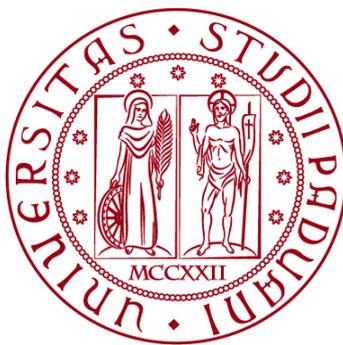


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Utilizzo di *C. elegans* per la caratterizzazione di varianti  
di significato non noto in geni malattia**

**Tutor: Prof.ssa Eva Trevisson**

**Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino**

**Co-tutor: Dott.ssa Elena Tacchetto**

**Laureanda: Sofia Milani**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



# INDICE

1. Abstract .....	4
2. Stato dell'Arte: introduzione al problema biologico .....	5
2.1 Le cilia.....	5
2.2 Le ciliopatie.....	6
2.3 La superfamiglia delle chinesine e KIF3B .....	7
2.4 Modelli di studio utilizzati.....	8
3. Scopo dello studio .....	9
4. Approccio sperimentale.....	10
4.1 Organismo modello: <i>C. elegans</i> .....	10
4.1.1 Ciclo vitale.....	11
4.1.2 Svantaggi di <i>C. elegans</i> .....	11
4.1.3 Affinità anatomiche .....	11
5. Materiali e Metodi.....	12
5.1 Crescita e mantenimento di <i>C. elegans</i> .....	12
5.1.1 Piastre di coltura.....	12
5.1.2 Inoculi di <i>E. coli</i> .....	13
5.1.3 Mantenimento di <i>C. elegans</i> .....	14
5.1.4 Crioconservazione di <i>C. elegans</i> .....	14
5.1.5 Sincronizzazione di colture di <i>C. elegans</i> .....	16
5.2 Saggi fenotipici svolti.....	17
5.2.1 Chemotassi con NaCl.....	17
5.2.2 <i>Dye-filling</i> .....	18
6. Risultati e discussione.....	19
6.1 Effetti delle mutazioni sulla chemotassi.....	19
6.2 Effetti delle mutazioni a livello morfologico e strutturale .....	21
6.3 Discussione e Conclusioni.....	24
7. Bibliografia e Sitografia .....	25

## 1. Abstract

Il presente elaborato si concentra sulla caratterizzazione di nuove varianti genetiche possibili candidate come cause delle ciliopatie. Le mutazioni sono state individuate a livello del gene *KIF3B* e, mediante l'utilizzo dell'organismo modello *C. elegans*, sono stati svolti due saggi fenotipici con l'obiettivo di valutare le modificazioni e la compromissione della funzione e della formazione delle ciglia.

Al fine di contestualizzare la ricerca effettuata, si propone una descrizione delle ciliopatie, sindromi dal fenotipo molto eterogeneo che possono interessare diversi organi e che possono essere causate da una o più mutazioni in geni codificanti proteine ciliari.

L'organismo modello scelto per il presente studio è stato ritenuto molto affidabile per applicazioni simili, visti i numerosi vantaggi che offre e la facilità di manipolazione genetica e di mantenimento. Per la realizzazione dei saggi di chemotassi e di *dye-filling* sono stati creati ceppi mutanti di *C. elegans* mediante l'utilizzo della tecnica di editing genetico CRISPR-Cas9, procedendo poi all'analisi dei risultati ottenuti.

Gli esiti acquisiti hanno evidenziato modifiche rilevanti sia a livello comportamentale che strutturale nelle linee mutanti, dimostrando come queste mutazioni possano essere cruciali per il funzionamento ciliare oltre che neuronale in *C. elegans*. In sintesi lo studio fornisce prove convincenti che queste varianti genetiche possano contribuire alle ciliopatie, ponendo le basi per ulteriori approfondimenti. Questi risultati potrebbero avere implicazioni importanti per la comprensione delle ciliopatie e per lo sviluppo di potenziali strategie terapeutiche.

## 2. Stato dell'Arte: introduzione al problema biologico

### 2.1 Le cilia

Le cilia sono estroflessioni della superficie cellulare di lunghezza variabile (1-9  $\mu\text{m}$ ), presenti in quasi tutte le cellule degli organismi vertebrati, con diverse funzioni importanti per la fisiologia e lo sviluppo della cellula. Esse sono formate da uno scheletro di microtubuli disposti radialmente, definito assonema ciliare, che è fermamente ancorato ad un corpo basale, rappresentato da un centriolo specializzato con funzione di centro per l'organizzazione dei microtubuli. Questa struttura, formata da 9 doppietti periferici di microtubuli che si dipartono dal corpo basale e si estendono per tutta la lunghezza del ciglio, accomuna sia le ciglia motili che quelle non-motili. Tuttavia, esse si differenziano per la presenza, nelle cilia motili, di un'ulteriore coppia centrale di microtubuli (definiti singoletti). Questi 2 microtubuli singoletti aggiuntivi sono rinforzati da ponti di nexina ed una struttura funzionale alla motilità di queste estroflessioni costituita da bracci di dineina e raggi radiali, che consentono il movimento ritmico mediante l'idrolisi di ATP [1]. Questo spiega il ruolo delle cilia motili nella locomozione di organismi unicellulari o pluricellulari, sebbene esse svolgano anche funzioni diverse quali chemosensoriali, osmosensoriali e di fototrasduzione. Le cilia non-motili o primarie sono, invece, funzionali alla trasduzione di segnali sia extracellulari che intercellulari tra cellule adiacenti.

Come sopraccitato, tutte le cilia originano da corpi basali, ossia strutture costituite da una coppia di centrioli formati attorno a 9 triplette di microtubuli disposti radialmente e carenti di coppie centrali. Dei 3 microtubuli costituenti la tripletta, poi, due di essi espandendosi giungono nel segmento prossimale collegandosi alla membrana ciliare e formano la cosiddetta zona di transizione. Questi compartimenti del ciglio hanno un ruolo fondamentale nella ciliogenesi, perché responsabili della formazione dell'impalcatura dei microtubuli e del coordinamento del traffico ciliare di vescicole e organelli.

In particolare, a partire dal corpo basale, le cilia si assemblano grazie alla funzione del complesso BBSome (proteine della sindrome di Bardet-Biedl) e di proteine di trasporto intraflagellare (IFT) che si avvalgono di due proteine motrici associate ai microtubuli denominate chinesine e dineine [2]. Attraverso questo sistema, i componenti, tra cui  $\alpha$ -/ $\beta$ -tubulina che formeranno l'assonema ciliare, vengono condotti mediante trasporto anterogrado lungo la stessa struttura in formazione dalla proteina chinesina-II. Quest'ultima è un complesso eterotrimerico ed è a sua volta composta da 2 subunità motorie (KIF3A e KIF3B) ed una non motoria definita proteina associata alla chinesina (KAP). Le dineine, al contrario, si occupano generalmente del riciclo di proteine lungo l'assonema e verso il corpo basale svolgendo un trasporto retrogrado.

Risulta quindi evidente come eventuali malfunzionamenti delle proteine IFT o di altre costituenti il corpo basale delle cilia comportino alterazioni del loro assemblaggio e del loro funzionamento, correlate all'insorgenza di ciliopatie.

## 2.2 Le ciliopatie

Il termine ciliopatie fa riferimento a un insieme di disturbi associati a mutazioni genetiche che portano alla codifica di proteine non perfettamente funzionanti che avranno come conseguenza anomalie nella formazione, funzione o biogenesi delle cilia. Vista la presenza di queste componenti ciliari in moltissime cellule, le condizioni patologiche correlate possono presentarsi con una grande varietà di sintomi, tra cui: degenerazione della retina, malattie renali e anomalie a livello cerebrale. Nei distretti appena citati, la malattia può presentare fenotipi con gravità differente a seconda della mutazione e/o della quantità di proteine aberranti e specie se caratterizzata da varianti in più di un gene ciliare, potrà influenzare anche l'età di comparsa di suddetta patologia.

Generalmente le ciliopatie si considerano malattie monogeniche, nonostante ci siano prove che testimoniano che il fenotipo subisca anche l'influenza della componente ambientale. Negli ultimi anni il numero delle ciliopatie identificate è in aumento e risultano associati a queste patologie quasi 200 geni già noti e molti altri sono ancora sottoposti a studi data la loro associazione con la ciliogenesi o con le funzioni ciliari [1].

Le ciliopatie possono essere suddivise in 2 principali sottocategorie: ciliopatie mobili e primarie. Entrambe portano a distruzione del cilio ed hanno in comune alcuni geni causali. Analizzando però il loro aspetto clinico, si è osservato che mentre le prime sono correlate per lo più a patologie polmonari, difetti nella fertilità o problemi nell'organogenesi (come l'inversione della lateralità degli organi o *situs inversus*), le ciliopatie primarie, invece, sono più gravi perché responsabili di sindromi pleiotropiche che coinvolgono più organi diversi. Queste differenze si ricollegano alla diversità strutturale e funzionale tra cilia motili e non-motili [2].

Ad esempio, l'alterazione della motilità delle cilia comporta quasi esclusivamente una ciliopatia mobile, denominata discinesia ciliare primaria (PCD). È una patologia ereditaria autosomica recessiva e può avere diverse complicanze, tra cui *situs inversus*, bronchite cronica, sinusite e infertilità maschile. Altri sintomi meno diffusi possono riguardare infertilità nella donna, predisposizione a cefalea e idrocefalo. Come altre ciliopatie, anche la PCD presenta un'elevata eterogeneità genetica e sono collegati alle stesse manifestazioni sindromiche almeno 37 loci disgiunti. Gli effetti di queste varianti patologiche sono relativi alla compromissione della formazione e/o funzione della proteina motrice dineina, implicata nel trasporto intracellulare e nella motilità delle cilia [3].

Mutazioni nelle cilia non-motili possono causare invece ciliopatie sensoriali, che hanno come oggetto variazioni nella funzionalità sensoriale o di segnalazione delle cilia (ad esempio mancanza di componenti di vie di trasduzione del segnale ciliare). Difetti di questo genere possono essere presenti, ad esempio, nella retina umana, dove cellule fotorecetrici funzionali alla vista presentano proteine specializzate nella fototrasduzione. Il fotorecettore in questo caso è un componente del cilio, che rappresenta non solo il sito di captazione del segnale ma anche il punto di origine della trasmissione di informazioni all'interno. Anomalie nella segnalazione ciliare

a livello oculare possono portare alla degenerazione retinica, anche nota come retinite pigmentosa (RP), tipico esempio di ciliopatia [3].

### **2.3 La superfamiglia delle chinesine e KIF3B**

La superfamiglia delle chinesine (KIF) è coinvolta nei meccanismi di trasporto lungo i microtubuli di proteine, lipidi, vescicole o RNA tra i diversi organelli o tra complessi proteici costituenti le cellule eucariotiche. Ci sono svariate sottofamiglie di KIF, tra le quali KIF3 rappresenta una tra le espressioni più comuni. Questa proteina, anche nota come chinesina-II, è costituita da 2 catene polipeptidiche: KIF3A e KIF3B (assimilabili alle catene pesanti della chinesina convenzionale) [4]. Entrambe le catene presentano diversi domini funzionali: un dominio motore globulare (N-terminale), una regione cerniera, una regione *coiled-coil* e infine la porzione C-terminale o coda a cui si associa anche una proteina correlata alla chinesina chiamata KAP3.

Il dominio motore è molto conservato all'interno della superfamiglia e viene anche definito come dominio catalitico data la sua capacità di legare l'ATP ed effettuare l'idrolisi, fornendo così l'energia meccanica per il movimento, utilizzata per trasportare i diversi tipi di cargo. Questo dominio è responsabile anche del legame ai microtubuli stessi. La porzione cerniera della proteina, invece, è una regione molto flessibile e dinamica, importante per la sua conformazione. Essa presenta amminoacidi carichi positivamente e/o negativamente in modo complementare ed omologo tra le catene KIF3A e KIF3B, influenzando la loro interazione per la formazione di eterodimeri e favorendo l'adattamento al legame di diverse sostanze da trasportare lungo i microtubuli. Anche la regione *coiled-coil* è di cruciale importanza per la funzionalità del complesso: essa collabora nell'interazione tra le 2 catene di KIF3 e garantisce stabilità strutturale durante il movimento. Infine, il dominio C-terminale o coda si occupa di assicurare specificità nella scelta del cargo da trasportare (mediante particolari sequenze amminoacidiche) e interagisce direttamente con la proteina accessoria KAP3, importante per l'attacco delle sostanze da spostare. Questo dominio gioca un ruolo rilevante anche nella regolazione dell'attività motoria della proteina, essendo sensibile a modifiche post-traduzionali quali le fosforilazioni [5].

La proteina KIF3B è localizzata a livello degli organelli mitotici come i microtubuli del fuso e i centrosomi di tutte le cellule. KIF3B risulta infatti, implicata maggiormente nella regolazione della migrazione e della proliferazione cellulare: durante la mitosi si occupa del trasporto di vescicole e contribuisce all'espansione della membrana. Essa promuove anche la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule mediante la regolazione del ciclo cellulare [4]. Evidenze dimostrano la sua importanza nella determinazione dell'asse sinistra-destra e nel trasporto dei componenti per la ciliogenesi delle cilia primarie (Nonaka et al., 1998).

Visto il suo ruolo fondamentale, l'osservazione di mutanti dominanti negativi per *KIF3B* ha evidenziato interferenze con una corretta mitosi, che possono causare varie anomalie cromosomiche, morte cellulare o insorgenza di tumori [4]. Dato il

coinvolgimento di questa superfamiglia nella ciliogenesi, l'ablazione della chinesina-II comporta conseguenze relative alle funzioni ciliari e alla loro formazione; infatti, diversi pazienti affetti da ciliopatie presentano mutazioni non sinonime in eterozigosi proprio di *KIF3B* [6].

Le mutazioni di *KIF3B* finora individuate, grazie a tecniche di sequenziamento dell'esoma e ibridazione genomica comparativa, sembrano avere un meccanismo di ereditarietà autosomica dominante. Tra queste si riportano due principali varianti eterozigoti rare, non sinonime e patologiche per la retinite pigmentosa: c.748G>C (p.Glu250Gln) una mutazione missenso *de novo* localizzata sul dominio motore conservato, e c.1568T>C (p.Leu523Pro) una mutazione missenso sulla regione *coiled-coil* della proteina in una posizione amminoacidica conservata. L'ereditarietà delle ciliopatie può anche essere autosomica recessiva ed è stata individuata infatti un'ulteriore variante missenso probabilmente correlata ad un'atrofia retinica di carattere recessivo nel gatto del Bengala: c.1000G>A (p.Ala334Thr), anch'essa variante non sinonima localizzata sempre sul dominio motore [6].

La variabilità e complessità di queste sindromi può essere attribuibile a modifiche dell'espressione genica ciliare e agli effetti che queste possono avere sui prodotti proteici. Inoltre, i fenotipi possono essere diversificati a causa anche di fenomeni di epistasi o del grado di espressione dell'allele *wild-type*, nei casi di ereditarietà autosomica dominante [1-6].

#### **2.4 Modelli di studio utilizzati**

Le varianti rintracciate sono state studiate e validate mediante progetti di ricerca su differenti modelli, che comprendono sia colture cellulari che organismi modello, quali ad esempio Zebrafish (*Danio rerio*), modelli murini (*Mus musculus*) o *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*).

Un parametro molto considerato è il cambiamento della lunghezza del cilio primario. Studi *in vitro* che ne provano la variazione sono stati svolti su fibroblasti della pelle isolati direttamente da pazienti portatori di mutazioni. Questi si sono fatti crescere in colture in condizioni di carenza di siero e con protocolli standard, al fine di favorire l'allungamento del cilio. I risultati hanno evidenziato un aumento significativo della lunghezza del cilio rispetto a colture di fibroblasti di controllo *wild-type* per *KIF3B*. Ulteriore conferma dell'impatto di queste mutazioni emerge dall'analisi della stabilità della proteina quando esposta ad un inibitore della sintesi proteica (cicloesimide), poiché proteine portatrici di una delle due mutazioni dominanti sopracitate dimostrano maggiore resistenza alla degradazione a seguito dell'esposizione a questa sostanza [6].

Lo studio di modelli *in vivo* ha permesso di valutare, inoltre, la relazione tra l'alterazione della struttura ciliare e i fenotipi individuati nell'uomo. Su modelli murini è stata provata la letalità delle mutazioni dominanti se presenti in condizione di omozigosi. Tramite la tecnologia di knockout condizionale Cre-loxP, con cui si è silenziato *KIF3B*, si è osservata una rapida degenerazione dei fotorecettori [6].

Anche l'uso di Zebrafish ha consentito di ottenere risultati interessanti: in questo caso si è operata la microiniezione a livello embrionale di mRNA mutato di *KIF3B* e, mediante tecniche di *imaging*, si sono valutati i cambiamenti nell'area oculare nel periodo dei 3 giorni post-fecondazione. Gli esiti hanno dimostrato una significativa diminuzione dell'area oculare se iniettato l'mRNA contenente la mutazione p.Glu250Gln, al contrario della p.Leu523Pro. La riduzione si ipotizza sia correlata ad un eccessivo tasso di apoptosi nella zona della retina, spiegabile dato il ruolo importante che *KIF3B* ricopre nella formazione dei fotorecettori. I mutanti presentano anche un trasporto difettivo della rodopsina, che la porta a localizzarsi erroneamente e ad essere sequestrata a livello del segmento interno dei bastoncelli, implicando un aumento della lunghezza delle cilia (specialmente nei casi di recessività) [6].

Ulteriori progetti di ricerca hanno invece previsto l'utilizzo di linee transgeniche di Zebrafish anche per lo studio di geni ciliari candidati per lo sviluppo del fenotipo relativo all'atresia biliare, tra i quali ritroviamo *KIF3B* (Lam et al., 2021).

Nel caso di studio preso in esame nel presente elaborato, si è invece scelto di utilizzare come organismo modello *C. elegans*, vista la corrispondenza tra il gene *KIF3B* e il suo ortologo *kfp-11* nel genoma del nematode, di cui sotto si espongono caratteristiche e aspetti vantaggiosi ai fini di ricerca.

### 3. Scopo dello studio

Nel presente elaborato si è scelto di prendere in esame un caso in cui una paziente presentava una grave sintomatologia alla nascita, assimilabile ad una ciliopatia. A seguito del sequenziamento dell'esoma della paziente sono emerse due mutazioni nel gene *KIF3B* in eterozigosi composta: una mutazione missenso in un allele, causante la sostituzione di un'arginina con una leucina in un residuo altamente conservato; una variante non-senso, con conseguente comparsa di un codone di stop prematuro nella sequenza amminoacidica. Un aspetto rilevante dello studio è che, a differenza delle mutazioni precedentemente citate e già validate da precedenti ricerche, queste presentano carattere di ereditarietà recessiva. I genitori, infatti, entrambi portatori di una delle due varianti citate, non mostravano alcun sintomo assimilabile alla sindrome, suggerendo un caso compatibile con un tipo di ereditarietà autosomica recessiva.

Attraverso saggi fenotipici utilizzando l'organismo modello *Caenorhabditis elegans*, l'attività di ricerca si è concentrata sulla validazione e conferma dei cambiamenti indotti dalle mutazioni in questione, rispetto alla condizione fisiologica a livello neuronale, per valutare l'associazione delle varianti candidate al fenotipo delle ciliopatie. In particolare, si è osservato che in questo organismo modello la funzionalità della proteina in questione sembra giocare un ruolo fondamentale a livello delle cilia sensoriali, che consentono percezioni ambientali come il rilevamento dei tassi di osmolarità (osmotassi), la chemotassi, cioè il rilevamento delle sostanze chimiche attraenti o nocive, la percezione della

temperatura e di eventuali stimoli fisici o meccanici (meccanosensibilità). Per valutare l'influenza delle mutazioni rintracciate, si sono messi a punto in laboratorio due saggi fenotipici su linee mutanti di *C. elegans* precedentemente create nel laboratorio di Model organisms and rare diseases dell'Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza mediante la tecnologia CRISPR-Cas9: una linea recante la mutazione missenso *R15L* e una linea recante la mutazione non-senso del gene. Successivamente, sono stati osservati i cambiamenti comportamentali in relazione a chemotassi con NaCl e i cambiamenti funzionali dei neuroni ciliati di *C. elegans* tramite la tecnica del *dye-filling*.

## 4. Approccio sperimentale

### 4.1 Organismo modello: *C. elegans*

Per il progetto di ricerca portato avanti in laboratorio si è utilizzato come organismo modello *C. elegans*, un nematode di dimensioni molto ridotte (circa 1 mm) e dall'aspetto trasparente che vive generalmente nel suolo. Questo organismo presenta una serie di caratteristiche rilevanti che lo rendono molto vantaggioso per scopi di ricerca in ambito biologico, genetico, neurobiologico, ecc.

In particolare, la sua naturale trasparenza è un notevole punto di forza perché consente la visualizzazione, durante tutto il ciclo vitale, dei processi cellulari, di embriogenesi o dei cambiamenti dovuti a mutazioni senza la necessità di usare tecniche invasive, con la possibilità di inserire anche proteine fluorescenti per evidenziare target specifici. Inoltre, si presta facilmente alla crescita in laboratorio viste le esigenze nutrizionali semplici e le modalità di coltivazione economiche.

È caratterizzato da un ciclo di vita breve e da un tempo di sviluppo molto rapido (vedi 4.1.1) al termine del quale può differenziarsi come ermafrodita o come maschio (evento con frequenza molto rara). Gli organismi ermafroditi hanno la capacità di autofecondarsi, il che è vantaggioso in studi di genetica poiché permette di ottenere linee geneticamente identiche da poter utilizzare ad esempio in incroci, mentre i maschi apportano variabilità genetica. Altro aspetto rilevante di questo organismo modello è che presenta un numero invariante di cellule somatiche (959 negli ermafroditi e 1031 nei maschi), che può essere sfruttato in caso di ricerche sulla divisione cellulare. A livello genetico, *C. elegans* è stato sottoposto ad un sequenziamento dell'intero genoma, che oggi consente uno studio più semplice e veloce delle funzioni di particolari geni ed anche l'introduzione di mutazioni desiderate mediante diversi strumenti di manipolazione genica, come *l'RNA interference*, la mutagenesi o editing genetico con CRISPR-Cas9. Il suo genoma contiene molte regioni di omologia con quello umano e molti geni o *pathway* molecolari sono conservati, permettendo di arrivare a risultati rilevanti nell'ambito biologico [7].

Anche per lo studio oggetto in tale elaborato si è innanzitutto ricercato il target delle due mutazioni individuate nella paziente e si è osservato che il gene *KIF3B* presenta l'ortologo *kfp-11* nel genoma del nematode, dove le varianti patologiche si trovano

in una porzione molto conservata. In *C. elegans* alcuni studi hanno individuato un ulteriore gene, *osm-3*, codificante una chinesina e dotato di un elevato grado di omologia con *klp-11*, per cui si ipotizza una dimerizzazione per formare un complesso multimerico, confermando l'equivalenza con il complesso KIF3 presente nei mammiferi. È stata anche dimostrata la cooperazione di *osm-3* e *klp-11* nel movimento delle proteine IFT lungo i microtubuli analogamente a quanto accade nell'uomo ad opera di chinesine e dineine [8-9].

#### **4.1.1 Ciclo vitale**

*C. elegans* ha un ciclo di vita considerato breve: partendo da uova fecondate sono necessari solo 3 giorni a circa 25°C per ottenere individui adulti in grado di produrre le loro stesse uova. Il suo ciclo vitale, a seguito della fecondazione dell'uovo, prevede la formazione di un rivestimento che gli permette di crescere in modo indipendente dalla madre. L'uovo fecondato passerà poi attraverso 4 fasi larvali: al momento della schiusa inizia la fase L1 (durata di circa 16 ore), in cui i nematodi iniziano a nutrirsi e a svilupparsi; nelle fasi L2-L3, se le condizioni sono favorevoli e il nutrimento non scarseggia, i vermi continuano ad accrescersi e sviluppare i vari apparati; nella fase L4, o stadio di giovani adulti che precede l'età adulta vera e propria, si completa l'apparato riproduttivo e si differenziano sessualmente. A differenza della fase L1, le altre fasi hanno una durata media di 12 ore ciascuna. Se nel corso di L1 o L2 dovesse verificarsi la mancanza di sostanze nutritive o la presenza di condizioni avverse, è possibile innescare uno stato di arresto che favorisce la sopravvivenza delle larve. La durata media della vita di questi organismi è di 2-3 settimane se mantenute ad una temperatura di circa 20°C [7].

#### **4.1.2 Svantaggi di *C. elegans***

*C. elegans* è un organismo modello che ha trovato ampio utilizzo nell'ambito della ricerca, tuttavia, presenta alcune limitazioni di cui si deve tenere in considerazione: non tutti i pathway di segnalazione presenti negli organismi più sviluppati si ritrovano inalterati nel nematode (es. segnalazione di Hedgehog), in quanto possono mancare diversi geni implicati nella cascata di regolazione. Inoltre, non esistono ancora linee di colture cellulari di *C. elegans*, anche se alcune tipologie di cellule sono già state coltivate e studiate *in vitro*. Data la piccola dimensione di questo organismo, è difficile anche mettere in atto tecniche di manipolazione sperimentale dei singoli tessuti.

#### **4.1.3 Affinità anatomiche**

I vantaggi dell'utilizzo di *C. elegans* non sono dovuti solamente al notevole grado di omologia a livello genetico, vi è anche una buona affinità a livello anatomico tra il sistema nervoso del nematode e quello umano. Questo rende *C. elegans* un ottimo modello per lo studio di meccanismi neurobiologici e malattie neurodegenerative. Il sistema nervoso di vermi adulti è differenziato a seconda della sessualità: gli individui ermafroditi presentano 302 neuroni mentre i maschi 383. La struttura dei loro neuroni è semplice, presentano al massimo un paio di processi neuronali ma

hanno la particolarità di essere multifunzionali, caratteristica che può essere dovuta al ridotto numero di cellule del loro sistema nervoso. I neuroni del nematode, infatti, possono sia creare giunzioni neuromuscolari che collaborare per garantire proprietà sensoriali in quanto possono prendere contatti pre- o post-sinaptici. I corpi cellulari dei neuroni sono per lo più localizzati a livello della testa (dove è presente un anello di neuroni che circonda la faringe), della coda e del cordone ventrale [8].

È stato osservato che per le segnalazioni nervose vengono utilizzati i medesimi neurotrasmettitori dei vertebrati più complessi, come acetilcolina, glutammato, dopamina o serotonina anche se sembra invece essere assente il potenziale d'azione, nonostante siano presenti in grande quantità diversi tipi di canali ionici. La membrana neuronale in *C. elegans*, infatti, è più resistente e i neuroni si trovano in una condizione di potenziale omogeneo [8].

Come negli organismi più complessi, anche in *C. elegans* sono presenti alcune cellule di supporto con funzionalità molto simile alle cellule della glia e queste si trovano in organi di senso insieme a neuroni sensoriali ciliati che risultano conservati in funzione e organizzazione se paragonati a quelli umani. La maggior parte dei neuroni in *C. elegans* ha morfologia unipolare mentre invece quelli associati a funzioni sensoriali e somatosensoriali sono bipolari, analogamente ai neuroni associati ai sensi speciali (vista e olfatto) nell'uomo. I neuroni sensoriali di questi vermi presentano terminazioni dendritiche ciliate, il cui cilio ha morfologia specifica e meccanismi di segnalazione diversi a seconda del sottotipo neuronale e della funzione sensoriale che esso svolge. Questo componente non attribuisce solo la funzione sensoriale: è importante anche nella definizione della polarità dei dendriti che sono disposti in modo da protendere verso l'esterno del nematode con il cilio, consentendogli di percepire direttamente i segnali esterni. La maggior parte dei dendriti ciliati sono rivestiti da cellule simil-gliali che creano un canale in continuità con il tessuto epiteliale della pelle e aperto verso l'esterno [10].

## **5. Materiali e Metodi**

### **5.1 Crescita e mantenimento di *C. elegans***

#### **5.1.1 Piastre di coltura**

*C. elegans* viene coltivato e fatto crescere in laboratorio su piastre Petri ventilate contenenti un terreno di coltura NGM (Nematode Growth Medium), che fornisce tutti i nutrienti e i fattori essenziali alla crescita dell'organismo. Questo viene poi arricchito con batteri *E. coli* del ceppo OP50 che fungono da fonte di cibo. Per la coltivazione di *C. elegans* si possono utilizzare piastre di 3 dimensioni diverse e quantità di NGM differenti: grandi (20ml), intermedie (6ml), piccole (3.5ml); la dimensione prescelta dipende strettamente dallo scopo della coltura.

Si riporta di seguito la procedura per la preparazione esemplificativa di 600ml di NGM.

Pesare i componenti riportati in **Tab.1** e inserirli all'interno di un becher da 1L. Sterilizzare in autoclave e poi trasferire in un bagnetto termico a 55°C per mantenere il terreno allo stato liquido e lasciarlo raffreddare. In condizioni di sterilità, sotto cappa biologica, aggiungere i componenti di **Tab.2**. A questo punto il terreno può essere colato nelle piastre, ad esempio, per piastre grandi si coleranno 20ml e si lasciano solidificare. Quando il terreno sarà perfettamente solido e asciutto, chiudere i coperti e conservare le piastre in frigo a 4°C. Queste vengono poi utilizzate come substrato per fare crescere batteri *E. coli* di ceppo OP50, piastrandone quantità di µl diverse a seconda delle dimensioni della piastra (100 µl, 50 µl o 30 µl rispettivamente). Dopo aver piastrato uniformemente al centro della Petri, attendere il completo assorbimento e incubare a 37°C per una notte in condizioni statiche. A crescita terminata, i batteri avranno formato un unico strato sulla superficie della piastra e si procede a richiuderla mediante *parafilm* per poterla conservare fino all'utilizzo a 4°C.

**Tabella 1.** Componenti per la preparazione del terreno di coltura NGM.

Componente	Grammi (g)
NaCl	1.8
Agar	10.2
Peptone	1.5
Acqua deionizzata	585

**Tabella 2.** Componenti per la preparazione del terreno di coltura NGM.

Componente	Volume (ml)
Colesterolo in etanolo (5mg/ml)	0.6
CaCl <sub>2</sub> (1M)	0.6
MgSO <sub>4</sub> (1M)	0.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6.0)	15

### 5.1.2 Inoculi di *E. coli*

La preparazione di inoculi in coltura liquida di ceppi OP50 di *E. coli* (privi di resistenze e difettivi per l'uracile) ha la finalità di far proliferare i batteri in terreno di coltura LB in modo da poterli poi utilizzare come fonte di nutrimento per *C. elegans*.

Prelevare 3ml dal terreno LB liquido e inserirli all'interno di una provetta. Scegliere opportunamente dalla piastra una colonia batterica ben isolata e prelevarla mediante un puntale attraverso l'uso della micropipetta p200; inserirlo all'interno della provetta contenente il terreno di coltura, pipettare e rilasciare un paio di volte per favorire il rilascio. Rimuovere il puntale dalla micropipetta lasciandolo all'interno del terreno; richiudere il tappo in modo da mantenere una condizione di crescita areata e incubare a 30°C in agitazione per una notte. Al termine dell'incubazione il terreno risulterà torbido e non più trasparente se la procedura è andata a buon fine.

L'inoculo realizzato sarà poi utilizzato per arricchire il terreno NGM come indicato nel precedente paragrafo 5.1.1.

### 5.1.3 Mantenimento di *C. elegans*

Per propagare colture di interesse di ceppi di *C. elegans* e realizzare nuove piastre esistono 2 metodi alternativi: “*picking*” e “*chunking*”, di cui si illustra di seguito il procedimento.

Per il *picking* è necessario innanzitutto realizzare un apposito strumento definito “*pick*” che consentirà il prelievo di un singolo esemplare, in modo da trasportarlo dalla piastra originaria alla nuova coltura. Lo strumento in questione si realizza a partire da un sopracciglio. Utilizzando un puntale per micropipette ed un Becco Bunsen fondere parzialmente sulla fiamma la punta del puntale, agganciare poi a quest'ultima il sopracciglio a livello del bulbo per evitare di perdere la sua flessibilità. Osservando a microscopio, prelevare un singolo esemplare mediante lo strumento appena realizzato e trasferirlo su una piastra NGM con batteri pulita. Ripetere la procedura per il numero di esemplari desiderato, sterilizzando di volta in volta il *pick* sulla fiamma e infine incubare per qualche giorno ad una temperatura compresa tra i 15-20°C a seconda delle modalità di crescita scelte.

Per il *chunking*, è necessario procurarsi un bisturi da sterilizzare mediante etanolo e passaggio sulla fiamma del Becco Bunsen per qualche secondo; lasciar raffreddare la lama e intagliare, nel terreno di coltura della piastra di partenza, un quadratino visualizzandolo mediante il microscopio; trasferire il quadratino (*chunk*) prelevato e disporlo su una piastra NGM con batteri pulita capovolgendolo per mettere i vermi a contatto diretto con il terreno e farli distribuire spontaneamente (favorendo la diffusione anche mediante spostamento). Rimuovere il quadratino, richiudere la piastra e incubare alle stesse condizioni indicate sopra.

### 5.1.4 Crioconservazione di *C. elegans*

Le colture di *C. elegans* possono essere utilizzate a breve termine o possono essere congelate in azoto liquido a -80°C per una conservazione a lungo termine. Generalmente si scelgono per questa procedura piastre contenenti ceppi in condizioni di carenza nutritiva, in cui sono presenti molti individui negli stadi larvali L1-L2 e delle uova (la presenza di queste è segnale che gli adulti non sono rimasti per molto tempo privi di cibo), poiché queste sopravvivono meglio al congelamento. Prendendo, ad esempio, 2/3 piastre è possibile realizzare 1 vial di congelamento per piastra e in aggiunta 1 vial di controllo, per verificare che la procedura sia andata a buon fine.

Precedentemente è necessario realizzare 3 soluzioni da 1 L (S basal, 1M Potassio citrato pH6.0, Trace metals solution) al fine di ottenere 2 soluzioni di congelamento: *S medium* e *S medium* con aggiunta di glicerolo (di cui sotto si riportano i componenti). Per i componenti vedi **Tab. 3**, **Tab. 4**, **Tab. 5**, **Tab.6** (riportate sotto). Al termine della preparazione delle prime tre soluzioni è necessario sterilizzarle. Successivamente aggiungere 10 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata in ogni piastra Petri che si

vuole congelare, effettuare dei lavaggi per rimuovere la maggior parte dei vermi dalla superficie, rilasciare il tutto all'interno di una provetta Falcon da 15 ml. Centrifugare a 4°C 1000 rpm per 3 minuti. Ripetere il lavaggio almeno un paio di volte a seconda di quanto le colture erano pure o contaminate. Rimuovere l'acqua in eccesso, facendo attenzione a non intaccare il pellet generato sul fondo. Aggiungere nuovamente altri 10 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata ed effettuare un ulteriore lavaggio con le stesse condizioni di centrifuga. Al termine di questo rimuovere l'acqua in eccesso lasciandone una piccola quantità che andrà rimossa sotto cappa. Gli step successivi sono da svolgere sotto cappa biologica per lavorare in condizioni di sterilità ed evitare la contaminazione delle soluzioni di congelamento. Generalmente si realizzano 2 vial di congelamento per Falcon di partenza ed 1 vial di controllo. Risospendere velocemente il contenuto delle Falcon, prelevare in totale 2 ml da ogni Falcon e inserirne 1 ml in entrambi i vial di congelamento. Aggiungere nell'ordine 400 µl *S Medium*, poi 400 µl *S Medium* + glicerolo in ogni vial facendo attenzione alla velocità poiché queste soluzioni possono causare shock agli organismi. La vial di controllo sarà realizzata a partire dalla quantità rimanente delle Falcon e delle 2 soluzioni di congelamento. Mettere la vial di congelamento e il controllo in freezer a -20°C per 30/40 minuti all'interno di un involucro di polistirolo e avvolgerlo con la carta (per evitare uno shock termico eccessivo). Trasferire poi il tutto in una scatola di polistirolo e congelare a -80°C. Dopo un certo periodo di tempo scongelare la vial di controllo per verificare l'efficacia del congelamento.

**Tabella 3.** Componenti soluzione *S basal*.

<b>Componente</b>	<b>Quantità</b>
NaCl	5.85 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
H <sub>2</sub> O deionizzata	955 ml fino a 1 L

**Tabella 4.** Componenti soluzione 1M Potassio citrato pH 6.0

<b>Componente</b>	<b>Quantità</b>
Acido citrico monoidrato	20 g
Citrato tripotassico monoidrato	293.5 g
H <sub>2</sub> O deionizzata	Fino a 1 L

**Tabella 5.** Componenti soluzione *Trace metals solution*

<b>Componente</b>	<b>Quantità</b>
EDTA disodico	1.86 g
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.69 g
MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	0.2 g
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.29 g
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0.025 g
H <sub>2</sub> O deionizzata	Fino a 1 L

**Tabella 6.** Componenti per le soluzioni di congelamento *S medium* e *S medium+glicerolo*

<b>Componente</b>	<b>Volume in S Medium</b>	<b>Volume in S medium + glicerolo</b>
S basal	47.8 ml	33.46 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.2 ml	1.54 ml
1M Potassio citrato	500 µl	350 µl
Trace metals solution	500 µl	350 µl
1M CaCl <sub>2</sub>	150 µl	105 µl
1M MgSO <sub>4</sub>	150 µl	105 µl
Colesterolo	50 µl	35 µl
Glicerolo		15 µl

### **5.1.5 Sincronizzazione di colture di *C. elegans***

Talvolta è necessario iniziare nuove colture di *C. elegans* in cui tutti gli esemplari si trovano allo stesso stadio di sviluppo (L1) ed avere, quindi, una popolazione sincronizzata. Questo si può svolgere selezionando le uova a partire da colture preesistenti di individui ormai adulti.

Procedimento: siglare opportunamente diverse provette Falcon (da 15 ml) a seconda del numero di piastre di cui si vogliono ottenere le uova. Attraverso l'uso del Pipetus e di una pipetta sierologica aggiungere ad ogni piastra 10 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata per lavare i vermi e le uova dalla superficie della Petri e trasferire il tutto in ogni Falcon. Centrifugare le Falcon a 4°C 1000 rpm per 3 minuti. Rimuovere l'acqua in eccesso e mantenere il pellet sul fondo, controllare al microscopio di aver prelevato la maggior parte dei vermi e con una sierologica pulita aggiungere nuovamente 10 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata e ripetere per altri 2-3 lavaggi centrifugando nella stessa modalità indicata. Rimuovere l'acqua in eccesso e mantenere nella Falcon il pellet a cui poi si deve aggiungere: 1ml di candeggina commerciale 20%, 500 µl NaOH 1M, 3.5 ml H<sub>2</sub>O. NaOH ci permette di lisare i vermi adulti, le larve e far rimanere vitali solo le uova mentre la candeggina previene ed elimina le contaminazioni. Le Falcon contenenti questa soluzione con candeggina si mantengono per circa 5 minuti in agitazione per assicurarsi che avvenga la lisi completa. Successivamente effettuare 3 lavaggi aggiungendo 10 ml di H<sub>2</sub>O e centrifugando a 4°C 1000 rpm per 1 minuto, avendo sempre cura di mantenere intatto il pellet. Alla fine dei lavaggi, rimuovere il surnatante e lasciare sul fondo il pellet di uova. Una parte di questo può essere direttamente piastrato su terreno NGM+*E. coli* (valutando il numero di µl a seconda della quantità di uova ottenute), il rimanente può essere conservato in tampone M9 aggiungendo ad ogni Falcon 1 ml di M9 (un mezzo salino con caratteristiche simili al terreno di coltura di *C. elegans* ma privo di nutrimento perché carente di *E. coli* che consente la crescita dei nematodi solo fino allo stadio L1). Incubare le piastre di coltura alla temperatura desiderata e mantenere le Falcon con M9 a 16°C fino a qualche giorno al massimo.

## 5.2 Saggi fenotipici svolti

### 5.2.1 Chemotassi con NaCl

Il saggio di chemotassi è uno tra i più utilizzati per studiare il comportamento di *C. elegans* nella percezione della presenza di sostanze attraenti, in questo caso NaCl. Si sono prese in esame nel presente studio 2 linee mutanti di *C. elegans*, una linea *kpl-11 KO* e una linea *kpl-11* con *KI* di *R15L*, oltre al ceppo *wild-type N2* utilizzato come controllo.

Si sono innanzitutto siglate delle piastre Petri *vented* creando una griglia costituita da 6 diversi settori paralleli con concentrazione salina decrescente dal settore 1 al 6 rispettivamente (2 piastre per ceppo). Si sono poi realizzate le soluzioni per 3 diversi terreni: High Salt, Low Salt e Isocratico (vedi i componenti in **Tab.7**).

**Tabella 7.** Componenti terreni per il saggio di chemotassi con NaCl

Terreno	Componenti
High Salt	Soluz. di Agar al 2% in buffer per chemotassi (5mM KPO <sub>4</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub> , 1mM MgSO <sub>4</sub> )
	60 mM NaCl
Low Salt	Soluz. di Agar al 2% in buffer per chemotassi (5mM KPO <sub>4</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub> , 1mM MgSO <sub>4</sub> )
	0 mM NaCl
Isocratico	Soluz. di Agar al 2% in buffer per chemotassi (5mM KPO <sub>4</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub> , 1mM MgSO <sub>4</sub> )
	30 mM NaCl

Dopo aver realizzato i terreni di coltura con concentrazioni saline differenti, lavorando in condizioni di sterilità sotto cappa biologica per evitare contaminazioni, è stato riposto un piano inclinato su cui posizionare le piastre Petri dei vari ceppi, secondo l'andamento della salinità tra i settori 1 (maggiore concentrazione NaCl) e 6 (minore concentrazione NaCl). Attraverso l'utilizzo del Pipetus sono stati colati in ciascuna piastra 20 ml di terreno High Salt. Dopo aver atteso il tempo necessario affinché il terreno fosse completamente asciutto, tutte le piastre sono state stese in orizzontale per colare il terreno Low Salt e livellare l'altezza. Quindi, utilizzando nuovamente il Pipetus e una sierologica pulita, nelle stesse piastre si sono colati 20 ml di terreno Low Salt. In questo modo abbiamo creato un gradiente salino 0-60 mM su ogni piastra. Per quanto riguarda le isocratiche, allo stesso modo all'interno di ogni piastra disposta orizzontalmente sono stati colati 20 ml di terreno isocratico mediante il Pipetus e si sono lasciati tutti solidificare. Tutte le piastre sono state incubate per 16h in modo che NaCl diffonda. Per effettuare il saggio si preferiscono vermi appartenenti ad una popolazione sincronizzata allo stadio di giovani adulti. Una volta fatti crescere su apposite

piastre di coltura sono stati raccolti tramite dei lavaggi e inseriti in provette per microcentrifuga. Sono stati poi centrifugati ed effettuati diversi lavaggi con buffer per chemotassi, senza andare a rimuovere il pellet sul fondo. Si sono prelevati 20  $\mu$ l dalla provetta dove il pellet di vermi era risospeso nel buffer e sono stati pipettati al centro delle piastre realizzate in precedenza. Dopo aver atteso circa 30 minuti per consentire agli esemplari mutanti di spostarsi sul terreno, le piastre sono state raffreddate a 4°C in modo da indurre una paralisi, per poi iniziare la conta per ognuno dei sei settori.

Per ogni settore si è calcolata anche la densità normalizzata di vermi attraverso la seguente formula:

$$\text{Densità normalizzata} = \frac{N^{\circ} \text{ vermi nel settore } X \div N^{\circ} \text{ vermi totali}}{\text{Area del settore } X \div \text{Area totale della piastra}}$$

Per ottenere i grafici di **Fig. 1** e **Fig. 2** e valutare gli esiti.

### 5.2.2 Dye-filling

La tecnica del *dye-filling* è un'altra tipologia di saggio fenotipico molto utilizzata al fine di testare e valutare l'integrità a livello morfologico dei neuroni sensoriali di *C. elegans*. Nello studio condotto in laboratorio ci siamo occupati di sottoporre i vermi ai coloranti fluorescenti lipofili FITC (Fluorescein Isothiocyanate) e Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate) in modo da valutare la struttura dei neuroni sensoriali o "anfidi della testa", importanti per percezioni sensoriali come chemiorecezione, termocezione o per comportamenti quali l'accoppiamento e il foraggiamento. Anche per il presente saggio si sono prese in esame le stesse 2 linee mutanti di *C. elegans*, *kpl-11 KO* e *kpl-11* con *KI* di *R15L*, oltre al ceppo di controllo *wild-type N2*. Tutti i campioni realizzati mediante colorazione sono poi stati visualizzati a microscopio elettronico a fluorescenza per la valutazione dei risultati ottenuti.

In primo luogo si sono creati i vetrini su cui andranno posizionati gli esemplari di *C. elegans* colorati per la visualizzazione al microscopio. I vetrini contengono un Pad di agarosio su cui i vermi vengono immobilizzati. Dopo esserci procurati diversi vetrini portaoggetti a seconda del numero di ceppi da visualizzare e altrettanti vetrini coprioggetti, si è impostato un termoblocco a 90°C per sciogliere una soluzione di Agar al 2% contenente anche una piccola quantità (2-10 mM) di sodio azide  $\text{NaN}_3$  utile per l'immobilizzazione. Una volta sciolto, si è lasciato raffreddare fino a circa 55-60°C. Mediante una micropipetta p20 e rispettivi puntali si sono poste su ogni vetrino portaoggetti 2 gocce di agarosio (1 goccia equivale a circa 15  $\mu$ l) per creare un Pad per le linee colorate con FITC ed uno per quelle colorate con Dil dello stesso ceppo. Si sono coperti entrambi i Pads con un vetrino coprioggetti per livellare la goccia e distribuirla, si è lasciata asciugare su una stufetta da laboratorio. Infine, sono stati rimossi i vetrini coprioggetti facendo in modo di non intaccare i Pads di agarosio.

Per realizzare le colorazioni si è invece partiti da colture dei 3 ceppi di *C. elegans* contenenti giovani adulti L4 o adulti, effettuando dei lavaggi con H<sub>2</sub>O e M9 per

rimuovere i vermi dalle piastre e raccogliarli all'interno di 3 provette Falcon da 15 ml. Il primo lavaggio si è effettuato con 10 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata, centrifugando a 4°C 1000 rpm per 3 minuti; il secondo lavaggio si è effettuato con 5 ml di M9 (mezzo più completo perché contiene anche sostanze essenziali per la sopravvivenza); si è rimosso l'eccesso di M9 fino a lasciarne nelle provette circa 500 µl. Per creare 2 campioni delle colorazioni per ceppo si sono prelevati circa 200 µl da ogni provetta e si sono inseriti all'interno di 6 Eppendorf da 1.5 ml. Si effettua una centrifuga per far depositare il pellet sul fondo 1-2 minuti a massima potenza. Si è poi rimosso tutto il surnatante di M9 lasciando il pellet e si sono aggiunti circa 100 µl di M9 per ogni Eppendorf. I passaggi successivi, invece, si sono svolti in condizioni di assenza di luce per evitare di danneggiare la struttura dei coloranti fluorescenti.

Per la colorazione con il FITC si è utilizzata una *Fitc Stock Solution* contenente 20 mg/ml di FITC in 500 µl di N,N-dimetilformammide. A partire da questa, si è innanzitutto effettuata una diluizione 1:25 prelevando 20 µl della soluzione e aggiungendo il rimanente volume di M9 (480 µl), infine, per avere una concentrazione finale di FITC pari ad una diluizione 1:50 si sono prelevati 100 µl della soluzione precedentemente diluita e si sono aggiunti 100 µl di M9. Il prodotto di quest'ultima diluizione è stato quindi aggiunto alle 3 Eppendorf contenenti già 100 µl M9 e il pellet.

Per la colorazione con il Dil è stato sufficiente aggiungere 0.1 µl ai 100 µl di M9 aggiunti in precedenza nelle altre 3 Eppendorf.

Affinché le colorazioni vadano a buon fine si deve aspettare un tempo minimo di 3 ore, ponendo le soluzioni in agitazione e coprendo le Eppendorf con carta stagnola in modo da mantenere la condizione di buio. Al termine delle 3 ore, sono stati centrifugati i campioni per 1-2 minuti a velocità massima per rimuovere la maggior parte del surnatante e si sono poi effettuati diversi lavaggi con M9 sotto cappa biologica. Si devono effettuare almeno 6 o 7 lavaggi con un contenuto di M9 variabile tra i 100-500 µl. Infine, si sono aggiunti 2 µl di sodioazide per anestetzare i vermi e sono stati caricati circa 10 µl su ogni Pad di agarosio ricoprendoli con vetrini coprioggetto, valutando la quantità di esemplari anche con l'utilizzo del microscopio. A questo punto è stato possibile visualizzare i vari campioni attraverso l'utilizzo di un microscopio elettronico a fluorescenza.

## 6. Risultati e discussione

### 6.1 Effetti delle mutazioni sulla chemotassi

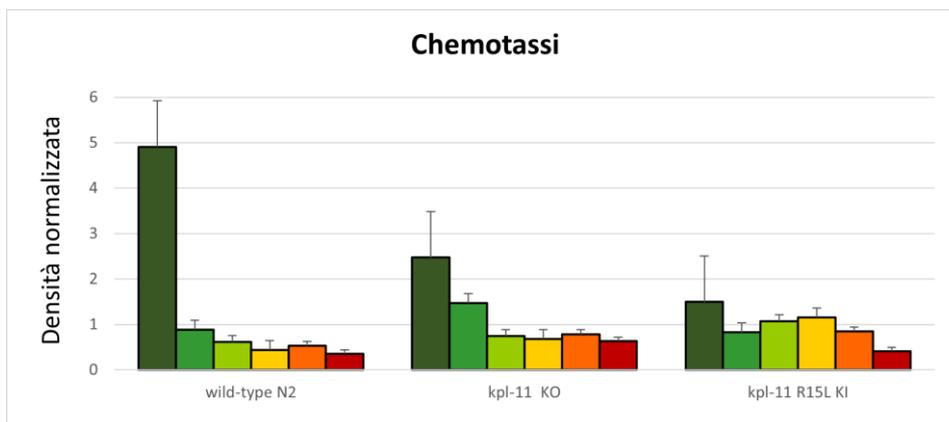
Nel complesso, sono state svolte due repliche del saggio di chemotassi con NaCl utilizzando le medesime condizioni, per garantire una maggior robustezza e affidabilità dei dati ottenuti. Gli esiti delle medie normalizzate sono stati rappresentati in **Fig.1** per una visualizzazione più chiara.

Dall'analisi del grafico di **Fig.1** emerge in modo evidente una netta differenza comportamentale tra il ceppo *wild-type* N2, utilizzato come controllo per validare

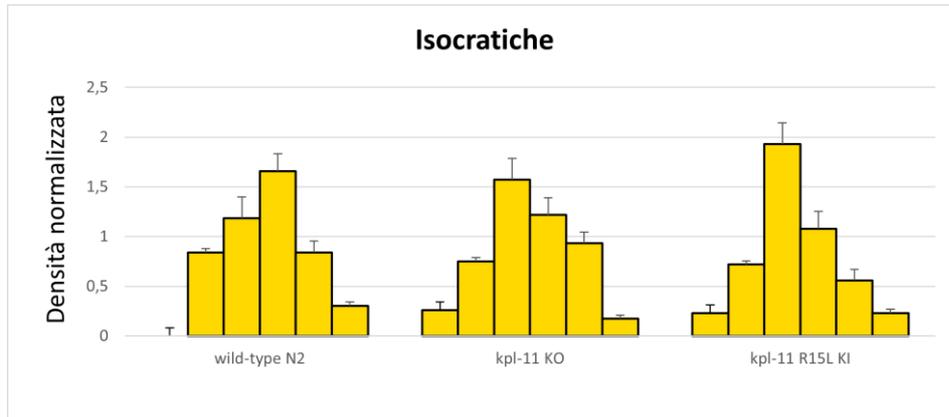
l'efficacia del saggio, e i due ceppi mutanti del gene *kpl-11*. Gli esemplari *wild-type*, infatti, dimostrano una preferenza molto marcata verso le concentrazioni di NaCl più elevate (in particolare a livello del settore 1) e solo pochi non hanno manifestato uno spostamento in questa direzione, fornendoci quindi conferma della buona esecuzione degli esperimenti svolti. Al contrario, i due ceppi *kpl-11 KO* e *kpl-11* con *KI* della mutazione *R15L* sembrano essere meno sensibili alle alte concentrazioni, mancando di un netto spostamento verso il maggior gradiente salino. Questo è particolarmente evidente nel caso degli esemplari di *knock-in*, che presentano una risposta molto ridotta rispetto agli altri due. I vermi mutanti sembrano essersi distribuiti in modo più omogeneo nelle piastre, nonostante la presenza dei gradienti, indicando in generale scarsa risposta chemotattica alla sostanza attraente. Nonostante questo, si è riscontrata una maggior quantità di esemplari in direzione della concentrazione salina più elevata dimostrando comunque un comportamento in parte regolare, il che permette di ipotizzare che la funzione dei neuroni sensoriali non venga persa totalmente.

Dall'osservazione dei grafici in **Fig.2**, rappresentanti l'andamento della distribuzione dei vermi sulle piastre isocratiche, invece, il ceppo *wild-type N2* mostra una distribuzione abbastanza uniforme nell'area, con alcune variazioni in direzione dei settori più esterni della piastra. I ceppi mutanti, in questo caso, non evidenziano particolari differenze, sebbene si riscontri una preferenza verso le zone più centrali della piastra facendo supporre un cambiamento comportamentale nel movimento, dovuto alla mutazione inserita.

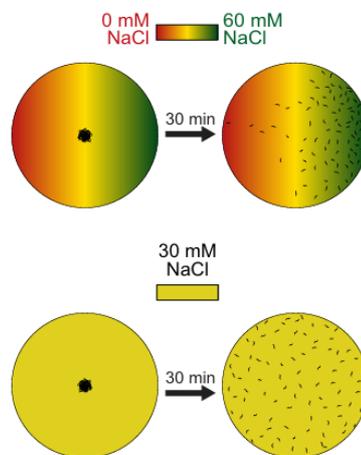
In linea generale, il saggio ha quindi dimostrato un cambiamento comportamentale in entrambe le piastre, portando ad ipotizzare una modifica del corretto funzionamento dei neuroni sensoriali dovuta alle mutazioni studiate. Queste mutazioni potrebbero ridurre la capacità di indirizzamento verso gli attrattori nei vermi trattati con l'editing genetico rispetto a quelli non trattati.



**Figura 1.** Istogramma rappresentativo della densità normalizzata dei vermi nei settori 1-6 presentanti gradiente di NaCl decrescente nella piastra di chemotassi, distinto per ceppo studiato e comprensivo di barre di errore che indicano la variabilità dei dati nel corso delle varie repliche.



**Figura 2.** Istogramma rappresentativo della densità normalizzata dei vermi nei settori 1-6 delle piastre isocratiche, con gradiente salino uniforme, distinte per ceppo studiato e comprensive di barre di errore.



**Figura 3.** Diagramma schematico dell'andamento delle concentrazioni di NaCl nelle piastre, esplicativo della colorazione delle barre dei grafici soprastanti.

## 6.2 Effetti delle mutazioni a livello morfologico e strutturale

Il saggio di *dye-filling* con coloranti lipofilici FITC (Fluorescein Isothiocyanate) e Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate) ci ha permesso di osservare in modo indiretto l'integrità strutturale delle cilia, a seconda del grado di assunzione dei coloranti fluorescenti a livello dei neuroni sensoriali della testa.

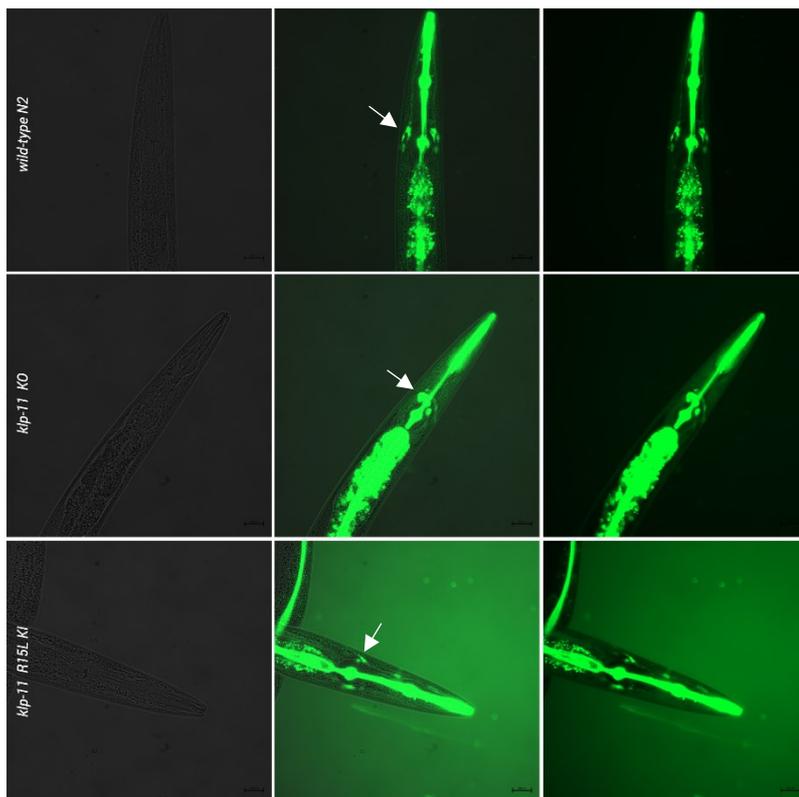
A seguito dell'esecuzione del protocollo indicato sopra, sono stati presi in esame alcuni esemplari a campione, cercando i più rappresentativi per il nostro studio, e sono state valutate le differenze a livello visivo. Come si può osservare da **Fig. 4**, il ceppo *wild-type N2* dimostra un'ottima intensità di colorazione, con una ritenzione notevole del colorante FITC a livello neuronale che evidenzia la struttura definita dei vari neuroni in tutte le loro componenti. Dall'analisi visiva del ceppo mutante con *knock-out* del gene, invece, si nota che il numero di neuroni è molto ridotto rispetto al controllo positivo e che non tutte le componenti sono ben definite. Infatti, la fluorescenza si rileva quasi esclusivamente a livello del corpo cellulare del

neurone ed è praticamente assente nella regione dendritica, portando a supporre una compromissione significativa della formazione di questa regione.

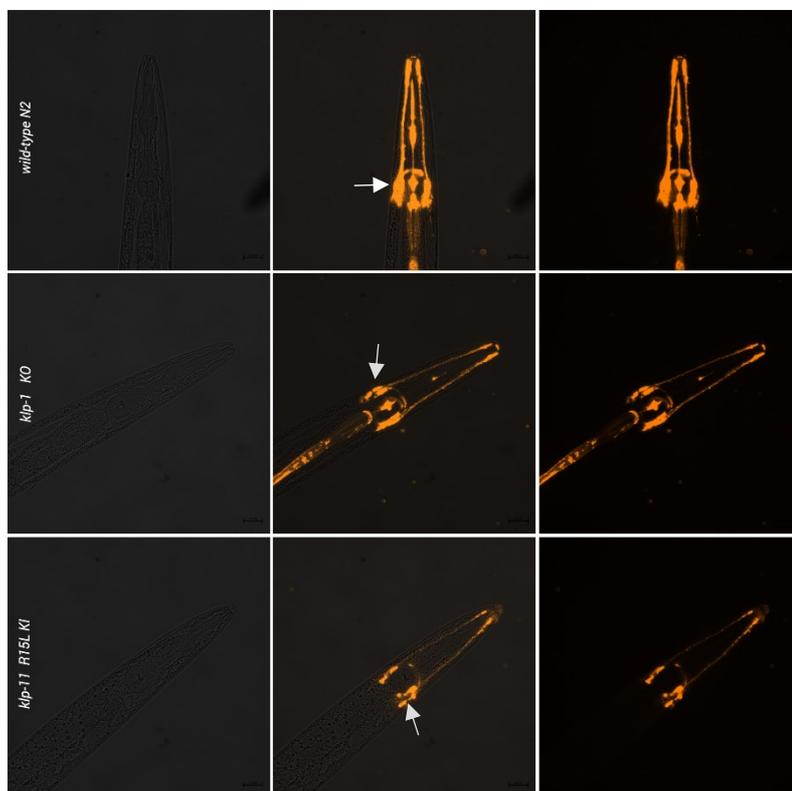
Per quanto riguarda il ceppo rappresentante la variante missenso *R15L*, la fluorescenza in questo caso appare meno intensa rispetto sia al ceppo *wild-type*, facendo ipotizzare un effetto rilevante della mutazione sulla capacità di assumere e mantenere il colorante. Anche per questa linea di *C. elegans* si può notare una notevole riduzione in termini numerici dei neuroni, sebbene i pochi visibili dimostrino fluorescenza anche nella regione dendritica a differenza degli altri. Questo aspetto può essere interpretato come prova dell'effetto dannoso, ma non del tutto distruttivo, della mutazione sull'integrità neuronale.

Analizzando, infine, le immagini di **Fig.5**, rappresentanti ulteriori esemplari a campione e realizzate mediante colorazione con colorante fluorescente lipofilico Dil, emerge ancor più chiaramente una riduzione dell'intensità di fluorescenza nei ceppi mutanti rispetto al ceppo di controllo *wild-type*. L'assunzione del colorante a livello neuronale appare visibilmente inferiore nel ceppo *knock-out*, ma in misura ancora maggiore nel ceppo con *knock-in* della variante missenso, sebbene entrambi presentino ancora la capacità di trattenerlo. Oltre all'inferiore robustezza della fluorescenza, si conferma anche in questo caso una diminuzione numerica dei corpi neuronali, ma viene evidenziata la presenza delle strutture dendritiche a differenza della colorazione precedente.

Si può concludere quindi, affermando che è visibile un cambiamento a livello morfo-strutturale dei neuroni, facendo supporre un'interazione rilevante delle proteine IFT con la formazione e l'assemblaggio delle strutture ciliari e sottolineando come mutazioni a carico del gene *klp-11* possano modificare la robustezza neuronale e la loro integrità. Tuttavia, queste analisi necessitano di ulteriori conferme dal punto di vista quantitativo, mediante misurazioni delle lunghezze dei dendriti ad esempio, oppure tramite l'utilizzo di software in grado di fornirci una quantificazione precisa della fluorescenza per ogni ceppo.



**Figura 4.** Immagini a microscopio a fluorescenza della colorazione con FITC. A sinistra immagine a contrasto di fase, in centro e a destra immagini a fluorescenza. Rappresentazione dei neuroni anfidi della testa dei ceppi wild-type, *klp-11* KO e *klp-11* R15L KI. Barra di scala: 20  $\mu$ m.



**Figura 5.** Immagini a microscopio a fluorescenza della colorazione con Dil. A sinistra immagine a contrasto di fase, in centro e a destra immagini a fluorescenza. Rappresentazione dei neuroni anfidi della testa dei ceppi wild-type, *klp-11* KO e *klp-11* R15L KI. Barra di scala: 20  $\mu$ m

### 6.3 Discussione e Conclusioni

Visto lo scopo dello studio condotto volto a convalidare la patogenicità di varianti di *KIF3B*, identificate come *VUS* (variant of uncertain significance), poiché ancora ignote fino al sequenziamento dell'esoma della paziente, gli esperimenti da noi realizzati sono stati finalizzati ad indagare eventuali modifiche nel fenotipo delle strutture ciliari per valutare la relazione di queste con i fenotipi usuali delle ciliopatie.

Essendo queste sindromi, però, caratterizzate da fenotipi molto eterogenei e livelli di penetranza e gravità variabili, è talvolta difficile effettuare diagnosi.

*C. elegans* si è dimostrato un modello di studio molto affidabile e rappresentativo di condizioni simili a quelle umane a livello genetico. I risultati ottenuti dai saggi fenotipici effettuati su questo organismo modello hanno per la maggior parte confermato l'ipotesi iniziale della rilevanza delle mutazioni prese in esame nel modificare l'azione delle proteine IFT e di conseguenza il processo di ciliogenesi.

I neuroni sensoriali ciliati degli esemplari mutanti di entrambi i ceppi hanno infatti riportato anomalie rilevanti nelle percezioni chemosensoriali, presentando scarsa capacità di indirizzamento verso la sostanza attraente e differenze in termini strutturali che possono influenzare di conseguenza il funzionamento dei neuroni.

Questo evidenzia come alterazioni nell'apparato ciliare dovute al malfunzionamento di *KIF3B* abbiano implicazioni a livello neuronale causando cambiamenti comportamentali.

I risultati ottenuti dallo studio possono avere, quindi, implicazioni degne di nota per la comprensione a livello molecolare delle ciliopatie e portare a stadi più avanzati il nostro livello di conoscenza su possibili geni correlati alle cause di queste sindromi così variegata. Infine, tali esiti possono guidare eventuali futuri approfondimenti sulla funzione e sulle interazioni molecolari di *KIF3B* in ambito umano, diretti ad indagare i possibili effetti dominanti negativi della proteina aberrante generata dalla mutazione missenso.

## 7. Bibliografia e Sitografia

- [1] Focşa I.O, Budişteanu M., Bălgrădean M. *Clinical and genetic heterogeneity of primary ciliopathies (Review)*, in “International Journal of Molecular Medicine” (15 Luglio 2021, n.48(3)), p.176, DOI: 10.3892/ijmm.2021.5009
- [2] Waters A.M., Beales P.L. *Ciliopathies: an expanding disease spectrum*, in “Pediatric Nephrology” (Luglio 2011 n.26(7)), p.1039-1056, DOI: 10.1007/s00467-010-1731-7
- [3] Reiter J.F., Leroux M.R. *Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies*, in “Nature Reviews Molecular Cell Biology” (Settembre 2017 n.18(9)), p.533-547, DOI: 10.1038/nrm.2017.60
- [4] Zhou L., Ouyang L., Chen K., Wang X. *Research progress on KIF3B and related diseases*, in “Annals of Translational Medicine” (Settembre 2019 n.7(18)), p.492, DOI: 10.21037/atm.2019.08.47
- [5] Chana M.S., Triplet B.P., Mant C.T., Hodges R. *Stability and specificity of heterodimer formation for the coiled-coil neck regions of the motor proteins Kif3A and Kif3B: the role of unstructured oppositely charged regions*, in “The Journal of Peptide Research” (Febbraio 2005, n.65(2)), p.209-220, DOI: 10.1111/j.1399-3011.2005.00210.x
- [6] Cogné B., Latypova X., Senaratne L.D.S, Martin L., Koboldt D.C., Kellaris G., Fievet L., Le Meur G., Caldari D., Debray D., Nizon M., Frengen E., Bowne S.J., Cadena E.L., Daiger S.P., Bujakowska K.M., Pierce E.A., Gorin M., Katsanis N., ..., Isidor B. *Mutations in the Kinesin-2 Motor KIF3B Cause an Autosomal-Dominant Ciliopathy*, in “The American Journal of Human Genetics” (Giugno 2020, n.106(6)), p.893-904, DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.04.005
- [7] Corsi A.K, Wightman B., Chalfie M. *A Transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans*, in “Genetics” (18 Giugno 2015, n.200(2)), p.387-407, DOI: 10.1534/genetics.115.176099
- [8] Khan M.L.A., Ali M.Y., Siddiqui Z.K., Shakir M.A., Ohnishi H., Nishikawa K., Siddiqui S.S. *C. elegans KLP-II/OSM-3/KAP-1: Orthologs of the Sea Urchin Kinesin-II, and Mouse KIF3A/KIFB/KAP3 Kinesin Complexes*, in “DNA Research” (1 Aprile 2000 n.7(2)), p.121-125, DOI:10.1093/dnares/7.2.121
- [9] Pan X., Ou G., Civelekoglu-Scholey G., Blacque O.E., Endres N.F., Tao L., Mogilner A., Leroux M.R., Vale R.D., Scholey J.M. *Mechanism of transport of IFT particles in C. elegans cilia by the concerted action of kinesin-II and OSM-3 motors*, in “The Journal of Cell Biology” (25 Settembre 2006, n.174(7)), p.1035-1045, DOI: 10.1083/jcb.200606003

[10] Heiman M., Bülow H. *Dendrite morphogenesis in Caenorhabditis elegans*, in “GENETICS” (5 Giugno 2024, n.227(2)), p. iyae056, DOI: 10.1093/genetics/iyae056