

Poster P.10.80

IMPLEMENTATION OF HUMAN NEURONAL CULTURES AND MOUSE MODELS OF PANTOTHENATE KINASE 2 DEFICIENCY TO INVESTIGATE PATHOGENIC MECHANISMS OF IRON-RELATED NEURODEGENERATION AND EVALUATE COENZYME A THERAPEUTIC EFFICACY

Santambrogio P.S.^[1], Di Meo I.^[2], Rubio A.^[1], Cavestro C.^[2], Ripamonti M.^[1], Carecchio M.^[3], Broccoli V.^[1], Taverna S.^[1], Tiranti V.^[2], **Levi S.*^[4]**

^[1]San Raffaele Scientific Institute ~ Milano ~ Italy, ^[2]IRCCS-Istituto C. Besta ~ Milano ~ Italy, ^[3]~ Milano ~ Italy, ^[4]Vita-Salute San Raffaele University ~ Milano ~ Italy

Pantothenate Kinase- and CoA synthase-associated neurodegeneration (PKAN and CoPAN) are inborn errors of CoA metabolism belonging to a wide spectrum of diseases characterized by brain iron accumulation (NBIA) (1). PKAN is caused by mutations in PANK2, encoding the mitochondrial pantothenate kinase 2 while CoPAN is due to mutation in COASY. To study these disorders we generated in vitro and in vivo models. We established two different neuronal models starting from PKAN iPSCs: 1) one enriched in glutamatergic neurons, 2) one producing striatal-like medium spiny neurons, with a prevalence of GABAergic neurons and a variable amount of astrocytes. EM on PKAN glutamatergic neurons demonstrated the presence of electron dense aggregates in mitochondria, which nature was defined as calcium phosphate by electron spectroscopic imaging. Impairment of calcium homeostasis was verified by monitoring the activity of calcium-dependent enzyme calpain1, calcium waves in neuronal cells, and voltage dependent calcium currents. Our data suggest a higher concentration of cytosolic calcium in PKAN neurons vs. controls. Interestingly, the presence of calcification in the internal globus pallidus was confirmed by brain CT scan of PKAN patients. While iron accumulation was not detected in glutamatergic neurons, data obtained on striatal-like cultures suggest iron deposition in cells resembling astrocytes. This result prompted us to optimize a technique to directly differentiate astrocytes from iPSCs. Both PKAN and CoPAN mature astrocytes resulted positive for iron content in the majority of cells. To investigate the role of COASY in vivo, we generated a Coasy mouse model using the Cre-loxP technology. Given the ubiquitous expression of Coasy and the central metabolic role of CoA, the constitutive Coasy KO mouse was embryonic lethal. To test the effect of Coasy ablation in the nervous system we generated two transgenic lines: one expressing Cre under the rat synapsin promoter (Syn1), and the other expressing Cre under the human glial fibrillary acid protein (hGFAP) promoter. The Syn1-KO Coasy mice showed a very severe phenotype with premature death at around day 15 and a smaller brain with a preserved structure. We observed that the Coasy protein was reduced by ~30% as compared to control and the level of acetylated tubulin was reduced as well. CoA measurement is currently in progress. Investigation of iron metabolism in these mice demonstrated an increased expression of ferritin light chain, which could indicate an increased presence of iron, but no evidence of iron accumulation using the specific Perls staining. Our in vitro models recapitulate the human phenotype of iron accumulation in basal ganglia. Most importantly, CoA supplementation during differentiation into striatal-like medium spiny neurons and astrocytes reduced significantly the formation of iron granules. The newly generated in vivo model will be further characterized and used to test CoA effect.

Sviluppo di modelli di cellule nervose umane e di modelli murini affetti da carenza di pantotenato chinasi-2 utili per lo studio dei meccanismi patogenetici di neurodegenerazione da accumulo di ferro e per valutare l'efficacia terapeutica del coenzima A.

La neurodegenerazione associata a difetti di pantotenato chinasi e CoA sintasi (PKAN e CoPAN) sono errori congeniti del metabolismo del CoA, appartenenti a un ampio spettro di malattie caratterizzate dall'accumulo di ferro nel cervello (NBIA). La PKAN è causata da mutazioni in PANK2, un gene che codifica per la pantotenato chinasi 2 mitocondriale, mentre CoPAN è dovuto a mutazioni nella CoA sintasi (COASY). Per studiare questi disturbi abbiamo generato modelli in vitro e in vivo. Abbiamo ottenuto due diversi modelli neuronali differenziando iPSC da pazienti PKAN in neuroni glutamatergici e in neuroni simil-striatali, con una prevalenza di neuroni GABAergici e una quantità variabile di astrociti. La microscopia elettronica sui neuroni glutamatergici di PKAN ha dimostrato la presenza di aggregati nei mitocondri composti da fosfato di calcio. L'alterazione dell'omeostasi del calcio è stata verificata studiando l'attività calcio-dipendente dell'enzima calpain1, le dinamiche di calcio citoplasmatico nelle cellule neuronali e le correnti di calcio voltaggio-dipendenti. I risultati suggeriscono una maggiore concentrazione di calcio citosolico nei neuroni PKAN rispetto ai controlli. La presenza di calcificazioni nel cervello di pazienti PKAN è stata confermata dalla TAC. Mentre l'accumulo di ferro non è stato rilevato nei neuroni glutamatergici, nelle colture simil-striatali abbiamo osservato la deposizione di ferro in cellule astrocitarie. Per studiare il ruolo di COASY in vivo, abbiamo generato modelli di topo Coasy utilizzando la tecnologia Cre-loxP. Data l'espressione ubiquitaria di Coasy e il ruolo cruciale del CoA, il topo Coasy KO costitutivo era letale embrionale. Per testare l'effetto dell'ablazione del gene nel sistema nervoso abbiamo generato due linee transgeniche: una esprime Cre sotto il promotore della sinapsina di ratto (Syn1) e l'altra esprime Cre sotto il promotore della proteina acida fibrillare della glia (hGFAP). I topi Syn1-KO Coasy hanno mostrato un fenotipo molto grave caratterizzato da: morte prematura al giorno 15; un cervello più piccolo del controllo ma ben preservato; una riduzione del 30% della proteina Coasy rispetto al controllo; un livello di tubulina acetilata ridotto rispetto al controllo. Lo studio del metabolismo del ferro ha dimostrato una maggiore espressione della ferritina-L, che potrebbe indicare una maggiore presenza di ferro sebbene non abbiamo osservato accumulo di ferro usando la specifica colorazione di Perls. Abbiamo quindi sviluppato i primi modelli in vitro che ricapitolano il fenotipo umano. Inoltre, l'aggiunta di CoA durante la differenziazione neuronale/astrocitaria ha ridotto significativamente la formazione dei granuli di ferro.

(1) Levi S, Tiranti V. Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders: Valuable Models Aimed at Understanding the Pathogenesis of Iron Deposition. *Pharmaceuticals* (Basel). 2019 Feb 9;12(1). pii: E27. doi: 10.3390/ph12010027.

Neurodegenerazione associata a pantotenato chinasi (PKAN) e Neurodegenerazione associata alla proteina COASY (CoPAN)

Coordinator: Sonia Levi

Partners: Vania Broccoli, Stefano Taverna, Valeria Tiranti

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

Telethon Project (nr):

GGP16234

Disease Name:

PKAN and CoPAN

Keywords:

neurodegeneration, iron, mitochondria