



Finanziato dall'Unione
europea
NextGenerationEU



Università
degli Studi
di Ferrara

Borsa di Studio finanziata da fondi PNRR ex DM 351 del 09.04.2022

Missione 4, componente 1, linea di investimento 4.1

Estensione del numero di dottorati di ricerca e dottorati innovativi per la pubblica amministrazione e il patrimonio culturale

Dottorati PNRR

Tematica di ricerca

ITALIANO

BDNFISH: Analisi delle funzioni e dei meccanismi molecolari di **Brain-Derived Neurotrophic Factor** in un modello zebrafish mutante.

INGLESE

BDNFISH: Analysis of functions and molecular mechanisms of **Brain-Derived Neurotrophic Factor** in a zebrafish mutant model.

Dottorato di Ricerca

Scienze della Vita e Biotecnologie

Ciclo di dottorato: XXXVIII

Tipologia di Impresa e mesi frequenza obbligatoria (se previsto)

Non previsto come da bando dottorati PNRR.

Mesi frequenza obbligatoria all'estero

Mesi 6 – Presso Karlsruhe Institute of Technology (D).

Obiettivi generali della ricerca

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) è una neurotrofina che svolge un ruolo fondamentale nella differenziazione, sopravvivenza e crescita neuronale, nonché nei meccanismi molecolari di apprendimento come plasticità sinaptica e rilascio di neurotrasmettitori. Alterazioni nella produzione di BDNF sono tra le cause di neuropatologie come insonnia, disturbi da stress, demenza e declino cognitivo. Inoltre, dati sperimentali indicano che trattamenti con BDNF esogeno possano fornire terapie per compensare i sintomi di tali patologie.

Le informazioni attualmente disponibili sulle funzioni molecolari di BDNF derivano da studi sui modelli murini, ma sono limitate a causa della precoce mortalità dei mutanti omozigote (*bdnf*^{-/-}). Considerato che BDNF ha elevati livelli di omologia nelle diverse classi di vertebrati (es. >90% omologia tra pesci e mammiferi), lo sviluppo di modelli non-mammiferi potrebbe fornire strumenti per l'avanzamento delle conoscenze su questa neurotrofina.

Applicando la tecnologia CRISPR/cas9 allo zebrafish, abbiamo generato il primo modello vertebrato mutante omozigote per *bdnf* vitale (D'Agostino et al., *iScience*, 2022, 25:104054) e realizzato la sua caratterizzazione relativa a trascrittoma, cognizione e comportamento. Questi dati preliminari indicano deficit comportamentali (ansia, sonno) e cognitivi (apprendimento, funzioni esecutive) del mutante *bdnf*^{-/-} che supportano l'omologia funzionale di BDNF tra zebrafish e uomo.

Scopo del progetto BDNFISH è formare un dottorando allo studio del modello zebrafish *bdnf*^{-/-} utilizzando un approccio multidisciplinare 'dai geni al comportamento'.

BDNFISH sfrutterà il modello zebrafish per investigare *in vivo* il ruolo di BDNF:

- 1) nei deficit di apprendimento e memoria;
- 2) nella risposta allo stress e comportamenti d'ansia;
- 3) nello sviluppo e nella plasticità neuronale di aree del cervello collegate ai processi cognitivi;
- 4) nello sviluppo della retina e nella capacità di percezione della luce;
- 5) nella sincronizzazione comportamentale (es. sonno e ritmi di attività) all'alternanza giorno/notte.



Finanziato dall'Unione
europea
NextGenerationEU



Università
degli Studi
di Ferrara

Inoltre, si deriveranno modelli *in vitro* a partire dai tessuti di zebrafish mutanti consistenti in linee cellulari e culture organotipiche che permetteranno di studiare nel dettaglio i pathways molecolari di BDNF e condurre i primi saggi neurofarmacologici.

Nell'ambito del progetto BDNFISH, il dottorando apprenderà dunque moderne tecniche comportamentali (test su apprendimento, memoria, funzioni esecutive, ansia, ritmicità circadiane), neurobiologiche (plasticità neuronale *in vitro*), molecolari (analisi di espressione genica e proteica) e cellulari (istologia, ISH e immunocitochimica).

BDNFISH risulta coerente con la tematica 12 Neuroscienze e Neurofarmacologia e nello specifico con la traiettoria che prevede lo sviluppo e la caratterizzazione in modelli animali per lo studio di pathways molecolari la cui alterazione è legata all'insorgenza di patologie neuronali. Lo sviluppo di modelli *in vitro* previsto da BDNFISH, oltre a rispondere alla richiesta sempre più pressante di modelli alternativi a quelli *in vivo*, fornirà utili strumenti per studi neurofarmacologici in BDNF. L'originalità e l'impatto di BDNFISH in relazione alla tematica 12 risiedono in primis nell'unicità del modello a nostra disposizione (mutante KO omozigote *bdnf* vitale), che permetterà di acquisire conoscenza fondamentale per comprendere le funzioni di BDNF nell'uomo e contrastare le neuropatologie ad esso correlate.

Un ulteriore pregio di BDNFISH è il rafforzamento di un network di collaborazioni nazionali e internazionali che permetteranno il raggiungimento di elevata interdisciplinarietà e intersettorialità. Il dottorando sarà inserito in uno stimolante gruppo di ricerca che comprende, oltre al team UniFE, la Scuola Normale Superiore di Pisa (Prof. Alessandro Cellerino, neurogenesi e plasticità neuronale) e la Stazione Zoologica di Napoli (Dr. Salvatore D'Aniello, sviluppo dei sistemi fotorecettivi). Inoltre, il dottorando svolgerà un periodo all'estero di 6 mesi presso i laboratori del Karlsruhe Institute of Technology (Prof. Nicholas Foulkes) dove svilupperà le linee cellulari primarie ed eseguirà saggi con geni reporter. In questo ambito, il dottorato avrà la possibilità di partecipare nelle diverse sedi ad attività seminariale e corsi formativi (es. International Zebrafish Medaka Course) per accrescere le proprie competenze complementari in diversi ambiti.

Si prevede che BDNFISH permetterà di pubblicare almeno 6 articoli scientifici su riviste internazionali specializzate in neuroscienze o su riconosciute riviste di biologia generale (*dissemination*). La rapidità ed efficienza di questa disseminazione è assicurata dall'intensa attività di pubblicazione del proponente e del gruppo di ricerca (più 10 articoli su riviste internazionali per anno). Si priorizzerà la pubblicazione con modalità open-access e i dati supportanti gli articoli verranno resi pubblici su appositi repository (es. Dryad), in linea con i principi di "Open science" e "Fair data". Ulteriori comunicazioni scientifiche in forma di poster e presentazioni orali verranno effettuate dal team di ricerca e dal dottorando presso convegni nazionali e internazionali. L'attività di divulgazione (*public engagement*) verrà effettuata tramite ufficio stampa UniFE, social media (es. twitter accounts), siti web del progetto e del gruppo di ricerca.

English version:

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a protein with a key role in neuronal differentiation, survival, and growth, as well as in the molecular mechanisms underlying learning such as synaptic plasticity and neurotransmitter release. Alterations in BDNF production have been linked to several neuropathologies including insomnia, stress disorders, dementia and cognitive decline. Moreover, pre-clinical research suggests that treatment with exogenous BDNF might contrast the symptoms of these neuropathologies.

Our current knowledge on the molecular functions of BDNF mostly derives from studies on rodent models. However, research in this taxon is limited by the fact that homozygous mutants (*bdnf*^{-/-}) display early mortality. Considering that BDNF sequence shows high homology across the different groups of vertebrates (e.g., >90% between teleost fish and mammals), the development of non-mammalian models is considered a critical step for research advancement.

Applying the CRISPR/cas9 technology in zebrafish, we generated the first vital *bdnf* homozygous mutant in a vertebrate (D'Agostino et al., *iScience*, 2022, 25:104054). Our preliminary characterisation of the mutant focussing on transcriptome, behaviour, and cognition supported the functional homology between zebrafish and human BDNF. The *bdnf*^{-/-} mutant zebrafish display a set of deficits, compared to the wild-type control, involving behaviour (sleep, anxiety) and cognition (learning, executive functions).

The aim of BDNFISH will be to study the zebrafish *bdnf*^{-/-} model with a multidisciplinary approach from genes to behaviour, ultimately training the PhD candidate for high-quality research on animal and *in vitro* models.

In detail, BDNFISH will exploit the zebrafish model to analyse *in vivo* the role of BDNF:

- 1) in learning and memory deficits;
- 2) in stress responses and anxiety-like behaviour;



Finanziato dall'Unione
europea
NextGenerationEU



Università
degli Studi
di Ferrara

- 3) in neuronal and developmental plasticity of brain areas connected to cognitive control;
- 4) in retinal development and light perception;
- 5) in the behavioural synchronisation to day/night alternation (sleep and activity rhythmicity).

Moreover, BDNFISH will implement *in vitro* models of mutant zebrafish tissues consisting in cellular lines and organotypic cultures; these models will allow the PhD candidate to investigate in detail the molecular pathways of BDNF and conduct neuropharmacological assays.

During the BDNFISH project, the PhD candidate will be trained to apply state-of-the-art assays for behaviour (e.g., tests for learning, memory, executive functions, anxiety, and circadian rhythmicity), neurobiological (e.g., neuronal plasticity and survival), molecular (e.g., analysis of gene expression), and cellular research (e.g., histology, ISH and immunohistochemistry).

BDNFISH aligns with the 'tematica 12' of PNRR PhD program in Neurosciences and neuropharmacology, with particular emphasis on the trajectory that supports the development and characterisation of animal models for the study of molecular pathways related to neuronal pathologies. The development of *in vitro* models in BDNFISH will achieve the two-fold aim of providing alternatives to *in vivo* models and permitting new tools for neuropharmacological research. The originality and the impact of BDNFISH in the light of PNRR 'tematica 12' are intrinsically linked to the unique model available at our laboratory (a vital *bdnf* homozygous KO mutant): this model will produce significant knowledge advancement on the functions of BDNF that can be applied to humans to understand and contrast relevant neuropathologist.

An additional strength of BDNFISH is the improvement of existing networks of national and international collaborations that will increase interdisciplinarity of our research. The PhD will be part of a stimulating research team that includes, beside the personnel at UniFE, the Scuola Normale Superiore of Pisa (Prof. Alessandro Cellerino, expert in neurogenesis and neuronal plasticity) and Anton Dohrn Zoological station in Naples (Dr. Salvatore D'Aniello, expert in the development of photoreceptive systems). Furthermore, the PhD candidate will spend a research period of 6 months at the laboratories of Prof. Nicholas Foulkes, Karlsruhe Institute of Technology, to develop the cellular lines and conduct assays with reporter genes. The PhD will participate to didactic activities and seminars conducted in the aforementioned institutes (e.g., International Zebrafish-Medaka course), further expanding her/his complementary research skills.

We expect that BDNFISH research will allow us to publish at least 6 scientific papers in interactional neurosciences or general biology journals (dissemination). The timing of this dissemination is ensured by the intense publication activity of the supervisor and its research team (more than 10 papers per year). We will prioritise publication with open-access modality and the data supporting the papers will be made publish via repositories (e.g., Dryad) in line with the principles of "Open science" and "Fair data".

The PhD candidate and the rest of the team will perform further scientific communications in form of posters and oral presentations at national and international conferences. Last, the team will conduct and intense divulgation activity (public engagement) via the press office of UniFE, social media (e.g., twitter), website of the project and the research group.

Impatto in relazione a uno o più dei seguenti fattori: (i) miglioramento della sostenibilità ambientale; (ii) accelerazione di processi di trasformazione digitale; (iii) promozione dell'inclusione sociale

Il concetto 3Rs (replacement, reduction and refinement) è uno dei principi cardine della Regolamentazione Europea sulla Sperimentazione Animale ed è ritenuto fondamentale alla riduzione dell'impatto ambientale della ricerca traslazionale. In quest'ottica, i ricercatori sono tenuti a sviluppare nuovi modelli animali basati su specie con ridotto sviluppo neurologico e qualora possibile sostituire modelli animali con sperimentazione *in vitro*. BDNFISH si prefigge di aumentare la sostenibilità della ricerca da entrambi questi punti di vista, ottenendo metodi alternativi a quelli basati su specie altamente senzienti e sugli animali in genere. Si svilupperanno modelli su una specie di pesce teleosteo, appartenente quindi al gruppo di vertebrati con minore complessità del sistema nervoso, incluse le fasi larvali che sono considerate un'estensione a vita libera della fase embrionale in questa specie. L'applicazione di New Approach Methodologies (NAMs) basate su metodi *in vitro* prevista dal presente progetto risulta interessante per ridurre la dipendenza della ricerca traslazionale dalle specie animali. Per esempio, culture cellulari e tissutali *in vitro* e uso di embrioni di zebrafish sono metodologie riconosciute come fondamentali per lo studio di sistemi biologici e le loro reazioni a farmaci, droghe ed inquinanti ambientali. A questo scopo, si svilupperanno culture primarie/stabilizzate di cellule e di organoidi derivati dal modello mutante, consentendo di studiare in dettaglio i meccanismi molecolari delle neurotrofine e condurre test farmacologici. Tutte queste accortezze contribuiranno a diminuire l'impatto ambientale, sulla salute e sul benessere degli animali della ricerca neuroscientifica.



Finanziato dall'Unione
europea
NextGenerationEU



Università
degli Studi
di Ferrara

English version:

The replacement, reduction and refinement (3Rs) of the use of animals in research is one of the cardinal principles in the EU Animal Research Regulations, and is expected to achieve greater environmental sustainability of translational research. Researchers are required to develop new models based on species with low development of nervous system and approaches alternative to animal-based experiments. Accordingly, BDNFISH has the ambition to improve environmental sustainability by developing alternatives to the research use of highly sentient species and animals in general. First, the project will be based on a species belonging to the group of vertebrates with lower nervous system development; most of the data will be collected in larvae, which in this species are considered a post-hatching extension of the embryonic stage. In this framework, also our application of New Approach Methodologies (NAMs) based on *in vitro* models hold great promises in providing useful information to reduce the current reliance on animal tests and to predict human responses better than with animal models. For instance, *in vitro* cell or tissues cultures and zebrafish embryo assays are well-recognized methodologies to investigate how pharmaceuticals and environmental chemicals interact with biological systems or to study the efficacy of new drugs. For this aim, the project will develop primary/stabilized cell lines and organotypic cultures from *bdnf* null mutant to study in detail molecular pathway of the neurotrophin and to carry out the neuropharmacological assays. Overall, this approach will contribute to reduce the impact of neuroscientific research on the environment and the animal welfare.