



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI BRESCIA

Zebrafish Brain and Coenzyme A ZEBRACA

Prof. Dario Finazzi
Dott.ssa Daniela Zizioli

Sezione di Biotecnologie

Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale Università di
Brescia

Laboratorio Centrale di Analisi Chimico Cliniche Spedali Civili di
Brescia



Bando Health & Wealth – tipologia FURTHER

Prosecuzione progetto Telethon

The Role of Iron and Mitochondria in the Pathogenesis of Pantothenate Kinase Associated Neurodegeneration (PKAN)

Papers

D Khatri, **D Zizioli**, A Trivedi, G Borsani, E Monti, **D Finazzi**

Overexpression of Human Mutant PANK2 Proteins Affects Development and Motor Behavior of Zebrafish Embryos. *Neuromolecular Med* 2019 Jun;21(2):120-131. doi: 10.1007/s12017-018-8508-8.

D. Khatri, **D. Zizioli**, N.Tiso, N.Facchinello, Sara Vezzoli, A. Gianoncelli, M. Memo, E. Monti, G. Borsani, **D. Finazzi**.

Down-regulation of coasy, the gene associated with NBIA-VI, reduces Bmp signaling, perturbs dorso-ventral patterning and alters neuronal development in zebrafish. *Sci Rep*. 2016; 6: 37660

D. Zizioli, N.Tiso, A. Guglielmi, C. Saraceno, G. Busolin , R, Giuliani, D.Khatri , E. Monti , G. Borsani, F. Argenton, **D. Finazzi**.

Knock-down of pantothenate kinase 2 severely affects the development of the nervous and vascular system in zebrafish, providing new insights into PKAN disease, *Neurobiol Disease* Jan; 85:35-48



Neurodegenerazione con accumulo cerebrale di ferro (NBIA)

- Gruppo eterogeno di disordini di natura ereditaria
- Malattie rare (1:3.000.000)
- Disturbi del movimento (distonia, parkinsonismo), decadimento cognitivo, ritardo nello sviluppo
- Accumulo cerebrale di ferro

PKAN

Types of NBIA	Gene	Inheritance
Pantothenate kinase associated neurodegeneration	PANK2	AR
PLA2G6 associated neurodegeneration	PLA2G6	AR
Mitochondrial membrane protein associated neurodegeneration	C19orf12	AR
Beta propeller protein associated neurodegeneration	WDR45	X-linked
Fatty acid hydroxylase associated neurodegeneration	FA2H	AR
Aceruloplasminemia	Ceruloplasmin	AR
Neuroferritinopathy	Ferritin light	AD
Woodhouse-Sakati syndrome	DCAF17	AR
Kufor-Rakeb	ATP13A2	AR

PKAN

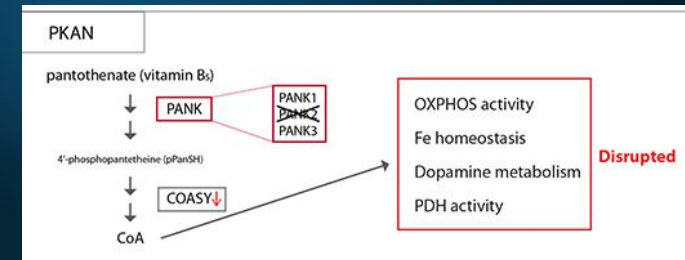
Neurodegenerazione associata a PANK2

~~PANK2~~ → → → → ~~Coenzima A~~ → **Neurodegenerazione**

Scopo del progetto:

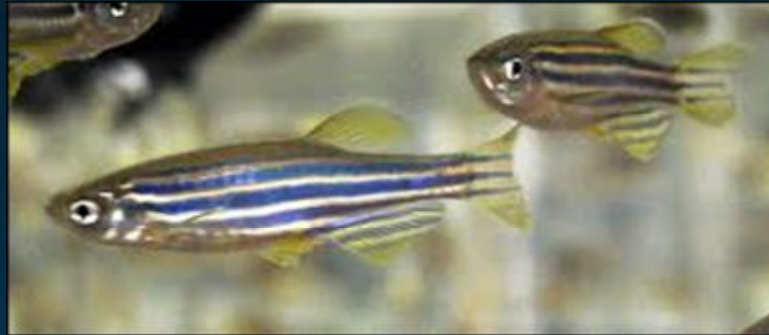
Generazione di organismo modello per

- definire meccanismi patogenetici
- selezionare molecole con potenzialità terapeutiche



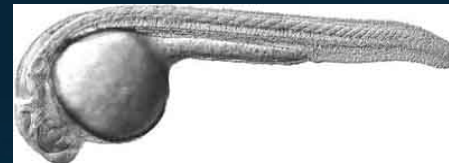
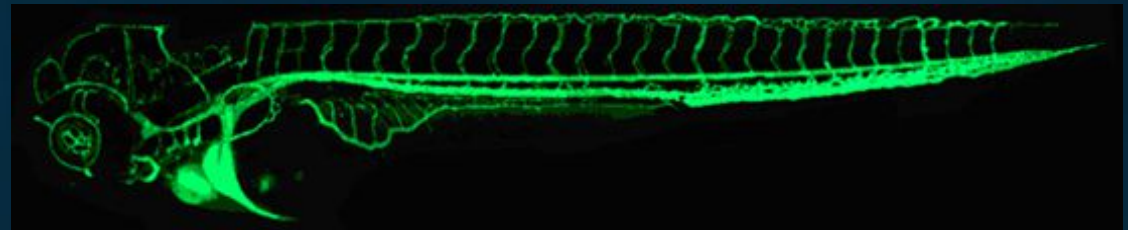
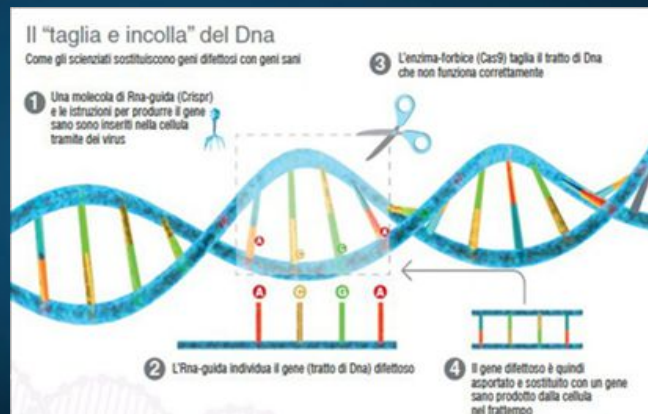
Zebrafish: un ottimo modello per lo studio di patologie umane

- • Progenie numerosa
Fecondazione esterna
- • Maturità sessuale
raggiunta in 3 mesi
- • Embrioni trasparenti
- • Piccole dimensioni
Facile da allevare



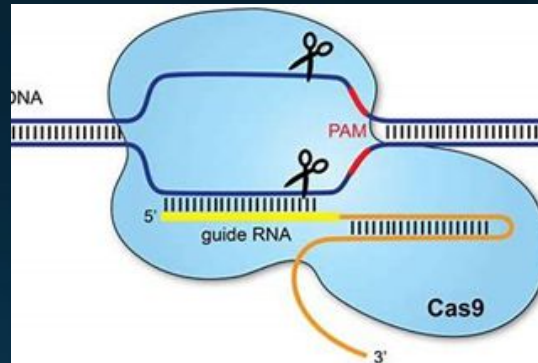
→ Screening di molecole
con potenziale terapeutico

Ottenimento di animali knock out (CRISPR/Cas9) e transgenici

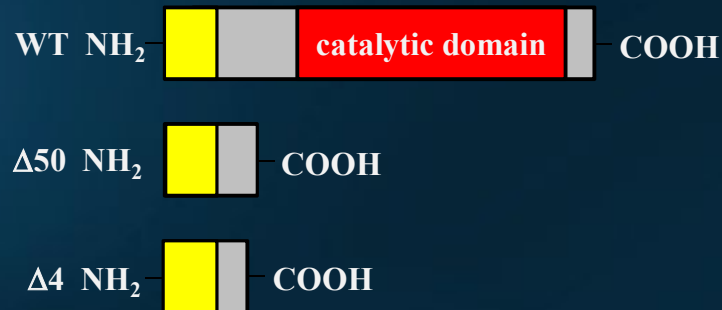


- • Rapido sviluppo embrionale: a 24-48 ore dalla fecondazione i principali organi sono formati e mostrano un'elevata omologia strutturale con gli organi dei mammiferi

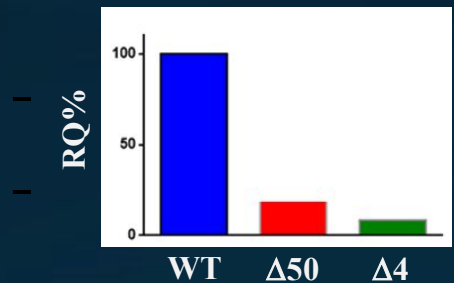
“Crispered” zebrafish (CRISPR/Cas9 technique)



WT TCGCTACAGCGGCTCCAGACGGTGAAGCGGCCGGGGGAAGTGCCTCAGAGAGCGGCGGGT
 Δ50 TC-----GCGGCGGGT
 Δ4 TCGCTACAGCGGCTCCAGACGGTGAAGCGGCCGGGGGAAGTGCCTCA----GCGGCGGGT

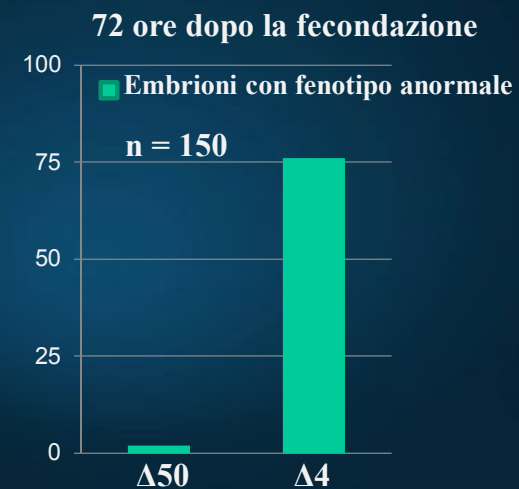
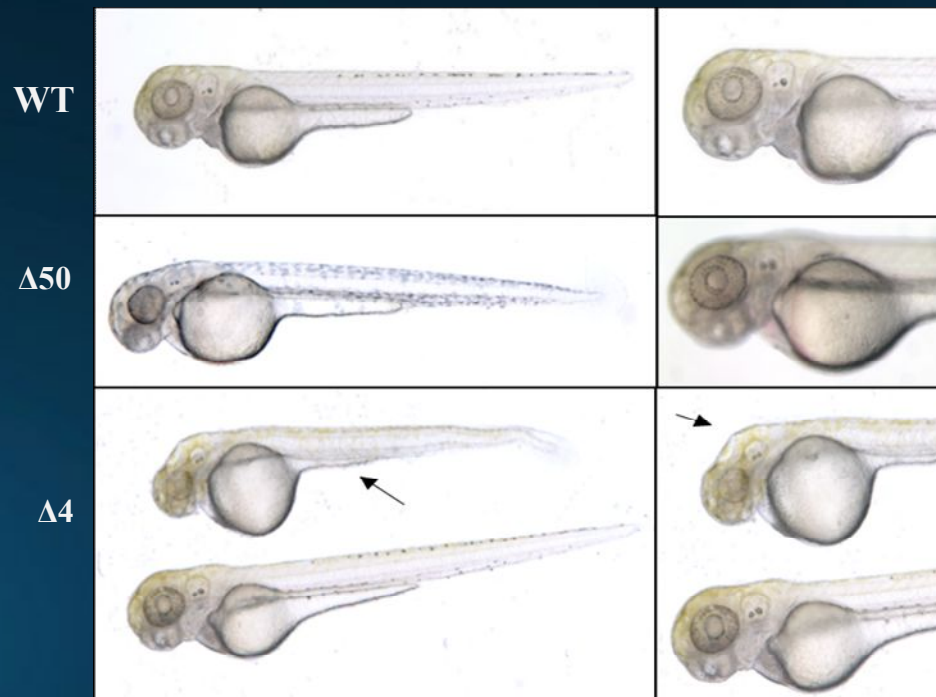


pank2 mutant fish validation



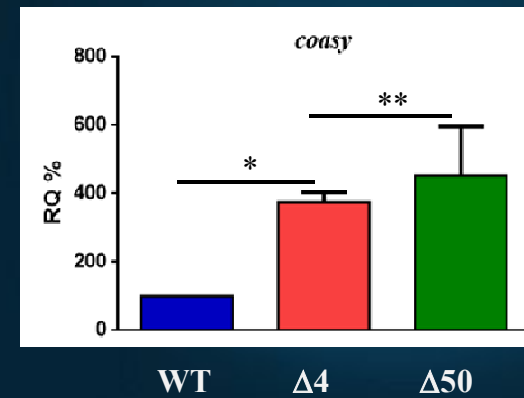
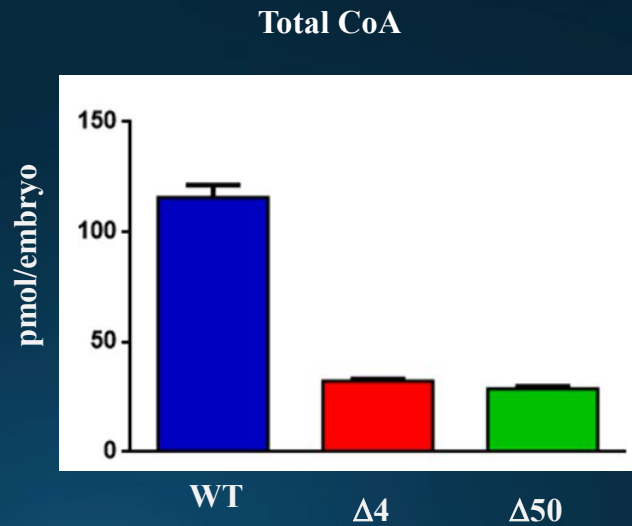
WB on Δ4 and Δ50 at 48 hpf

Caratterizzazione morfologica a 72 ore dopo la fecondazione



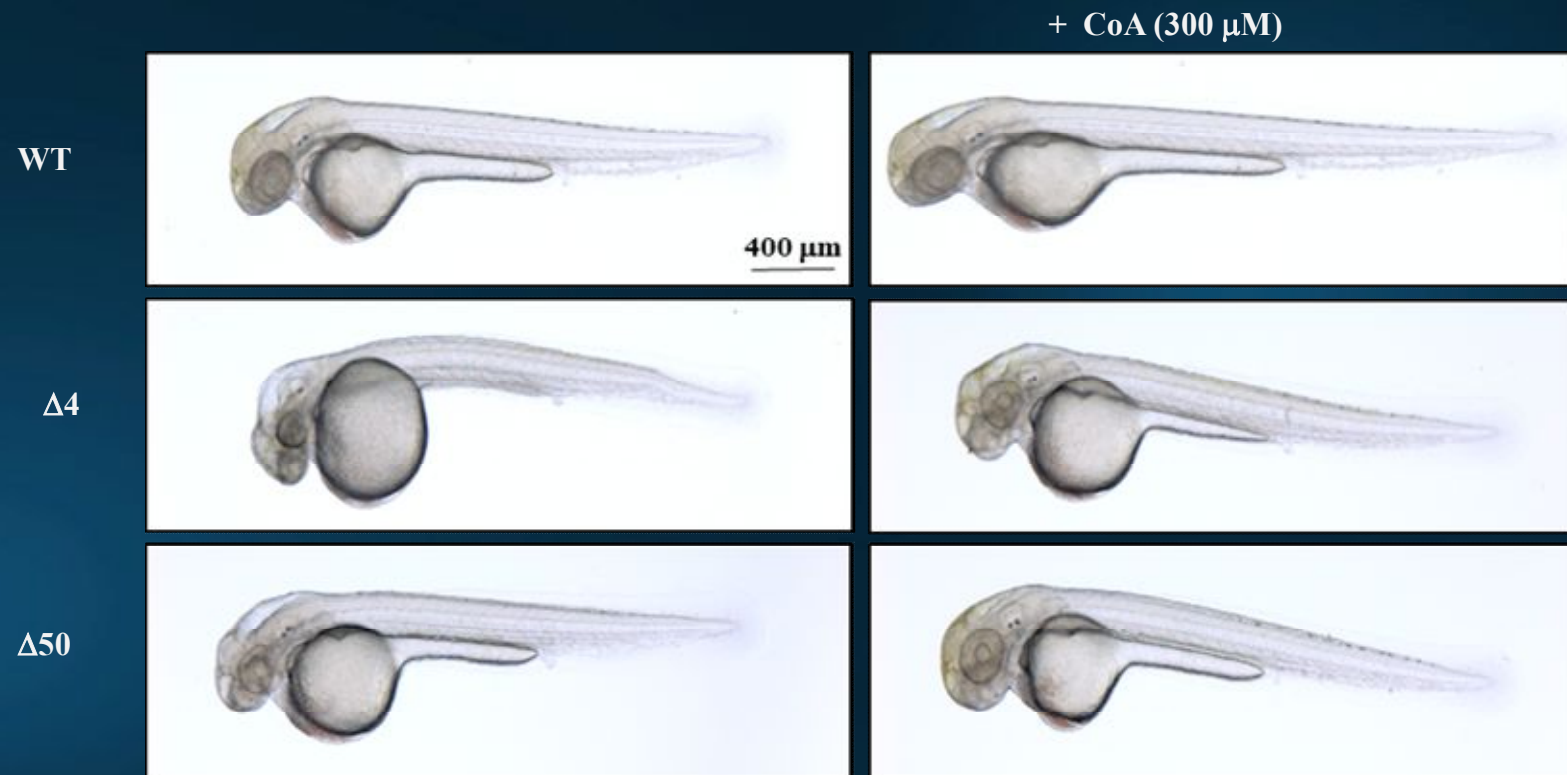
- **Δ4** 75% degli embrioni mostra alterazioni ed edema a livello del sistema nervoso centrale, ridotte dimensioni e alterato sviluppo antero-posteriore
- **Δ50** 2% degli embrioni mostra un edema a livello del sistema nervoso centrale

Dosaggio del CoA



- ➔ Embrioni *pank2*KO mostrano una significativa riduzione del contenuto totale di CoA
- ➔ Embrioni *pank2*KO mostrano una significativa induzione dell'enzima CoAsy

Trattamento con CoA e “rescue” del fenotipo

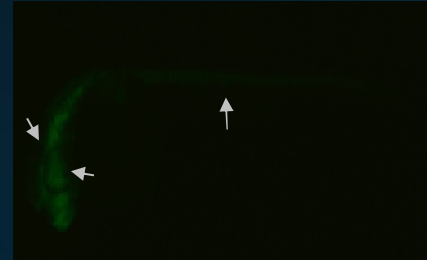
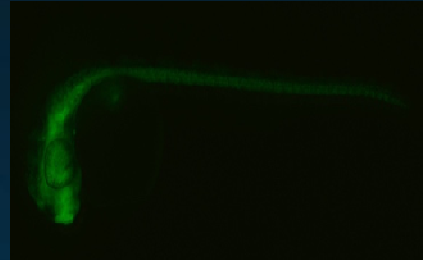


Il trattamento di embrioni mutanti *pank2*-KO (dopo 4 ore dalla fecondazione) con CoA (300uM) permette uno sviluppo normale e il «recupero» del fenotipo a livello del sistema nervoso centrale

Sviluppo neuronale

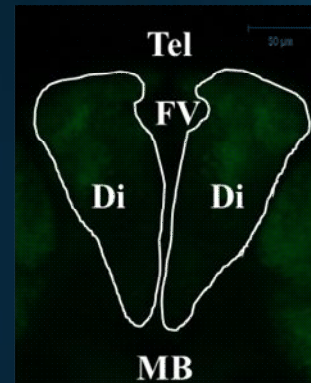
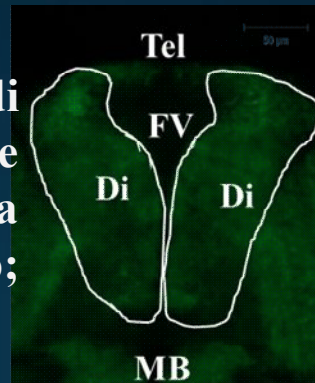
Tg(*neurod*:EGFP)

$\Delta 50$ /Tg(*neurod*:EGFP)

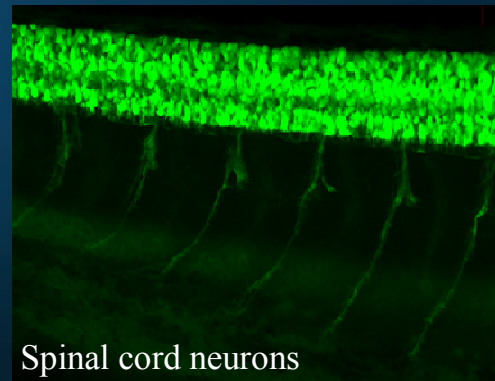


24 dopo la fecondazione

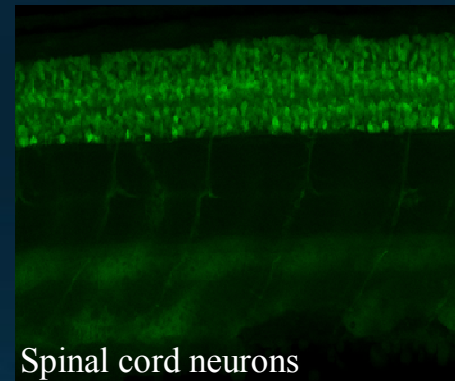
Riduzione significativa di cellule *neurod1*/EGFP positive in alcune aree del sistema nervoso centrale: telencefalo; mesencefalo e midollo spinale



48 dopo la fecondazione

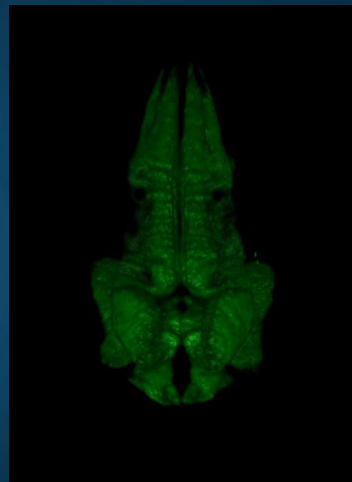
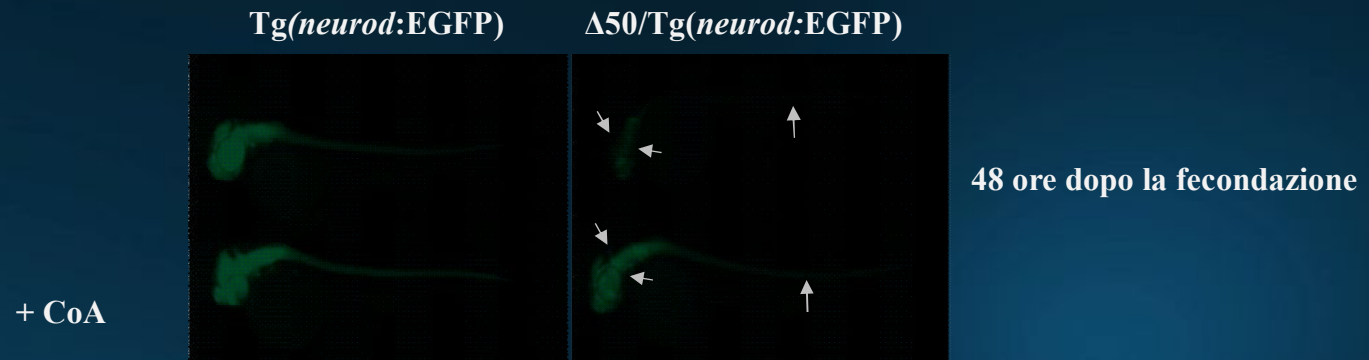


Spinal cord neurons

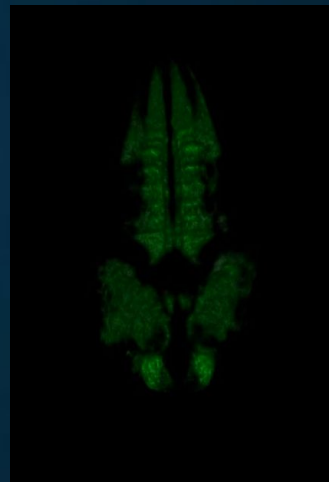


Spinal cord neurons

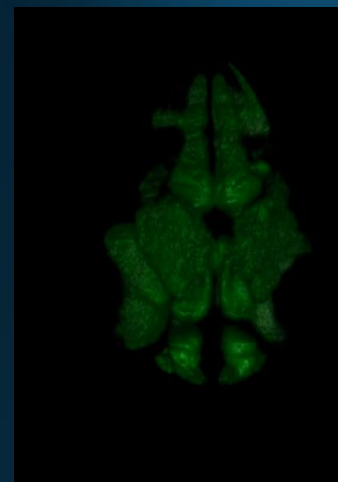
Sviluppo neuronale e rescue del fenotipo



WT



$\Delta 4$



$\Delta 4$ + CoA



Conclusioni e prospettive

- ➔ Sono state generate due linee mutanti omozigoti per il gene *pank2:Δ4* and *Δ50*.
- ➔ Il fenotipo delle linee mutanti conferma i dati ottenuti precedentemente con la tecnologia del morfolino. In particolare i mutanti mostrano difetti a livello del sistema nervoso centrale durante i primi stadi dello sviluppo embrionale
Ridotta espressione di neuroni dopaminergici (*neurod1*) e problemi associati al movimento
- ➔ L'aggiunta di CoA provoca un rescue del fenotipo e la correzione di malformazioni a livello del sistema nervoso centrale
- **Il modello animale zebrafish rappresenta quindi**
 - un buon modello per studiare il ruolo del CoA durante lo sviluppo embrionale in particolare durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale e i meccanismi patogenetici responsabili della patologia PKAN
 - un buon modello per lo studio di molecole con elevato potere terapeutico per la «cura» della patologia



Il gruppo di ricerca

UNIVERSITY OF BRESCIA

Dr Daniela Zizioli

Dr Deepak Khatri

Dr Akansha Trivedi

Dr Luca Mignani



UNIVERSITY OF PADOVA

Prof Natascia Tiso

Dr Nicola Facchinello

Funding: H&W Program UNIBS -- AISNAF -- Fondazione Camillo Golgi



Grazie per la vostra attenzione !