UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie

ELABORATO DI LAUREA

ANALISI DEL NETWORK MITOCONDRIALE IN ZEBRAFISH WILDTYPE E KNOCKOUT PER IL COLLAGENE VI

Tutor: Prof.ssa Paola Braghetta
Dipartimento di Medicina Molecolare

Co-tutor: Dott.ssa Camilla Sancassani
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureando: Riccardo Vecchiato

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

INDICE

1. ABSTRACT 3
2. INTRODUZIONE 4
3. MATERIALI E METODI 7
3.1 TRATTAMENTO FARMACOLOGICO 8
3.2 ACQUISIZIONE AL CONFOCALE 8
4. ANALISI DELLE IMMAGINI 9
4.1 PREPARAZIONE DELLE IMMAGINI 10
4.2 ANALISI DELL'AREA DEGLI ELEMENTI 11
4.3 ANALISI DELLA CIRCULARITY 11
4.4 TEST DELLA SENSIBILITA' DEL METODO 12
5. RISULTATI 13
5.1 RISULTATI CIRCULARITY 14
5.2 RISULTATI SULLA SENSIBILITÀ DEL METODO 16
6. CONCLUSIONI 18
7. REFERENZE BIBLIOGRAFICHE 19

1. ABSTRACT

Le miopatie associate al collagene VI (Col6) sono patologie genetiche causate da mutazioni nei geni COL6A1, COL6A2 e COL6A3. Queste mutazioni compromettono la produzione del collagene VI, un componente essenziale della matrice extracellulare con molteplici funzioni biologiche. Nei topi knockout per il collagene VI, sono state osservate significative anomalie strutturali e funzionali dei mitocondri nelle cellule muscolari. L'analisi ultrastrutturale ha rivelato mitocondri con morfologia alterata, incluse creste disorganizzate e matrice di densità anomala. Inoltre, abbiamo riscontrato una ridotta capacità respiratoria e un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Parallelamente, negli zebrafish mutanti per il collagene VI, sono stati messi in evidenza difetti simili, ma con alcune peculiarità. In particolare, è stata notata una distribuzione alterata dei mitocondri all'interno delle fibre muscolari e una compromissione della dinamica mitocondriale. L'obiettivo di questo studio è confermare e approfondire le differenze precedentemente osservate nell'organizzazione del network mitocondriale nel modello zebrafish, utilizzando tecniche di imaging in vivo su linee transgeniche reporter per i mitocondri. I risultati forniranno nuove informazioni sui meccanismi patogenetici delle miopatie legate al collagene VI e suggeriranno potenziali bersagli terapeutici mirati alla disfunzione mitocondriale in queste patologie.

2. INTRODUZIONE

Il Collagene VI (COL6) è una proteina che costituisce la matrice extracellulare che forma un network microfilamentoso nei muscoli scheletrici ed altri organi. Nei mammiferi sono presenti sei geni che codificano per le diverse catene da α1(VI) a α6(VI). La proteina si forma in seguito all'assemblaggio in triple eliche date dai monomeri α1 e α2 che interagiscono con una terza catena identificata come αX (dove αX può essere data da una delle altre isoforme da α3 a α6)[1]. Questi trimeri associano intracellularmente formando dimeri e tetrameri legati da ponti disolfuro. Vengono quindi secreti verso lo spazio extracellulare, dove formano microfilamenti i quali, assieme alle altre proteine extracellulari, costituiscono il network della matrice.

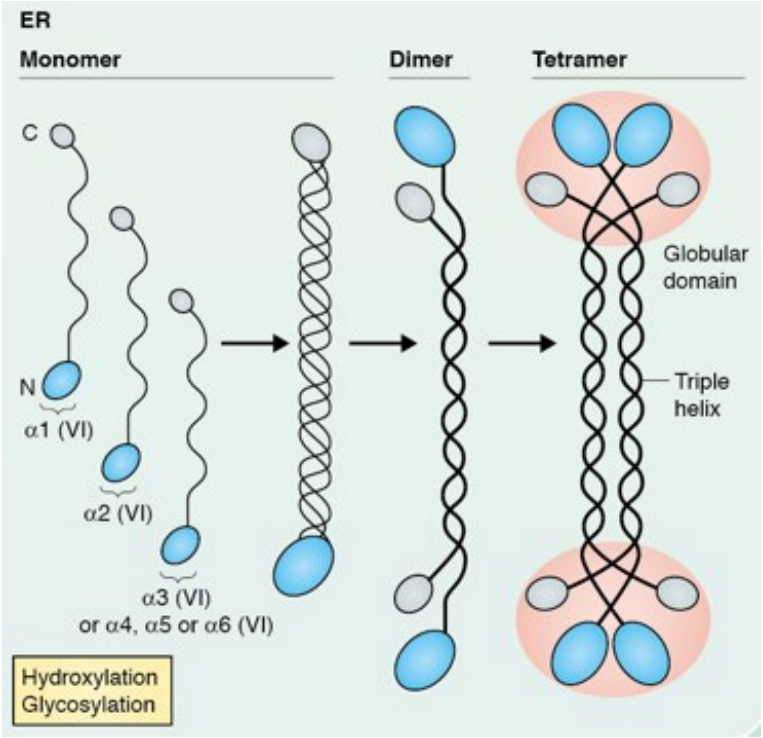


Fig.1 Struttura e meccanismo di assemblaggio del Collagene VI[2]

In figura 1 è possibile vedere a sinistra come le catene α1, α2 e αX si associno tra loro formando dei trimeri, che in seguito si associano a loro volta andando a formare dimeri e tetrameri.

Nell'uomo le mutazioni a livello dei geni che codificano per COL6 sono la causa di un gruppo di disordini muscolari che prende il nome di "COL6-related-myopathies" (COL6-RM)[3], delle quali fanno parte la distrofia muscolare congenita di Ullrich (UCMD) e la miopatia di Bethlem (BM). La UCMD è caratterizzata da debolezza generalizzata, basso tono muscolare, contratture a livello delle articolazioni prossimali e una iperlassità delle articolazioni distali. Il decorso della malattia è rapido e spesso provoca la perdita di mobilità entro il primo decennio di vita. Nei casi più gravi non si raggiunge la deambulazione autonoma e la veloce progressione dei sintomi porta ad una morte precoce per insufficienza respiratoria

dovuta a rigidità a livello toracico e malfunzionamento del diaframma. Le biopsie effettuate su pazienti affetti da UCMD hanno evidenziato una bassa quantità di COL6 nella matrice extracellulare, indice clinico della patologia[3]. Anche la BM presenta un precoce esordio dei sintomi, con comparsa di moderata debolezza principalmente nella zona prossimale e sviluppo di contratture, tuttavia con esisti meno gravi.

Nel corso degli ultimi vent'anni sono stati generati animali modello con svariati fenotipi per studiare le COL6-RM. In particolare, i topi knockout per il gene *Col6a1* hanno permesso di comprendere i meccanismi pato-molecolari, evidenziando che le fibre muscolari deficienti in COL6 subiscono apoptosi spontanea e accumulano mitocondri disfunzionali a causa della mancata regolazione da parte del macchinario autofagico, riscontrato anche nei pazienti BM/UCMD. La mancanza di COL6 colpisce anche il compartimento neuromuscolare andando a frammentare i cluster di recettori per l'acetilcolina e alterando la trasmissione neuromuscolare. Inoltre, i topi *Col6a1*$^{-/-}$ mostrano un'accelerata degenerazione articolare accompagnata da un ritardo nella ossificazione secondaria e un'inferiore densità ossea[1].

Per uno screening su larga scala, il modello di roditore non risulta vantaggioso, in quanto presenta diverse limitazioni. Infatti, presentano elevati costi di mantenimento e hanno un tempo di gestazione elevato che dà origine a una prole contenuta. Inoltre, i roditori presentano uno sviluppo embrionale interno che quindi ne rende difficile l'osservazione e i tempi per permettere lo sviluppo del fenotipo risultano non compatibili con un'analisi su larga scala. Invece, *Danio rerio* (comunemente chiamato zebrafish), rappresenta un eccellente modello di studio, grazie alla sua elevata velocità di riproduzione. Lo Zebrafish è un piccolo pesce d'acqua dolce, caratterizzato dalla presenza di striature lungo il suo corpo, ampiamente impiegato negli screening farmacologici grazie a vantaggi quali lo sviluppo embrionale ex utero, che permette di condurre uno studio dei primi stadi di sviluppo attraverso un'analisi visiva diretta, la sua elevata fertilità e il corto ciclo di vita, il costo di mantenimento relativamente basso e un'anatomia tale da permettere una comparazione con la biologia umana e le malattie ad essa legate. Infatti, nonostante siano più distanti filogeneticamente dagli umani rispetto ai topi, condividono un 82% dei geni associati a malattie, rendendoli quindi ottimi candidati per studi mirati su malattie genetiche[4].

L'evoluzione delle tecniche di ingegneria genetica ha reso lo zebrafish un modello ancora più utile nell'ambito della ricerca farmacologica. Tra le varie metodologie, la tecnologia CRISPR-Cas è una delle più importanti, in quanto permette di introdurre modificazioni in vivo, facilitando così la generazione di nuove linee mutanti da utilizzare negli studi farmacologici. A questo proposito, gli screening fenotipici offrono svariati vantaggi rispetto agli approcci basati su target molecolari, in quanto permettono di verificare l'efficacia di farmaci anche qualora il target specifico non sia ancora stato individuato o validato.

I mitocondri, spesso definiti come la centrale energetica della cellula, sono organelli presenti all'interno delle cellule eucariotiche. Si sono formati in seguito all'evoluzione di un antenato procariotico che ha instaurato un rapporto simbiotico in seguito all'inglobamento all'interno della cellula. I mitocondri contengono un proprio genoma estremamente conservato tra i mammiferi che viene ereditato per via materna.

Gli studi degli ultimi decenni hanno evidenziato che i mitocondri cambiano continuamente forma attraverso processi di fusione e di fissione che vanno a modificare costantemente la morfologia del network che essi formano[5]. Come si può ben intendere questi processi consistono in un continuo fondersi e dividersi andando a formare sia un vero e proprio network mitocondriale, sia elementi isolati. Questi processi sono fondamentali per la crescita, la ridistribuzione mitocondriale e il mantenimento di un network sano; un loro scompenso può generare situazioni patologiche.

Fusione e fissione partecipano inoltre alla regolazione di processi quali apoptosi, autofagia selettiva di mitocondri danneggiati o vecchi, anche detta mitofagia, che assieme alla biogenesi mitocondriale permette il turnover, ovvero il rinnovamento costante dei mitocondri all'interno della cellula[6]. I processi di fusione e fissione sono gestiti da macchinari di cui fanno parte tre proteine della famiglia delle dinamine che svolgono una funzione chiave, quali *Mfn1* e *Mfn2* per la fusione e *Drp1* per la fissione che sono a loro volta controllate da una serie di proteine adattatrici situate sulla superficie del mitocondrio[7].

Grazie alla microscopia, si è in grado di osservare la morfologia dei mitocondri e del network che essi formano, evidenziando possibili condizioni che possono indicare un loro malessere. Ad esempio, sfruttando la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è possibile osservare lo stato di salute delle creste mitocondriali, indicatori del benessere del mitocondrio. Sfruttando linee mutanti che esprimono la GFP a livello delle membrane mitocondriali si può osservare lo stato del network mitocondriale in tempo reale mediante l'utilizzo di microscopia confocale. Per quanto riguarda un'analisi di tipo quantitativo, è possibile valutare la funzionalità mitocondriale mediante l'uso di numerosi saggi biochimici. Questi permettono di determinare e quantificare determinati fattori che assumono un ruolo importante nella regolazione del metabolismo mitocondriale quali: potenziale di membrana, importante nella valutazione della bioenergetica e della conseguente produzione di ATP, lo stress ossidativo determinato dalla produzione di ROS, per finire con la quantifica dei livelli di calcio, che hanno un ruolo determinante nella via apoptotica. Un importante esempio di saggio biochimico può essere rappresentato dal Seahorse[8], che permette di valutare in tempo reale il metabolismo cellulare attraverso due parametri: il tasso di consumo di ossigeno (OCR) e il tasso di acidificazione extracellulare (ECAR). Il variare di questi due parametri determina un cambiamento nel fabbisogno energetico della cellula, più nello specifico, l'OCR permette di misurare la respirazione cellulare, mentre l'ECAR va a dare una misura relativa alla glicolisi anaerobica. Tramite l'utilizzo di vari inibitori della respirazione questo saggio permette di determinare il tasso di

respirazione basale e la produzione totale di ATP[9]. Attraverso tecniche di Western blotting si possono quantificare enzimi coinvolti nella catena di trasporto mitocondriale o altre proteine facenti parte di svariati processi mitocondriali.

Le tipologie di analisi esposte in precedenza possono essere accompagnate da uno studio relativo all'espressione dei geni chiave per la funzione mitocondriale mediante qPCR. In seguito ad un trattamento con un farmaco di cui non sono conosciuti gli effetti è possibile studiare come questo vada ad agire nei confronti di geni, come *Mfn1*, *Mfn2*, *Drp1*, fondamentali nei processi di fusione e fissione[10]. per valutare una loro maggiore o minore espressione. Inoltre, sempre utilizzando la PCR, è possibile osservare se nei modelli knockout è naturalmente presente una sovra-espressione o una sotto-stimolazione di un determinato pathway e di come questa interagisca sulla salute del metabolismo mitocondriale.

Come si è potuto osservare, per lo studio dello stato di salute mitocondriale vi sono svariate tecniche, che comprendono sia approcci in vivo che ex vivo, scelte in base a ciò che si desidera osservare. Nel caso specifico del network mitocondriale, nel laboratorio Bonaldo è stata ottimizzata un'analisi in vivo mediante microscopia confocale ove vengono acquisite delle singole immagini per i singoli individui che vengono in seguito vagliate da un software.

Per lo studio del network mitocondriale, è stata generata in laboratorio una linea murante per il gene *COX8A* tramite l'uso della tecnologia di editing genetico CRISPR-Cas9. Questa contiene un costrutto codificante la GFP con la sequenza di localizzazione mitocondriale della subunità VIII della Citocromo C ossidasi[1].

Lo scopo della mia ricerca è quello di partecipare alla validazione di questo nuovo metodo di analisi del network mitocondriale eseguito su immagini di emisomiti di zebrafish a 48 ore post fecondazione (hpf), analizzate con AIVIA, un software basato sull'intelligenza artificiale. Il mio contributo alla validazione è quello di riproporre la medesima analisi sfruttando un programma già ampiamente in uso a questo scopo (ImageJ) e osservare dunque le differenze degli *outcomes*.

3. MATERIALI E METODI

Tutte le pratiche sperimentali che coinvolgono l'utilizzo dello zebrafish devono essere condotte in conformità alla legislazione Italiana ed Europea sulla protezione degli animali (direttiva 2010/63/EU). Il mantenimento viene condotto in vasche adatte allo stadio di sviluppo e alla dimensione degli individui, ove è installato un sistema di filtrazione. Questi sistemi garantiscono un mantenimento della qualità dell'acqua mediante una combinazione di processi meccanici, biologici e un'azione germicida mediante UVC. I parametri di qualità dell'acqua come pH, livelli di ammoniaca, salinità, ossigeno disciolto e conduttività sono controllati regolarmente in modo da garantire un ambiente stabile. La temperatura dell'acqua è mantenuta a 28.5 °C e il fotoperiodo consiste in un ciclo di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Gli zebrafish vengono nutriti tre volte al giorno con cibo secco, con l'aggiunta di artemie vive in modo tale da aumentare la competizione.

Gli zebrafish sono mantenuti in un medium chiamato *Fish Water* (FW), composto da sali che non interagiscono con i farmaci utilizzati o con il dimetil-solfossido (DMSO), solvente in cui i farmaci sono disciolti. Gli esperimenti vengono condotti utilizzando le larve di zebrafish e non individui adulti; perciò, per ottenere le larve con il fenotipo voluto sono condotti degli accoppiamenti che richiedono estrema attenzione. Questi sono effettuati usando particolari vasche dotate di un inserto removibile forato in modo da raccogliere le uova sul fondo ed evitare il fenomeno del cannibalismo filiale. Le uova vengono raccolte in una piastra Petri, ove è mantenuta una densità di 50 embrioni per piastra per ridurre fattori di stress che possano inficiare lo sviluppo dell'embrione.

3.1 TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

L'analisi del network mitocondriale viene effettuata su embrioni zebrafish a 48 hpf (*hours post fertilization*). I trattamenti vengono effettuati a partire dalle 7 hpf e vengono rinnovati dopo le prime 24h. Per permettere l'ingresso del farmaco, si esegue la foratura del corion, la membrana protettiva che riveste gli embrioni. Le condizioni considerate sono:

- Wild-type (wt) trattati con DMSO 1:1000;
- Knockout (ko) per il Col6, trattati con DMSO 1:1000;
- Knockout trattati con Formoterolo (FORM) 10 μM;

Viene utilizzato DMSO in concentrazione 1:1000 come trattamento di controllo in quanto è il solvente utilizzato per il veicolo del farmaco. Per ogni condizione sperimentale, sono stati allestiti circa 20 embrioni per pozzetto, distribuiti in piastre da 12 pozzetti contenenti 1 mL di *Fish Water* con 1 μL di soluzione o solvente. La concentrazione finale di formoterolo è pari a 10 μM. L'analisi finale si è basata su un complessivo di circa 30 pesci per condizione.

3.2 ACQUISIZIONE AL CONFOCALE

Al raggiungimento delle 48 hpf, gli embrioni vengono decorionati, anestetizzati con Tricaina e montati direttamente su vetrini coprioggetto utilizzando Agarosio *low melting* (Agarosio LMP). Questo tipo di agarosio presenta punti di fusione e solidificazione inferiori, riducendo i rischi di danno ai campioni dovuti alla temperatura, pur mantenendo una adeguata stabilità per eseguire l'acquisizione al microscopio.

Mediante l'utilizzo del microscopio confocale Leica Stellaris SP8, viene acquisita una singola immagine dell'emisomita situato al livello della porzione finale della *yolk sac extension*. La muscolatura dello zebrafish, come per ogni vertebrato, è distinta in fibre muscolari lente, più superficiali e caratterizzate da una contrazione lenta ma sostenuta, e fibre muscolari veloci, più in profondità, forniscono potenza e velocità ma si affaticano più rapidamente. Per questa analisi verrà tenuto conto solo delle fibre lente, in quanto le veloci non hanno mostrato differenze statisticamente rilevanti negli esperimenti effettuati in precedenza.

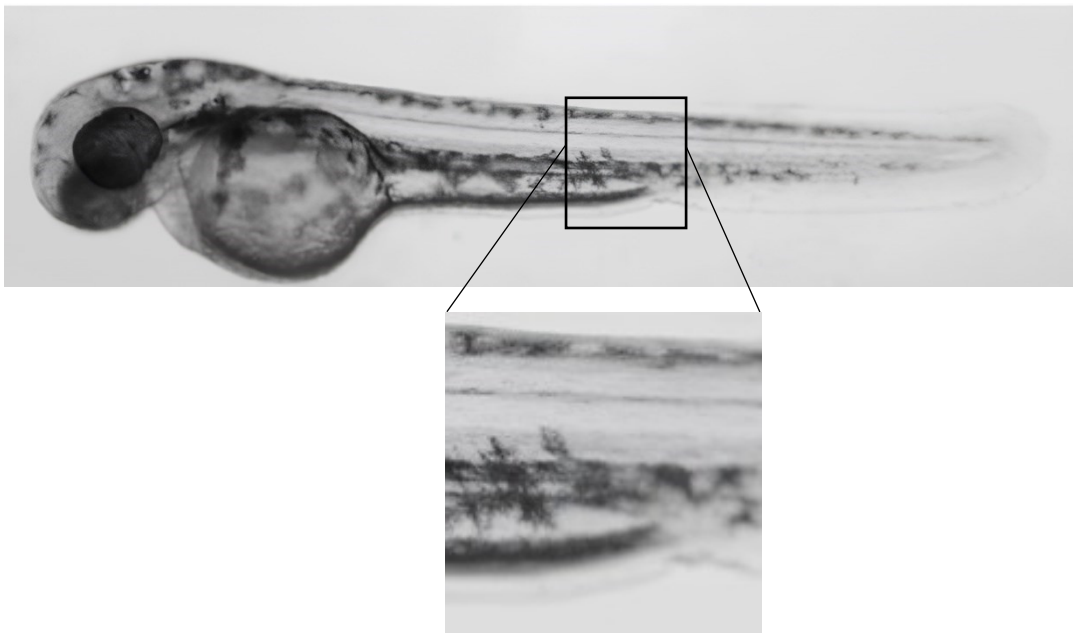


Fig.2 Immagine rappresentativa di una larva di Zebrafish wt 48 hpf e un ingrandimento del fascio di fibre preso in esame situato subito al di sopra della parte terminale della Yolk sac extension[11].

Il piano prescelto per l'acquisizione è dato dal secondo fascio di fibre al di sotto della pelle, nel punto in cui i nuclei vengono visualizzati con la loro massima ampiezza, in modo tale da vedere le fibre nella loro interezza. Il primo fascio di fibre non è stato ritenuto adatto per l'acquisizione in quanto la presenza di pelle non permette una corretta visualizzazione della fibra intera, il secondo garantisce sufficiente certezza di osservare le fibre muscolari lente.

Le condizioni di acquisizione sono le seguenti:

- obiettivo ad ingrandimento 63x;
- zoom digitale 2x;
- frequenza di scansione pari a 100 Hz;
- risoluzione di 2048 × 2048 pixel.

4. ANALISI DELLE IMMAGINI

Come anticipato in precedenza, per eseguire l'analisi delle immagini per la convalida della procedura con AIVIA ho utilizzato ImageJ, uno dei programmi più sfruttati nell'ambito dell'analisi di immagini.

L'analisi è stata condotta suddividendo le diverse componenti del network mitocondriale delle fibre in tre classi principali definite in precedenza in base all'area degli oggetti rilevati:

- *Isolated*: con area compresa tra 0.1017 μm^2 e 1.017 μm^2 (incluso);
- *Associated*: con area compresa tra 1.017 μm^2e 6.102 μm^2 (incluso);

- *Complex Network*: con area maggiore di 6.102 μm^2;

Queste tre categorie sono state selezionate e perfezionate per meglio definire lo stato di associazione dei mitocondri formanti il network. I mitocondri rientranti nella classe degli *isolated* idealmente non intrattengono interazioni con altri elementi e possono risultare dunque come prodotti di biogenesi mitocondriale o resti di un processo di fissione. Quelli rientranti nella classe degli *associated* rappresentano mitocondri con interazioni semplici, formanti strutture non articolate ma che garantiscono interconnessione tra elementi singoli. Gli elementi del network mitocondriale che si estendono per i valori più ampi di area vanno a definire interazioni multiple tra un numero maggiore di mitocondri che formano connessioni ampie permettendo di connettere fra loro punti distanti della fibra muscolare.

4.1 PREPARAZIONE DELLE IMMAGINI

Procedendo con la quantifica dei dati relativi a queste classi si è partiti dalle immagini ricavate al microscopio, convertite nel formato richiesto dal software (RGB). È stato applicato un *Color Threshold* con *Hue* fissata a 0, che ha permesso di aggiustare la luminosità e il contrasto dell'immagine in modo tale da rimuovere il background dell'immagine, lasciando in evidenza esclusivamente il network mitocondriale, mantenendo coerenza con le immagini analizzate tramite AIVIA. A questo punto attraverso una linea poligonale chiusa è stata tracciata una *Region Of Interest* (ROI), la quale permette di determinare l'area dell'emisomita, escludendo così l'intorno non analizzato. Solo una volta disegnata la ROI si può procedere con l'analisi, frammentando il network in elementi diversi.

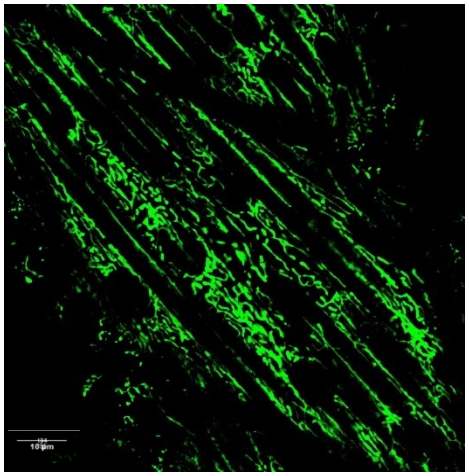


Fig.3 Emisomita (muscolatura lenta di larva di Zebrafish 48 hpf) wt Pre-analisi

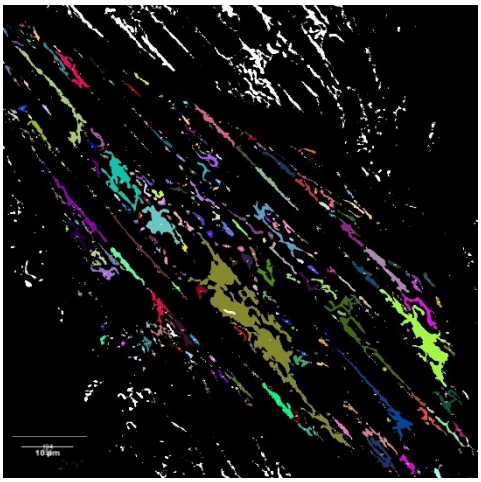


Fig.4 Emisomita (muscolatura lenta di larva di Zebrafish 48 hpf) wt Post-analisi

In figura 3 si può vedere un emisomita di muscolatura lenta acquisita al confocale alla quale è stato rimosso il background, mentre in figura 4 è possibile vedere le maschere generate da ImageJ relative ai diversi oggetti formanti il network all'interno della ROI selezionata.

4.2 ANALISI DELL'AREA DEGLI ELEMENTI

Per ogni immagine sono state eseguite tre analisi distinte, una per ciascun intervallo di area definito nelle classi citate in precedenza. Sono stati ottenuti i dati relativi alle tre classi, per un numero di immagini tale da permettere di avere una popolazione statistica sufficientemente rilevante per tutte e tre le condizioni sperimentali. I valori sono stati importati in Excel per essere sottoposti ad una normalizzazione. Il numero di elementi appartenenti alle varie classi di aree è stato trasformato in percentuale di elementi appartenenti a ciascuna classe sul totale di elementi presenti in ciascuna immagine. Questa conversione ha restituito un parametro che permettesse di comparare in maniera coerente tra loro diverse immagini in diverse condizioni, per poter svolgere in seguito un'analisi statistica.

In seguito, i valori così ottenuti sono stati inseriti su Graphpad Prism 10, grazie a cui è costruito un grafico per ciascuna delle classi prese in esame, dove ognuno dei quali andava ad indicare la distribuzione percentuale degli elementi in ciascun intervallo d'area per ciascuna delle tre condizioni dell'esperimento. Sempre utilizzando Graphpad Prism sono stati applicati dei test statistici per lo studio della varianza che permettessero di verificare la significatività dei dati restituiti al termine dell'analisi. I test selezionati sono il test di Welch e il test di Brown-Forsythe in quanto sono robusti e affidabili in caso di disomogeneità delle varianze e ottimi nei casi in cui è necessario confrontare le medie di tre o più gruppi.

4.3 ANALISI DELLA CIRCULARITY

Oltre all'area, è stato preso in considerazione un ulteriore parametro morfologico ottenuto dall'analisi: la *circularity*, che consiste nel grado di rotondità dei vari elementi. Per questa analisi sono stati osservati esclusivamente gli elementi *isolated*, in modo tale da poterli confrontare con quanto ottenuto con AIVIA, dove erano presenti delle differenze morfologiche chiaramente distinguibili. Questo è stato fatto in modo tale da ottenere dati utili a sostegno della validazione del metodo.

Anche per questo dato sono state identificate tre classi:

- *Filamentous*: con *circularity* compresa tra 0 e 0.20 (incluso);
- *Intermediate*: con *circularity* compresa tra 0.21 e 0.60 (incluso);
- *Sphere*: con *circularity* maggiore di 0.61;

L'analisi effettuata con ImageJ non ha prodotto alcuna differenza statisticamente rilevante tra le varie condizioni in analisi, probabilmente dovuto alla scarsa sensibilità di questo software di adattare gli elementi rivelati con sufficiente aderenza all'immagine reale. Per questa ragione, il proseguo di questa validazione è stato traslato nuovamente su AIVIA andando a valutare la sua sensibilità all'induzione delle modifiche apportate alla morfologia del network mediante interventi farmacologici mirati.

4.4 TEST DELLA SENSIBILITA' DEL METODO

L'analisi con AIVIA presentava una problematica essenziale: essa, infatti, si pone lo scopo di valutare la morfologia di un network che naturalmente si sviluppa in tre dimensioni, analizzando un unico piano di acquisizione in 2D. Quindi ci si è chiesto se il metodo fosse sufficientemente sensibile per captare i cambiamenti a livello della morfologia del network pur utilizzando immagini singole. Per capire questo, è stata indotta la fusione mitocondriale grazie alla somministrazione del farmaco mdivi1, inibitore di *Drp1*, che ha mostrato efficacia statisticamente rilevante (dati non mostrati). Parallelamente è stata indotta la frammentazione del network, generata farmacologicamente con oligomicina, un antibiotico macrolide noto per inibire la sintesi dell'ATP sintasi mitocondriale producendo un notevole cambiamento morfologico dei mitocondri. Io mi sono occupato dell'analisi di questi ultimi dati.

Sono stati applicati un *Pixel Classifier* e una *Recipe* precedentemente definite e ottimizzate:

- *Background removal factor* = 26;
- *Contrast Threshold* = 62;
- *Fill hole* = 0;
- *Smoothing factor* = 0;

In seguito, tramite il tool *Subset filtering* è stato possibile determinare e riconoscere esclusivamente gli oggetti di una determinata grandezza in pixel:

- *Object size*: maggiore di 0.0061, per escludere il rumore di fondo.
- *Separation factor*: none

È stata in seguito selezionata una ROI attorno all'emisomita da valutare, discriminando i valori in base all'area in μm^2, mantenendo le classi viste in precedenza. In questo caso la *circularity* è stata valutata per tutte le classi d'area in modo da vedere come le modifiche indotte alla morfologia andavano a variarne il contenuto. Da questi dati, ciascuna classe è stata suddivisa in 3 sottoclassi basate sui valori di *circularity* per definire la forma degli oggetti e non solo la loro ampiezza spaziale. I dati ottenuti associati alle relative classi d'area di appartenenza sono stati analizzati tramite Graphpad Prism per ottenere i relativi grafici e inferenza statistica.

5. RISULTATI

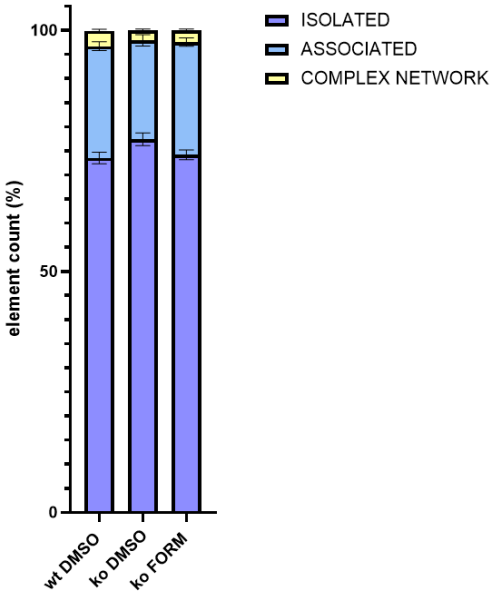


Fig 5. Elementi totali per classe d'area in ciascuna condizione sperimentale (%)

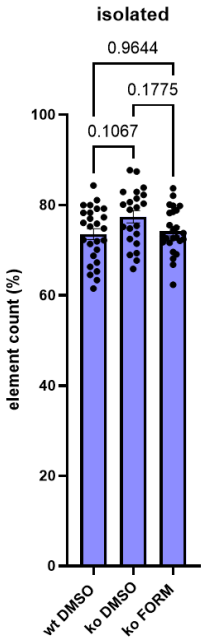


Fig. 6 Elementi Isolated per ciascuna condizione sperimentale (%)

In figura 5 si può osservare il conteggio degli elementi ottenuti per ciascuna condizioni sperimentale suddivisi per classi d'area.

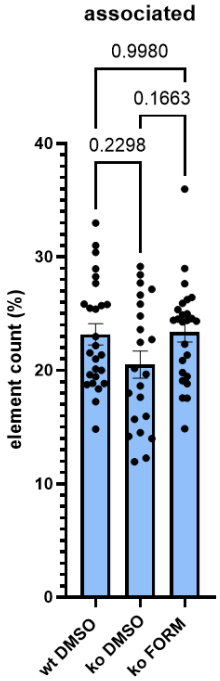


Fig. 7 Elementi Associated per ciascuna condizione sperimentale (%)

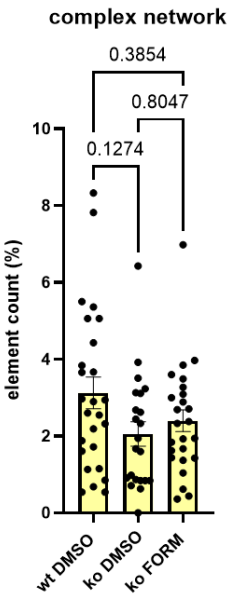


Fig. 8 Elementi Complex Network per ciascuna condizione sperimentale (%)

L’analisi della distinzione degli elementi sulla base dell’area, effettuata mediante ImageJ, non ha prodotto alcuna rilevanza statistica, pur mantenendo un andamento coerente con i risultati ottenuti con il software AIVIA (dati non mostrati). È infatti possibile notare che negli individui knockout la percentuale degli elementi isolati è tendenzialmente maggiore (Fig 6), a discapito di formazioni interconnesse più o meno intricate (Fig. 7,8). Inoltre, si osserva come questa tendenza venga parzialmente revertita grazie al trattamento farmacologico con Formoterolo, che sembra permettere il recupero di quasi tutti questi parametri, ad eccezione degli elementi formanti network più complessi (Fig 8), che si rivelano essere comunque presenti in minor misura rispetto a ciò che è osservabile nelle fibre degli individui wildtype.

5.1 RISULTATI CIRCULARITY

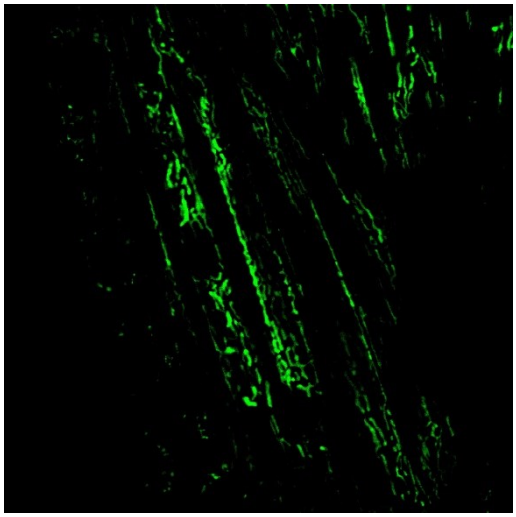


Fig. 9 Emisomita (muscolatura lenta di larva di Zebrafish 48 hpf) wt

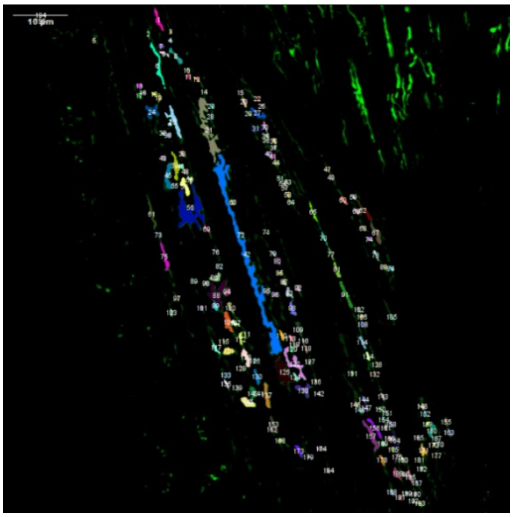


Fig. 10 Emisomita (muscolatura lenta di larva di Zebrafish 48 hpf) wt con maschere di ImageJ

L’analisi della *circularity* degli elementi *isolated* tramite l’utilizzo del software ImageJ non ha mostrato alcuna differenza significativa tra le varie condizioni osservate, dato in estremo disaccordo con quello ottenuto con AIVIA, dove è possibile osservare un aumento della sfericità di questi oggetti (dati non mostrati) negli individui ko. La differenza è visibile dalle maschere prodotte da ImageJ a partire dall’immagine originale: si può notare infatti una scarsa aderenza alla forma reale degli oggetti, motivo per i cui i dati risultano essere scarsamente affidabili e perciò non rilevanti, come mostrato in figura 10.

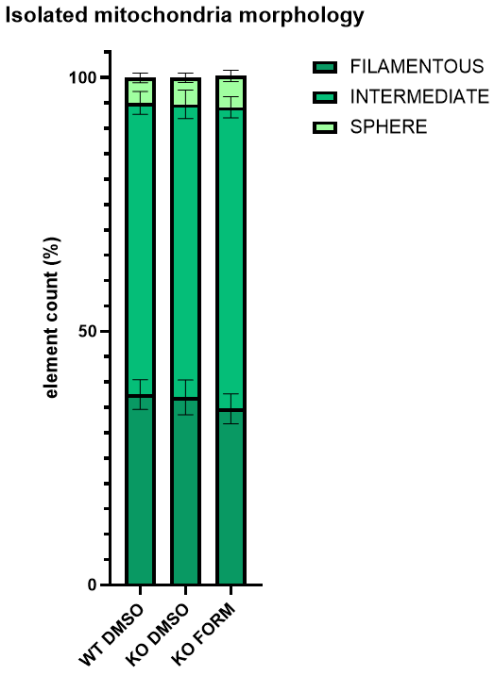


Fig 11 Elementi totali per classe di circularity in ciascuna condizione sperimentale (%)

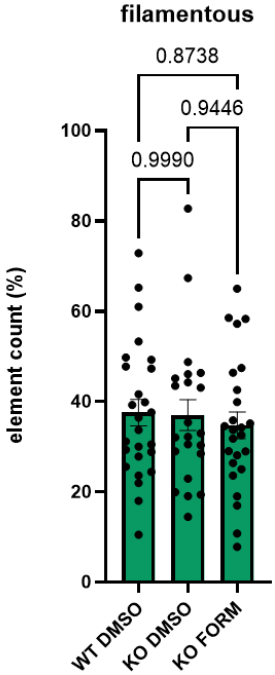


Fig. 12 Elementi Filamentous in ciascuna condizione sperimentale (%)

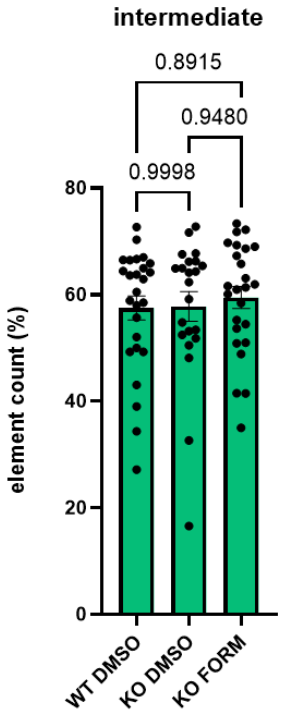


Fig 13 Elementi Intermediate in ciascuna condizione sperimentale (%)

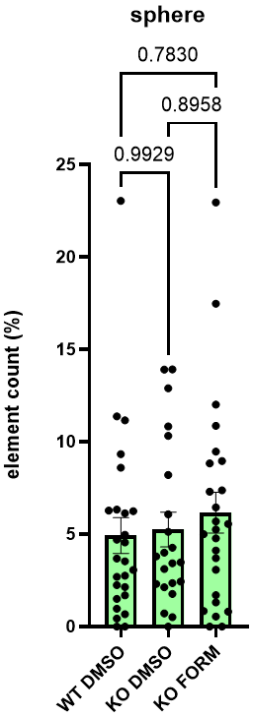


Fig 14 Elementi Sphere in ciascuna condizione sperimentale (%)

A causa di ciò, si ottiene una scarsa variabilità delle classi al variare delle condizioni. Infatti, nei grafici delle figure 12, 13 e 14, i valori ottenuti per gli individui wildtype, knockout e knockout trattato non si discostano tra loro, cosa che non può essere veritiera, in quanto per rendere i risultati rilevanti deve essere presente una variabilità tale da permettere di osservare differenze significative.

5.2 RISULTATI SULLA SENSIBILITÀ DEL METODO

In merito al test relativo alla sensibilità del metodo basato su AIVIA, sono state introdotte modifiche alla morfologia mediante trattamenti farmacologici mirati, che hanno così alterato l'equilibrio tra fusione e fissione, controllato da *Mfn1*, *Mfn2* e *Drp1*. L'inibizione di *Drp1* mediata da mdivi1 ha favorito la fusione mentre l'oligomicina ha incentivato la frammentazione. Da una prima esamina sembrava che l'oligomicina, anziché diminuire il numero di elementi *associated* e *complex network*, li andasse ad aumentare. Tuttavia, dalle immagini si è visto che gli elementi con aree elevate, rientranti di default nelle classi *associated* e *complex network*, erano in realtà mitocondri *swallen* (Fig. 19). Per questo motivo, dai dati ottenuti sono stati sottratti gli elementi non filamentosi (*intermediate* e *sphere*) delle classi *associated* e *complex network*, in modo tale da eliminare i mitocondri rigonfi che comportavano l'errore nei dati. Infatti, una volta rimossi si è notato un notevole aumento degli elementi *isolated*, rappresentato in figura 15, come preventivato.

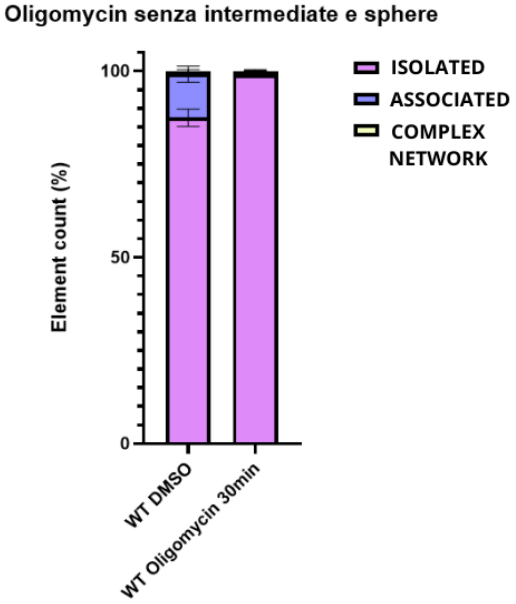


Fig. 15 Elementi suddivisi nelle 3 classi d'area (%)

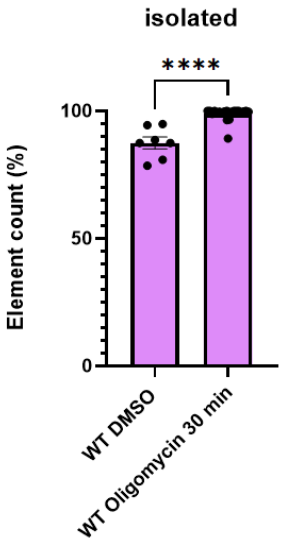


Fig. 16 Elementi Isolated (%)

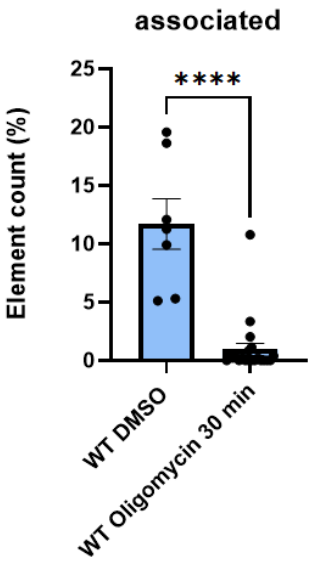


Fig. 17 Elementi Associated (%)

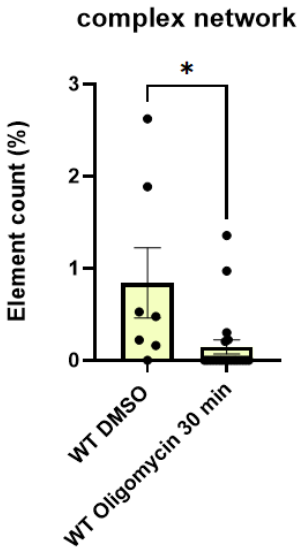
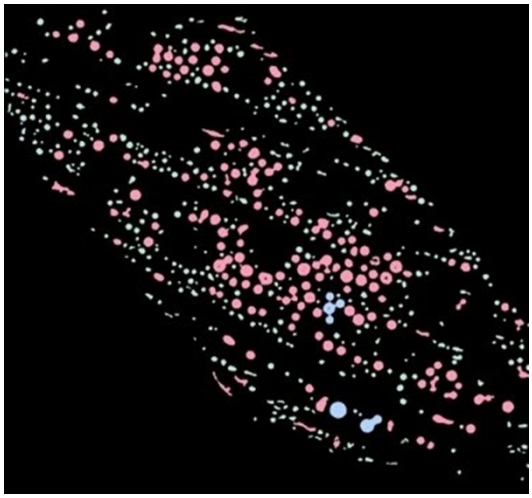


Fig. 18 Elementi Complex Network (%)

Inoltre, osservando i grafici in figura 17 e 18 è possibile vedere come negli individui trattati rimanga una percentuale esigua di elementi formanti associazioni più o meno complesse, segno della frammentazione del network mitocondriale provocata dal trattamento.



.

Fig. 19 Emisomita (Muscolatura lenta di Zebrafish 48 hpf) trattato con oligomicina 25 µM.per 30 minuti

In figura 19 è possibile vedere le maschere ottenute con AIVIA delle tre diverse classi d'area evidenziate in colori differenti, in verde gli elementi *isolated*, in rosso gli elementi *associated* ed in blu il *complex network*. La presenza di mitocondri *swallen* è ben visibile data la presenza di numerosi elementi sferici di notevoli dimensioni.

6. CONCLUSIONI

Dall'insieme dei dati ottenuti e le significatività ad essi associate, si può affermare che: il metodo di analisi innovativo con AIVIA, oltre a restituire dati coerenti con quelli ottenuti con ImageJ sia a livello numerico che di andamento, permette di effettuare uno studio statistico robusto, che comporti una significatività comprovata. Questi aspetti comportano un grado di precisione più elevato, rendendo il metodo con AIVIA preferibile rispetto al metodo tradizionale per l'analisi del network mitocondriale. Inoltre, poiché il test sulla sensibilità ha restituito esiti positivi, è stato dimostrato che il software è in grado di captare cambiamenti della morfologia del network in immagini 2D, a differenza di ImageJ, rimarcando la superiorità di AIVIA. In conclusione, data l'assenza di evidenze che sostengano il contrario, è possibile affermare che il metodo possa definirsi validato.

7. REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

---

[1] Valentina Tonelotto et al., «Collagen VI Ablation in Zebrafish Causes Neuromuscular Defects during Developmental and Adult Stages», *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 112 (settembre 2022): 39–61, https://doi.org/10.1016/j.matbio.2022.08.004.
[2] Matilde Cescon et al., «Collagen VI at a Glance», *Journal of Cell Science* 128, fasc. 19 (2015): 3525–31, https://doi.org/10.1242/jcs.169748.
[3] A. Reghan Foley et al., «Collagen VI-Related Dystrophies», in *GeneReviews®*, a c. di Margaret P. Adam et al. (University of Washington, Seattle, 1993), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1503/.
[4] Calum A. MacRae e Randall T. Peterson, «Zebrafish as Tools for Drug Discovery», *Nature Reviews. Drug Discovery* 14, fasc. 10 (2015): 721–31, https://doi.org/10.1038/nrd4627.
[5] Alexander M. van der Bliek et al., «Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion», *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, fasc. 6 (2013): a011072, https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011072.
[6] Wen Chen et al., «Mitochondrial Dynamics in Health and Disease: Mechanisms and Potential Targets», *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8, fasc. 1 (2023): 333, https://doi.org/10.1038/s41392-023-01547-9; van der Bliek et al., «Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion».
[7] Hanne Hoitzing et al., «What Is the Function of Mitochondrial Networks? A Theoretical Assessment of Hypotheses and Proposal for Future Research», *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 37, fasc. 6 (2015): 687–700, https://doi.org/10.1002/bies.201400188.
[8] Jenna K. Caines et al., «The Use of Seahorse XF Assays to Interrogate Real-Time Energy Metabolism in Cancer Cell Lines», *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2508 (2022): 225–34, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_17.
[9] Caines et al., «The Use of Seahorse XF Assays to Interrogate Real-Time Energy Metabolism in Cancer Cell Lines».
[10] Han Dong e Shih-Yin Tsai, «Mitochondrial Properties in Skeletal Muscle Fiber», *Cells* 12, fasc. 17 (2023): 2183, https://doi.org/10.3390/cells12172183.
[11] Stefan Scholz et al., «The Zebrafish Embryo Model in Environmental Risk Assessment--Applications beyond Acute Toxicity Testing», *Environmental Science and Pollution Research International* 15, fasc. 5 (2008): 394–404, https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z.