

## **ISTITUTO GIANNINA GASLINI**

*per la cura, difesa ed assistenza  
dell'infanzia e della fanciullezza*

*Istituto a carattere scientifico  
D.M. 24/4/1959 n°300.8/60807  
Cod. Fisc. E.P. IVA: 00577500101*

## **Laboratorio di Biologia Molecolare**

**Direttore: Dr. Luigi Varesio**

L.go Gaslini,5

16148 Genova Quarto, Italy

tel: 010 5636599

fax: 010 3733346

e-mail: biolmolecolare@ospedale-gaslini.ge.it

25/09/2007

### **RICERCA SULLA GLICOGENOSI 1A**

Responsabile:

Dr. Luigi Varesio

Personale Laboratorio di Biologia Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova:

Dr. R. Lavieri

Dr. L. Emionite

Dr. M. Puppo

Dr. L. Varesio

Dr. A. Ricciardi

Dr. L. Belli

Dr. A. Eva

Collaboratori:

Dr. J. Chou, NIH, NICHD HDB, Bethesda

Dr S. Thea., Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Chimica

Participating clinical centers:

Dr. M. Di Rocco, G.Gaslini Institute (Genova)

Dr. D. Melis, Federico II University (Napoli)

Dr. R.Parini, S.Gerardo Hospital (Monza)

Dr. M. Torcoletti, S.Paolo Hospital (Milano)

Dr. E. Procopio, Meyer Hospital (Firenze)

Dr. C. Dionisi, Bambin Gesù Hospital (Roma)

### **TERAPIA FARMACOLOGICA E CELLULARE PER IL TRATTAMENTO DELLA GLICOGENOSI TIPO 1 A**

#### **Riassunto**

La Glicogenosi di Tipo 1a (GSD-1a) è una malattia congenita causata dalla non funzionalità di una proteina presente nel fegato, la glucosio-6-fosfatasi (G6Pasi), che è importante per il controllo del metabolismo degli zuccheri. A seguito di questa mutazione il metabolismo del glucosio è fortemente alterato ed è compromessa la funzionalità epatica e renale, spesso in modo particolarmente grave. Ci proponiamo di

studiare le possibilità di curare la malattia utilizzando due strategie diverse rappresentate dalla terapia cellulare con cellule staminali e dall'identificazione di farmaci che correggono lo scompenso metabolico. Questi studi saranno condotti in parte su un modello sperimentali di topo che manifesta una patologia simile alla Glicogenosi 1 a umana, in parte su sangue ed urina dei pazienti. Studi iniziali hanno dimostrato che è possibile utilizzare cellule staminali del midollo osseo per rimpiazzare le cellule malate del fegato aprendo la possibilità di utilizzare una terapia cellulare per trattare questa patologia. Inoltre, abbiamo indicazioni di una via metabolica, il metabolismo del triptofano, la cui compromissione può essere legata al decorso della malattia. E' quindi possibile ipotizzare che farmaci che agiscono su questa via metabolica siano efficaci nel trattare la Glicogenosi. In conclusione, riteniamo che la combinazione di queste strategie ci permetterà di contribuire significativamente al miglioramento e forse alla cura definitiva di pazienti affetti da Glicogenosi 1 a.

## **Introduzione**

La Glicogenosi di Tipo 1a (GSD-1a) è una malattia congenita causata dalla non funzionalità di una proteina presente nel fegato, la glucosio-6-fosfatasi (G6Pasi), che è importante per il controllo del metabolismo degli zuccheri. Il glucosio è presente solo in piccole quantità nel sangue di questi pazienti, mentre si accumula notevolmente nel fegato e nel rene. I pazienti con Glicogenosi di tipo 1a sono costretti ad alimentarsi ogni tre ore per evitare gravi crisi ipoglicemiche che possono portarli rapidamente al coma. Nel tempo la malattia compromette il funzionamento del rene e può portare alla comparsa di tumori nel fegato.

Questo progetto è articolato in due parti in relazione al tipo di trattamento proposto. La prima parte (A) propone di studiare un approccio farmacologico, mentre la seconda (B) propone di studiare un approccio di terapia cellulare.

### **A. Metabolismo epatico e Glicogenosi 1a**

#### **Scopo del progetto**

Gli effetti della glicogenosi 1a sulla funzionalità del fegato sono conosciuti in modo incompleto. Una conoscenza dettagliata del metabolismo epatico in questi pazienti può dare indicazioni preziose su potenziali farmaci e possibili terapie per correggere le alterazioni di quest'organo, migliorare la qualità di vita del paziente e prevenire il danno renale.

Per raggiungere quest'obiettivo si stanno utilizzando vari approcci e tecnologie che includono la tecnologia microarray, l'analisi del siero mediante tecniche analitiche molto precise ( HPLC, spettrografia di massa) e tecniche molecolari ed istologiche classiche. Abbiamo a disposizione campioni di fegato di pazienti affetti da GSD-1a su cui abbiamo eseguito l'analisi del profilo di espressione genica per evidenziare le alterazioni dei geni associate alla malattia. Disponiamo di topi knock out per il gene G6Pasi che mostrano una patologia molto simile a quella descritta nell'uomo e che saranno indispensabili per validare le ipotesi e testare farmaci e trattamenti di potenziale rilevanza clinica. Questi studi rappresentano l'applicazione di una tecnologia di avanguardia allo studio della GSD-1a. Il fine ultimo è di correlare le disfunzioni metaboliche con il decorso della malattia e di utilizzare farmaci che agiscono su questi processi per controllare l'evolversi della malattia. Questi studi hanno un interesse

scientifico, sono trasferibili alla clinica e hanno una solida base sperimentale in quanto abbiamo a disposizione il materiale clinico, incluso campioni di fegato patologico, un modello animale per validare le conclusioni e testare le ipotesi e la tecnologia per affrontare questo progetto. I risultati ottenuti saranno inoltre fondamentali per disegnare nuovi protocolli per trattare le complicazioni associate al decorso della GSD-1a e specificamente il danno renale.

### **Obiettivi specifici**

1. *Analisi del profilo di espressione genica del fegato di pazienti con glicogenosi e identificazione dei clusters di geni coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi.* Il mio laboratorio è responsabile della 'core facility' per il microarray presso l'Istituto G. Gaslini e abbiamo una buona esperienza in questa metodologia. Definiremo quindi il profilo di espressione genica nei fegati di pazienti affetti da GSD-1a che hanno subito trapianto di fegato. Questi campioni biologici sono molto preziosi e abbiamo avuto la possibilità di ottenere i fegati di 4 pazienti. Durante questi studi prevediamo di stabilire delle collaborazioni con altri ospedali per ottenere ulteriore materiale biologico. Il profilo di espressione genica, servirà per scoprire le alterazioni metaboliche che sono associate al blocco della funzionalità organica causato dalla malattia. Sal momento che la tecnologia del microarray ci dà una visione complessiva delle vie metaboliche alterate, questi studi porteranno all'identificazione di geni rilevanti modulati durante il decorso della malattia e la formulazione di ipotesi sul coinvolgimento del metabolismo di specifici aminoacidi nel decorso della malattia e stabilirà la base per confermare i risultati da un punto di vista biochimico su un gran numero di pazienti. Questi studi hanno una buona possibilità di riuscita in quanto abbiamo già a disposizione del materiale con cui lavorare e la stretta collaborazione con la clinica assicurerà l'accesso a ulteriore materiale biologico di pazienti con glicogenosi.
2. *Analisi dei livelli del triptofano e dei suoi metaboliti nel sangue e nelle urine dei pazienti affetti da GSD-1a.* Risultati preliminari suggeriscono che il metabolismo del triptofano, un aminoacido essenziale, può essere alterato in pazienti con GSD-1a. Si propone di studiare sistematicamente questo aminoacido nel sangue e nelle urine di pazienti con GSD-1a. Inoltre si analizzeranno due derivati del triptofano: l'acido picolinico e quinolinico in quanto biologicamente attivi e potenzialmente coinvolti nella patologia della malattia. L'acido quinolinico si associa al blocco renale e l'acido picolinico può avere un impatto sull'infiammazione del tessuto. Per studiare la correlazione tra metabolismo del triptofano e progressione della malattia utilizzeremo sangue ed urine di pazienti affetti da GSD-1a. L'Istituto G. Gaslini, dove lo studio sarà fatto, è un ospedale di riferimento per il trattamento delle malattie metaboliche, compresa la GSD-1a. Abbiamo accesso al sangue dei pazienti per valutare i metaboliti del triptofano e potremo correlare i risultati con la severità della malattia. Dovremmo essere in grado di analizzare circa 25 pazienti reperiti presso il reparto di Pediatria II dell'Istituto. Inoltre abbiamo stabilito una collaborazione con altri centri italiani che trattano questa malattia per ottenere campioni di sangue e di urina di pazienti. La correlazione tra l'alterazione del metabolismo del triptofano e il decorso della malattia permetterà di ipotizzare l'utilizzo di inibitori di questo processo nel trattamento della GSD-1a.

3. *Studio del metabolismo del triptofano in topi knock out per il gene G6Pase.*  
L'utilizzo di modelli animali è indispensabile per studiare malattie metaboliche rare e ancor di più quando si ha a che fare con patologie pediatriche, dove l'età dei pazienti limita la quantità e il numero di campioni biologici che si possono ottenere. Abbiamo a disposizione un modello murino costituito da topi knock-out per il gene G6Pase sviluppato dalla Dott.ssa Chou presso i National Institutes of Health. I topi G6Pase<sup>-/-</sup> sviluppano la stessa patologia dei pazienti affetti da GSD-1a e rappresentano quindi un modello unico e valido per studiare la relazione causale tra i cambiamenti dei metaboliti aminoacidici e la rilevanza clinica. Dopo aver stabilito la natura e le alterazioni dei livelli del triptofano o dei suoi metaboliti nella GSD-1a, valuteremo gli effetti della modulazione farmacologica di queste molecole sulla progressione della malattia. Il contributo principale di questi esperimenti sarà quello di determinare le condizioni per inibire il metabolismo del triptofano nei topi normali e G6Pase<sup>-/-</sup>. Se l'uso degli inibitori dovesse ridurre o inibire la progressione della malattia avremo la prima dimostrazione che il catabolismo del triptofano è intimamente coinvolto nella patologia della GSD-1a.

## **B. Terapia della Glicogenosi 1a con cellule staminali**

### **Scopo del progetto**

Lo scopo generale del progetto è quello di studiare un sistema di trasferimento genico per trattare la GSD-1 utilizzando un modello sperimentale preclinico rappresentato da topi che mancano di una G6Pase funzionante e che manifestano la stessa patologia dei pazienti affetti da GSD-1a.

Meno del 15% di questi topi sopravvive oltre le tre settimane e i danni epatici sono irreversibili già a due settimane di età. Quindi nei topi così come negli esseri umani, quanto prima si interviene terapeuticamente tanto più alta sarà la probabilità di curare le lesioni degli organi colpiti dalla malattia.

Proponiamo di sviluppare un approccio terapeutico basato sul trapianto di cellule staminali ematopoietiche derivate dal midollo osseo per ottenere l'espressione permanente del gene normale della G6Pasi negli organi danneggiati dalla malattia e curare gli animali. La terapia cellulare che utilizza cellule staminali si basa sulla capacità di queste cellule di rinnovarsi e di rigenerare tessuti e organi. E' stato visto come le cellule staminali ematopoietiche possono differenziarsi in vivo in cellule non ematopoietiche tipo cellule muscolari sia scheletriche che cardiache, cellule nervose e cellule epiteliali, tipo epatociti. Studi recenti hanno dimostrato che il midollo osseo di topi adulti contiene cellule staminali che hanno la capacità di dare origine a epatociti e che questi epatociti derivano dalla fusione tra le cellule ematopoietiche e gli epatociti dell'ospite.

Il traguardo finale è quindi quello di definire l'efficacia terapeutica di cellule staminali ematopoietiche derivate dal midollo osseo, isolate sia da topi normali che dai topi malati e poi modificate geneticamente, trapiantate nei topi affetti da GSD-1a con l'obiettivo finale di ottenere la rigenerazione dell'organo malato.

### **Obiettivi specifici**

1. *Utilizzo di cellule ematopoietiche staminali per ripopolare il fegato.* Lavori recenti hanno dimostrato che cellule staminali normali derivate dal midollo osseo sono capaci di ripopolare il fegato fondendosi con gli epatociti malati e dando origine a epatociti sani funzionanti. Tuttavia, epatociti completamente funzionanti si ottengono nei topi adulti con una frequenza piuttosto bassa e con un tempo piuttosto lungo. I nostri risultati preliminari dimostrano che il trapianto di cellule staminali derivate dal midollo osseo nei topi neonati permette una significativa rigenerazione del fegato in due o tre settimane dal trattamento. Quindi l'intervento su topi molto giovani, come neonati, in cui il fegato è ancora proliferante aumenta moltissimo l'efficienza di ripopolazione del fegato da parte cellule staminali derivate dal midollo osseo. Valuteremo la specificità e la capacità delle cellule staminali derivate dal midollo osseo di colonizzare i tessuti, la distribuzione e l'espansione in vivo di queste cellule dopo averle iniettate nella vena temporale di topi neonati. Studieremo anche gli effetti a lungo termine di questa colonizzazione in topi normali eseguendo analisi istologiche ed istochimiche a vari tempi dal trattamento. Effetti patologici sul fegato o altri organi causati dalla colonizzazione delle cellule staminali derivate dal midollo osseo devono essere valutati prima di poter proporre il trapianto di cellule staminali ematopoietiche come una valida strategia terapeutica.
2. *Ingegnerizzazione di cellule staminali.* Il trattamento di neonati richiede lo sviluppo di strategie per trattare i tessuti e la comprensione di come manipolazioni genetiche possano influire sullo sviluppo. Inoltre l'espressione di un gene sano in individui molto giovani dovrebbe prevenire i danni causati dall'insorgere della patologia e permettere quindi il trattamento di una malattia genetica altrimenti mortale. Un approccio terapeutico basato sul trapianto di cellule ematopoietiche staminali per permettere l'espressione del gene sano poco dopo la nascita potrebbe avere l'efficienza necessaria e sufficiente per il trattamento efficace della GSD-1a. Proponiamo di stabilire le condizioni tecniche migliori per modificare geneticamente le cellule staminali derivate dal midollo osseo dei topi malati e definire i requisiti per un trapianto autologo. Proponiamo cioè di modificare geneticamente cellule ematopoietiche estratte dal midollo di topi affetti da GSD-1a in modo da indurle ad esprimere il gene della G6Pasi. Le cellule così modificate saranno poi utilizzate per trattare i topi malati. Il fattore limitante di questo approccio è rappresentato dalla percentuale di cellule ematopoietiche che riusciremo a modificare. Supponiamo però che il vantaggio selettivo di crescita delle cellule normali possa produrre l'efficienza necessaria per il successo del trattamento.
3. *Terapia cellulare di topi KO che manifestano la Glicogenosi 1 a.* Proponiamo di trattare gli animali malati con cellule staminali derivate dal midollo osseo e geneticamente modificate per l'espressione della G6Pasi, simulando la situazione dei pazienti in cui il trattamento richiede il trapianto di cellule autologhe. Il trattamento delle malattie del fegato con cellule staminali ematopoietiche può essere considerato vantaggioso rispetto all'uso di altre cellule in quanto queste cellule sono facilmente disponibili. Inoltre il ripopolamento del fegato con le stesse cellule dell'ospite cioè con un trapianto autologo, elimina il problema del rigetto delle cellule trapiantate. Quindi cellule staminali ematopoietiche ingegnerizzate a produrre G6Pasi saranno iniettate per via ematica nei topi neonati affetti da GSD-1a per il trattamento della malattia. Analizzeremo la distribuzione e la crescita delle cellule iniettate, la colonizzazione del fegato, e l'efficienza della riparazione del tessuto e la

valutazione dei parametri funzionali del fegato. Esperimenti analoghi verranno eseguiti iniettando le cellule ingegnerizzate direttamente nel fegato. Questa via di somministrazione può essere vantaggiosa nel caso in cui le cellule ingegnerizzate a disposizione siano in numero limitato in quanto si eviterebbe la diluizione delle cellule in altri organi. Inoltre tratteremo gli animali con iniezioni intrauterine direttamente nel fegato dei feti. Questa terza via di somministrazione avrebbe l'ulteriore vantaggio di sfruttare ancora di più la capacità proliferativa del fegato. Abbiamo già eseguito esperimenti preliminari utilizzando queste tre vie di somministrazione e cellule staminali normali ed ottenuto risultati molto incoraggianti.

4. *Adattamento della terapia cellulare al rene.* Due organi sono colpiti dalla GSD-1a : il fegato e il rene. La possibilità di trattare un organo per volta aiuterà a stabilire le condizioni migliori per il ripopolamento dell'organo da parte delle cellule ematopoietiche staminali e quindi per il trattamento della malattia. I nostri dati preliminari indicano che mentre il trattamento dei topi neonati con le cellule staminali ematopoietiche per iniezione nella vena temporale permette una rigenerazione significativa del fegato malato in 2 o 3 settimane dall'iniezione, il rene non viene raggiunto dalle cellule iniettate e degenera rapidamente. Proponiamo di trattare gli animali malati con cellule staminali derivate dal midollo osseo e geneticamente modificate per l'espressione della G6Pasi come indicato nell'obiettivo 3 ma utilizzando degli animali geneticamente modificati in modo che solo il fegato o solo il rene siano danneggiati dalla malattia in modo da poter intervenire sull'organo specifico e valutare quindi le condizioni terapeutiche che meglio si adattano al trattamento di quel determinato organo. Questi animali saranno in parte forniti dalla Dr. J. Chou, dell'Heritable Disorders Branch, NICHD, NIH, Bethesda e in parte prodotti negli stabulari del CBA, Genova.

Per organizzare questo progetto e raggiungere gli obiettivi prefissati si richiedono due borse di studio:

1. Dr. R. Lavieri euro 13.000 / anno
2. Dr. L. Emionite euro 16.500 / anno

Ringraziando per la collaborazione, porgo distinti saluti

Dr. Luigi Varesio  
Direttore  
Laboratorio di Biologia Molecolare  
Istituto Giannina Gaslini  
Largo G. Gaslini 5  
16147 Genova  
Italia