

Lafora Workshop

Sanford Consortium of Regenerative Medicine, University of California San Diego on June 12-13, 2014

Il seminario è stato diretto dal Dr. Jack Dixon, organizzato dal Dr. Carolyn Worby e Dr. Kim Rice, e sponsorizzato dalla fondazione Chelsea's Hope Lafora Research. E' presente un saluto di benvenuto di Linda Gerber, una presentazione e un video dal titolo "La storia di Kristin" di Kim e Jim Rice, un discorso del Dr. Berge Minassian, la discussione scientifica ad una tavola rotonda. Piu' di 25 ricercatori, stagisti, e studenti coinvolti direttamente nella ricerca sulla malattia di Lafora, e molti genitori hanno seguito il seminario.

Di seguito sono riportati i punti salienti delle presentazioni escludendo il gergo scientifico il piu' possibile. Ho sottolineato il significato della ricerca di potenziali trattamenti clinici come tali, senza sminuire il significato di una serie di altre squisite ricerche fondamentali presentate.

Dr. Berge Minassian

(note del presentatore)

Il Dr. Minassian non necessita di una lunga introduzione. E' un professore nel Departmento di Pediatria all' Universita' di Toronto e neurologo a The Hospital for Sick Children. Voglio sottolineare che e' un professore e il suo laboratorio ha scoperto i geni responsabili della malattia di Lafora, EPM2A codificando la laforina e EPM2B, codificando la malina, e ipotizzando che essi hanno un ruolo cruciale nel metabolismo del glicogeno.

E' un forte proponente della teoria che la formazione dei corpi di Lafora (LB) e' dovuta dal glicogeno poco ramificato (catene poliglucosani) come causa principale della malattia di Lafora. Il suo laboratorio ha mostrato in due documenti che sia topi con mutazione della malattia di Lafora sia con riduzione della produzione di glicogeno non hanno sviluppato la malattia. Hanno seguito questi topi fino all'eta' avanzata, piu' di due anni, e sono rimasti assolutamente sani! Inoltre, questa via di attacco alla malattia e' stata confermata da altri due laboratori diretti dal Dr. De Paoli Roach e dal Dr. Guinovart (ne riparleremo piu' avanti). Questa indipendente conferma sara' estremamente importante quando richiederemo l'approvazione per la sperimentazione sulle persone.

L'intuizione cruciale di questi studi e' che riducendo la produzione di glicogeno del 30-50% si previene la formazione dei corpi di Lafora e molto piu' importante lo svilupparsi della malattia.

Per ridurre la produzione del glicogeno sono stati identificati tre obiettivi: il primo per la molecola di glicogeno, glicogenina (GYG), la proteina mirante al glicogeno (PTG) che attiva la glicogeno sintasi e glicogeno sintasi (GS) stesso, l'enzima che aggiunge molecole di glucosio al glicogeno.

Senza entrare in dettagli tecnici, ci sono tre fasi nella produzione di un enzima o di una proteina: cosi' ci sono tre livelli dove uno puo' interferire, e tutti e 3 sono aree di ricerca attive nel laboratorio del Dr. Minassian.



Gene level:

CRISPR

E' la nuova tecnica di manipolazione genetica ispirato dalla difesa dei batteri contro i virus. E' stata sviluppata al MIT dal Dr. Feng Zhang, ed è un prodotto recente. Al momento non può

essere utilizzata per geni di riparazione, solo per farli tacere. È possibile immaginare CRISPR come una coppia molto precisa di forbici che possono essere mirate ad uno specifico gene in una cellula, rendendolo inattivo.

Il Dr. Minassian ha avvicinato il dottor Zhang lo scorso autunno e ha avviato un progetto di ricerca per CRISPR mirato alla Lafora. Il dottor Zhang ha recentemente consegnato le CRISPRs contro GS, PTG, e GYG con un'efficienza superiore al 50%!

Il passo successivo consiste nel testarle in colture cellulari e nei topi, impiegando un metodo efficace di somministrazione.

Attraverso un altro collaboratore, il Dr. Brian Kaspar dalla Ohio State University, il dottor Minassian ha accesso ad un nuovo virus adeno --- associato chiamato AAV9 che ha ottime caratteristiche per la terapia genica: esso può attraversare la barriera emato-encefalica (BBB); può popolare larghe percentuali del cervello senza generare una reazione negativa; non si integra nel genoma (senza rischio di complicazioni dovute al DNA alterato); rimane attivo per lunghi periodi di tempo; è abbastanza grande per ospitare CRISPRs. Il Dott. Kaspar ha mostrato buoni risultati utilizzando AAV9 in topi con sclerosi laterale amiotrofica (SLA).

Il Dr. Minassian ha esperimenti in corso utilizzando AAV9 e CRISPR in colture cellulari e presto nei topi. Lui è molto entusiasta e ottimista su questi esperimenti. Anche a livello di gene, AAV9 è impiegato per il trasporto di geni normali EPM2A e EPM2B nei topi con malattia di Lafora. Il virus attiverà i geni all'interno della cellula che produce la laforina mancante e la proteina malina ripristinando la loro funzionalità nel metabolismo del glicogeno. In caso di successo questa può essere una cura efficace per la malattia di Lafora!

RNA level:

Il Dr. Minassian ha ricordato la sua collaborazione con ISIS Pharmaceuticals, specializzata in anti-senso farmaci di senso che legano l'mRNA prodotta da questo, trasformando quel gene in "off". Lui era entusiasta di annunciare che hanno consegnato l'Anti-senso oligonucleotidi (ASO) che portano GS, PTG, e GYG giù del 50%, l'obiettivo che aveva chiesto.

ISIS ha testato questi in colture cellulari e nei topi normali. Al Dr. Minassian non è stato permesso di mostrare i risultati effettivi a causa di un accordo di non divulgazione (NDA), ma ha già iniettato ASO nel cervello dei topi Lafora. Lo svantaggio di ASO è che non possono attraversare la barriera ematoencefalica. Così, hanno bisogno di essere iniettati nei ventricoli cerebrali o da un "rubinetto" spinale ad un intervallo di tre mesi.

Una nota su ISIS Pharmaceuticals: attualmente ha un farmaco approvato (KYNAMRO per ipercolesterolemia), e vari composti in studi clinici per una varietà di malattie come il morbo di Crohn, la psoriasi, l'asma e il cancro. Essi stanno collaborando con Biogen (\$ 100 milioni del progetto) per sviluppare farmaci antisenso per le malattie neurologiche, che faranno progredire i metodi di consegna del farmaco nel cervello per ASOS.

Protein Level:

Dagli aggiornamenti del Dr. Minassian sappiamo tutti che il suo laboratorio e collaboratori sono impegnati in una massiccia selezione automatica di piccole molecole che possono attraversare la barriera ematoencefalica (più di 190.000) per trovare inibitori di GS. Inoltre, il Dott. Minassian è entrato in un accordo con una società farmaceutica di cui non ne il nome per condividere 5.000 composti chimici che, nelle loro prove, mostravano la riduzione GS.

Ufficiosamente, perché è limitato dalla riservatezza non può mostrare i risultati effettivi, ha condiviso con noi che 40 di questi composti infatti hanno ridotto il GS nei saggi di prova!

Mentre ha chiamato questo "fantastico progresso" è stato veloce nell'avvertire che ciò non significa automaticamente che tali composti siano sicuri per l'uso nei pazienti.

Infatti egli non sa nemmeno che cosa questi composti siano in quanto sono identificati solo da un codice. La società ha la possibilità di proseguire il trattamento con Dr. M. oppure semplicemente rivelare a lui quale sia la loro composizione chimica. In questo momento Dr. M.

è già impegnato nella fase successiva, la determinazione del dosaggio necessario per produrre la soppressione del 50% di GS in colture cellulari. Dopo di che, naturalmente, saranno testati su topi per la sicurezza e l'efficacia. Dr. Minassian è ottimista circa questa modalità di trattamento come prima linea di attacco sulla malattia. A suo parere ciò permetterebbe la definizione più veloce per i test umani.

Dissolving Lafora Bodies:

La maggior parte dei ricercatori concordano nel dire che il glicogeno si accumula in catene poliglucosani insolubili poco ramificate che formano i corpi di Lafora che a loro volta producono la degenerazione neuronale. I progetti di ricerca precedentemente elencati sono tutti volti a ridurre la produzione di glicogeno nel cervello e fermare la formazione dei corpi di Lafora, e arrestare la malattia. Tuttavia, per invertire efficacemente la malattia, i corpi Lafora devono essere rimossi. E' stato ipotizzato al Workshop che le cellule potrebbero avere meccanismi di pulizia che sono semplicemente sopraffatti dai corpi di Lafora. Se la produzione di glicogeno si riduce potrebbero lentamente ripulire i corpi di Lafora. Tuttavia, il laboratorio del Dott. Minassian lavora sul modo di sciogliere i corpi di lafora utilizzando amilasi. La sfida è di fornire amilasi funzionale al cervello. Due veicoli sono ora sotto inchiesta. AAV9 caricato con amilasi e' già stato iniettato nei topi e i risultati sono in attesa. La seconda prevede CRM197 un mutato, una non tossina difterica (DT) che viene integrato con amilasi. La tossina difterica attraversa la membrana ematoencefalica e infetta i neuroni. Si spera che questa versione mutata in modo sicuro trasporti amilasi nel cervello.

Dr. Anna DePaoli---Roach

Professoressa Emerita, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine.

Il suo laboratorio lavora sulla comprensione dei meccanismi della malattia di Lafora. Il laboratorio ha anche prodotto i primi topi privi PTG, aprendo la strada agli studi del Dr. Minassian sugli effetti della produzione di glicogeno sulla formazione dei corpi di Lafora. Il suo lavoro indipendente ha confermato che la riduzione di glicogeno nei neuroni salva dalla malattia di Lafora, e risponde affermativamente che i corpi Lafora sono la causa della malattia di Lafora.

Un trattamento sperimentale sui topi con Lafora con rapamicina + verapamil (aumento autofagia, il meccanismo di pulizia della cellula), non ha mostrato alcun effetto sulla progressione della malattia. Il suo laboratorio funziona indipendentemente dal Dr. Minassian per identificare inibitori GS dallo screening di piccole molecole dalle librerie Chembridge (193.000 composti). Ha annunciato di aver trovato 29 composti molecolari potenzialmente attivi, così come cinque composti attivi dalla lista di 1.200 farmaci approvati dalla FDA. Altre prove sono necessarie prima su colture cellulari e sui topi per confermare i risultati.

Dr. Joan Guinovart

Group Leader at the Institute for Research in Biomedicine, and professor in the Biochemistry and Molecular Biology Dept., University of Barcelona, Spain.

Lavora con i neuroni in coltura, i topi geneticamente modificati e insetti, il suo laboratorio ha scoperto che i neuroni contengono basse quantità di glicogeno e il meccanismo di metabolizzalo. Egli ha mostrato che i topi senza glicogeno erano meno in grado di apprendere, e che il glicogeno ha effetti positivi sulla sopravvivenza dei neuroni in stress indotto da ipossia, e in situazioni che richiedono attività cerebrale intensa. Il suo lavoro con i topi Lafora ha mostrato che la riduzione glicogeno sintasi del 50% impedisce la malattia, confermando in maniera indipendente i risultati del dottor Minassian con un metodo diverso. Inoltre, il topo senza mutazioni Lafora, ma con una maggiore espressione PTG (aumento di produzione di

glicogeno) ha mostrato la formazione di accumuli simili ai corpi di Lafora. Il loro lavoro ha anche rivelato che l'accumulo di glicogeno è la causa della neurodegenerazione, in opposizione all'ipotesi che incolpa l'autofagia.

Lawrence Goldstein, Ph.D.

Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California San Diego.

Ha presentato un lavoro su una malattia neurodegenerativa che ha analogie con Lafora. Il suo lavoro è la produzione di neuroni che trasportano le mutazioni della malattia da cellule staminali epiteliali, cellule che hanno un buon potenziale nella creazione di neuroni colpiti da Lafora per studi su colture cellulari.

Pascual Sanz, Ph.D.

Biomedicine Institute of Valencia, Spain

Il suo gruppo sembra sostenere la teoria che i corpi di Lafora non sono la vera causa della malattia. Utilizzando fibroblasti di pazienti con malattia di Lafora e campioni di cervello di topo con malattia di Lafora, hanno trovato alterazioni mitocondriale, segni di stress ossidativo e un deficit di enzimi antiossidanti. Sta lavorando per trovare composti molecolari che riducano lo stress ossidativo. Note personali: NAC (N-Acetil-Cisteina) ha un effetto antiossidante. Nella discussione che seguì la sua presentazione la maggior parte degli scienziati concordarono sul fatto che lo stress ossidativo è presente, ma è causato da accumulo di glicogeno.

J. Machado-Salas, M.D., Ph.D.

West Los Angeles Medical Center and David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA.

Ha studiato i corpi Lafora nel cervello del topo. Ha identificato corpi di Lafora di tipo I, che appaiono in primo luogo, hanno forma irregolare e sono in gran numero, nonché corpi di Lafora di tipo II, che appaiono successivamente, sono sferici in apparenza con architetture complesse, e il loro numero è molto minore. La sua ipotesi è che corpi di Lafora del tipo II sono infatti i risultati dei neuroni di elaborazione dei corpi di Lafora del tipo I. Inoltre, ha individuato grandi differenze nel numero di corpi di lafora in differenti aree del cervello.

José M Serratos, M.D., Ph.D.

Research Center for Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain

Ha studiato la sensibilità dei topi con Lafora alla somministrazione di farmaci convulsivanti in diverse dosi. Non sorprende che i topi con Lafora siano più sensibili (convulsioni avute più velocemente e in bassi dosaggi) dei topi sani. Poiché questo è un test standard con cui i trattamenti antiepilettici sono valutati, il suo lavoro ha aperto la strada per dimostrare l'efficacia nella malattia di Lafora. Sarà molto utile nel persuadere il NIH e FDA per concordare i test sui pazienti.

Matthew S. Gentry, Ph.D.

Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Center for Structural Biology, College of Medicine, University of Kentucky

La sua ricerca è a livello scientifico fondamentale. Sta cercando di capire l'esatta struttura molecolare della laforina e il ruolo della laforina nel metabolismo del glicogeno. Ha presentato modelli dettagliati di laforina e ha mostrato il possibile impatto di alcune delle mutazioni Lafora nella sua funzionalità. Il suo lavoro è molto importante per capire la malattia di Lafora e

potrebbe portare a diverse vie di trattamento. Nelle sue parole: "La nostra speranza è che possiamo identificare alcune piccole molecole che saranno utili per alcune mutazioni. Io vedo questo tipo di lavoro come una seconda ondata sul lavoro. La mia speranza è che la prima ondata abbia successo e che siamo in grado di concepire un trattamento che rallenta il progresso della malattia, mentre noi continuiamo a lavorare su questa seconda ondata".

Oliver Kötting, Ph.D.

Institute of Agricultural Sciences, ETH Zurich, Switzerland

Ha studiato il metabolismo amido vegetale che è l'equivalente del metabolismo del glicogeno negli animali. Recentemente è passato a studiare i corpi Lafora. Nel suo lavoro ha purificato i corpi di Lafora ed ha individuato quali proteine ed enzimi sono presenti nei corpi di Lafora. L'obiettivo è quello di individuare tutte le proteine coinvolte nella formazione dei corpi di lafora. Soprattutto ha sviluppato un metodo per purificare i corpi di Lafora e questo è un servizio molto importante per altri ricercatori. So che il dottor Minassian prevede di utilizzare i corpi di Lafora purificati da Oliver per la sua ricerca amilasi.

Felix Nitschke, Ph.D.

University of Potsdam, Potsdam, Germany

Lui è un altro convertito dalla ricerca del metabolismo vegetale, sta lavorando ora con il dottor Minassian in Toronto. Ha studiato in dettaglio le funzionalità di laforina sul glicogeno e fornito informazioni dal confronto con il metabolismo amido vegetale. Il suo lavoro ha un contributo significativo per capire esattamente come la malattia di Lafora si sviluppa.

Peter J. Roach, Ph.D.

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

Ha scoperto che i corpi di lafora sono formate da glicogeno iper-fosforilata, e ha introdotto l'ipotesi che laforina è coinvolta nel metabolismo del glicogeno. Il suo lavoro attuale è il reale meccanismo mediante il quale il GS costruisce la molecola di glicogeno e l'effetto della mancanza di laforina su questo processo. Ricerca fondamentale molto importante, che potrebbe aprire ulteriori vie di trattamento.

Antonio V. Delgado-Escueta, M.D.

West Los Angeles Medical Center and David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA

Egli non ha presentato alcun lavoro scientifico; la sua presentazione era per il finanziamento di una potenziale opportunità per l'epilessia attraverso NIH, per creare un "Centro senza ostacoli".

Round table discussion:

Dr. Dixon ha condotto la tavola rotonda e ha iniziato chiedendo pareri in merito alla utilità del Simposio. Tutti gli scienziati concordano sul fatto che è stato molto utile per loro e hanno votato per organizzarlo ogni due anni. Il prossimo nel 2016 sarà ancora a San Diego. L'opportunità di finanziamento proposto dal Dr. Escueta è stata discussa, ma nessun consenso è stato raggiunto.

Dott. Gentry è stato incaricato della notifica degli atti del workshop al direttore del programma NIH Rare Disease.