

## Poster P.04.21

### GENE THERAPY AND LONG TERM EVALUATION OF DIFFERENT DIETARY REGIMENS IN A GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE III KO MOUSE MODEL

Pagliarani S.<sup>[1]</sup>, Lucchiari S.<sup>[1]</sup>, Vidal P.<sup>[3]</sup>, Ripolone M.<sup>[2]</sup>, Fortunato F.<sup>[1]</sup>, Moggio M.<sup>[2]</sup>, Ronzitti G.<sup>[3]</sup>, Mingozi F.<sup>[3]</sup>, Comi G.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Università degli Studi di Milano ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Ospedale Maggiore Policlinico Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>INTEGRARE, Genethon, Inserm, Univ Evry, Université Paris-Saclay ~ Evry ~ France

Glycogen disease type III (GSDIII) is a rare monogenic disorder due to glycogen debranching enzyme (GDE) deficiency. In infancy and childhood, main symptoms are hepatomegaly, ketotic hypoglycaemia, hyperlipidemia, high transaminase levels, and growth delay. These signs gradually decrease in adolescence, though an apparent glycaemic control may hide a progressive liver fibrosis and hepatic adenomas. Skeletal myopathy develops since the second decade of life and may progressively worsen to partial or complete disability.

We developed a knock-out (KO) mouse model of GSDIII and we evaluated high protein treatments differing in their protein and carbohydrate contents, namely high protein (HP; 45.9% protein) and glucose free (GF; 53.4% protein) diets. Though both diets ameliorated muscle performance, GF diet showed the best results: mice were able to run on a treadmill until 10 months of age vs 5 months of age for untreated and HP mice. GF mice showed decreased vacuolization of muscle fibres and decreased muscle glycogen content; hepatomegaly was reduced. Taken together, these data are suggestive of a better metabolic compensation in mice treated with a glucose free/high protein diet. Liver expression profiling of GF mice showed an increased gene expression of gluconeogenesis and Krebs cycle indicating the use of dietary proteins both for the production of glucose to sustain glycaemia, and of energy to sustain metabolic requirements. Ongoing studies on a new diet called low carb (LC; this is a high protein/high fat/low carbohydrate diet) have shown promising results on fasting hypoglycaemia, reduction of glycogen content in skeletal muscle and heart, and on hepatomegaly in mice treated for two months.

Another goal of this project was to generate proof-of-concept data for GDE gene therapy in the GSDIII mouse model. Given the predominant skeletal muscle and liver involvement in this disease, both liver and muscle were transduced with tissue-specific dual vector constructs. The overexpression of GDE in skeletal muscle led to a functional rescue and a decrease of glycogen content in muscle, but it had no effects on the liver signs of the disease. The overexpression of GDE in the liver using a dual-overlapping AAV system had a direct impact on blood glucose levels and dramatically decreased the liver glycogen content.

These promising data support our work on both dietary and gene therapy as valid and reliable approaches to improve the disease course, to improve the quality of life of patients and in the near future be able to cure GSDIII.

Terapia genica e valutazione nel lungo periodo di diversi tipi di dieta in un modello murino KO di Glicogenosi di tipo III.

La Glicogenosi di tipo III (GSDIII) è una malattia monogenica causata dal deficit di enzima deramificante (GDE) che è necessario per la scissione del glicogeno in glucosio. Nell'infanzia, i sintomi principali sono ingrossamento del fegato, crisi ipoglicemiche, iperlipidemia, transaminasi alte e ritardo di crescita. Questi sintomi regrediscono durante l'adolescenza. La miopatia si sviluppa durante la vita adulta e progressivamente può peggiorare fino alla perdita della deambulazione.

Nel nostro laboratorio abbiamo sviluppato un modello animale che riproduce le caratteristiche della GSDIII. Abbiamo somministrato due diverse diete con differente contenuto di proteine e di carboidrati: la dieta high protein (HP) e la dieta glucose free (GF). I topi GSDIII trattati con la dieta GF sono in grado di correre sul tapis roulant fino a 10 mesi di vita, mentre i non trattati e quelli trattati con la dieta HP solo fino ai 5 mesi. I topi trattati mostrano fibre muscolari con meno vacuoli; inoltre, il dosaggio del contenuto di glicogeno nei tessuti mostra una riduzione rispetto ai topi non trattati. Anche le dimensioni del fegato sono ridotte rispetto ai topi non trattati. Questi dati suggeriscono che la dieta GF può indurre una miglior compensazione metabolica nei topi GSDIII. Questo indica che le proteine introdotte sono utilizzate sia per la produzione di glucosio per mantenere la glicemia (gluconeogenesi), sia per la produzione dell'energia necessaria alle cellule epatiche (ciclo di Krebs). Sono inoltre in corso studi con una dieta ricca in grassi e proteine e povera di carboidrati. I dati preliminari su topi che sono stati trattati per 2 mesi mostrano che questa dieta è in grado di ridurre il contenuto di glicogeno nel muscolo e nel cuore, ridurre l'epatomegalia e aumentare i livelli di glucosio nel sangue degli animali a digiuno.

Questo progetto è volto anche allo studio della terapia genica basata su di una strategia dual-vector e applicata alla GSDIII. Il gene dell'enzima deramificante è molto grande e difficilmente può essere inserito integralmente in un vettore per terapia genica (AAV). Sono stati quindi prodotti vettori chiamati dual vector: uno contenente la prima parte del gene e un vettore contenente la seconda parte del gene. I vettori sono stati targettati selettivamente al muscolo scheletrico o al fegato. L'espressione nel muscolo ha portato ad un miglioramento funzionale ed alla diminuzione del glicogeno muscolare. L'espressione nel fegato ha mostrato l'aumento dei livelli di glucosio nel sangue e la diminuzione del glicogeno epatico.

Questi dati promettenti sostengono lo sviluppo del nostro lavoro sia sulla terapia genica che sulla terapia dietetica come validi approcci per migliorare il corso della malattia e la qualità della vita dei pazienti e portare in un prossimo futuro alla cura della GSDIII.

- Pagliarani S, Lucchiari S, Ulzi G, Violano R, Ripolone M, Bordoni A, Nizzardo M, Gatti S, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Glycogen storage disease type III: A novel Agl knockout mouse model. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1842(11):2318-28. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.07.029.

- Pagliarani S, Lucchiari S, Ulzi G, Ripolone M, Violano R, Fortunato F, Bordoni A, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Glucose-free/high-protein diet improves hepatomegaly and exercise intolerance in glycogen storage disease type III mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 Oct;1864(10):3407-3417. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.07.031.

- Vidal P, Pagliarani S, Colella P, Costa Verdera H, Jauze L, Gjorgjieva M, Puzzo F, Marmier S, Collaud F, Simon Sola M, Charles S, Lucchiari S, van Wittenberghe L, Vignaud A, Gjata B, Richard I, Laforet P, Malfatti E, Mithieux G, Rajas F, Comi GP, Ronzitti G, Mingozzi F. Rescue of GSDIII Phenotype with Gene Transfer Requires Liver- and Muscle-Targeted GDE Expression. *Mol Ther*. 2018 Mar 7;26(3):890-901. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.12.019.

### Glicogenosi di tipo III

Coordinator: Giacomo Pietro Comi

Partner: Federico Mingozzi

Duration (N. Years): 4

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15051

**Disease Name:**

Glycogen Storage Disease Type III

**Keywords:**

GSDIII, gene therapy, dietary treatment