

## Conference Proceedings

### The 5th International Lafora Epilepsy Workshop: Basic science

#### elucidating therapeutic options and preparing for therapies in the clinic

Matthew S. Gentry a,b, Zaid Afawi c,d, Dustin D. Armstrong e, Antonio Delgado-Escueta b,f, Y. Paul Goldberg g, Tamar R. Grossman g, Joan J. Guinovart b,h,i, Frank Harris b,j, Thomas D. Hurley b,k, Roberto Michelucci b,l, Berge A. Minassian b,m, Pascual Sanz b,n, Carolyn A. Worby b,o, Jose M. Serratosa b,p,q

Traduzione a cura della Dott.ssa Federica Prondelli, MD, e Dott.ssa Francesca Bisulli, PhD, MD  
IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, Italy  
Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie dell'Università di Bologna

#### Abstract

*La malattia di Lafora (LD) è una forma di epilessia ad esordio in infanzia-adolescenza, fatale, causata da mutazioni recessive nei geni EPM2A o EPM2B responsabili di un'alterazione del metabolismo del glicogeno. L'elemento caratteristico della LD sono gli aggregati di carboidrati citoplasmatici aberranti chiamati corpi di Lafora (LB).*

*Il 5° Workshop internazionale sull'Epilessia di Lafora si è recentemente tenuto ad Alcalá de Henares in Spagna. L'evento ha riunito circa 100 clinici, accademici, scienziati, tirocinanti, rappresentanti dei National Institutes of Health (NIH) nonché amici e parenti di pazienti affetti da LD. Il workshop ha trattato vari aspetti della LD: dalla definizione dei suoi meccanismi patogenetici all'illustrazione delle terapie e lo studio recentemente avviato, finalizzato a definire la storia naturale della malattia.*

La malattia di Lafora (LD) è una malattia fatale autosomica recessiva a carico del metabolismo del glicogeno che causa una neurodegenerazione progressiva con epilessia, demenza e mioclono.

I pazienti esordiscono, nella loro infanzia o adolescenza, con crisi epilettiche che, assieme al declino cognitivo e alle mioclonie, conducono alla morte, dopo circa 10 anni, a causa di complicazioni respiratorie, morte improvvisa (SUDEP) o stato di male epilettico.

Il National Institute of Neurological Disease and Stroke (NINDS) del National Institutes of Health (NIH) ha finanziato un progetto nel 2016 riunendo i migliori laboratori che si occupano di LD per definirne i meccanismi patogenetici e sviluppare soluzioni terapeutiche. Questo finanziamento ha dato vita alla Lafora Epilepsy Cure Initiative (LECI) diretta da Matthew Gentry, Professore al Kentucky College of Medicine. La LECI è composta da ricercatori provenienti da: Università del Kentucky, Indiana, Texas-Southwestern, UC-San Diego, Fundación Jimenez Díaz (Madrid), Institute for Research in Biomedicine (Barcelona) e Institute of Biomedicine of Valencia (IBV-CSIC).

Il 5° Workshop Internazionale sull'Epilessia di Lafora si è tenuto al Parador ad Alcalá de Henares, in Spagna, nei giorni 8-11 settembre 2019. È stato organizzato e coordinato da Jose Serratosa (Fundación Jimenez Díaz, Madrid, Spagna) e Matthew Gentry e sponsorizzato da NINDS (P01 S097197), Ionis Pharmaceuticals, Valerion Therapeutics, Maze Therapeutics, Chelsea's Hope e University of Kentucky College of Medicine. Questo workshop rappresenta una commistione unica di clinici, accademici, scienziati dall'industria e dal NIH, tirocinanti, amici e parenti di pazienti affetti da LD, con circa 100 rappresentanti da Stati Uniti, Spagna, Canada, Israele, Ungheria, Slovacchia, Russia, Honduras, Turchia, India, Italia, Francia, Australia e Paesi Bassi. Il principale obiettivo del gruppo è quello di accelerare la ricerca sulla LD al fine di fornire una cura ai pazienti affetti.

Il workshop è iniziato il 9 settembre con una sessione focalizzata sugli aspetti clinici e condotta da scienziati di Ionis Pharmaceuticals e Valerion Therapeutics assieme a neurologi fra i maggiori esperti di LD a livello mondiale. Il gruppo ha discusso lo studio Natural History and Functional Status Study finanziato congiuntamente dalle due aziende (NCT03876522). Le aziende hanno individuato quattro diverse sedi per

monitorare un totale di 30 pazienti con LD per un periodo di due anni. Queste quattro sedi sono dirette da Berge Minassian (UT-Southwestern), Antonio Delgado-Escueta (UCLA), Roberto Michelucci (Bologna) e Jose Serratosa (Madrid). I dati di questa coorte di pazienti saranno utilizzati per orientare future sperimentazioni cliniche, oltre che individuare dei biomarcatori e definire la storia naturale della malattia.

Serratosa ha salutato il gruppo ad Alcalá de Henares con una breve descrizione storica della città, luogo natale del celebre scrittore Miguel de Cervantes, e della Università che risale al XV secolo. Ha poi continuato raccontando come il neurologo spagnolo Gonzalo Rodriguez Lafora lasciò Madrid per recarsi a Washington D.C. nel 1910 e, in questo periodo, eseguendo l'autopsia di un paziente con epilessia, scoprì gli aggregati intracellulari aberranti simili al glicogeno denominati in seguito "corpi di Lafora". Serratosa ha poi messo in luce il lavoro svolto negli anni '80 da Delgado-Escueta che ipotizzò che la mappatura genetica potesse essere utilizzata per individuare geni mutati in epilessie specifiche. Serratosa si è unito al gruppo di Delgado-Escueta nel 1989 e insieme hanno mappato con successo un locus genico della LD nel cromosoma 6q. Successivamente anche Minassian si è unito al gruppo di ricerca, ed è stato identificato in maniera indipendente il primo gene causativo *EPM2A*, codificante per la fosfatasi laforina. I laboratori di Minassian e Delgado-Escueta hanno poi collaborato per scoprire, nel 2003, il secondo gene, *EPM2B*, che codifica per l'ubiquitina ligasi E3 malina. In seguito alla scoperta dei geni, vari laboratori hanno prodotto modelli murini e di coltura cellulare ed hanno eseguito analisi biochimiche delle proteine malina e laforina.

Diversi laboratori, utilizzando vari tipi di modelli, hanno scoperto che la formazione dei corpi di Lafora rappresenta la causa della LD e, di conseguenza, ogni gruppo si è prefissato di operare la rimozione, il blocco o il silenziamento di essi. Serratosa ha chiuso enumerando le cinque principali opzioni terapeutiche in via di sviluppo: piccole molecole, terapia enzimatica, oligonucleotidi antisense (ASO), riposizionamento dei farmaci e terapia genetica.

Frank Harris, presidente del North American advocacy group for patients with LD, Chelsea's Hope, ha proseguito con un benvenuto e una decisa "chiamata alle armi": "Ciò che importa in questo momento è spostare la terapia nella pratica clinica". Ha invitato chi si occupa della scienza di base a definire in maniera più precisa i meccanismi cellulari e chi si occupa di scienza traslazionale e clinica a fare tutto il possibile per trasferire le nuove terapie precliniche nella clinica. Harris ha poi mostrato un video di 5 minuti il cui protagonista era un paziente adolescente con LD dalla zona di Boston e ha introdotto Gentry come speaker di apertura.

Gentry ha iniziato il suo intervento spiegando come, allo stesso modo delle grandi squadre di calcio europee, la comunità LD abbia bisogno di tante opportunità di tiro a rete. Ha affermato che la scienza di base ha fornito cinque opzioni terapeutiche che sono in fase di sviluppo e che potrebbe dare l'avvio alla prossima ondata di potenziali cure. Nella sua introduzione ha sottolineato che ogni gruppo si concentra su ciò che sa fare meglio: gli scienziati di base definiscono la fisiopatologia, gli scienziati traslazionali completano gli esperimenti preclinici sui modelli murini e gli scienziati industriali collaborano con neurologi esperti di LD per far arrivare rapidamente le terapie alla pratica clinica. Ha poi posto l'accento su un recente lavoro del suo laboratorio svolto in collaborazione con Valerion Therapeutics. È infatti stata sviluppata una "fusione enzima-anticorpi" (AEF) che sfrutta un frammento di anticorpo capace di penetrare nella cellula, fuso con un'amilasi in grado di distruggere i corpi di Lafora. Gentry ha mostrato che l'AEF, denominata VAL-0417, degrada efficacemente i corpi di Lafora in vitro, liberando glucosio e maltosio. Ha poi proseguito dimostrando che VAL-0417 degrada i corpi di Lafora in modelli murini di LD sia dopo iniezione intramuscolare che endovenosa. Tuttavia, rimuovere i corpi di Lafora in astrociti e neuroni è essenziale per trattare la LD e VAL-0417 probabilmente non è in grado di superare la barriera ematoencefalica.

Il gruppo ha somministrato VAL-0417 per via intraventricolare nel cervello di modelli murini con conseguente silenziamento dei corpi di Lafora positivi all'acido periodico-reattivo di Schiff (PAS+). Allo stesso modo, è stata sintetizzata una seconda AEF in grado di silenziare i corpi di Lafora PAS+.

È stato poi il turno di Paul Goldberg, vicepresidente della sezione Clinical Development presso Ionis Pharmaceuticals, che ha presentato la piattaforma ASO di Ionis in un intervento rivolto sia agli scienziati che ad amici e parenti di pazienti con LD. Dopo aver descritto la tecnologia ASO, Goldberg ha spiegato il funzionamento dell'eccezionale farmaco Spinraza® (Nusinersen) che rappresenta un programma in collaborazione con Biogen, attualmente utilizzato con successo per trattare pazienti con atrofia muscolare spinale. Ha poi descritto come sia stato dimostrato da vari laboratori che una riduzione del 50% della sintesi

del glicogeno riesca a prevenire la LD in modelli murini preclinici. Gli scienziati di Ionis, in collaborazione con il laboratorio Minassian, hanno identificato per primi gli ASO confrontandoli con il gene murino della glicogeno sintetasi (*GYS1*) per condurre un iniziale studio di fattibilità in modelli murini affetti da LD. Ionis ha passato in rassegna numerosi ASO umani e ha identificato l'ASO *GYS1* umano candidato allo sviluppo. È stato avviato un importante test sulla sicurezza e tossicità di questo ASO umano e contemporaneamente Ionis si sta preparando per una futura sperimentazione clinica. Goldberg ha spiegato che, essendo la LD una patologia ultra rara, il reclutamento e potenziamento per studi ben controllati sarà una grande sfida. Ionis esplorerà nuovi disegni sperimentali e lavorerà con la FDA e altre autorità competenti per ottenere l'approvazione per una sperimentazione. Ha poi enfatizzato l'importanza dello studio sulla storia naturale ed ha annunciato che Ionis sta finanziando anche uno studio retrospettivo. Questi dati di storia naturale serviranno da raffronto quando sarà somministrato il farmaco al fine di supportare evidenze di miglioramento. Ha anche sottolineato il ruolo chiave che questi dati hanno nel dialogo con gli organismi regolatori governativi così che si possa congiuntamente elaborare una sperimentazione clinica appropriata. Lo studio sulla storia naturale consentirà a Ionis e Valerion di supportare in maniera adeguata la selezione degli obiettivi della sperimentazione clinica. Un ulteriore aspetto rilevante dello studio è la raccolta del siero e del liquor al fine di validare biomarcatori di sicurezza e tossicità. Goldberg ha infatti specificato che tali biomarcatori possono accelerare il processo di approvazione. Ad oggi sono stati reclutati 15 pazienti per lo studio e i gruppi stanno lavorando per individuare e sviluppare biomarcatori adeguati. Durante questa sessione è emerso chiaramente che gli scienziati stanno portando avanti parallelamente il lavoro in modo che i dati derivanti dallo studio sulla storia naturale, dallo studio retrospettivo e da quello sulla tossicità negli animali siano raccolti il più velocemente possibile. Goldberg ha concluso dichiarando con entusiasmo che Ionis è impegnata nei confronti della comunità LD al fine di velocizzare l'uscita del farmaco.

Dustin Armstrong, Responsabile Scientifico per Valerion Therapeutics, ha raccontato la storia della nascita di Valerion e i dettagli sulla sua piattaforma dei farmaci. Si è focalizzato principalmente sui risultati ottenuti dal recente completamento delle Fasi 1 e 2 di una sperimentazione clinica che ha trattato pazienti affetti da malattia di Pompe con il farmaco VAL-1221 sviluppato da Valerion e ne ha confrontato la sicurezza, tollerabilità, farmacocinetica, farmacodinamica ed efficacia rispetto all'attuale trattamento standard Myozyme® (NCT02898753). La malattia di Pompe colpisce il metabolismo del glicogeno ed è causata da mutazioni nell'enzima lisosomiale alfa-glucosidasi acida. I pazienti che ne sono affetti mostrano primariamente una ridotta funzionalità del muscolo scheletrico e del cuore causata dall'accumulo di glicogeno nei lisosomi. Armstrong ha precisato che Myozyme® è un alfa-glucosidasi acida ricombinante e ha spiegato che il suo iniziale impatto positivo in questi pazienti si attenua nel tempo, a causa dell'accumulo di glicogeno citoplasmatico che Myozyme® non riesce a degradare, dato che colpisce il lisosoma. VAL-1221 è un'AEF che unisce lo stesso frammento anticorpale utilizzato in VAL-0417 ad un'alfa-glucosidasi acida, incorporando sia la regione target citoplasmatica che lisosomica. VAL-1221 bersaglia sia il citoplasma che i lisosomi della cellula e si è dimostrato efficace in modelli murini preclinici. Lo speaker ha presentato dati molto incoraggianti dalla Fase 1 e 2 della sperimentazione clinica su VAL-1221 anche riguardo alla sua sicurezza ed efficacia, affermando che tutti i pazienti della sperimentazione stanno attualmente assumendo VAL-1221. Ha poi ribadito i risultati già presentati da Gentry su VAL-0417 e la sua capacità di rimuovere corpi di Lafora PAS+, oltre che l'impegno di Valerion nel fare approvare un farmaco AEF nella sperimentazione clinica sulla LD. Al termine della presentazione è stata data risposta a una domanda chiave riguardo allo studio sulla storia naturale e a eventuali futuri studi clinici: Ionis e Valerion hanno convenut

o che i pazienti devono essere reclutati in una futura sperimentazione clinica anche se non hanno partecipato all'attuale studio sulla storia naturale.

La serata si è chiusa con una cena al Restaurante de Desayunos dove il dibattito scientifico è andato avanti. Il secondo giorno è stato scandito da tre sessioni scientifiche di cui due focalizzate su scienza di base/traslazionale e una sulla clinica. Olga Varea del laboratorio di Guinovart ha presentato dati entusiasmanti sulla definizione della finestra terapeutica di trattamento della LD. Varea ha descritto dati su diversi nuovi modelli murini che sono stati generati per rispondere alla domanda sulle tempistiche terapeutiche, ovvero quando si deve intervenire e quando è troppo tardi per farlo. Utilizzando la tecnologia

Cre/lox è stato generato un modello murino di LD con delezione indotta da tamoxifene della glicogeno sintetasi (Gys1). La soppressione di Gys1 in animali LD di 4 o 6 mesi di età ha ridotto drasticamente gli aggregati di corpi di Lafora nel cervello e i marcatori di neurodegenerazione e infiammazione. Varea ha presentato i dati di un secondo progetto su modelli murini con espressione del gene della malina (Epm2b) dipendente da tamoxifene. Ha mostrato che l'espressione della malina in animali knockout (KO) di 4 mesi di età ha determinato una drastica riduzione dei corpi di Lafora nel cervello e una quasi totale eliminazione di tali corpi nei muscoli e nel cuore. Questi dati sono molto incoraggianti pensando ad una possibile terapia genetica per la LD.

In seguito ha preso la parola Tom Hurley dell'Indiana University School of Medicine con un aggiornamento sugli sforzi dei laboratori di Roach, DePaoli-Roach e Hurley volti ad identificare una piccola molecola inibitrice della glicogeno sintetasi (GS). Hurley ha ricordato alla platea che la riduzione della sintesi del glucosio, dovuta ad una insufficienza di GS o della Protein Targeting to Glucose (PTG), ha normalizzato l'accumulo di glicogeno e le funzioni neuronali in modelli murini LD. Il lavoro di questi laboratori si concentra sull'analisi dei composti che competono con il legame del glucosio-6-fosfato (G6P) dato che si tratta di un inibitore allosterico della GS. Dopo aver passato in rassegna diversi cataloghi di piccole molecole, i laboratori hanno identificato un probabile concorrente del G6P ma studi cristallografici hanno dimostrato che la piccola molecola si lega alla sede attiva piuttosto che a quella di legame del G6P. In collaborazione con il LECI Medicinal Chemistry Core, diretto da David Watt (Kentucky) e Steve Johnson (Indiana), sono stati esaminati degli omologhi ed è stato identificato un sottogruppo con una potenza di oltre 100 volte superiore. È stata inoltre ridotta la flessibilità conformazionale del composto e sono stati generati oltre 60 omologhi con pattern di sostituzione differenziale. Alcuni di questi composti sono stati decisamente migliorati e il gruppo sta continuando il suo lavoro in questa direzione. Questi e altri sforzi hanno avuto come risultato la produzione di diversi composti che il gruppo sta portando ai test su animali. Marina Sanchez (Fundación Jimenez Díaz) ha presentato nuovi dati sul trattamento con metformina su topi in età neonatale. Sono infatti stati trattati con metformina, topi affetti da LD, sin dal momento del concepimento, con conseguente manifestazione clinica di minore entità (minor frequenza di mioclonie e crisi indotte da pentetrazolo (PTZ)), correlata ad un quadro istopatologico più lieve (minor perdita neuronale e astrocitica, minor numero di corpi di Lafora). Ciò dimostra il vantaggio di svolgere un trattamento precoce. Sanchez ha anche presentato dati di diagnostica per immagini con risonanza magnetica (RM) e tomografia a emissione di positroni (PET) su modelli murini preclinici LD che verranno valutati come possibili biomarcatori.

Tamar Grossman, responsabile della sezione Translational Medicine presso Ionis Pharmaceuticals, ha poi illustrato i successi dei farmaci ASO nella pratica clinica, sintetizzati con diverse tecnologie tra cui la "ASO coniugato al ligando" (LICA) che facilita il rilascio di ASO nei tessuti bersaglio.

Grossman ha descritto i sette tipi di ASO che sono stati approvati dalla FDA e ha evidenziato i cinque di Ionis. Ha poi descritto le terapie in ambito neurologico sviluppate da Ionis con programmi sulla malattia di Huntington, la sclerosi amiotrofica laterale e la malattia di Alzheimer. Ha presentato i dati di sicurezza e farmacocinetica/farmacodinamica sugli ASO che vengono iniettati intratecalmente. I farmaci raggiungono un livello impressionante di biodistribuzione su tutto il cervello in studi su primati non umani e negli umani. Ha inoltre sottolineato che l'emivita della maggior parte degli ASO è sufficientemente lunga da poter effettuare iniezioni trimestrali ai pazienti.

Dopo il coffee break e la sessione poster, Jordi Duran, ricercatore senior presso il laboratorio di Guinovart, ha presentato un nuovo interessante lavoro sul ruolo della p62 nella LD e su come la LD possa essere considerata una patologia astrocitica. Il loro lavoro suggerisce con forza che la p62 possa promuovere l'accumulo di glicogeno aberrante e che malina e laforina siano probabilmente coinvolte nei meccanismi che portano all'autofagia del glicogeno. Ha poi presentato gli storici dati a sostegno della natura neurocentrica della patogenesi della LD. Il laboratorio di Guinovart ha, tuttavia, dimostrato di recente che vi è un numero decisamente maggiore di corpi di Lafora negli astrociti rispetto che nei neuroni.

Ha poi definito due sottotipi di corpi di Lafora: corpi simil-amilacei (CAL) astrocitici e corpi neuronali (nLB). È stato generato un modello murino KO Gys1 condizionale specifico per astrociti e i relativi dati sono piuttosto sorprendenti, essi mostrano infatti che i CAL sono la tipologia più abbondante di corpi di Lafora.

Il successivo intervento è stato quello di Lyndsay Young, specializzanda presso il laboratorio di Gentry, che ha presentato una nuova scoperta sulla sintesi e la degradazione del glicogeno nel nucleo cellulare. Young ha mostrato che il tessuto polmonare normale sintetizza il glicogeno nel nucleo e che l'enzima malina ubiquitina la glicogeno fosforilasi (GP) per poi spostarsi nel nucleo e degradare il glicogeno. Il glucosio-1-fosfato liberato dalla GP viene convertito da enzimi glicolitici nucleari in piruvato e poi acetato, utilizzato per acetilare gli istoni. Al contrario, cellule polmonari neoplastiche (Non Small Cell Lung Cancer) sembrano avere ridotti livelli di malina, con il risultato che la GP permane nel citoplasma e si assiste alla formazione di ampi aggregati simili ai corpi di Lafora che producono una riduzione dell'acetilazione istonica, oltre che un incremento della proliferazione cellulare.

Carolyn Worby (UC-San Diego) ha poi presentato un aggiornamento sul Biological Core LECI. Sono state infatti sviluppate linee cellulari mutate, grazie alla tecnologia CRISPR, in pazienti e modelli mutazionali murini di pazienti LD, sia per mutazioni di laforina che di malina. Diversi gruppi stanno utilizzando questi reagenti in sperimentazioni in corso e stanno analizzando nuovi modelli murini.

L'ultimo intervento prima di pranzo e la presa visione dei poster sono stati presentati da Felix Nitschke del laboratorio di Minassian. Nitschke ha discusso l'importante ruolo del glicogeno fosfato e della ramificazione nella formazione di corpi di poliglucosano (PGB). Il suo intervento si è focalizzato su un aspetto chiave irrisolto della LD, ovvero quale sia il meccanismo biochimico e/o chimico che sottende la formazione dei corpi di Lafora. Nitschke ha presentato nuovi dati su diversi modelli murini: laforina KO, malina KO, enzima ramificante del glicogeno Y329S. Egli ha sviluppato metodi per la separazione di glucani solubili da glucani insolubili così che possano essere analizzati individualmente. L'architettura del glicogeno solubile (ovvero la lunghezza della catena e la ramificazione) rimane immodificata nei vari modelli a confronto con quelli non mutati. Tuttavia questi parametri risultano alterati nel glicogeno insolubile nei modelli mutati.

Nitschke ha sottolineato che il glicogeno è molto eterogeneo in termini di lunghezza della catena e della propensione a precipitare formando PGB.

Dopo il pranzo e la sessione di poster, Pascual Sanz ha presentato il lavoro scaturito dalla sua recente e più importante scoperta, ovvero che nei topi LD oltre 90% di astrociti e solo circa il 10% di neuroni contengono corpi di Lafora. Il laboratorio si è recentemente focalizzato sul definire se questi accumuli causino cambiamenti nel metabolismo e/o infiammazione. È stato eseguito il sequenziamento di RNA in campioni di cervello provenienti da topi di 3 e 16 mesi di età mutati per laforina o malina messi a confronto con controlli normali. Il numero di geni sottoregolati in entrambi i modelli a confronto con i modelli normali si è rivelato relativamente piccolo e il numero di geni sopraregolati è stato di circa 400. Sorprendentemente le classi di geni che sono stati modificati sono risultate molto simili in entrambi i modelli murini di LD, suggerendo un meccanismo patologico analogo. La maggior parte dei geni codifica per proteine proinfiammatorie e fagocitiche che sono principalmente espresse da astrociti reattivi e microglia. Il laboratorio si è focalizzato su un sottogruppo di questi geni ed è stato scoperto che si verifica una chiara sopraregolazione negli animali LD con l'avanzare dell'età. Come prossimo passo il gruppo si occuperà dei seguenti quesiti: qual è il rispettivo contributo delle cellule gliali mature, microgliali, degli astrociti e degli oligodendrociti nella sopraregolazione dell'espressione genica? Qual è la relazione fra metabolismo ed espressione genica infiammatoria? Sanz ha concluso affermando che, essendo stato accertato che vi sia infiammazione nei cervelli LD, forse dobbiamo prendere in considerazione una riduzione della neuroinfiammazione come strategia terapeutica.

Dopo Sanz, Silvia Nitschke del laboratorio di Minassian ha proposto un interessante intervento su una recente aggiunta alla famiglia delle patologie cerebrali legate ai PGB.

Si tratta di un caso complicato che lega i PGB con l'infiammazione neuronale e immunodeficienza causate da mutazioni nell'Rbck1 dell'ubiquitina ligasi E3 che prende il nome di "Miopatia da corpi di poliglucosano 1 con o senza immunodeficienza". Anche se il preciso meccanismo patogenetico è sconosciuto, è stato osservato che topi Rbck1 KO mostrano livelli marcati di PGB nel sistema nervoso centrale. Nitschke ha mostrato che nei topi Rbck1 -/- si riscontrano PGB nel midollo spinale, nella corteccia, nell'ippocampo e nel cervelletto e che i PGB presentano catene di glucosio più lunghe, ramificazione aberrante, e aumentata fosforilazione sul residuo C6. Ha mostrato che l'incrocio di topi Rbck1 -/- con topi che presentano deficienza di GS ha preservato i fenotipi comportamentali e la maggior parte dei PGB nel cervello. Ha poi

sottolineato come questo modello consentirà una maggiore comprensione della formazione dei PGB e che anche il trattamento per la LD potrebbe essere applicabile a questa patologia.

Si sono susseguiti poi tre brevi interventi presentati da Carlos Roma-Mateo (Università di Valencia), Gino Cingolani (Thomas Jefferson University) e Mitchell Sullivan (Mater Research Institute — The University of Queensland). Roma-Mateo ha illustrato il nuovo lavoro sulle popolazioni miRNA nei modelli animali KO per laforina e malina. Ha analizzato il tessuto cerebrale di entrambi i modelli e ha notato alterazioni in un sottogruppo di miRNA con l'avanzare dell'età dei topi LD. Cingolani ha aggiornato il gruppo sui recenti avanzamenti di microscopia crioelettronica (cryo-EM) e su lavori precedenti volti a determinare la struttura tridimensionale della GS. Sebbene esista una struttura di GS batterica, da lievito e da *C. elegans*, la struttura dell'enzima umano rimane incerta. Il suo laboratorio ha ottimizzato l'espressione di GS utilizzando nuovi protocolli per ridurre l'eterogeneità della proteina. I dati cryo-EM iniziali sono promettenti per quanto riguarda una futura struttura di questo importante enzima.

Sullivan ha poi delineato i tratti generali di diabete, glucosio ematico, insulina e metabolismo del glicogeno, spiegando che il glicogeno del fegato diabetico è architetturealmente diverso da quello di un fegato normale. Il suo gruppo sta studiando la sede e la struttura del glicogeno aberrante che si accumula nei reni diabetici.

L'ultimo intervento di scienza di base è stato proposto da Eva Pérez-Jiménez del laboratorio di Sanz che ha spiegato come l'omeostasi del trasportatore astrocitico del glutammato Glt-1 sia alterata in modelli murini di LD. Ha delineato eccellentemente il quadro delle alterazioni di segnale nelle regioni CA1-CA3 dell'ippocampo in cervelli epilettici e ha descritto come un eccesso di glutammato aumenti l'eccitotossicità postsinaptica. Il trasportatore di glutammato Glt-1 è normalmente responsabile della mediazione della clearance dell'eccesso di glutammato, tuttavia i livelli di Glt-1 si presentano ridotti sulla superficie cellulare degli astrociti nei topi LD, causando un aumento dei livelli sinaptici di glutammato. In studi di coltura cellulare la laforina e la malina governano l'ubiquitinazione del Glt-1, ma questo processo non ne causa la degradazione, al contrario stabilizza il Glt-1 nella membrana plasmatica. Inoltre la laforina e la malina bersagliano una proteina adattatrice dell'ubiquitina ligasi E3, Nedd4.2, per la degradazione. Siccome la Nedd4.2 promuove l'endocitosi del Glt-1, l'azione della laforina e della malina previene l'endocitosi e preserva il Glt-1 sulla superficie della cellula. Per tale ragione l'assenza di laforina o malina causa la riduzione del trasportatore Glt-1 nella membrana cellulare a causa dell'aumentata endocitosi.

La sessione finale si è concentrata sulla scienza clinica e ha coinvolto alcuni neurologi fra i massimi esperti mondiali di LD. Delgado-Escueta ha aperto la sessione discutendo l'importanza di reclutare tutti i pazienti viventi affetti da LD in un nuovo registro che Serratosa ha lanciato. Ha sostenuto l'utilizzo del Montreal Cognitive Assessment (MOCA) per la valutazione del progresso cognitivo dei pazienti. Ha poi esposto una tempistica MOCA ben definita, dalla prima crisi fino agli stadi avanzati di demenza.

Michelucci ha poi discusso i dati clinici di 27 pazienti italiani con LD ed in particolare i dati elettroencefalografici di pazienti presintomatici o in stadio iniziale. Si osserva infatti, un'attività di fondo con punte e onde isolate generalizzate o scariche con complessi punte-onde fotosensibili, nessuna attivazione dei parossismi durante sonno non-REM. L'EEG di pazienti in fasi intermedie e avanzate mostra deterioramento dell'attività di fondo, scariche veloci subcontinue con punte e onde o con complessi di punte e onde con punte subcontinue occipitali focali e centrali.

Maria Machio della Serratosa Epilepsy Unit ha poi presentato un'analisi dei primi sintomi della LD: crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi miocloniche e sintomi visivi sono fra i più comuni. La maggior parte dei pazienti ha ricevuto diagnosi errata all'esordio.

Serratosa ha poi presentato i dati EEG di pazienti affetti dalle due principali forme di LD: LD classica e lentamente progressiva. Sia i pazienti con la forma classica che i loro fratelli in stadio presintomatico, mostrano un EEG gravemente patologico 2-3 anni dopo l'esordio. In particolare, rallentamento dell'attività di fondo e frequenti scariche epilettiformi sono stati riscontrati nei fratelli/sorelle presintomatici di pazienti con LD. Pazienti con la forma lentamente progressiva presentano anomalie meno gravi e rischiano inizialmente di ricevere una diagnosi sbagliata di epilessia mioclonica giovanile. In entrambe le forme il sonno è associato ad una forte diminuzione delle scariche epilettiformi.

Afawi ha illustrato i dati sulle famiglie provenienti da Israele e la sua esperienza con gli studi genetici sull'epilessia. Minassian ha poi descritto il lavoro preliminare sullo sviluppo di biomarcatori dal liquor e ha

sottolineato l'importanza di raccogliere campioni di siero e liquor dei pazienti, così che tutti gli aspetti delle sperimentazioni cliniche siano in ordine. Ha poi discusso ulteriori modelli animali di LD, nello specifico modelli canini e murini. Il modello canino riassume fedelmente i fenotipi mioclonico ed epilettico dei pazienti affetti da LD che però si sviluppano nell'arco di diversi anni. Il suo laboratorio ha istituito un modello di ratti LD attualmente in fase di valutazione. Serratosa ha concluso la sessione clinica ponendo l'accento sulla necessità della comunità di definire gli stadi precoci della LD per poterne comprendere la progressione. Il suo laboratorio clinico ha iniziato alcune analisi di valutazione comportamentale e fisiologica dello stadio precoce per meglio focalizzarne il quadro. Ha poi ribadito l'importanza del registro di pazienti e di reclutare tutti i pazienti attraverso neurologi qualificati così che tutti possano essere registrati per le future sperimentazioni. I medici possono inserire i propri pazienti partecipando al registro o contattando Delgado-Escueta, Minassian, Michelucci o Serratosa. La serata è culminata con una cena presso l'Hostería del Estudiante, un edificio del XVI secolo costruito per ospitare studenti e dominare il cortile Cervantes dell'Università di Alcalá. Il giorno mercoledì 11 settembre gli studiosi LECI si sono riuniti per discutere il finanziamento NIH P01 e definire dettagli di progetto, scambiarsi dati e protocolli e stabilire le priorità per l'anno a venire.

## Affiliazioni degli autori

a Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Epilepsy and Brain Metabolism Alliance, and Epilepsy Research Center, University of Kentucky College of Medicine, Lexington, KY 40536, USA

b Lafora Epilepsy Cure Initiative (LECI), USA

c Sackler School of Medicine, Tel-Aviv University, Ramat Aviv, Israel

d Department of Psychiatry, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, the Netherlands

e Valerion Therapeutics, Concord, MA 01742, USA

f Veterans Affairs Greater Los Angeles Healthcare System, Los Angeles, CA 90073, USA

g Ionis Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, CA 92008, USA

h Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona Institute of Science and Technology, 08028 Barcelona, Spain

i Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), 28029 Madrid, Spain

j Chelsea's Hope, PO Box 348626, Sacramento, CA 95834, USA

k Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA

l IRCCS-Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, Unit of Neurology, Bellaria Hospital, Bologna, Italy

m Department of Pediatrics, University of Texas Southwestern, Dallas, TX 75390, USA

n Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), 46010 Valencia, Spain

o Department of Pharmacology, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093, USA

p Laboratory of Neurology, IIS-Jimenez Diaz Foundation, UAM, 28045 Madrid, Spain

q Biomedical Research Networking Center on Rare Diseases (CIBERER), 28029 Madrid, Spain