

-News da Groningen – Ricerche in corso in Europa- Ricerche finanziate A.I.G.

The 4th International GSD Conference

June 15-17, 2017

University Medical Center Groningen
The Netherlands

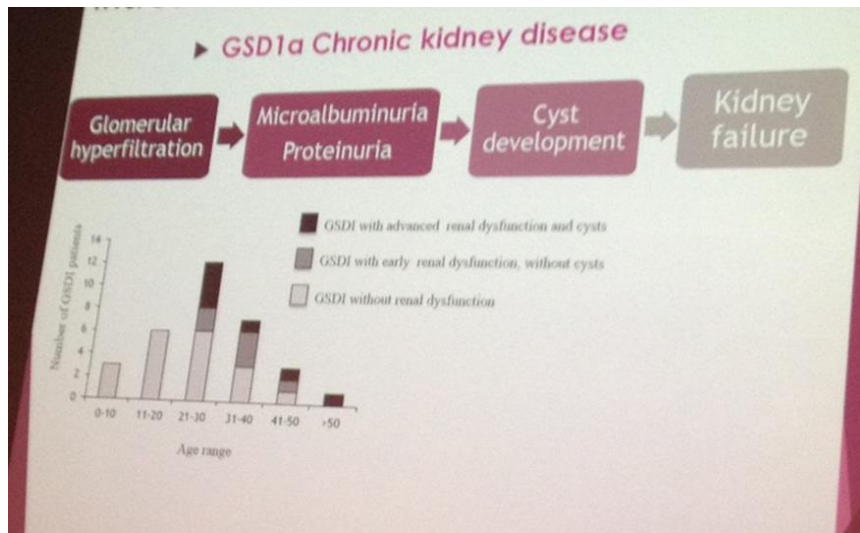
IGSD2017

www.igsd2017.com

Sviluppo di cisti renali in pazienti con GSD1.

Philippe Labrune, Parigi.

La patologia renale nella glicogenosi 1 è caratterizzata dalla disfunzione renale progressiva e dallo sviluppo di rene policistico che probabilmente porta all'insufficienza renale irreversibile.



Effetti protettivi del fenofibrato sui reni nei topi con GSD1a

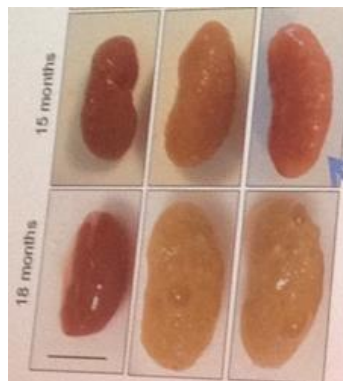
Laure Monteillet, Lione

Modello per la progressione della malattia renale cronica (CKD).

- L'accumulo di G6P nei tubuli induce l'attivazione di vie metaboliche, tipo la sintesi di glicogeno, la de novo lipogenesi (DNL) e la via dei pentoso fosfati.
- Queste deregolazioni portano all'accumulo di glicogeno e lipidi e all'infiammazione.
- Tutto ciò è associato all'attivazione del sistema renina-angiotensina che potrebbe determinare l'aumento di espressione del fattore pro-fibrotico TGF- β 1.



9 mesi



15 mesi

18 mesi

Infine, la progressione della fibrosi tubolare e interstiziale e la sclerosi glomerulare portano allo sviluppo del rene policistico.

Trattamento con fenofibrate:

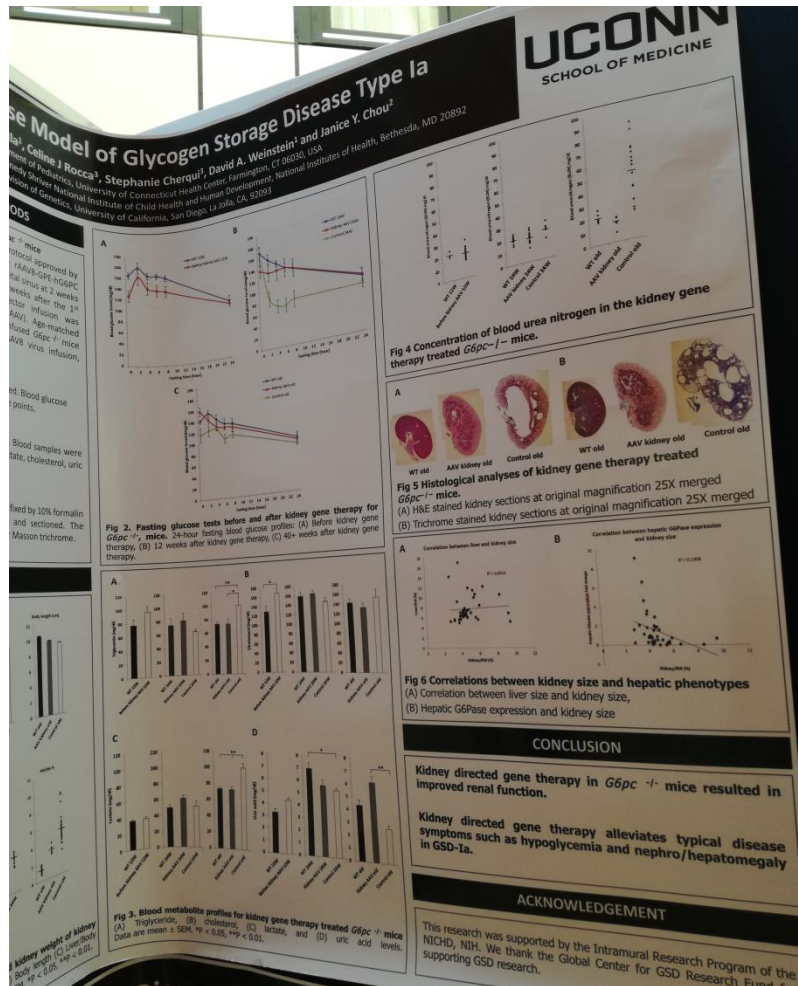
- Effetto ipolipemico
- Stimolazione del catabolismo lipidico
- Diminuzione dei trigliceridi renali e contenuto di glicogeno
- Prevenzione della nefromegalia
- Miglioramento dei marcatori della nefropatia
- Inibizione della transizione epitelio mesenchimale

Conclusioni

Il fenofibrate riesce a prevenire i danni renali come la glomerulosclerosi e danni ai tubuli renali diminuendo il contenuto di lipidi e di glicogeno nel tessuto. Il fenofibrate potrebbe essere una strategia molto interessante per prevenire la malattia renale cronica prima che si presentino danni seri nei pazienti con GSD1a.

Terapia genica per il trattamento del rene nella glicogenosi 1a.

Young Mok Lee, Connecticut University



I topi sono stati trattati:

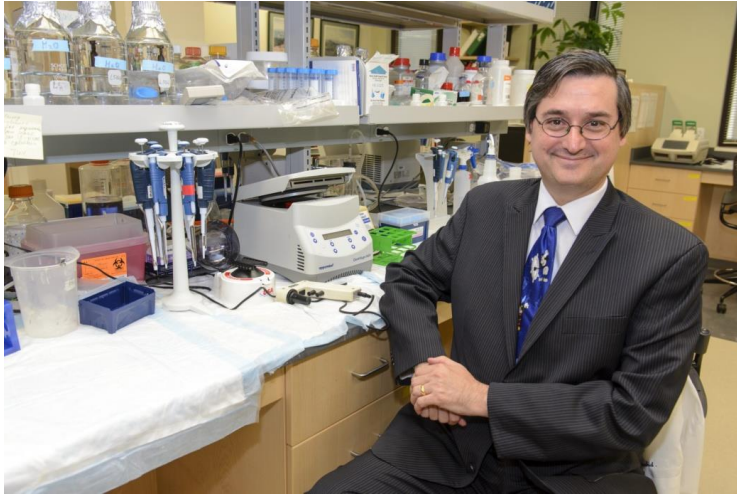
- neonati con l'adenovirus rAAV8-G6PC per il trattamento del fegato e per determinare quindi la sopravvivenza degli animali.
- a 12 settimane con l'adenovirus ricombinante rAAV9-G6PCE' che ha un buon tropismo per il rene.

Risultati:

- diminuzione dell'ipoglicemia
- diminuzione della nefro/epatomegalia,
- profili di glucosio normali in condizioni di digiuno
- miglioramento dei valori di funzionalità renale.

David Weinstein

University of Connecticut School of Medicine



Terapia genica

Gli studi di base su topi e cani con glicogenosi hanno dimostrato che l'utilizzo di virus adeno-associati ricombinanti (rAAV) come vettori per la terapia genica può mediare una significativa correzione del fenotipo GSD 1a e che il trasferimento genico può essere una promettente terapia alternativa per questa malattia e per altre malattie genetiche del fegato.

E' stata costruita presso l'Università del Connecticut un'Unità di Terapia Genica dedicata al trattamento della GSD1a con rAAV. Il clinical trial dovrebbe iniziare nel 2018.

I problemi associati alla terapia con rAAV sono diversi tra cui:

- 20-30% della popolazione ha anticorpi contro il virus adeno-associato. Queste persone saranno escluse dal clinical trial.

Soluzione a questo problema: l'uso di steroidi per bloccare il rigetto, anche se nei pazienti con glicogenosi questo provoca un aumento di acido lattico. L'utilizzo di basse dosi per breve tempo dovrebbe ovviare al problema del rigetto del virus e dell'aumento dell'acido lattico.

- Si può avere solo una correzione parziale del difetto genetico.

Soluzione a questo problema: ottenere una correzione del 5-10% che, come è stato visto nei topi e nei cani, dovrebbe essere sufficiente a risolvere il problema dell'ipoglicemia.

Il protocollo dovrebbe prevedere 3 iniezioni in modo simile a ciò che si fa per l'emofilia, e l'utilizzo di steroidi a basse dosi per breve tempo.

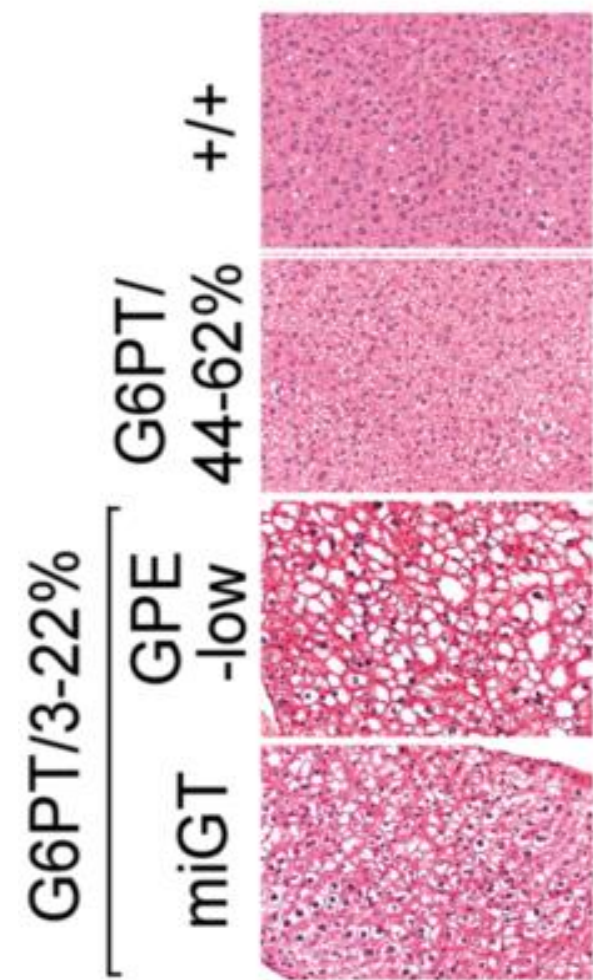
L'efficacia del trattamento sarà determinata con test di digiuno, analisi di funzionalità epatica e utilizzo della risonanza magnetica per la valutazione dell'accumulo di glicogeno nel fegato.

Terapia genica per la Glicogenosi 1b.

Janice Y. Chou. NIH, Bethesda.

L'unica comunicazione sulla 1b è stata quella di J.Y. Chou.

La dottoressa Chou ha esaminato l'efficacia della terapia genica nella GSD 1b su topi KO totali da lei generati qualche anno fa.

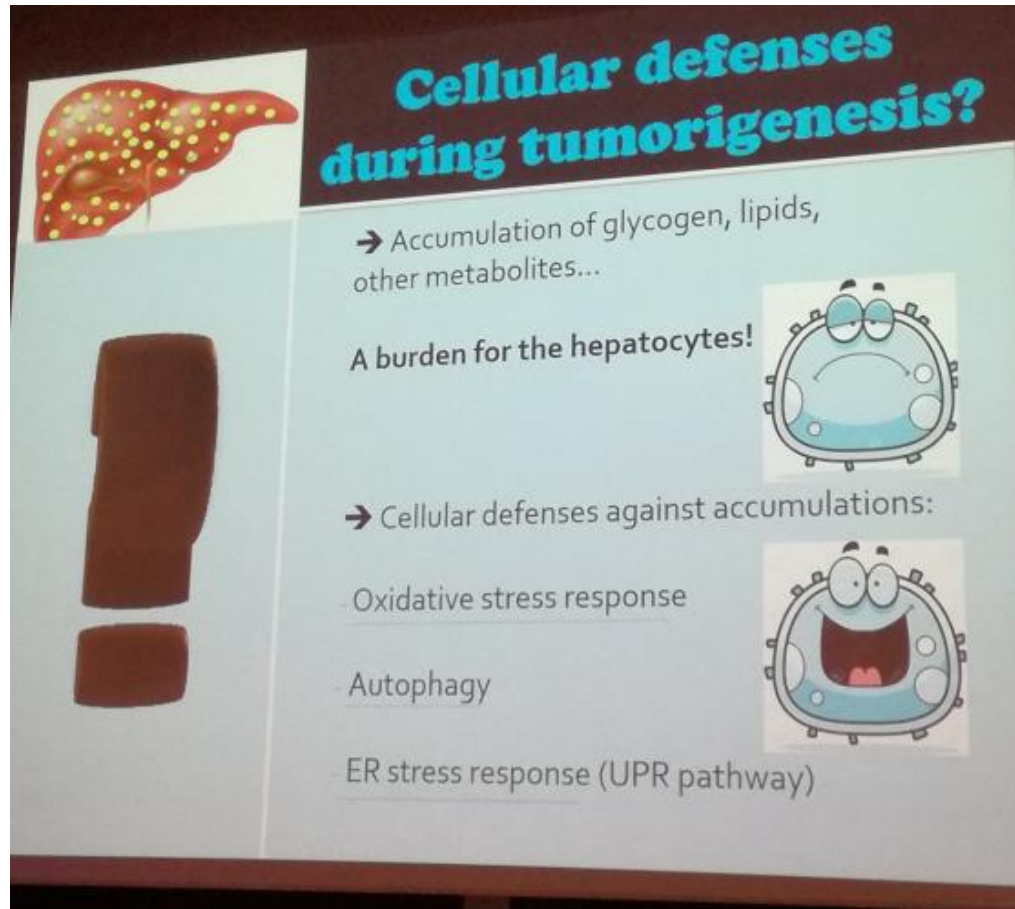


E' stato usato un virus adeno-associato che è in grado di ripristinare la funzionalità del fegato.

Inoltre, se si ha un'espressione del gene sano terapeutico superiore al 3% di quello che è espresso nei topi sani, non si sviluppano tumori del fegato, aumenta la sensibilità all'insulina e si previene l'obesità legata all'età e quindi lo sviluppo di sindrome metabolica.

Alterazione delle difese cellulari durante lo sviluppo dei tumori epatici nella GSD1a.

Monika Gjorgjieva, Lione, Francia



Cellular defenses during tumorigenesis?

→ Accumulation of glycogen, lipids, other metabolites...

A burden for the hepatocytes!

→ Cellular defenses against accumulations:

- Oxidative stress response
- Autophagy
- ER stress response (UPR pathway)

The slide includes an illustration of a liver with yellow spots, a sad cartoon cell with a frown, and a happy cartoon cell with a wide smile.

L'accumulo di glicogeno, di lipidi e di altri metaboliti nel fegato sono tre condizioni di alterazione metabolica che portano allo sviluppo di adenomi e adenocarcinomi.

Le cellule si difendono con:

Risposta allo stress ossidativo

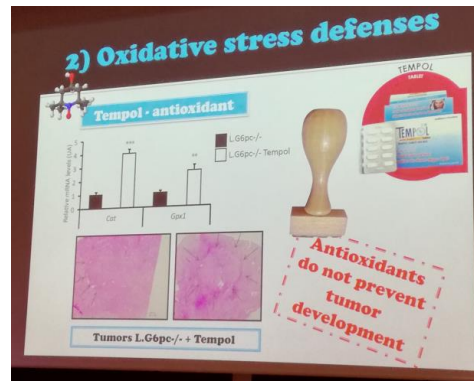
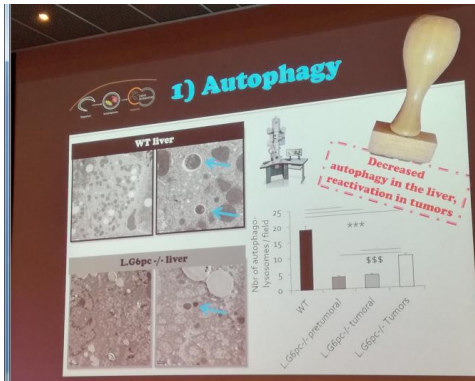
(degradazione dei radicali liberi per prevenire i danni da loro indotti)

Autofagia

(sistema intracellulare di eliminazione di organelli non funzionali, proteine, metaboliti etc)

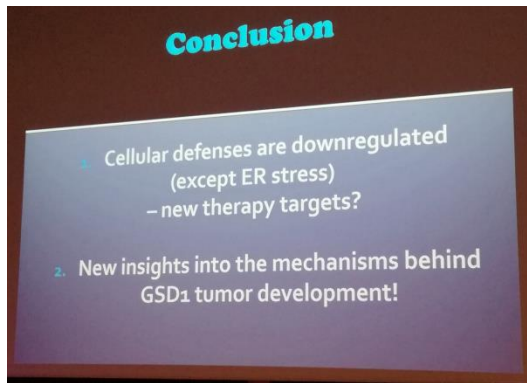
Risposta allo stress del reticolo endoplasmatico

(apoptosi, antiossidanti, degradazione del reticolo)



Risultati:

Utilizzando il modello di topo malato di GSD1a solo nel fegato si è visto che i meccanismi di difesa delle cellule contro questi stress metabolici sono diminuiti.



Conclusioni:

Le difese cellulari sono diminuite.

La diminuzione dell'autofagia durante la fase pretumorale può contribuire all'instabilità genetica.

Il danno ossidativo può promuovere ulteriormente la tumorigenesi favorendo le mutazioni del DNA.

Proposta:

Si può pensare di intervenire per aumentare i meccanismi di difesa identificando nuovi targets terapeutici.

Introduction

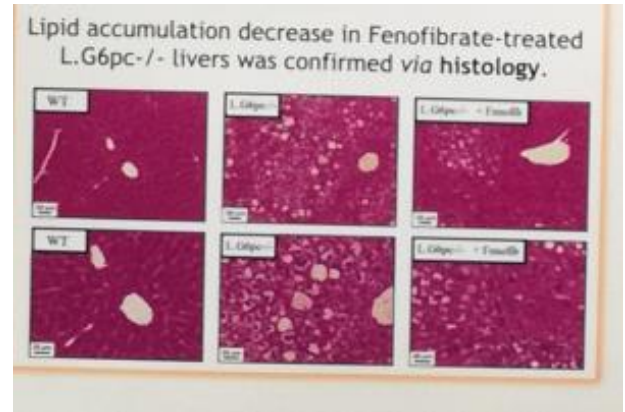
Glycogen storage disease type 1a

- Glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC) deficiency → hypoglycemia;
- Hepatomegaly & hepatic steatosis (strong lipid accumulation in the liver);
- Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - like complications.

Goal

In this study, we aimed to decrease hypertriglyceridemia and hepatic steatosis in GSD1a livers by using Fenofibrate, a lipid-lowering drug.

Il fenofibrate è un farmaco che diminuisce la quantità di lipidi nel sangue.



Conclusion

GSD1a liver
NAFLD complications

Fenofibrate treatment

GSD1a liver

No hypertriglyceridemia
 Decreased steatosis
 Normalized liver injury markers
 Increased antioxidant defenses

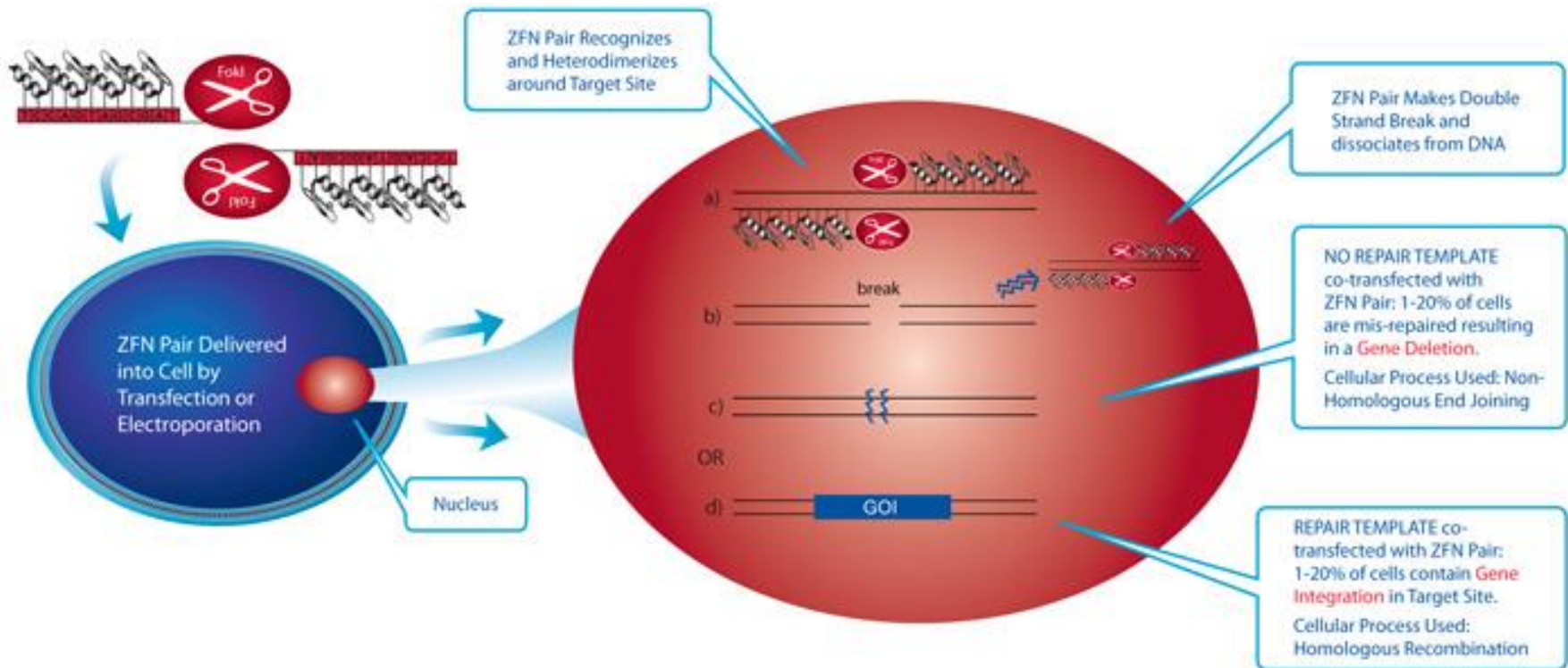
Il trattamento con fenofibrate dei topi malati di GSD1a nel fegato determina:

- No ipertrigliceridemia
- Diminuita steatosi
- Normalizzazione dei markers del danno epatico
- Aumentata difesa anti-ossidanti

In vivo genome editing to achieve integration of a glucose-6-phosphate transgene in glycogen storage disease type 1a

Koeberl D., Duke University

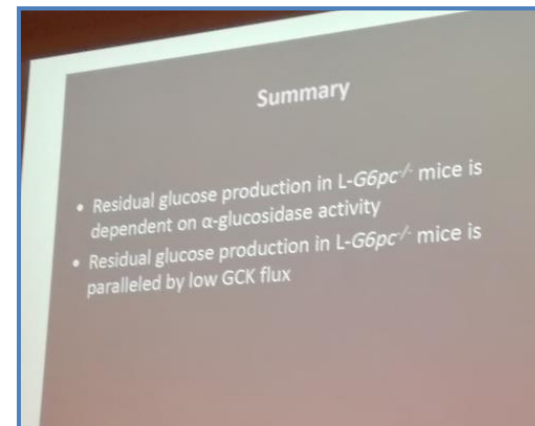
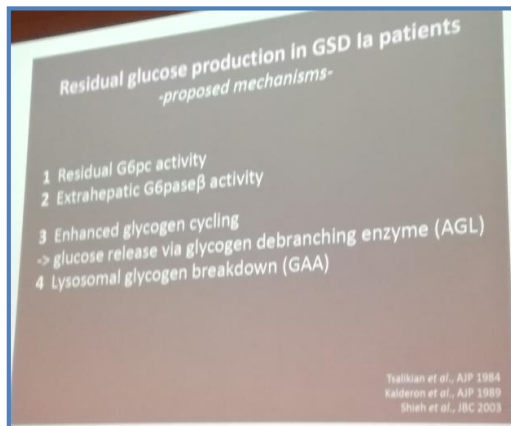
Possibilità di utilizzare la tecnica del "genome editing" per ovviare al problema della perdita del gene terapeutico, cosa che avviene dopo un po' di tempo dal trattamento con virus adeno-associato ricombinante.



Hepatic alpha glucosidase activity contributes to residual endogenous glucose production in a mouse model for GSD1a

Maaïke Oosterveer, Groningen, Paesi Bassi

Esiste una produzione residua di glucosio nei pazienti con GSD1a. A cosa è dovuta?



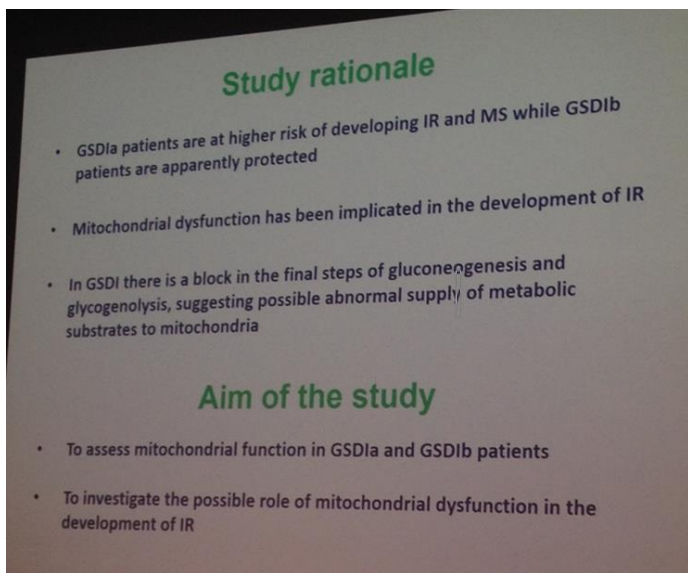
Analizzando i topi malati solo nel fegato è stato visto che la capacità di produrre glucosio negli epatociti malati era dovuta a:

- Un aumento dell'attività dell'alfa glucosidasi (deficit nella malattia di Pompe), che idrolizza il glicogeno in unità di glucosio
- Una parallela diminuzione della glucochinasi, un enzima che fosforila il glucosio in posizione 6

La proposta è di intervenire con trattamenti farmacologici per modulare l'attività di questi due enzimi e migliorare la produzione di glucosio.

Resistenza all'insulina nella GSD1a: collegamento tra carboidrati e mitocondri

Alessandro Rossi, Università di Napoli



Razionale

- I pazienti con glicogenosi 1a sono a rischio più alto di sviluppare resistenza all'insulina e sindrome metabolica rispetto ai pazienti con glicogenosi 1b che sembrano protetti.
- La disfunzione mitocondriale è stata implicata nello sviluppo della resistenza all'insulina

Scopo dello studio:

- Determinare la funzione dei mitocondri nella glicogenosi 1a e 1b
- Analizzare il possibile ruolo della disfunzione dei mitocondri nello sviluppo della resistenza all'insulina



Conclusioni

- I dati suggeriscono una possibile correlazione tra la disfunzione mitocondriale e la resistenza all'insulina
- I pazienti con GSD1b sono apparentemente protetti da iperlipidemia, resistenza all'insulina e disfunzione mitocondriale
- Nuovi potenziali target terapeutici nella GSD1a

CONCLUSIONI GENERALI PER LE RICERCHE IN CORSO IN EUROPA

Rene

Terapia genica (AAV) e farmacologica (fenofibrate)

Fegato

- Terapia genica per la GSD1b (AAV) e per la GSD1a (genome editing)
- Terapia farmacologica (fenofibrate) per il fegato nella GSD1a
- Alterazioni metaboliche nel fegato per l'identificazione di nuovi target terapeutici (difese cellulari, attività dell'alfa glucosidasi e della glucochinasi, e disfunzione mitocondriale)

Laboratorio di Biologia Molecolare

Istituto Giannina Gaslini



ISTITUTO GIANNINA GASLINI
Istituto Pediatrico di Ricovero e Cura a carattere Scientifico



Partecipanti:

Roberta Resaz

Anna Livia Pissavino

Alessandra Eva

UN PALLONCINO PER SPERARE



Presentazioni

Presentazione orale:

'New biomarkers and resonance imaging approaches for GSD1a: translational studies'.

Poster:

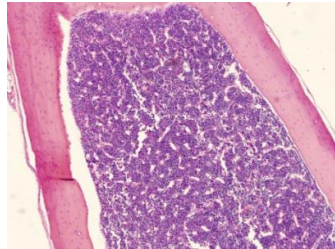
An inducible mouse model for GSD-1b

A new resonance imaging approach for adenoma classification in an animal model of GSD1a

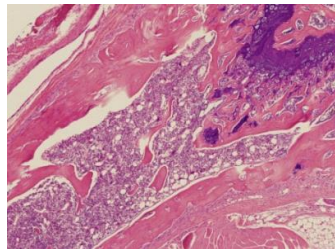
Liver proteomic profile of liver-specific G6Pase^{-/-} mice: an approach to identify new biomarkers for Glycogen Storage Disease type 1a

AN INDUCIBLE MOUSE MODEL FOR GSD-1b

Bone marrow



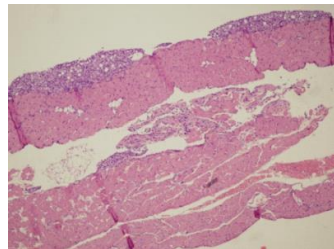
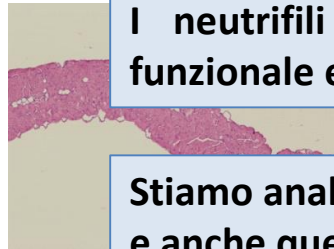
+/+



-/-

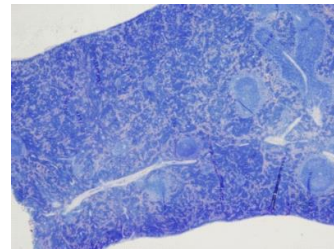
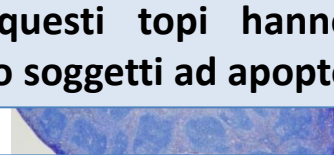
Arrows show bone marrow substitution

Diaphragm



Arrows show inflammation and mesothelial reaction

Spleen



White pulp is reduced compared to control

I neutrofili di questi topi hanno una diminuita capacità funzionale e sono soggetti ad apoptosi, cioè morte cellulare.

Stiamo analizzando attualmente i monociti e i macrofagi e anche queste cellule hanno problemi funzionali.

Abbiamo sviluppato un modello inducibile di topo che mima la patofisiologia della GSD1b per quello che riguarda il danno ai tessuti, la neutropenia, e la disfunzione dei neutrofili e dei monociti/macrofagi.

A new resonance imaging approach for adenoma classification in an animal model of GSD1a

Abbiamo dimostrato che gli adenomi ad alto rischio hanno delle caratteristiche di immagine in risonanza magnetica chiaramente distinguibili da quelle esibite dagli adenomi a basso rischio.

L'aver sviluppato un protocollo di risonanza magnetica per rilevare e analizzare le lesioni epatiche nei topi apre la possibilità di applicare questo protocollo ai pazienti allo scopo di eseguire delle diagnosi non invasive.

Analisi dell'espressione delle proteine nei topi a seconda dell'età.

RISULTATI

Abbiamo trovato che 273 proteine tra le 4000 identificate sono espresse in modo diverso nei topi malati rispetto a quelli sani.

CONCLUSIONI

Queste proteine sono dei potenziali biomarcatori della degenerazione epatica in questi topi.

Questi risultati possono portare allo sviluppo di trattamenti farmacologici per contrastare le complicanze a lungo termine della malattia.

Presentazione orale

**NEW BIOMARKERS AND RESONANCE IMAGING
APPROACHES FOR GSD1a: TRANSLATIONAL STUDIES**

(Nuovi biomarcatori e approcci di risonanza magnetica per la GSD1a: studi traslazionali)

Alessandra Eva e Luigi Varesio

RICERCA DI BIOMARCATORI PROGNOSTICI DELL'INSORGENZA DI ADENOMI E CARCINOMI EPATICI NELLA GSD1a

E' possibile trovare dei biomarcatori specifici dello stato patologico del fegato allo scopo di sviluppare nuovi farmaci per prevenire le complicanze a lungo termine della glicogenosi 1a?

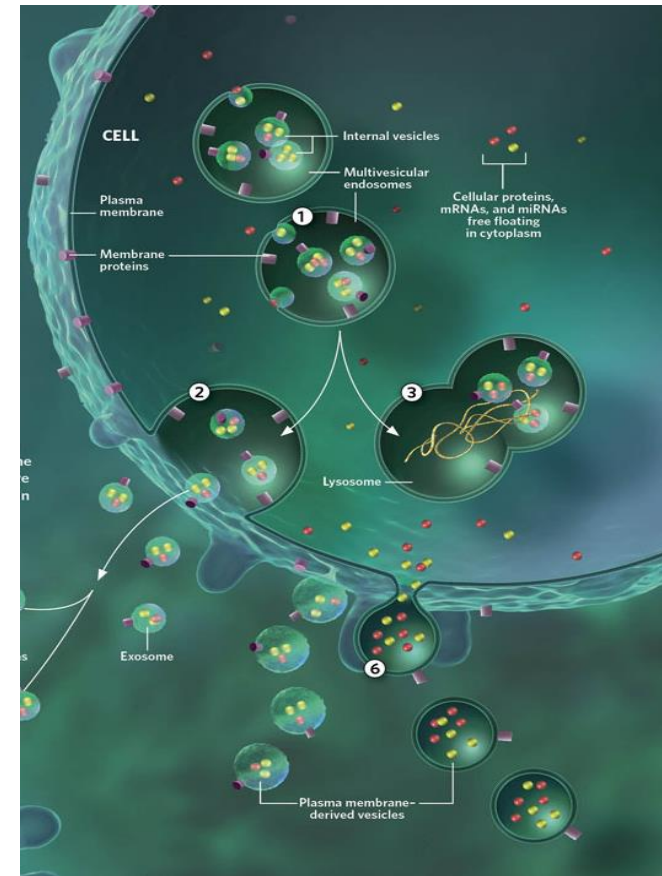


- 1. Valutazione e analisi dell'espressione dei microRNA presenti negli esosomi derivati dal plasma dei topi e dei pazienti con GSD1a .**
- 2. Valutazione e analisi delle proteine espresse nei fegati dei topi con GSD1a (analisi proteomica)**
- 3. Correlazione dei dati di espressione dei miRNA e delle proteine con l'insorgere degli adenomi epatici.**

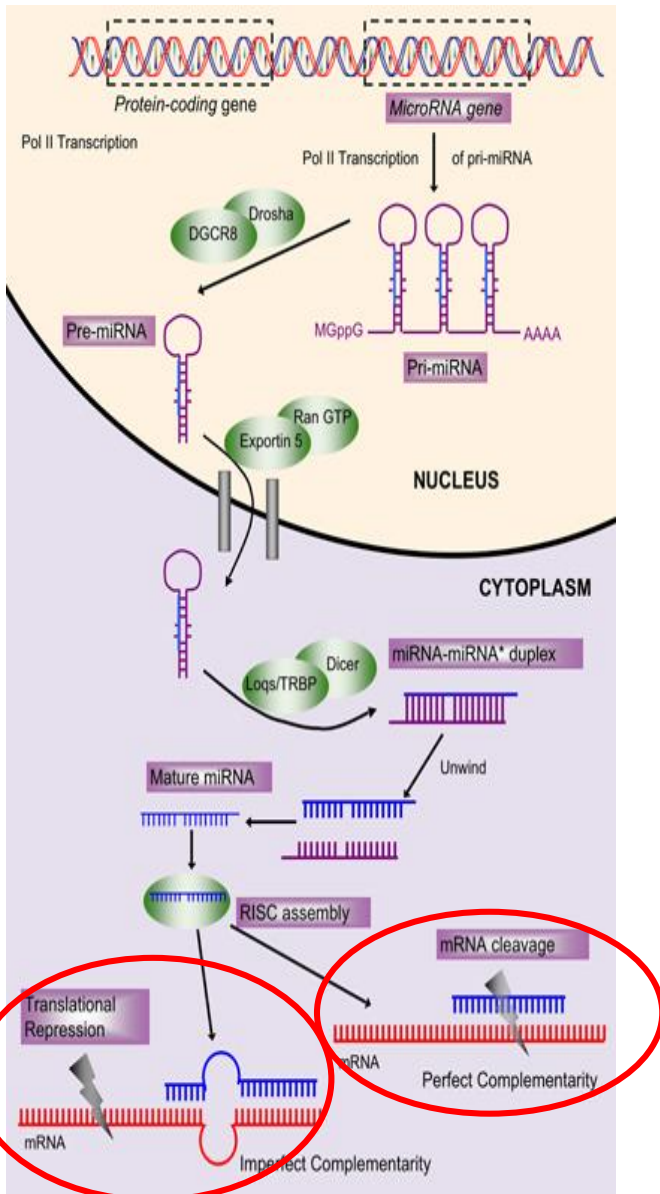
ESOSOSMI



- Vescicole secrete dalle cellule
- Si trovano nei fluidi biologici (sangue, urine, etc)
- Contengono diverse molecole biologiche tra cui i microRNA



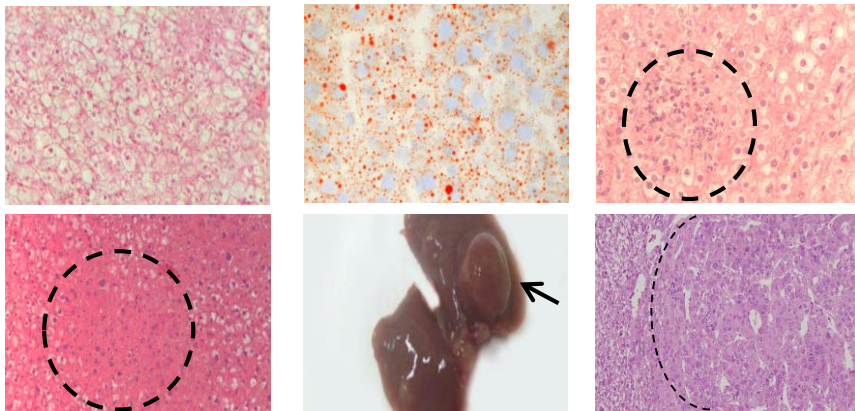
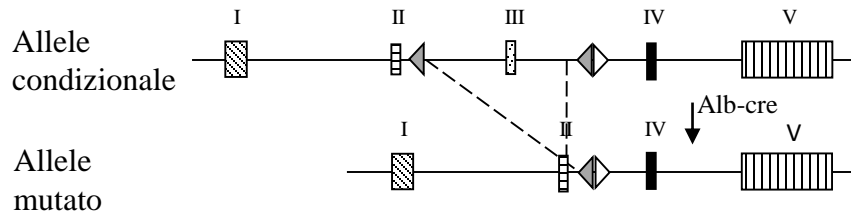
microRNA



- I microRNA sono un gruppo di piccoli RNA che regolano l'espressione di geni specifici inibendoli.
- I microRNA agiscono su molti geni regolando molte funzioni biologiche e sono importantissimi nello sviluppo di molte malattie tra cui anche dei tumori.
- I tipi di microRNA che si trovano negli esosomi varia a seconda dei tessuti da cui derivano e a seconda dello stato di salute del tessuto stesso.

Valutazione e analisi dell'espressione dei microRNA presenti negli esosomi derivati dal plasma dei topi.

Topo condizionale (*LS-G6pc^{-/-}*)



5 topi malati e 3 topi sani per gruppo

Gruppo	Età (Mesi)	Adenomi
1	1-3	-
2	4-6	-
3	7-9	-
4	10-12	-
5	10-12	+
6	13-15	-
7	13-15	+
8	16-18	-
9	16-18	+

CONCLUSIONI

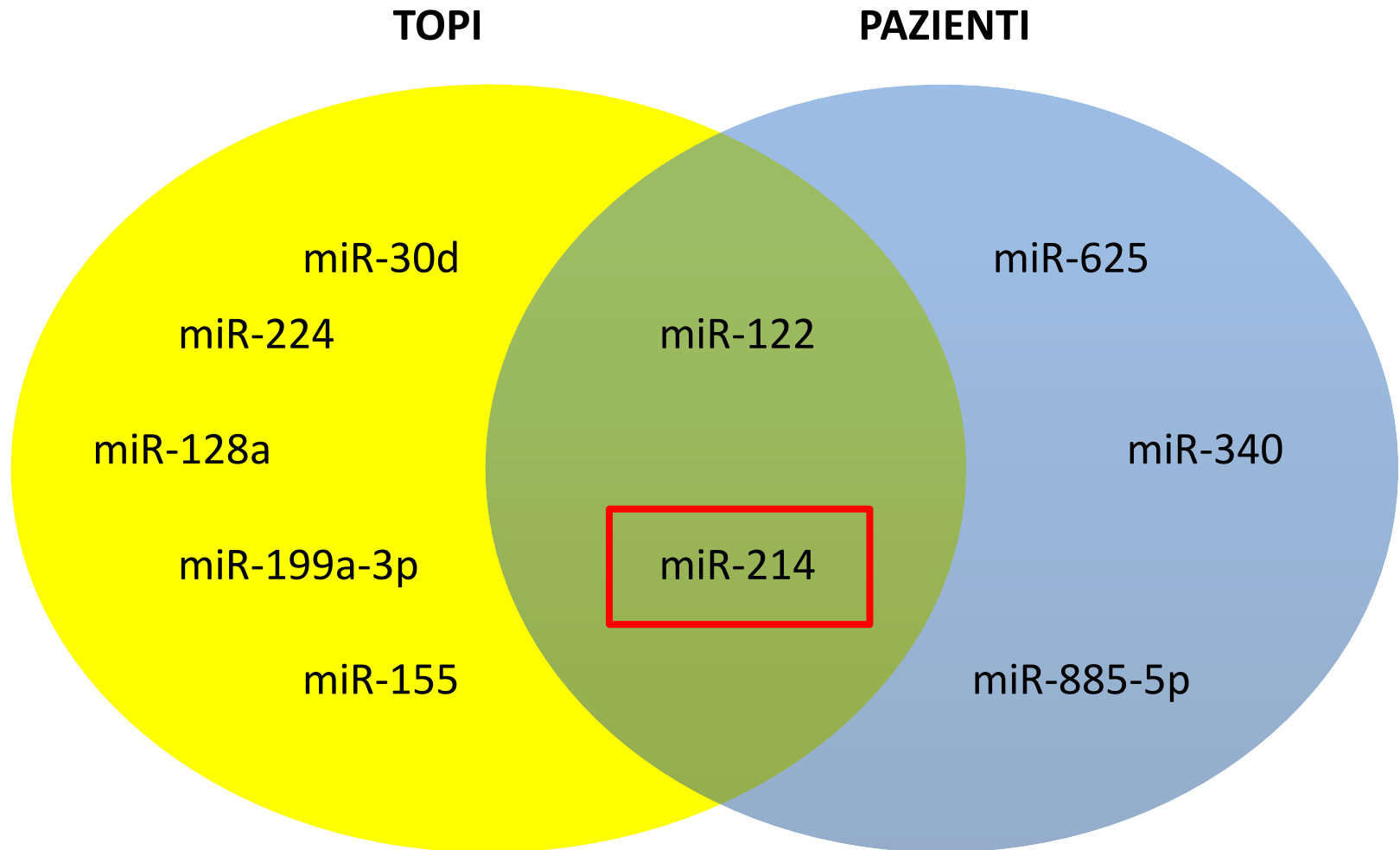
L'analisi dell'espressione degli microRNA nei topi mostra che:

- **Alcuni microRNA sono espressi in modo diverso nei topi malati rispetto a quelli sani.**
- **12 microRNA sono più espressi e 15 microRNA sono meno espressi nei topi malati con adenoma rispetto ai topi malati senza adenoma.**
- **Alcuni di questi microRNA sono stati associati con alcune malattie del fegato e con carcinomi epatici.**

Valutazione e analisi dell'espressione dei microRNA presenti negli esosomi derivati dal plasma dei pazienti con GSD1a .

Pazienti			
Gruppo	Età (anni)	Adenomi	Totale
1	0-24	-	20
2	25-50	+	18

CONCLUSIONI



**Il microRNA-214 inibisce la crescita dei carcinomi epatici bloccando la beta-catenina
Questo microRNA è molto poco espresso sia nei topi che nei pazienti con GSD1a**

CONCLUSIONI GENERALI PER LE RICERCHE FINANZIATE DA A.I.G.

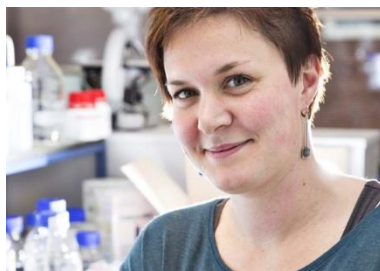
Abbiamo terminato l'analisi del modello di topo inducibile per la GSD1b
Stiamo scrivendo un lavoro scientifico

Abbiamo terminato lo studio dell'espressione delle proteine del fegato dei topi del modello condizionale per la GSD1a
Stiamo terminando l'analisi bioinformatica dei risultati ottenuti per l'identificazione di possibili biomarcatori proteici
Prevediamo di scrivere un lavoro scientifico entro la fine della prossima primavera

Abbiamo terminato lo studio dell'espressione dei microRNA dei topi del modello condizionale per la GSD1a
Stiamo terminando l'analisi bioinformatica dei risultati ottenuti per l'identificazione di possibili biomarcatori
Prevediamo di scrivere un lavoro scientifico entro la fine della prossima primavera

COLLABORAZIONI:

Maaïke Oosterveer
Università di Groningen
(T. Derks)



Studio sugli acidi biliari
nella glicogenosi 1b
(nostro modello animale)

Janice Y. Chou
NIH, Bethesda



Studio sulle caratteristiche del fegato
nella glicogenosi 1b
(nostro modello animale)

Young Mok Lee
Connecticut University
(D. Weinstein)

Analisi dei microRNA nei pazienti con GSD1a

1. Raccolta di plasma da 100 pazienti
2. Purificazione e analisi dei microRNA degli esosomi

Studi con il modello animale della glicogenosi 1b.

1. Studi sul midollo, neutrofili, monociti
2. Sviluppo di una terapia per il midollo (neutrofili e monociti)
tra cui terapia genica ex-vivo

Studi con il modello animale della glicogenosi 1a.

1. Analisi di farmaci candidati ad alleviare o curare il fenotipo della GSD1a
2. Controllo e terapia dietetica nei topi GSD1a



Istituto G. Gaslini, Genova, Italy

- R. Resaz
- D. Segalerba
- M. Morini
- D. Cangelosi
- A. Eva
- L. Varesio

Istituto G. Gaslini, Genova, Italy

- A. Petretto
- E. Inglese
- M. Di Rocco

Università Federico II, Napoli, Italy

- D.Melis

Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italy

- F. Rosa
- L. Basso
- C. E. Neumaier
- F. Grillo
- L. Mastracci

Ospedale San Paolo, Milano, Italy

- S. Paci

Azienda Ospedaliero-Universitaria Santa Maria della Misericordia, Udine, Italy

- A. Sechi

UN PALLONCINO PER SPERARE



**Associazione
Italiana
Glicogenosi**

