

## LAFORA RADIONICA

Sanford Konzorcijum Regenerativne Medicine Univerzitet Kalifornije San Dijego, 12-13 juni  
2014. Godine

Radionicom je upravljao dr Jack Dixon, organizovali su je dr Carolyn Worby i Kim Rice, a sponzorisana od strane Fonda za istraživanje Chelseas Hope. Nakon dobrodošlice koju je uputila Kim Rice, prešlo se na prezentaciju i video prikaz pod nazivom „Kristenina priča“, ključnu reč dr Berge Minassiana, jedanaest naučnih prezentacija i diskusiju na Okruglom stolu. Više od 25 naučnika, doktora nauka i studenata koji su direktno uključeni u istraživanje Lafore, kao i nekoliko Lafora roditelja prisustvovali su Radionici.

Predstavljam vam najvažnije prezentacije bez naučnog žargona, koliko je to moguće. Naglaska sam stavila na značaj istraživanja u potencijalnom kliničkom lečenju. Moguće je da su izostavljena mnoga izuzetna temeljna istraživanja koja su predstavljena.

### **Dr Berge Minassian (glavni govornik)**

Pretpostavka je da svi poznaju dr Minassiana tako da ga ne treba posebno predstavljati. Samo bih rekla da je profesor na Katedri za pedijatriju pri Univerzitetu u Torontu i neurolog u Bolnici za Bolesnu decu (Sick Kids Hospital). Njegova je laboratorija otkrila gen koji je odgovoran za Laforinu bolest, EPM2A laforin i EPM2B malin, te su pošli od hipoteze da ovi imaju ključnu ulogu u metabolizmu glikogena. On je jak zagovornik teorije da je formiranje Laforininih tela iz oskudno razgranatih glikogena (lanaca poliglukoza), glavni uzrok Lafore. Njegova je laboratorija u dva rada pokazala da se kod miševa sa mutacijom Laforine bolesti ili mutacijama koje smanjuju proizvodnju glikogena, uistinu nije razvila bolest. Pratili su te miševe sve do njihove duboke starosti, do preko dve godine, i oni su ostali potpuno zdravi. Štaviše, put kojim se napada ta bolest potvrđena je od strane još dve laboratorije, koje vode dr DePaoli-Roach i dr Guinovart (više o tome kasnije). Ove nezavisne potvrde će biti izuzetno važne kad budemo tražili dozvolu za humana testiranja. Ključna stvar kod ovih studija je smanjenje proizvodnje glikogena za 30-50%. Kako bi se smanjila proizvodnja glikogena, identifikovana su tri cilja: okidač za glikogenske molekule, glikogenin (GYG), protein koji cilja na glikogen (PTG) koji aktivira glikogensku sintazu i sama glikogenska sintaza (GS), enzim koji molekule glikoze dodaje u glikogen.

Bez ulaženja u tehničke detalje, ovo su tri stadija u proizvodnji nekog enzima ili proteina:

GEN ----> RNK ----> PROTEIN

Dakle, postoje tri nivoa na kojima se može intervenisati i sva tri su područje aktivnog istraživanja laboratorije dr Minassiana.

### **Genski nivo:**

CRISPR je najnovija tehnika na polju genske manipulacije inspirisana bakterijskom odbranom od virusa. Razvijena je u MIT-u od strane dr Feng Zhang-a i jako je poželjna. Do sada se ne može koristiti za popravljavanje gena, već samo za njihovo smirivanje. CRISPR možete zamisliti kao par veoma preciznih makaza koje mogu unutar neke ćelije prići određenom genu,

deaktivirajući ga. Dr Minassian je prošle jeseni stupio u kontakt sa dr Zhang i započeo projekat CRISPR-a koje ciljaju na Laforu. Dr Zhang je nedavno isporučio CRISPR-ove protiv GS, PTG i GYG sa preko 50% učinkovitosti. Naredni korak je njihovo testiranje u ćelijskim kulturama i na miševima, koristeći efektivnu metodu isporuke.

Uz pomoć još jednog saradnika, dr Brian Kaspar-a sa Državnog Univerziteta u Ohaju, dr M ima pristup jednom novom adeno-sličnom virusu zvanom AAV9 koji ima veoma dobre karakteristike za gensku terapiju: on može da prođe moždanu krvnu barijeru (BBB); može da naseli veliki procenat mozga, a da pritom ne izazove negativne reakcije; ne integriše se u genom (nema rizika od komplikacija zbog izmenjene DNK); duži vremenski period ostaje aktivan; dovoljno je velik da primi CRISPR-ove. Dr Kaspar je postigao dobre rezultate koristeći AAV9 na miševima obolelim od Amiotrofične lateralne skleroze (ALS).

Dr Minassian provodi eksperimente koristeći AAV9 i CRISPR-ove u ćelijskim kulturama, a uskoro će i na miševima. On je veoma uzbuđen i optimističan u pogledu ovih eksperimenata.

Takođe, na genskom nivou, AAV9 je angažovan da transportuje normalne EPM2A i EPM2B gene u miševima sa Laforom. Virus će aktivirati gene unutar ćelije proizvodeći nedostajući laforin i malin proteine i obnavljajući njihovu funkciju u metabolizmu glikogena. Ukoliko bude uspešno, to može biti efektivan lek protiv Lafore.

#### **RNK nivo:**

Dr Minassian je pomenuo i saradnju sa ISIS Farmaceutikal-om, koji su specijalizirani za anti-sens lekove koji se vežu za mRNK, efikasno „isključujući“ taj gen. Bilo mu je zadovoljstvo izvestiti nas da su oni isporučili Anti-sens oligonukleotide (ASO) koji GS, PTG i GYG smanjuju za 50%, dakle za onoliko za koliko je i tražio. ISIS je ove testirao na ćelijskim kulturama i na miševima. Dr Minassianu nije bilo dozvoljeno da objavi najnovije rezultate zbog postojanje Ugovora o poverljivosti, ali je on već ubrizgao ASO-ve u mozgove Lafora miševa. Nedostatak ASO-va je taj da ne mogu da prođu BBB (moždana krvna barijera). Stoga oni moraju biti ubrizgani u moždane šupljine ili putem kičmene moždine u intervalima od 2-3 meseca.

Napomena o ISIS Farmaceutikalsu: trenutno imaju jedan odobren lek (KYNAMRO za hiperholesterolemiju) i brojne sastojke u kliničkim ispitivanjima za potrebe raznih bolesti kao što su Kronova bolest, psorijaza, astma i rak. Oni saraduju sa Blogen-om (projekat vredan 100 miliona dolara) kako bi razvili antisens lekove za neurološke poremećaje koji će unaprediti metode transporta ASO-va u mozak.

#### **Proteinski nivo:**

Dr Minassian nas je već ranije obavestio da su njegova laboratorija i saradnici uključeni u ogromno automatsko snimanje (skrining) malih molekula koje mogu proći BBB (preko 190,000) kako bi našli GS inhibitore. Dr Minassian je takođe zaključio sporazum sa jednom neimenovanom farmaceutskom kompanijom kako bi njihovom testiranju pridružio 5,000 hemijskih komponenti koje pokazuju smanjenje GS-a. Nezvanično, obzirom da je obavezan Ugovorom o poverljivosti, saopštio nam je samo to da je 40 tih komponenti prilikom testiranja uistinu smanjilo GS! Iako je ovo nazvao „fantastičnim napretkom“, oprezan je u pogledu toga da ovo ne znači da su te komponente sigurne i za upotrebu na pacijentima. On i ne zna o kojim se komponentama uopšte i radi obzirom da su oni identifikovani samo kroz kod. Kompanija može da nastavi sa terapijom zajedno sa dr M ili da mu samo otkrije o kojoj se hemijskoj komponenti

radi. Trenutno se dr M već uključio u naredni korak, određivanje koja je doza potrebna kako bi se postiglo 50% umanjenja GS-a u ćelijskim kulturama. Nakon toga će naravno biti testirani na miševima zbog sigurnosti i efikasnosti. Dr Minassain je optimističa u pogledu toga da bi ovakav pristup mogla biti prva linija odbrane od ove bolesti. Po njemu bi ovo omogućilo najbrži prelazak na humano testiranje.

### **Uništavanje (topljenje) Laforinih tela:**

Većina istraživače se slaže sa tim da se slabo razgranati glikogen akumulira u nerastopivim poliglukosanskim lancima koji stvaraju Laforina tela, a koja zauzvrat izazivaju neurološku degeneraciju. Istraživački projekti o kojima je gore bilo reči svi imaju za cilj da smanje proizvodnju glikogena u mozgu i zaustave stvaranje Laforinih tela, zaustavljajući time i bolest. No, kako bi se ova bolest preokrenula u suprotnom smeru, potrebno je i eliminisati Laforina tela. Postojala je hipoteza na Radionici kako bi ćelije mogle imati mehanizam čišćenja koji je naprosto onemogućen postojanjem Lafore. Ukoliko se proizvodnja glikogena smanji, one bi polako mogle počistiti Laforina tela. No, bilo kako bilo, laboratorija dr Minassiana radi na istraživanju razgradnje Laforinih tela putem amilaze. Izazov je dovesti funkcionalnu amilazu u mozak. Trenutno su dva „prevoznika“ pod istragom. AAV9 natovaren amilazom već je ubrizgan u miševima i rezultati se čekaju. Druga mogućnost uključuje CRM197, jedan mutirani, bezotrovni toksin difterije (DT) koji je snabdeven amilazom. Otrov difterije prolazi BBB i zaražava neurone. Nadati se da će ova mutacijska verzija bezbedno transportovati amilazu u mozak.

### **Dr Anna DePaoli-Roach**

Profesor Emeritus, odsek za biohemiju i molekularnu biologiju, Univerzitetska škola medicine u Indijani.

Njena laboratorija radi na razumevanju mehanizama Laforine bolesti. Laboratorija je takođe proizvela prvog miša kojem je nedostajao PTG, popločavši time put dr Minassianovim studijama efekata glikogenske proizvodnje u formacijama Laforinih tela.

Njen rad je nezavisno potvrdio da smanjenje prisustva glikogena u neuronima spašava od Lafore i dao pozitivan odgovor na to da Laforina tela zavise od Laforine bolesti. Jedan eksperiment u kojem su miševi tretirani sa rapamicynom+ verapamilom (povećavajući autofagiju, mehanizam čišćenja ćelija), pokazao je da taj tretman nije imao uticaja na progresiju bolesti.

Njena laboratorija nezavisno od dr Minassiana radi na identifikaciji GS inhibitora snimajući male molekule iz ChemBridge biblioteke (193,00 komponenti). Ona je objavila da je našla 29 potencijalnih aktivnih molekularnih komponenti, kao i 5 aktivnih komponenti sa liste 1,200 FDA odobrenih lekova. Potrebno je još testova pre nego ćelijske kulture ili miševi potvrde ove rezultate.

### **Dr Joan Guinovart**

Vođa grupe na Institutu za Istraživanje i Biomedicinu, te profesor odseka Biohemije i molekularne biologije na Univerzitetu u Barceloni.

Radeći sa kulturama neurona, genetski modifikovanim miševima i muvama, njegova laboratorija je pronašla neurone koji sadrže male količine glikogena, te mehanizam kako ih metabolisati. Pokazao je da miševi bez glikogena imaju manju sposobnost da uče, te da glikogen ima pozitivne efekte na neurološko preživljavanje prilikom stresa izazvanog hipoksijom, kao i u

situacijama koje zahtevaju povećanu moždanu aktivnost. Njegov rad sa Lafora miševima pokazao je da smanjenje glikogenske sintaze za 50% sprečava bolest, time nezavisno potvrđujući dr Minassianove rezultate dobijene drugačijom metodom. Štaviše, miševi bez Laforine mutacije, ali sa povećanom PTG ekspresijom (povećanom proizvodnjom glikogena) pokazivala su formacije akumulacija slične Laforinim telima.

Njihov rad je takođe otkrio da je akumulacija glikogena uzrok neurodegeneracije, koji se kosi sa hipotezom koja okrivljuje smanjenu autofagiju.

**Lawrence Goldstein,**

Odsek za ćelijsku i molekularnu medicinu, Univerzitet Kalifornije, San Diego

Predstavio je rad na neurodegenerativnim bolestima koje imaju sličnosti sa Laforom. Njegov rad na proizvodnji neurona koje nose mutacije bolesti sa epitelnih ćelija stvarajući matične ćelije, ima potencijala u stvaranju neurona napadnutih Laforom, za potrebe proučavanja kultura.

**Pascual Sanz,**

Institut za biomedicinu u Valensiji, Španija

Njegova grupa izgleda da podržava teoriju kako Laforina tela nisu u stvari uzrok Lafore. Koristeći fibroblaste iz laforinih tela pacijenata i uzorke iz mozгова laforinih miševa, pronašli su mitohondrijske promene, znake oksidativnog stresa i manjak antioksidantnih enzima. On radi na pronalaženju molekularnih komponenti koje bi smanjile oksidativni stres. Llična primedba: NAC (N-acetil-cistein) ima antioksidantni efekat.

U diskusiji koja je usledila po njegovoj prezentaciji, većina se naučnika složila sa činjenicom da je oksidativni stres prisutan, ali je uzrokovan glikogenskom akumulacijom.

**J. Machado-Salas,**

Medicinski Centar i David Geffen Medicinska škola Zapadnog Los Anđelesa na UCLA, Los Anđeles, Kalifornija

On je proučavao Laforina tela u mozgovima miševa. On je identifikovao Laforina tela tipa I koja se prvi pojavljuju, nepravilnog su oblika i brojniji su, kao i Laforina tela tipa II koja se pojavljuju kasnije, sferičnog su oblika sa kompleksnom građom i u znatno su manjem broju. Njegova hipoteza je ta da su Laforina tela tipa II u stvari rezultat neuronske prerade Laforinih tela tipa I. Takođe je uočio velike razlike u broju Laforinih tela u različitim delovima mozga.

**Jose M Serratosa**

Centar za istraživanje retkih bolesti (CIBERER), Madrid, Španija

On je proučavao osetljivost laforinih miševa na davanje lekova protiv (*ili za, nisam sigurna*) grčenja u različitim dozama. Ne iznenađuje da su laforini miševi bili osetljiviji (imali su brže napade i pri manjim dozama) od zdravih. Obzirom da je ovo standardni test kojim se procenjuju anti-epileptici, njegove je rad utemeljio put koji pokazuje efektivnost Lafore. Veoma je korisno za odobravanje humanog testiranja od strane NIH-a i FDA-e.

**Matthew S. Gentry**

Odsek za molekularnu i ćelijsku biohemiju, Centar za strukturalnu biologiju, Medicinski koledž, Univerzitet u Kentakoku

Njegovo je istraživanje na naučnoj osnovi. On pokušava da tačno shvati molekularnu strukturu laforina i ulogu laforina u metabolizmu glikogena. On je predstavio odabrane detaljne modele laforina i pokazao mogući uticaj nekoliko laforinih mutacija na njegovo funkcionisanje. Njegov rad je veoma važan u shvatanju Laforine bolesti i mogao bi voditi do različitih načina lečenja. Njegovim rečim: „Naša je nada da identifikujemo neke male molekule koje će biti korisne za neke mutacije. Ovaj vid rada ja vidim kao drugi talas. Nadam se da je prvi talas uspešan i da možemo razraditi tretman koji će usporiti proces bolesti dok nastavljamo sa radom na ovom drugom talasu.“

**Oliver Koetting**

Institut za poljoprivrednu nauku, ETH Ciri, Švajcarska

On je proučavao metabolizam biljnog škroba koji je ekvivalentan metabolizmu glikogena kod životinja. On je nedavno prešao na proučavanje Laforinih tela. U svom radu on je pročitao Laforina tela i identifikovao koji proteini i enzimi su prisutni u Laforinim telima. Cilj je otkriti sve proteine koji su prisutni u formacijama Laforinih tela. Ono što je najvažnije je to da je razvio metodu pročišćavanja Laforinih tela i to je veoma korisno za ostale istraživače. Znam da Dr Minassian namerava da koristi Oliverova pročišćena Laforina tela za svoja istraživanja amilaze.

**Felix Nitschke**

Univerzitet u Potsdamu, Potsdam, Nemačka

I on se preobratio sa istraživanja na biljkama i sada radi sa dr Minassianom u Torontu. On je detaljno proučavao funkcionalnost laforina na glikone i omogućio poređenje sa biljkama koje imaju metabolizam biljnog škroba. Njegov rad pruža značajan doprinos razumevanju kako se tačno razvija Laforina bolest.

**Peter J. Roach**

Odsek za biohemiju i molekularnu biologiju, Univerzitetska škola medicine u Indijani, Indijanapolis

On je otkrio da su Laforina tela građena od hiper-fosforizovanog glikogena i predstavio hipotezu da je laforin uključen u metabolizam glikogena. Njegov trenutni rad je na tačnom mehanizmu kojim GS izgrađuje molekule glikogena i koji efekat manjak laforina ima na taj proces. Ovo je veoma važan temeljni rad koj bi mogao stvoriti dodatne načine lečenja.

**Antonio V. Delgado-Escueta**

Medicinski Centar i David Geffen Medicinska škola Zapadnog Los Anđelesa na UCLA, Los Anđeles, Kalifornija

On nije predstavio bilo kakav naučni rad; njegova prezentacija je bila o NIH-ovom finansiranju potencijalne mogućnosti za epilepsiju, kako bi stvorio „Centar bez zidova“.

**Diskusija na Okruglom stolu:**

Dr Dixon je vodio okrugli sto i započeo pitanjem za mišljenja u pogledu korisnosti Simpozijuma. Svi naučnici su se složili da je bilo od koristi za njih i glasali su za to da se organizuje svake dve godine. Sledeći, 2016 godine će se održati u San Diegu. Razmatrane su mogućnosti finansiranja koje je predložio dr Escueta, ali nije postignut dogovor. Dr Gentry je zadužen da NIH-ovom upravniku za program retkih bolesti prenese rezultate Radionice.