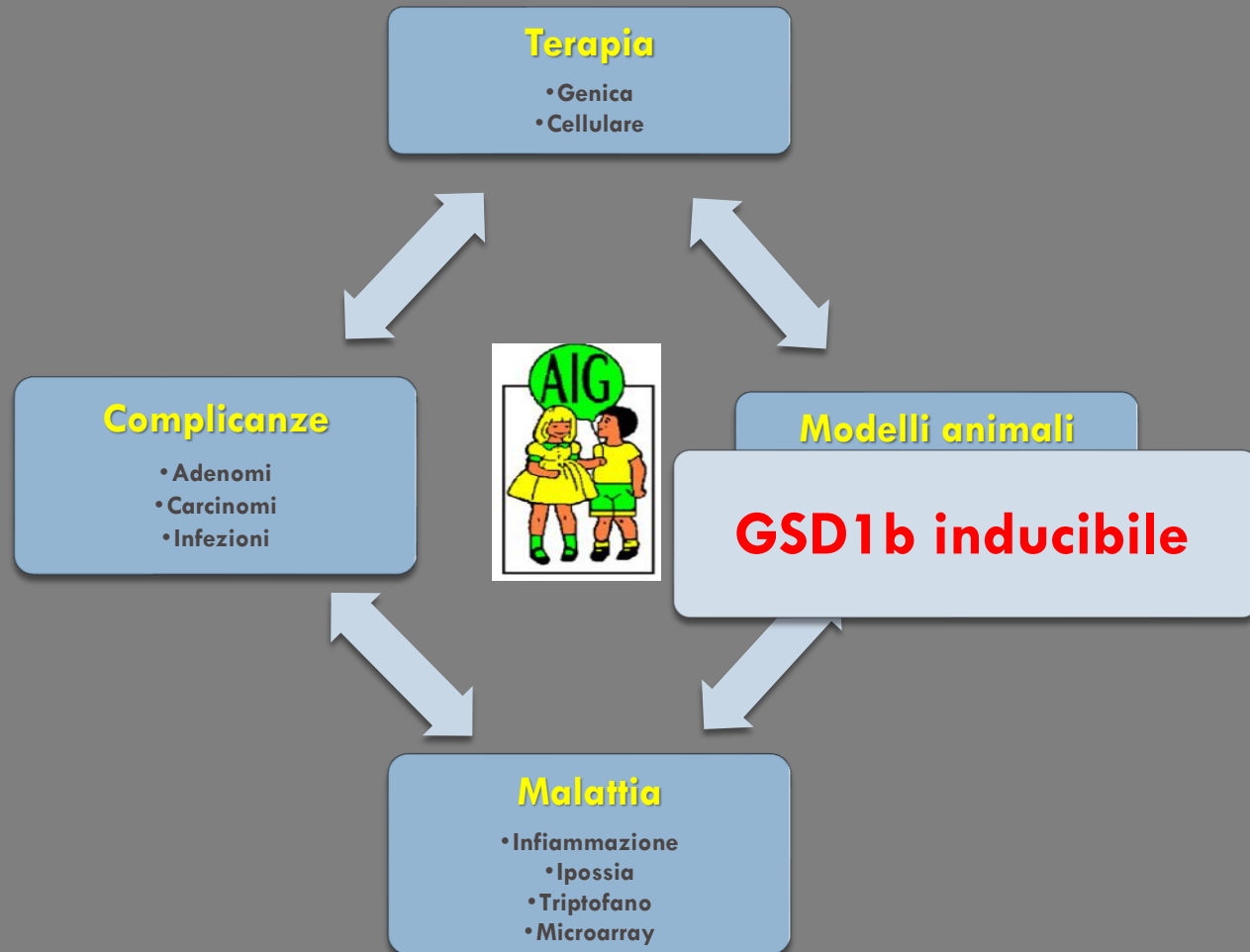


# CREAZIONE E UTILIZZO DI NUOVI MODELLI ANIMALI PER IL PROGRESSO DELLA CONOSCENZA E DEL TRATTAMENTO DELLA GLICOGENOSI 1



## **Glicogenosi 1b**

**Topo knock-out creato da J.Y. Chou, NIH**

**Animali ad altissima mortalità nei primi giorni di vita.**

**Estremamente difficili da trattare**



**Sviluppo di un nuovo modello animale per la GSD1b**

**Topo inducibile per la manifestazione fenotipica in età adulta**

# Nuovo modello animale della Glicogenosi 1b



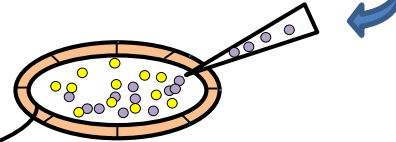
Costrutto G6PT (EUCOMM)



Trasfezione di cellule staminali embrionali (ES)



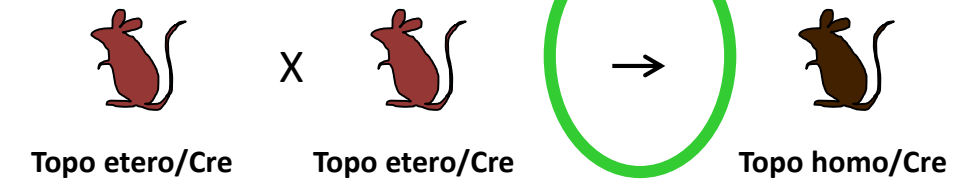
ES selezionate con Neomicina



Microiniezione in blastocisti di femmina gravida normale e reimpianto in femmine pseudogravide



Dopo il trattamento con tamoxifen la proteina Cre taglia il pezzo di gene G6PT compreso tra le sequenze LoxP determinando la sua inattivazione



Espansione colonia

# TEMPISTICA DELLA PRODUZIONE DI TOPI INDUCIBILI

	2013			2014			
	Apr-Giu	Lug-Set	Ott-Dic	Gen-Ma	Apr-Giu	Lug-Set	Ott-Dic
<b>1) Produzione topo condizionale G6PT</b>							
a) Acquisto e caratterizzazione cellule ES	■						
b) Iniezione blastocisti e nascita chimere		■	■				
c) Incrocio chimere e caratterizzazione cucciolate F1		■	■	■			
d) Incroci F1 con FLP-deleter e C57 e caratterizzazione cucciolate F1			■	■	■		
e) Invio topi a Genova				■	■		
<b>2) Produzione topo inducibile</b>							
a) Adattamento topi ricevuti					■		
b) Incroci FLP x FLP e caratterizzazione cucciolate					■	■	
c) Incroci Cre x Cre e caratterizzazione cucciolate					■	■	
d) Incroci G6PT x G6PT e caratterizzazione cucciolate					■	■	■
e) Incroci G6PT x Cre caratterizzazione cucciolate (F1)						■	■
f) Incroci topo F1 x G6PT per produzione topo inducibile (F2)						■	■

# Il modello murino di GSD1b inducibile

- **Vantaggi del modello**
  - Utilizzare l'accoppiamento di animali sani per la colonia.
    - Efficienza e risparmio dell'ampliamento
    - Utilizzare animali adulti quindi più resistenti
- **Progetto di ricerca**
  - Caratterizzazione del nuovo modello animale GSD1b
    - Insorgenza della Glicogenosi 1b dopo delezione del gene
      - analisi istologiche e funzionali del fegato e dei rene
      - Valutazione dei neutrofili per numero e difetti funzionali
- **Futuro**
  - Terapia genica/cellulare
  - Bersagli farmacologici
  - «Esosomi»

# Dal laboratorio al paziente: alla ricerca di un marcatore comune



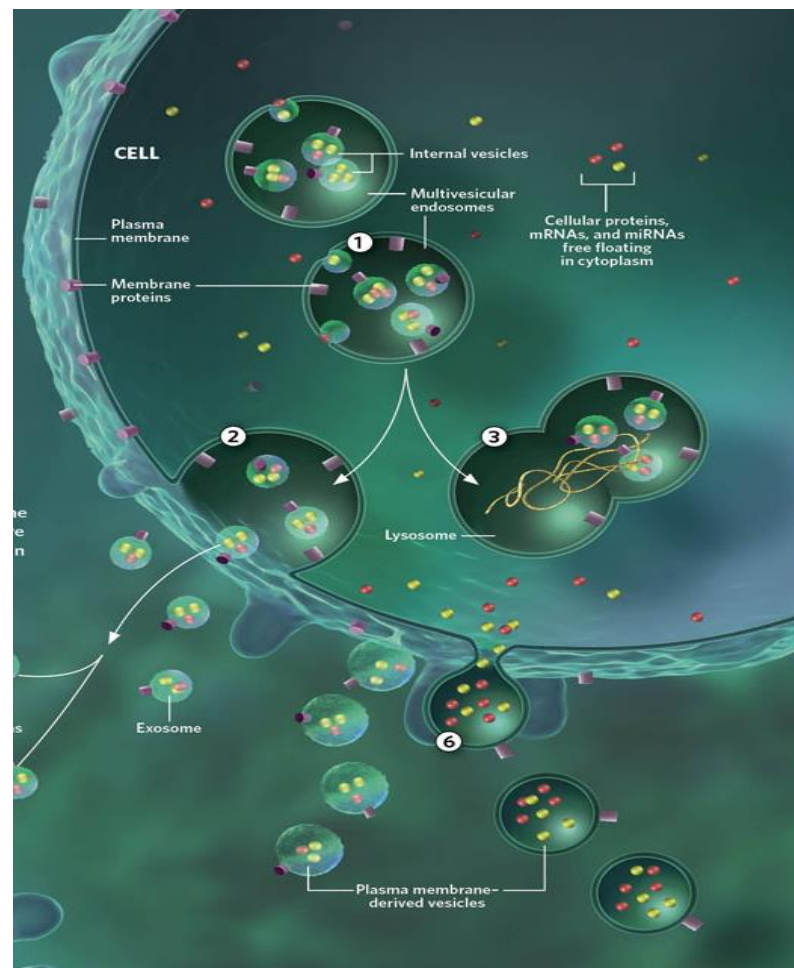


# Progetto Esosomi

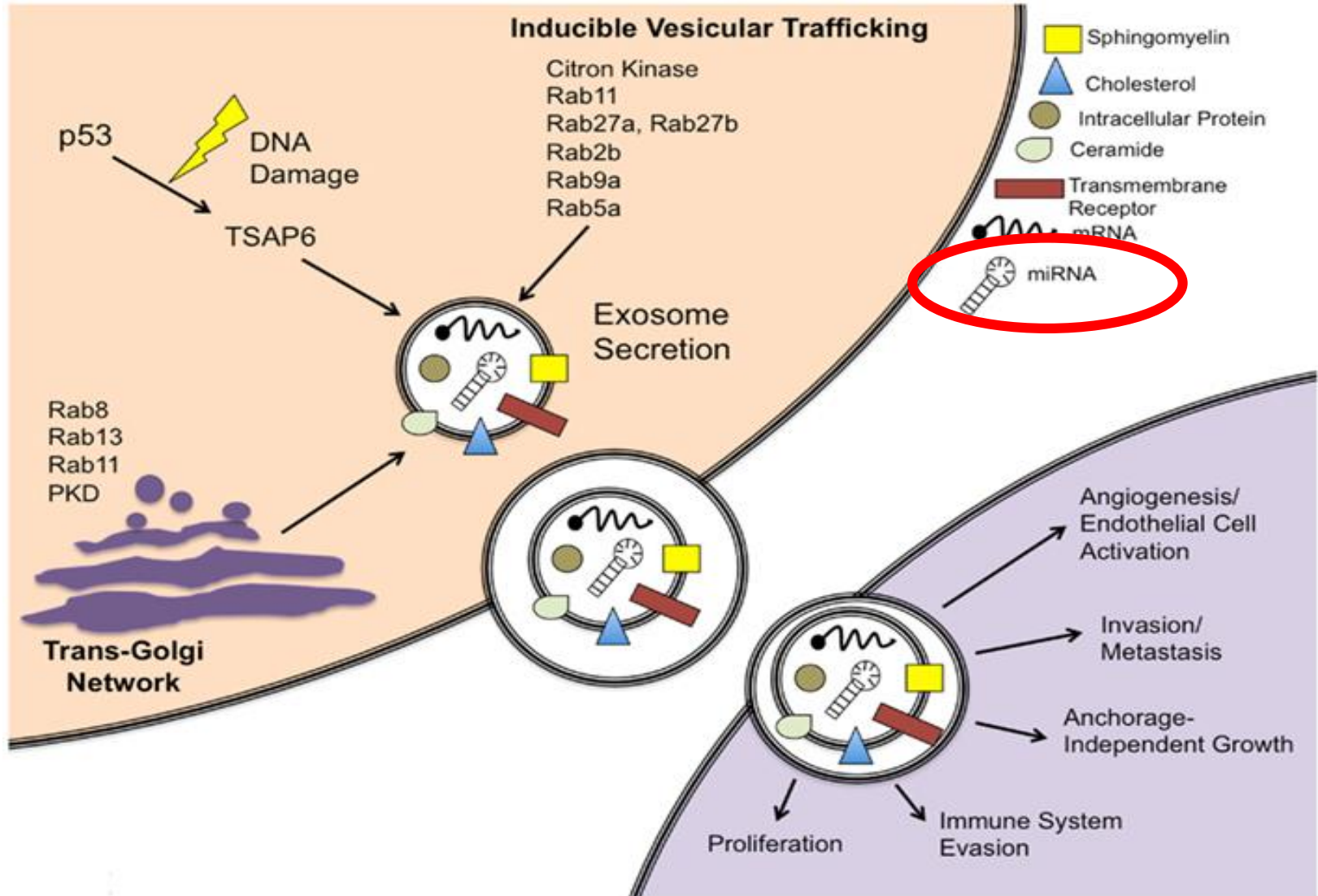


## Gli esosomi sono:

- Vescicole secrete dalla cellula
- Indicatori dell'attività della cellula
- Stabili nei fluidi biologici (plasma, urine)
- Isolabili efficientemente
- Ideali per studi sugli studi dell'esordio della malattia e della sua evoluzione
- Ottenibili dai modelli animali e dai pazienti



# Scambio di informazione tramite esosomi





# Il sangue come tessuto surrogato: Esosomi e GSD1

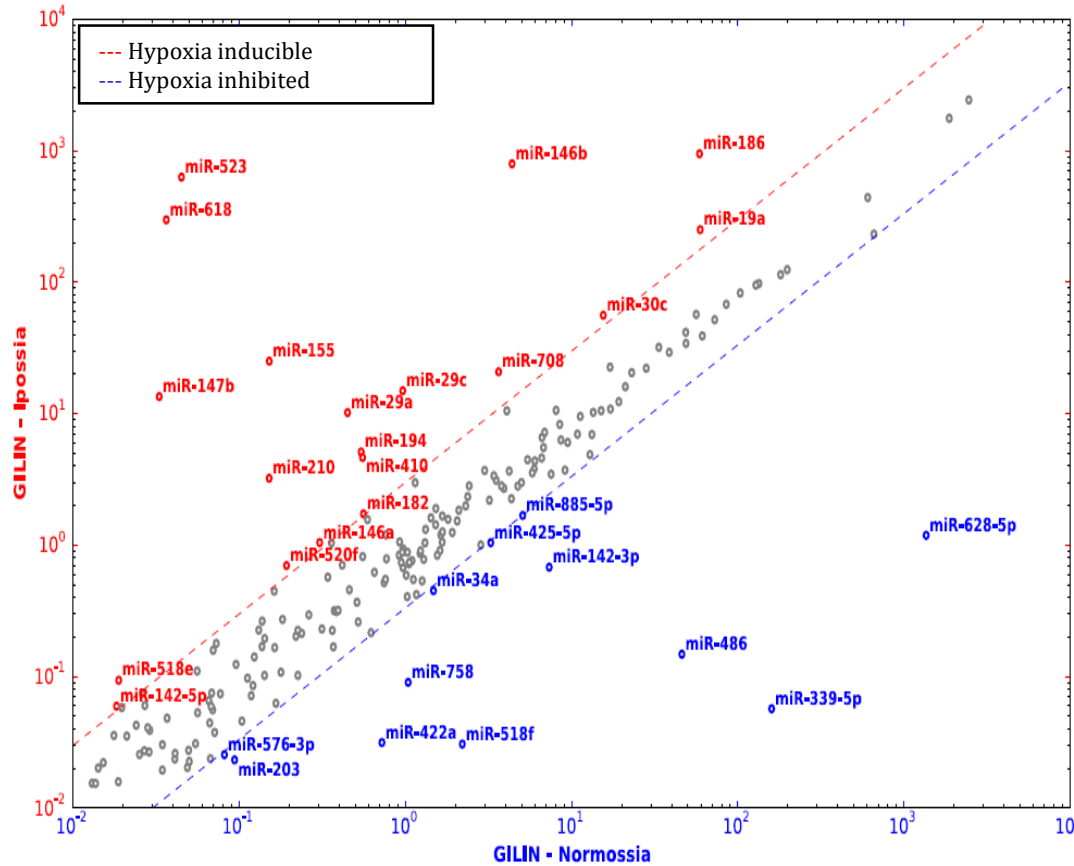


- **SCOPO: Correlare il contenuti di miR negli esosomi del plasma dei pazienti con:**
  - Compenso dietetico/biochimica
  - Adenomi
  - Carcinomi
  - Nefropatie
  - Risposta al trattamento (inibitori di ACE, GCSF, etc.)
- **Campioni biologici**
  - 3 cc di sangue con anticoagulante tenuto refrigerato
  - Profilo metabolico e dati clinici al prelievo.
- **Osservazioni**
  - Costi elevati dell' analisi degli esosomi
  - Medicina personalizzata
  - Minima invasività
  - Analisi Bioinformatica





# Hypoxia modulated genes





# Studio dei miRNA negli esosomi del plasma dei pazienti con Glicogenosi 1a

## Reclutamento dei pazienti GSD1a per prelievo di sangue

- **Dr. M. Di Rocco**
  - ▣ (Istituto G. Gaslini, Genova)
- **Dr. D. Melis**
  - ▣ (Università Federico II, Napoli)
- **Dr. S. Paci**
  - ▣ (Ospedale San Paolo, Università di Milano)
- **Dr. A. Sechi**
  - ▣ (Ospedale Santa Maria della Misericordia, Udine)

□ Pazienti	25
□ Pazienti con 1 campione di plasma disponibile	13
□ Pazienti con 2 campioni di plasma disponibile	10
□ Pazienti con 3 campioni di plasma disponibile	2
□ Campioni di plasma disponibili	39
□ Isolamento esosomi/estrazioni RNA	22
□ Cards fatte	2

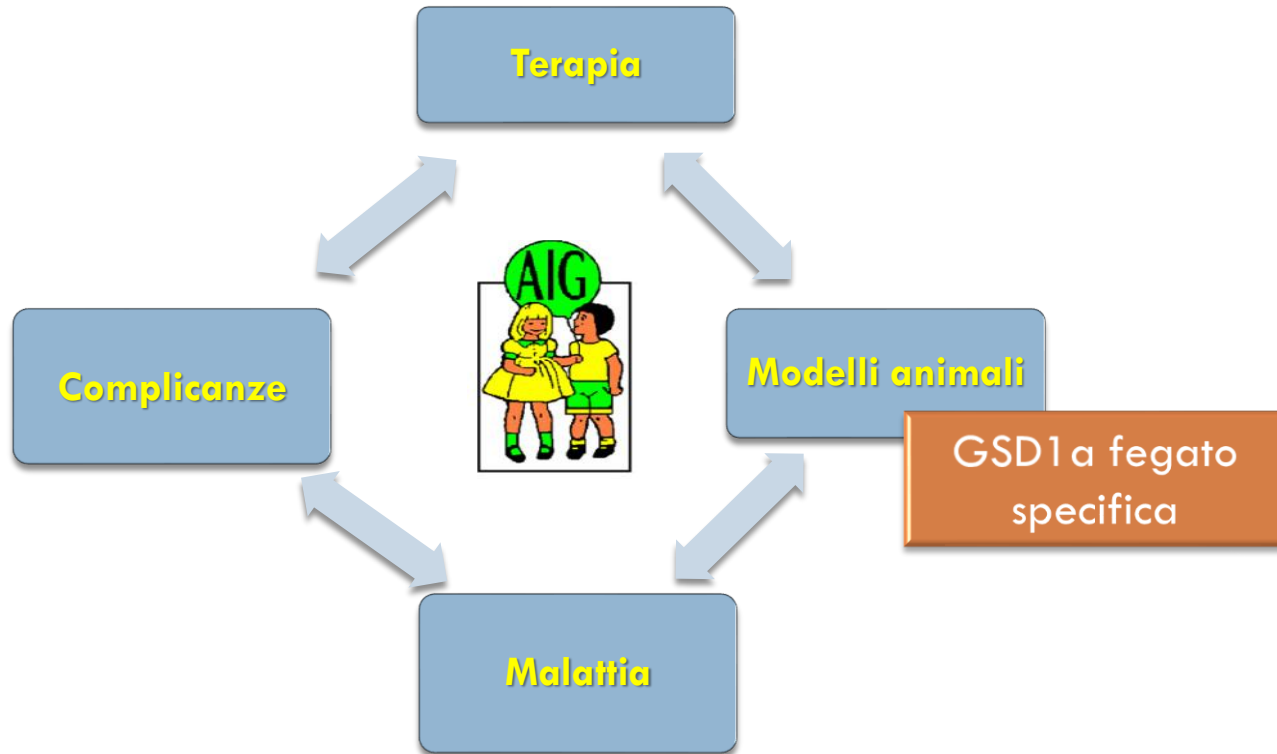


# Studio dei miRNA negli esosomi del plasma dei pazienti con Glicogenosi 1a

miR	Pz1/Pz2
□ hsa-miR-199a-3p	32.62
□ hsa-miR-188-3p	23.26
□ hsa-miR-501	20.53
□ hsa-miR-652	17.50
□ hsa-miR-140-3p	14.38
□ .....	.....
□ hsa-miR-194	1.08
□ hsa-miR-335	1.08
□ hsa-miR-27a	1.06
□ hsa-miR-486	1.03
□ hsa-miR-337-5p	1.00
□ .....	-----
□ hsa-miR-200b	0.02
□ hsa-miR-548a-5p	0.01
□ hsa-miR-100	0.01
□ hsa-miR-99a	0.00
□ hsa-miR-138	0.00
□	

	Proliferazione trasformazione	infiammazione
Paziente 1	bassa	alta
Paziente 2	alta	bassa

# Le complicanze della Glicogenosi 1a: dai topi agli esosomi



# Glicogenosi 1a

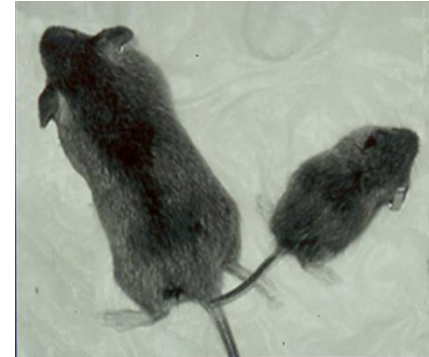
## Studi sugli animali

### 1. Topo knock-out

Creato da J.Y. Chou, NIH

#### Caratteristiche:

- Animali molto piccoli, fragili, alta mortalità.
- Basso numero di animali malati nati vivi.
- Manifesta la maggioranza dei segni clinici e della patologia associata alla condizione umana.



#### Utilizzato per lo studio di:

- terapia cellulare: staminali ematopoietiche e spermatogoniali

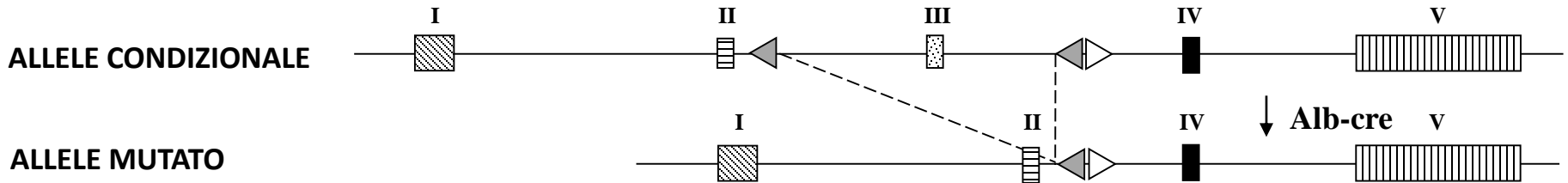
(Resaz, R. et al., 2011)

#### Non idoneo allo studio:

- degli effetti a lungo termine della terapia cellulare
- della progressione della malattia e insorgenza delle complicanze a lungo termine

## Sviluppo di un nuovo modello animale per la GSD1a

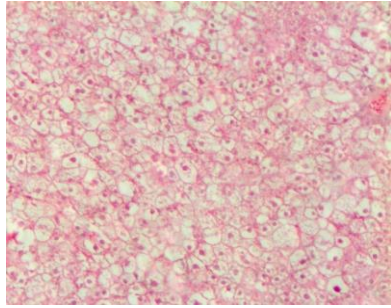
Abbiamo generato dei topi che mancano della G6Pasi solo nel fegato (GAF) (Resaz, R. et al., 2014)



I topi GAF sono vitali e manifestano una patologia epatica simile a quella dei pazienti

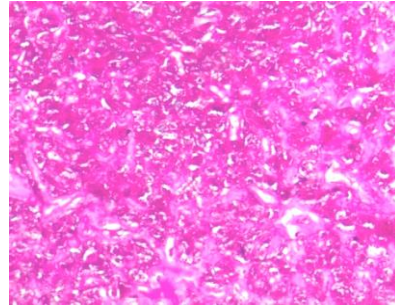
**Analisi su topi di età compresa tra 2 settimane fino a 19 mesi di vita**

**Istologia (H&E)**

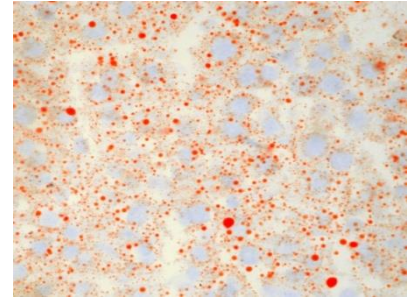


**GAF**

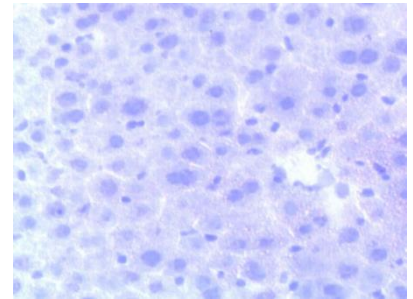
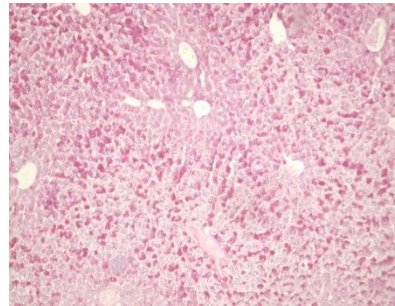
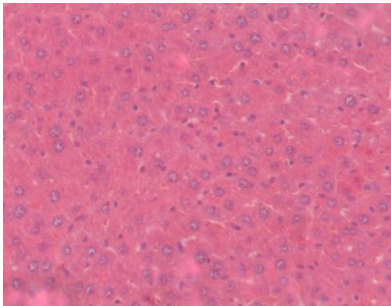
**Accumolo glicogeno (PAS)**



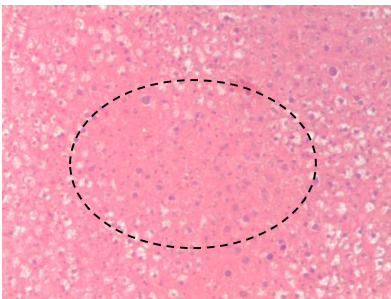
**Accumulo lipidi (Oil red O)**



**Control**

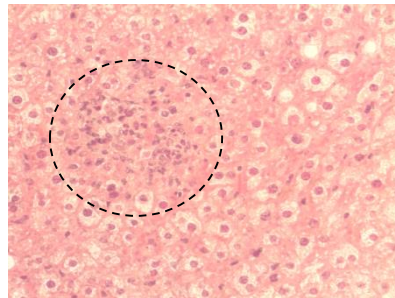


**Necrosis (H&E)**



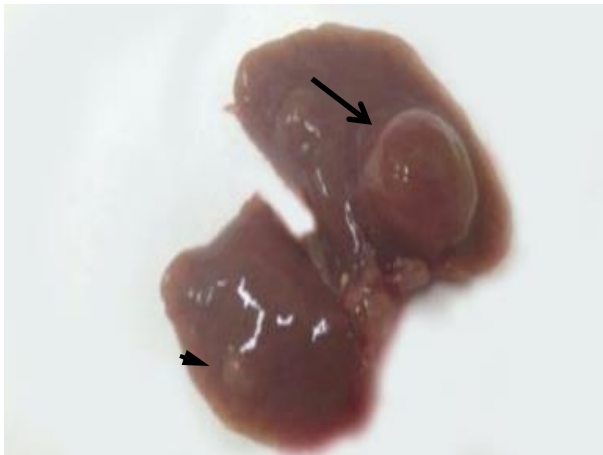
**GAF**

**Infiltrati infiammatori (H&E)**

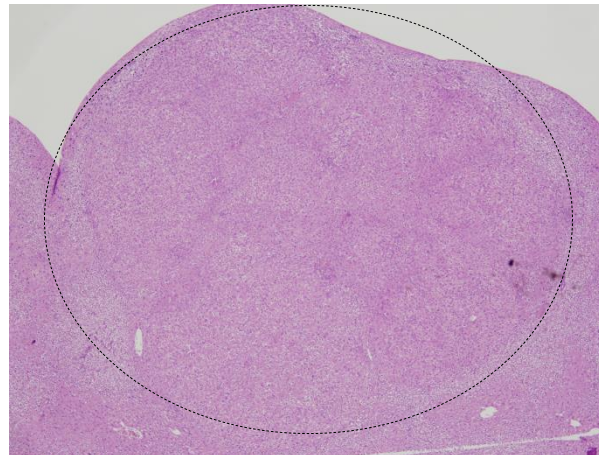


**Analisi su topi di età compresa tra 10 e 19 mesi di vita**

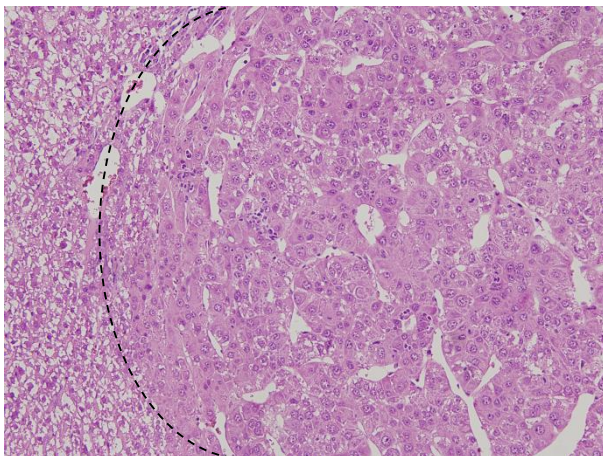
**Noduli del fegato**



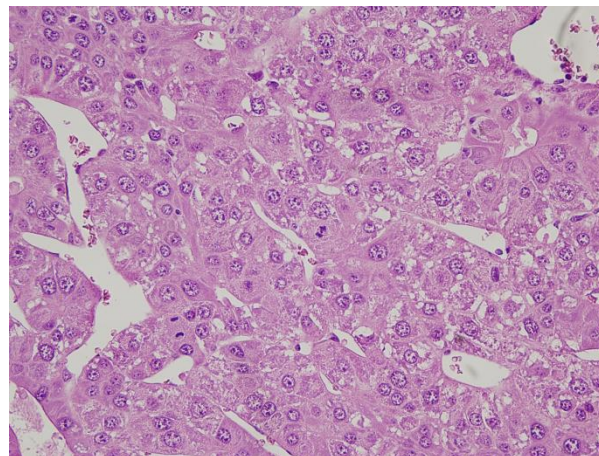
**Adenoma**



**Carcinoma nell'adenoma**



**Carcinoma**



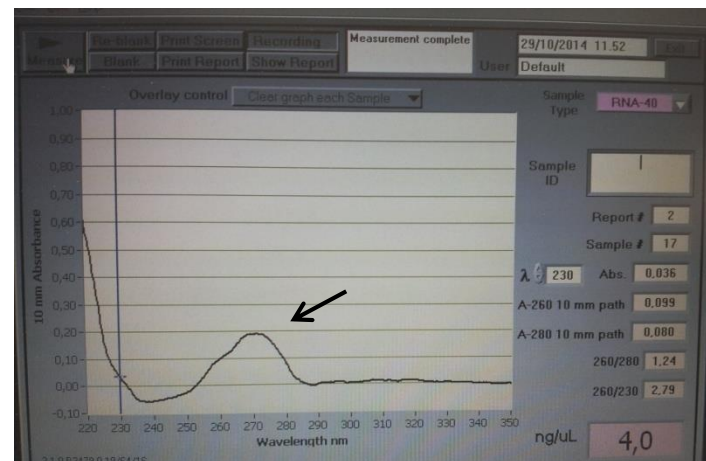
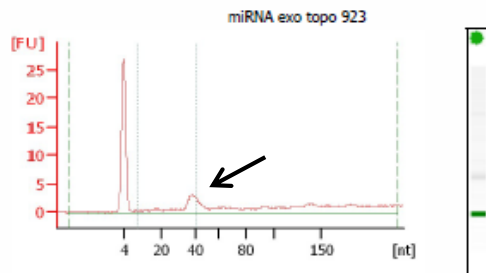
## **Questi animali sono quindi idonei allo studio:**

- **degli effetti a lungo termine della terapia cellulare**
  - Ripopolazione del fegato dei topi GAF
  - Correzione dei danni epatici e dell'ipoglicemia da digiuno
  - Prevenzione delle complicanze a lungo termine
  
- **della progressione della malattia e dell'insorgenza delle complicanze a lungo termine**
  - Studio sulla espressione dei miRNA derivati dagli esosomi presenti nel plasma dei topi GAF
  - Proteomica su fegato di topi GAF
  - Analisi istopatologica per la classificazione degli adenomi epatici (bHCA e IHCA)

# Studio sulla espressione dei miRNA degli esosomi nel plasma dei topi GAF

## Studi eseguiti:

Purificazione degli esosomi dal plasma di 4 topi ed estrazione dell'RNA



## Studi futuri:

Analisi dell'espressione dei miRNA nei topi GAF dai 2 ai 18 mesi di vita

Valutazione dell'espressione di miRNA specifici con lo stato patologico del fegato del topo.

## Proteomica su fegato di topi GAF

### **Studi eseguiti:**

Proteomica sul fegato di un topo GAF

### **Studi futuri:**

Proteomica sui fegati dei topi GAF dai 2 ai 18 mesi di vita e valutazione dei risultati rispetto allo stato patologico del fegato.

## Analisi istopatologica degli adenomi epatici dei fegati e loro classificazione

### **Studi in corso:**

Collaborazione con gli anatomopatologi dell'IST Dr. Luca Mastracci e Dr.ssa Federica Grillo  
Sono in corso d'analisi per immunohistochimica gli adenomi di 9 topi su 18 analizzati dai 10 ai 19 mesi

### **Studi futuri:**

Analisi istopatologiche di ulteriori topi GAF dai 10 ai 18 mesi di vita per la valutazione della frequenza di adenomi con beta-catenina mutata, cioè più a rischio di trasformazione in carcinoma epatico



# Glicogenosi 1

- **Terapia**
  - Epatociti derivati da cellule staminali
  - Cellule staminali ematopoietiche e spermatogoniali
  - Futuro → GSD1b, Esosomi
- **Modelli animali**
  - Modello murino con GSD1a solo epatica (GAF)
  - Modello animale inducibile per la GSD1b
  - Futuro → Caratterizzazione dei modelli
- **Complicanze**
  - Futuro → esosomi come biomarcatori per la progressione della malattia GSD-1a, 1b.
- **Malattia**
  - Analisi dei miRNA e proteomica nei topi GAF
  - Classificazione degli adenomi nei topi GAF
  - Futuro → miR degli esosomi: bersagli molecolari



**Istituto G. Gaslini**

**Laboratorio di Biologia Molecolare**

**Roberta Resaz**

**Daniela Segalerba**

**Cristina Vanni**

**Alessandra Eva**

**Luigi Varesio**



# Collaboratori

- **Janice Y. Chou, NIH, Bethesda**
  - Topi KO per la GSD1a
  - Topi condizionali per la costruzione dei topi GAF
  - Virus adenoassociato per l'espressione della G6Pasi
- **Fiorella Altruda, Università di Torino**
  - Spermatogoni
  - Costruzione modello animale per la GSD1b
- **Guido Tarone, Università di Torino**
  - Preparazione AAV
- **Andrea Petretto, Core Facility, Istituto G. Gaslini, Genova**
  - Proteomica
- **Ottavia Barbieri, IST, Genova**
  - Supervisione sperimentazione animale
- **Angela R. Sementa, Patologia Pediatrica, Istituto G. Gaslini**
  - Analisi istopatologica dei tessuti murini
- **Luca Mastracci, Anatomia Patologica, Università di Genova**
  - Analisi istopatologica dei tessuti murini
- **Federica Grillo, Anatomia Patologica, Università di Genova**
  - Analisi istopatologica dei tessuti murini
- **Maja Di Rocco, Istituto G. Gaslini**
  - Dati clinici
  - Raccolta plasma
- **Daniela Melis, Università "Federico II"**
  - Dati clinici
  - Raccolta plasma
- **Sabrina Paci, Ospedale San Paolo**
  - Dati clinici
  - Raccolta plasma
- **Annalisa Sechi, AOS "Santa Maria della Misericordia"**
  - Dati clinici
  - Raccolta plasma

UN PALLONCINO PER SPERARE

