, Milan, Italy.

Case study

55 year old woman affected by GDSIIIa
- **unable to run and to get up from the ground without support**
- **widespread fatty replacement and atrophy**
- mild hepatomegaly and liver steatosis

PCR on gDNA on ex 32

check cDNA

Fig. 1

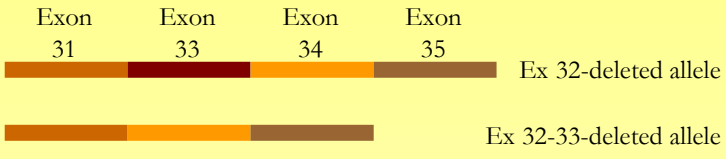
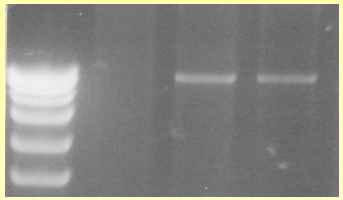


Fig. 2 **IVS 31 -> IVS 35**



Exon 32 deletion

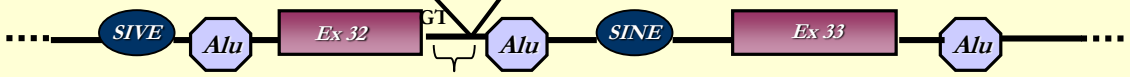
+

duplication of the c-terminal exons

Macrorearrangement ?

DNA Copy Number Variation test

Presence of exon 32

***Alu* mediated rearrangement ?**

Check and see by Next Gen Seq