



Fondazione Camillo Golgi Bando 2018

Caratterizzazione di un modello zebrafish per la comprensione della malattia rara PKAN.

PREMESSA

Nel 2001, Zhou e colleghi (Zhou et al., 2001) hanno individuato mutazioni nel gene pantotenato chinasi 2 (PANK2) nella Neurodegenerazione associata alla pantotenato chinasi (PKAN). Si tratta di una rara malattia neurodegenerativa autosomica recessiva che presenta depositi di ferro nel globo pallido (Angelini et al., 1992; Swaiman, 1991, Hayflick et al., 2003). PANK2 catalizza la fosforilazione della vitamina B5 nella prima tappa della biosintesi del coenzima A (CoA) (Abiko, 1967). Sebbene sia espresso ubiquitariamente, è presente ad alti livelli relativi nel cervello (Zhou et al., 2001; R Leonardi et al., 2007b), suggerendo così un ruolo rilevante nelle cellule neurali. Gli studi condotti in diversi contesti sperimentali (Levi e Finazzi, 2014; Aoun e Tiranti, 2015) indicano una riduzione del livello di CoA cellulare come la principale conseguenza dei difetti PANK2. La connessione molecolare tra deficit di CoA e patogenesi della malattia è ancora poco chiara. Abbiamo pensato che il modello zebrafish potesse rappresentare un utile sistema sperimentale per studiare le vie molecolari interessate da difetti di biosintesi del CoA in vivo, dalle prime fasi dello sviluppo embrionale all'età adulta. Inoltre, i modelli di zebrafish si stanno dimostrando sempre più utili come sistemi per screening farmacologici di prima linea. A tale scopo abbiamo prima sviluppato modelli di zebrafish di PKAN mediante microiniezione di morfolini gene-specifici (Zizioli et al., 2016; Khatri et al., 2016) e descritto un ruolo essenziale di *pank2* nello sviluppo del sistema nervoso e vascolare. Per superare i limiti temporali e biochimici dell'approccio morfolino abbiamo ora sviluppato linee di zebrafish con alleli mutati di *pank2*. Il progetto prevede la caratterizzazione morfo-funzionale di queste linee e la messa a punto di sistemi per lo screening di una libreria di molecole per individuare composti capaci di un recupero fenotipico. Queste molecole dovrebbero individuare le vie molecolari interessate dalla delezione del gene *pank2* ed eventualmente suggerire nuovi approcci terapeutici.

RISULTATI

Caratterizzazione morfo-funzionale delle linee mutanti *pank2*.

Abbiamo ottenuto linee di zebrafish con mutazione omozigote nel gene *pank2* (denominate $\Delta 4$ e $\Delta 50$ delezione) e documentato la riduzione dell'espressione di *Pank2* a livello proteico. L'analisi morfologica ha evidenziato un modesto edema cerebrale durante le primissime fasi di sviluppo associato a ridotte dimensioni del corpo. Queste anomalie svaniscono nelle fasi successive dello sviluppo. L'analisi dell'espressione del gene *coasy*, che codifica per l'enzima che controlla gli ultimi passaggi della biosintesi del CoA, ha rivelato un aumento significativo nelle linee mutanti. Abbiamo documentato una significativa riduzione della concentrazione di CoA in entrambe le linee e osservato che l'integrazione di CoA nell'acqua dei pesci può ristabilire il livello normale del metabolita, consentendo uno sviluppo normale. Abbiamo anche analizzato il comportamento di movimento in larve di 4 e 5 giorni. In entrambi i momenti, le larve mutanti hanno nuotato per una distanza più breve rispetto a quelle WT. Questo potrebbe rappresentare un possibile marker per indagini neurofarmacologiche.

Analisi di linee transgeniche reporter con alleli *pank2* mutati.





Abbiamo incrociato le nostre linee mutanti con linee Tg(neurod:EGFP) e Tg(kdrl:mCherry). Abbiamo analizzato gli embrioni WT e Tg mutante (neurod:EGFP) a 24 e 48 hpf. Come mostrato nella figura 1, una chiara riduzione dell'intensità della fluorescenza era evidente nei pesci mutanti a 24 hpf. L'imaging confocale ha mostrato che la riduzione della fluorescenza era particolarmente evidente nel telencefalo, nel diencefalo, nel confine mesencefalo/retroencefalo e nel midollo spinale. Per analizzare nel dettaglio lo sviluppo vascolare abbiamo analizzato embrioni derivati dalla linea Tg(kdrl:mCherry). Il gene kdrl è espresso nelle cellule endoteliali ed è coinvolto nella germinazione dei vasi vegf-dipendenti. Abbiamo confrontato gli embrioni WT transgenici con quelli mutanti a 24 (non mostrati) e 48 hpf (figura 18) al microscopio a fluorescenza. Nessuna differenza era presente né come intensità del segnale né come sviluppo della struttura. Un'attenta analisi del plesso caudale non ha rilevato alcuna anomalia né nei vasi anastomotici intersegmentali né dorsolaterali. Possiamo concludere che il sistema vascolare sembra svilupparsi normalmente nelle linee mutanti *pank2*. Rimangono da capire le ragioni delle differenze riscontrate tra linee mutanti e linee morfanti.

Sviluppo di saggi per uno screening su larga scala di una libreria di composti bioattivi.

L'integrazione di CoA nell'acqua dei pesci da 0,5 hpf ha ristabilito il normale livello di espressione di EGFP nei pesci mutanti a 48 hpf. La ricostruzione 3D del cervello di embrioni mutanti mediante Light Sheet Imaging mostra chiaramente una drammatica perdita di fluorescenza EGFP negli embrioni mutanti *pank2* omozigoti. L'esposizione al CoA porta ad un significativo recupero del segnale nel cervello dei mutanti. Il trattamento con vitamina B5 non ha modificato il segnale fluorescente. Per dimostrare ulteriormente la specificità del trattamento con CoA abbiamo somministrato cisteamina (Cys) agli embrioni *pank2*^{-/-}. L'analisi della Tg(neurod1:EGFP) ha mostrato livelli normali di intensità di fluorescenza negli embrioni trattati con CoA e Cys. Il trattamento con CoA ha ripristinato i normali livelli di espressione di *coasy*, suggerendo così un completo salvataggio metabolico. Al contrario, la somministrazione di Cys è stata associata ad un forte aumento del livello di mRNA *coasy*. Questi risultati suggeriscono l'importanza di più saggi per analizzare a fondo l'attività di salvataggio di diverse molecole e per individuare i possibili meccanismi biochimici che provocano il fenomeno. Questi risultati pongono le basi per lo screening di Drug Library con molecole già approvate dalla FDA per l'utilizzo clinico.

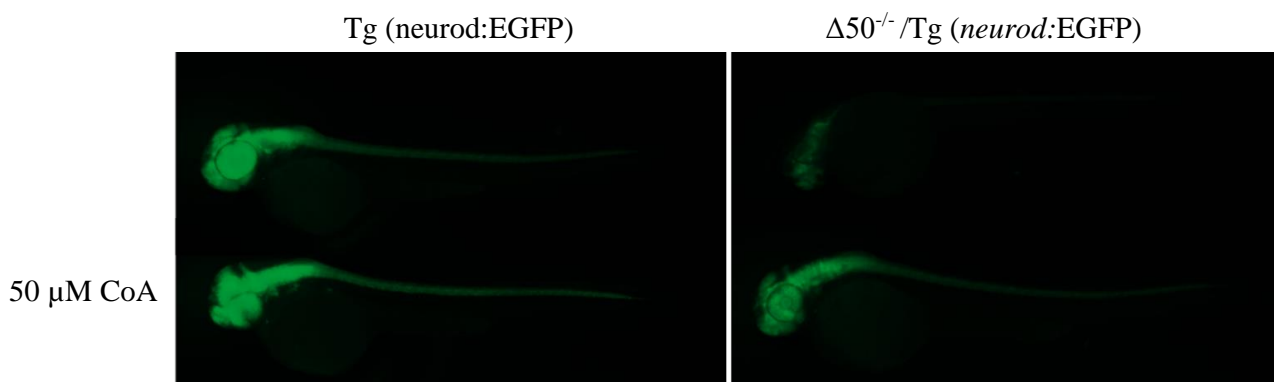


Figura 1. Analisi di fluorescenza in Tg(neurod1:EGFP) mutato e di controllo, trattati o meno con CoA. Gli embrioni mutanti mostrano una riduzione dell'intensità della fluorescenza a 48 hpf rispetto agli embrioni di controllo. L'aggiunta di 50 μ M di CoA ha ripristinato in modo efficiente l'espressione di EGFP.

