



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**“FEDERICO II”**



**Tesi di Dottorato**

**Generation and characterization of BDNF**

**knock-out in zebrafish by CRISPR/Cas9 system**

**Coordinatore**  
Prof. Giuseppe  
Cringoli

**Candidato**  
Dott.ssa Ylenia  
D'Agostino

**Tutor**  
Dott. Salvatore  
D'Aniello

## **Abstract**

BDNF is one of the main neurotrophin (NT) expressed in the brain as well in some peripheral sensory neurons. The important role played by BDNF is demonstrated by its well-established effects on axon growth, synaptic plasticity and, not less important, in processes of learning and memory. Moreover, BDNF is becoming a valid candidate for treatment of neurodegenerative disorders such as epileptic seizures, anxiety and depression or Alzheimer's and Parkinson's diseases. However, unless the huge number of studies performed about its role, some points remain controversial and the whole scenario is still far from be fully delineated.

Most of the information we currently have about BDNF function derives from studies in mice but, in this case, the major obstacle is represented by the early postnatal lethality of BDNF<sup>-/-</sup> and, as consequence, all the results are limited to BDNF<sup>+/-</sup> animals.

The main objective of this PhD thesis was the generation of a BDNF knock-out line in zebrafish through the CRISPR/Cas9 technology and the characterization of the mutant phenotype from both molecular and behavioural points of view.

My results show that zebrafish BDNF<sup>-/-</sup>, unlike from what happens in mouse, survives after birth with undetectable levels of BDNF protein and does not present any mutation in

undesirable off-target gene. Behavioural test through larvae monitoring reveals a significantly lower activity, suggestive of reduced exploratory behaviour, while several anomalies such as aberrant pharyngeal arches formation or increasing of apoptotic cells underline the complex role played by BDNF and its implication in a variety of biological processes. Differential transcriptomic analysis between mutant and wild type has been also performed in order to identify downstream target gene regulated by BDNF. The ongoing analysis of the RNA-Seq data will provide new insights on the role played by BDNF during the development of the nervous system. Finally, the zebrafish knock-out line also provides a promising tool in terms of diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases in which this important NT is implicated.

## Abstract in italiano

BDNF è una delle principali neurotrofine (NT) espresse nel cervello e in alcuni neuroni sensoriali periferici. L'importante ruolo svolto da BDNF è dimostrato dai suoi ormai affermati effetti sulla crescita degli assoni, la plasticità sinaptica e, non meno importante, nei processi di apprendimento e memoria. Inoltre, BDNF sta diventando un valido candidato per il trattamento di patologie neurodegenerative, come crisi epilettiche, ansia, depressione o i morbi di Alzheimer e di Parkinson. Tuttavia, nonostante i numerosi studi effettuati, alcuni punti restano ancora da chiarire e l'intero scenario è tuttora lontano dall'essere pienamente delineato.

A oggi, gran parte delle informazioni disponibili circa la funzione di BDNF deriva da studi su topo ma in questo caso l'ostacolo maggiore è rappresentato dalla mortalità precoce dei topi  $BDNF^{-/-}$  e, di conseguenza, tutti i risultati ottenuti sono limitati agli animali  $BDNF^{+/-}$ .

L'obiettivo principale di questa tesi è stato quello di generare una linea knock-out di BDNF in zebrafish attraverso la tecnologia CRISPR/Cas9 e di caratterizzare il fenotipo mutante sia dal punto di vista molecolare che comportamentale.

I miei risultati dimostrano che zebrafish  $BDNF^{-/-}$ , diversamente da quanto accade nel topo, sopravvive dopo la nascita in assenza della proteina BDNF e non presenta alcuna mutazione in altri geni off-target. Test comportamentali, attraverso il monitoraggio della locomozione delle larve, rivelano un'attività dei pesci mutanti significativamente più bassa, indicativa di una ridotta capacità esplorativa. Inoltre diverse anomalie come l'alterata formazione degli archi faringei o l'aumento di cellule in apoptosi sottolineano il complesso ruolo svolto da BDNF e la sua implicazione in numerosi processi biologici. Per identificare eventuali geni bersaglio a valle di BDNF è stato effettuato un esperimento di trascrittomica differenziale tra wild type e mutanti. L'analisi in corso dei dati di RNA-Seq fornirà una nuova visione sul ruolo svolto da BDNF durante lo sviluppo del sistema nervoso.

Infine, questa linea knock-out di zebrafish potrebbe fornire uno strumento valido in termini di diagnosi e cura delle malattie neurodegenerative in cui questa importante neurotrofina è implicata.