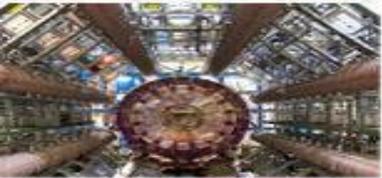


# Zebrafish come organismo modello



Dott.ssa Perugini Monia





# Cosa sono gli organismi modello?

Sono specie **non-umane** che sono state studiate approfonditamente, di cui si conosce perfettamente la biologia e il genoma, e che vengono utilizzati dai ricercatori per studiare fenomeni biologici di importanza scientifica.



- Dimensioni ridotte
- Tempi brevi riproduzione
- Possibilità di manipolare genoma



# Tipi di organismi modello

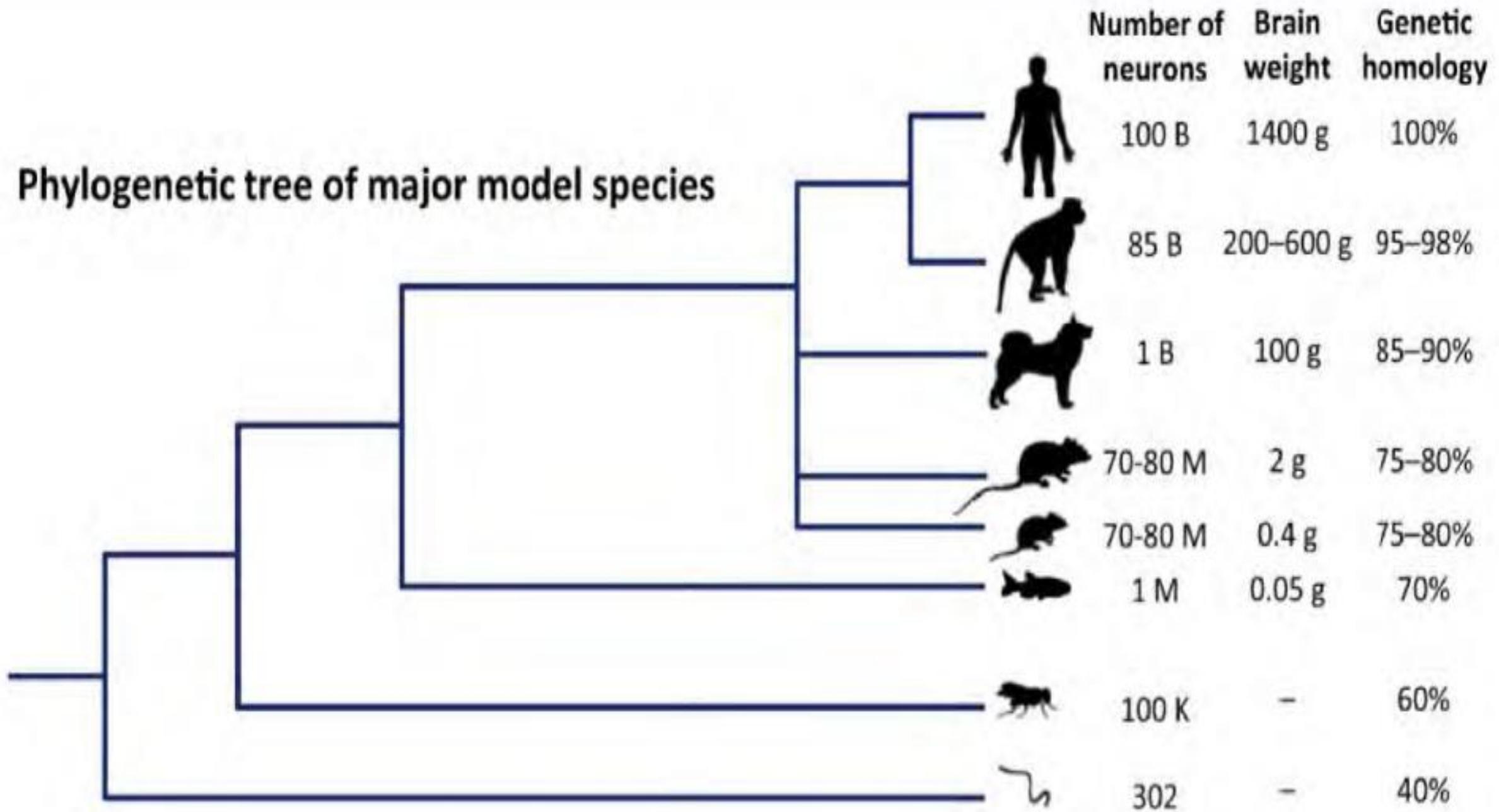


Genetic model organisms	Experimental model organisms	Genomic model organisms
Good candidates for genetic analysis.	Good candidates for research into developmental biology.	Good candidates for genome research.
Breed in large numbers.	Produce robust embryos that can be easily manipulated and studied.	Easy to manage genomes e.g. small genome size or limited number of repeats.
Have short generation times so large scale crosses can be followed over several generations.		Genome is similar to a human.



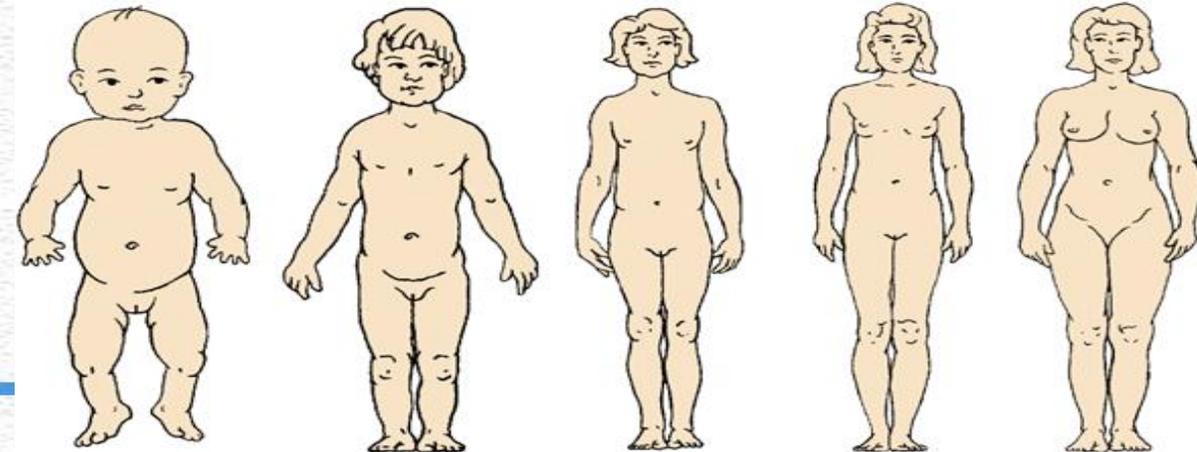
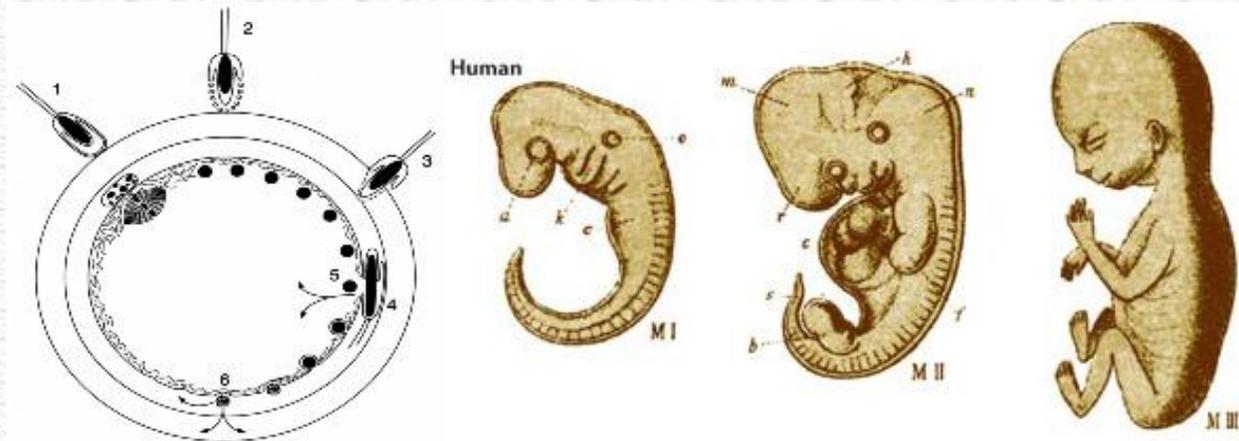


## Phylogenetic tree of major model species

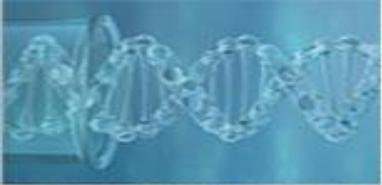
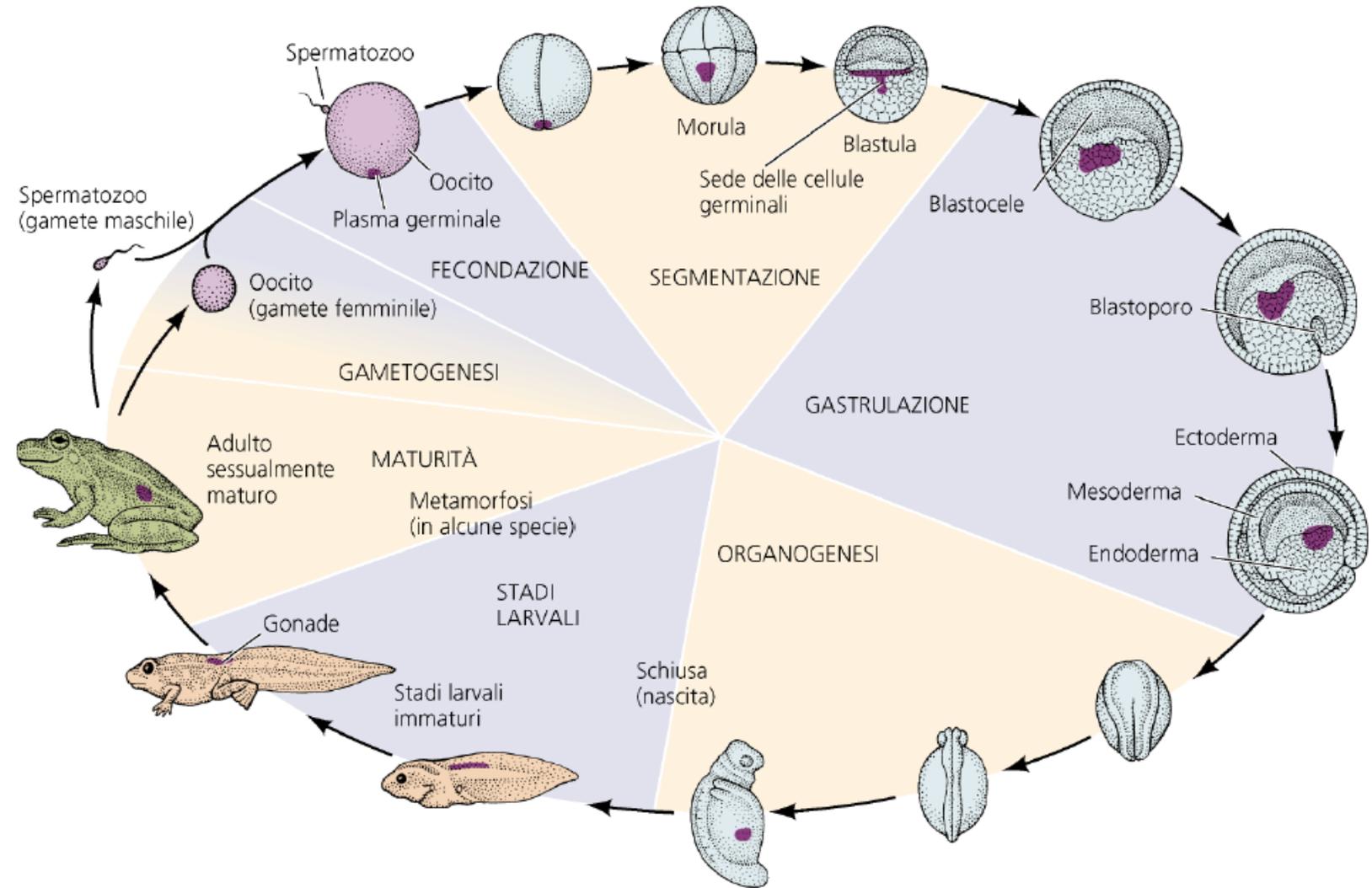


# BIOLOGIA DELLO SVILUPPO

La biologia dello sviluppo studia tutti i processi che riguardano lo sviluppo, a partire dalla cellula uovo fecondata fino alla nascita ed oltre.

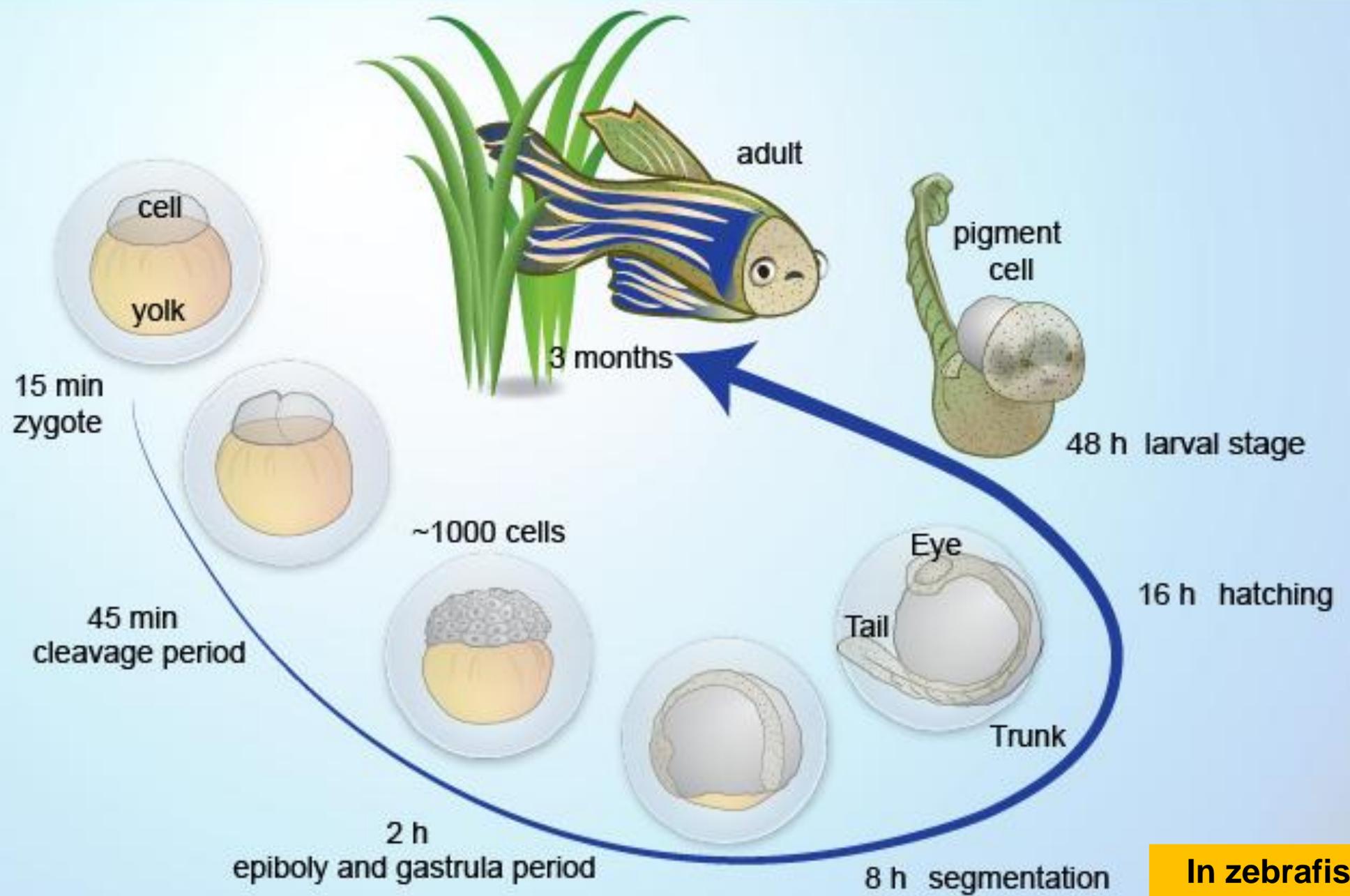


# Il ciclo della vita: gli stadi dello sviluppo animale





f  
e  
r  
t  
i  
l  
i  
z  
a  
t  
i  
o  
n



**In zebrafish  
l'intero ciclo  
dura 90 gg**

# FECONDAZIONE

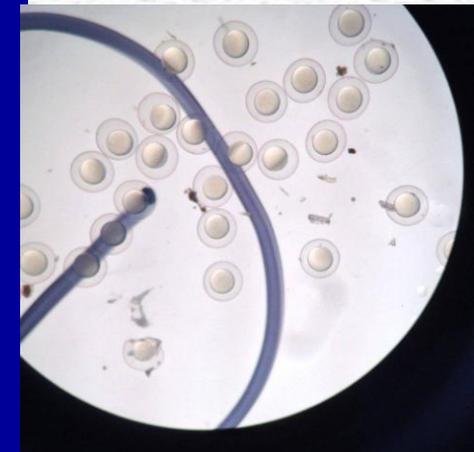
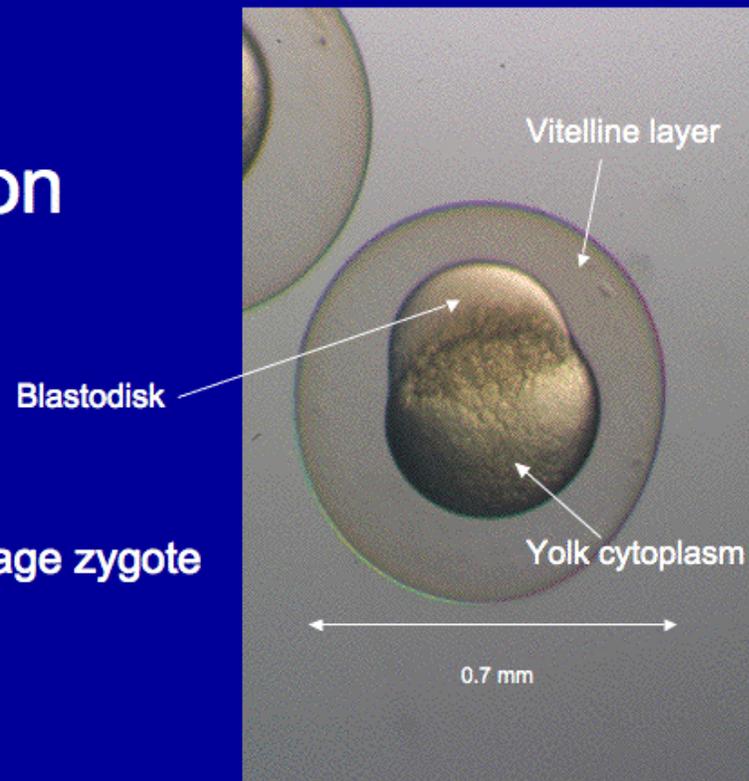
Dal singolo uovo fecondato (lo **zigote** unicellulare) si origina un n° enorme di diversi tipi cellulari con le più disparate funzioni. Tutte queste cellule contengono il medesimo patrimonio genetico.



Negli embrioni di zebrafish la prima divisione comincia 40 minuti dopo la fecondazione

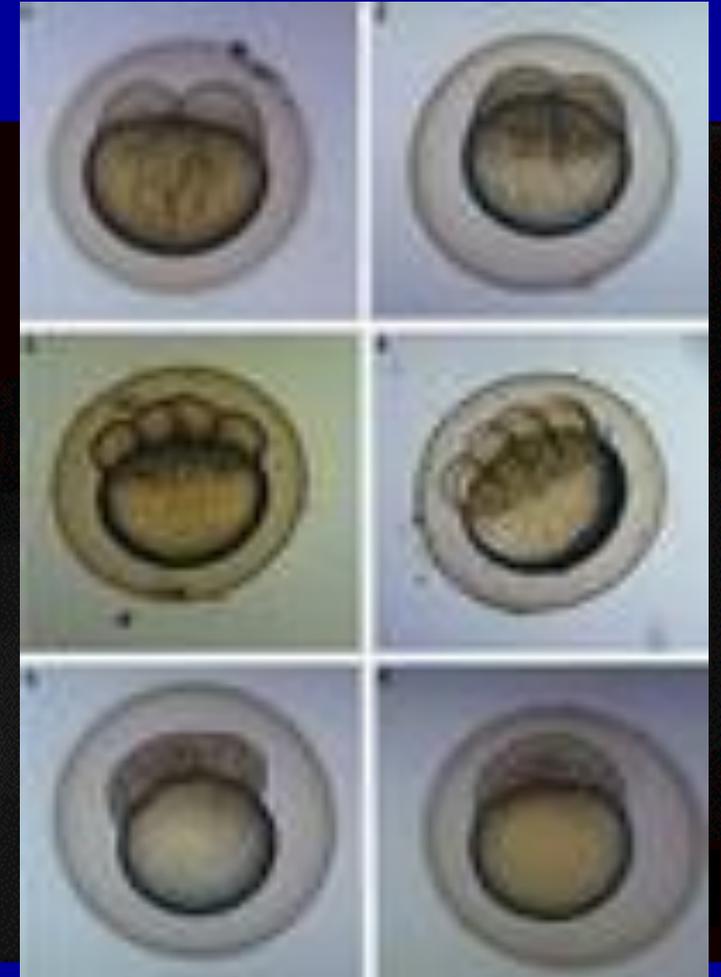
## Fertilization

1 cell stage zygote

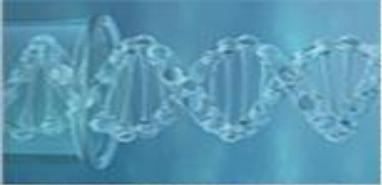


# Developmental Timetable

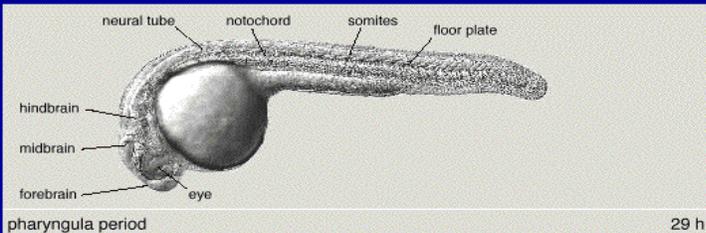
Zygote	0-0.75 hr
Cleavage	0.75-2.25 hr
Blastula	2.25-5.25 hr
Gastrula	5.25-10 hr
Segmentation	10-24 hr
Pharyngula	24-48 hr
Hatchling	48-72 hr
Larval Fish	72 hr



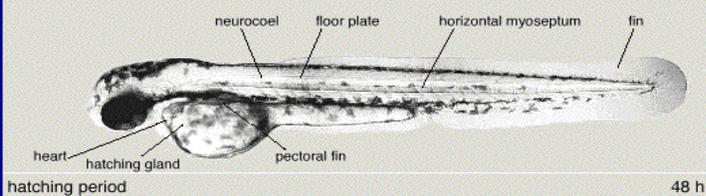
17 Hours of Development



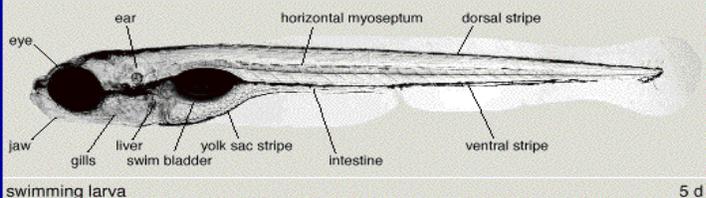
Pharyngula

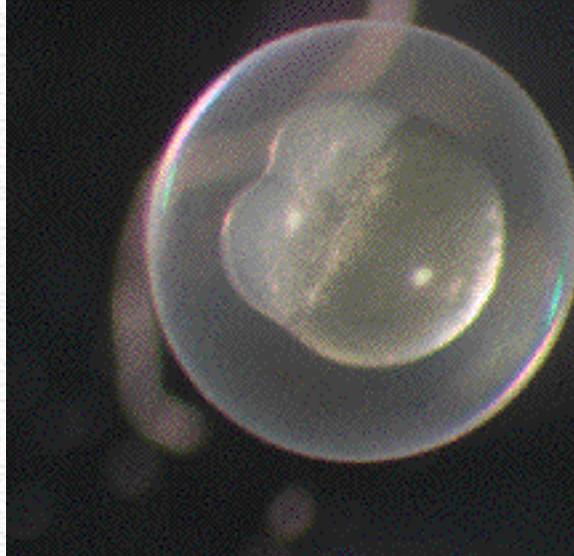
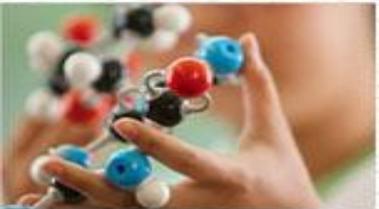
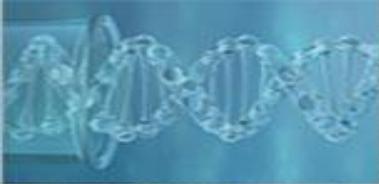


Hatchling



Larva

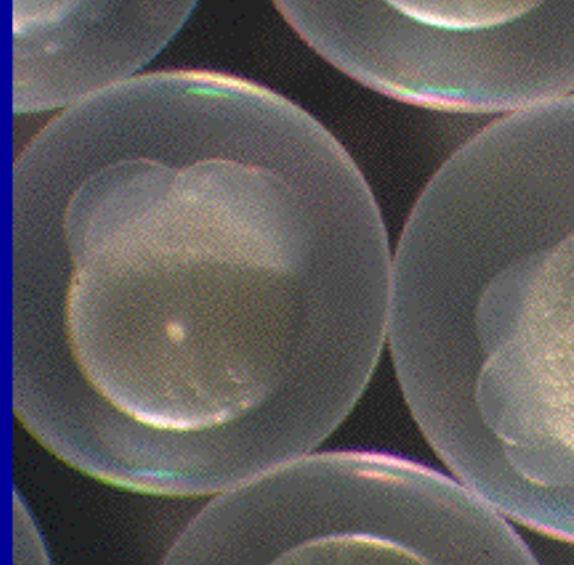




2



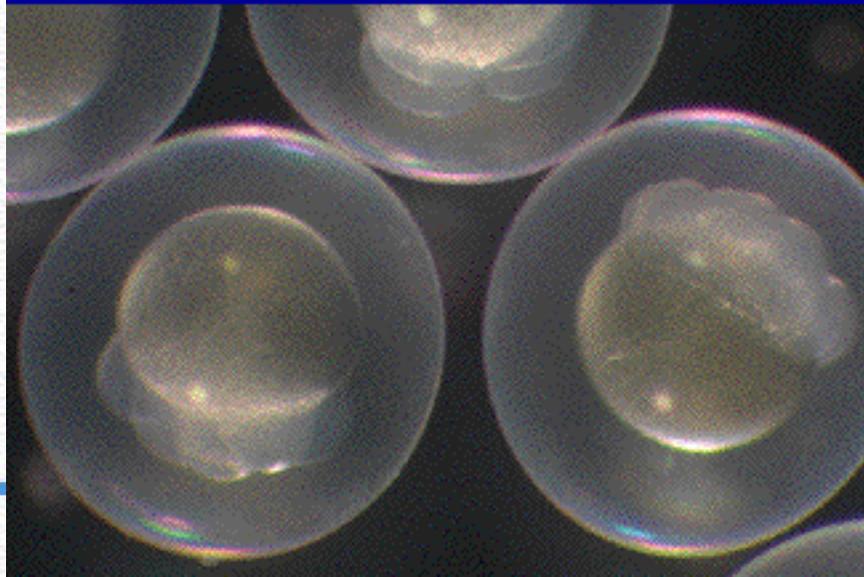
4



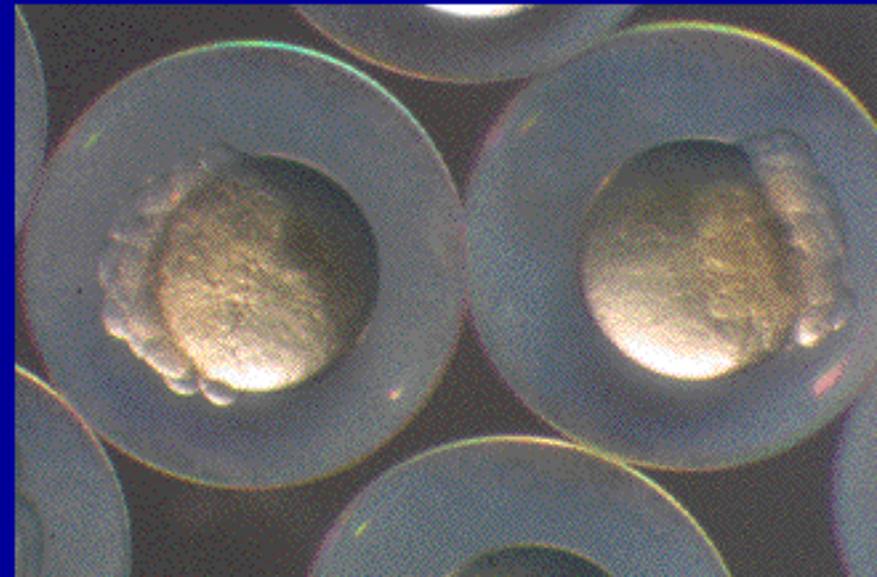
# Cleavage

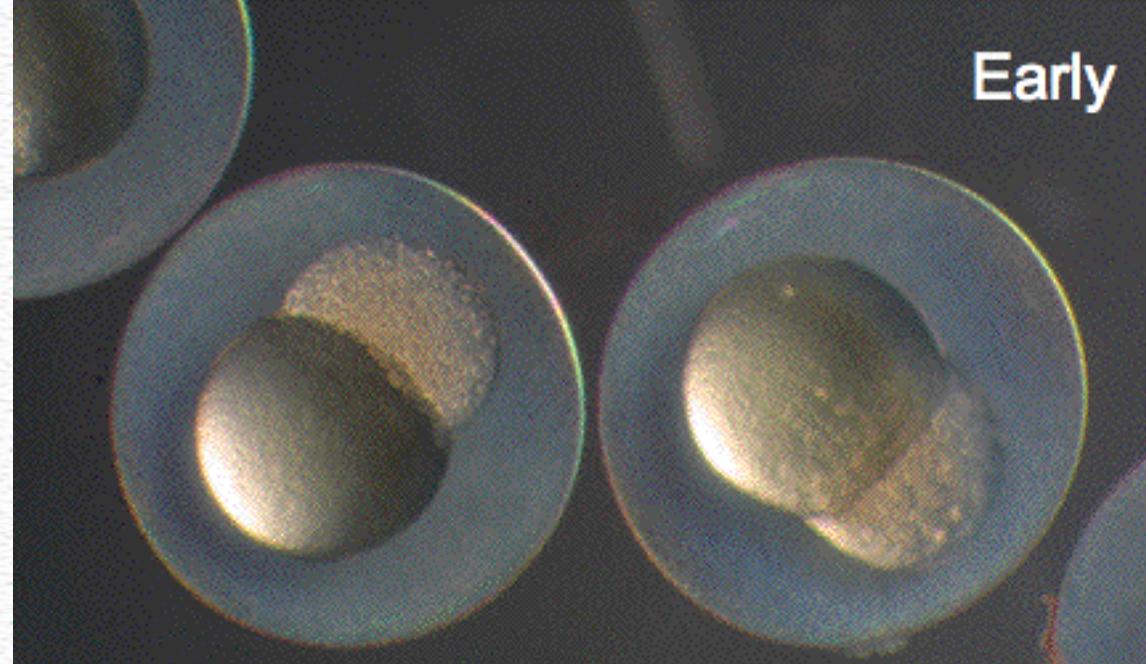
of the Blastodisk Cytoplasm

8



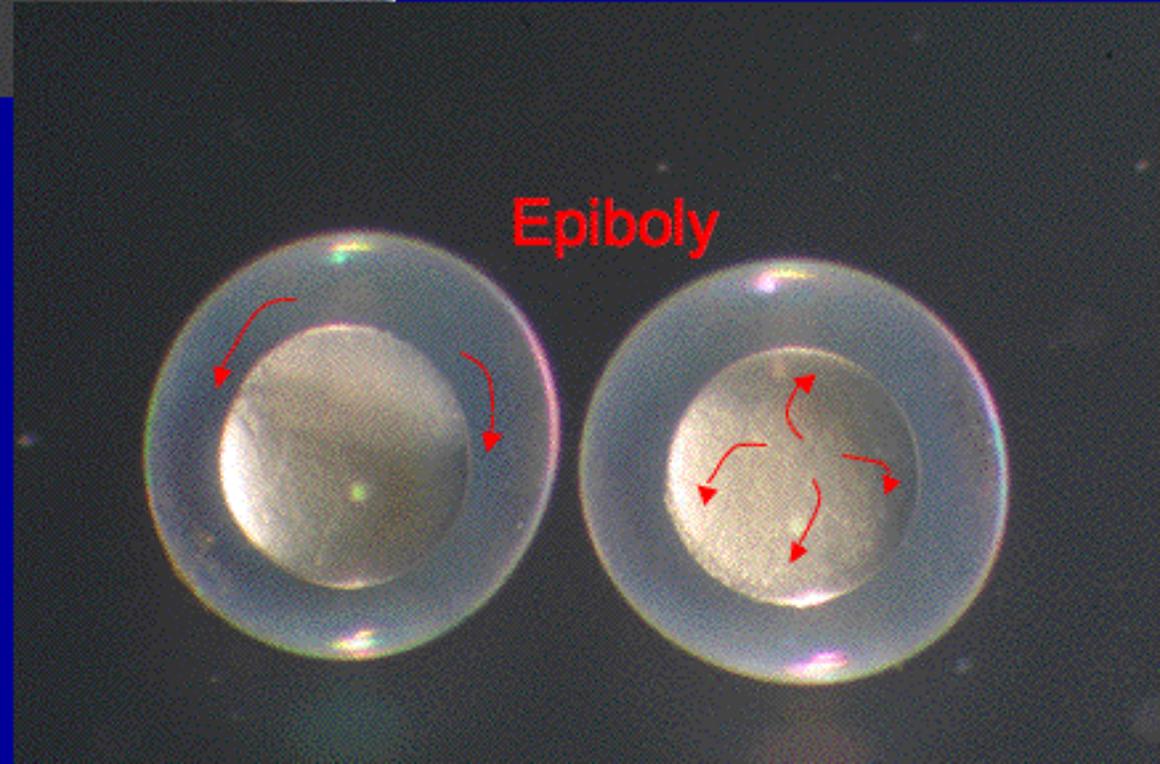
32





Early

Blastula

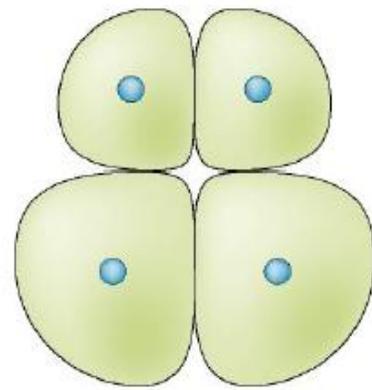


Epiboly

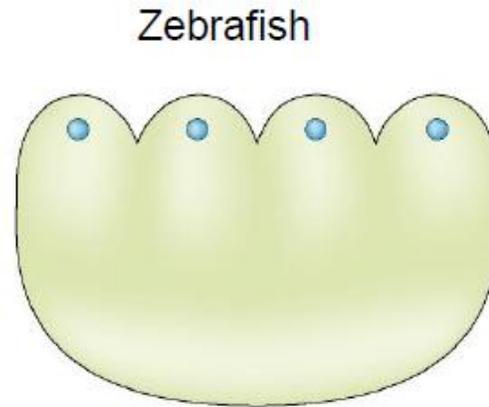


Zebrafish egg development over 24 hours.mp4

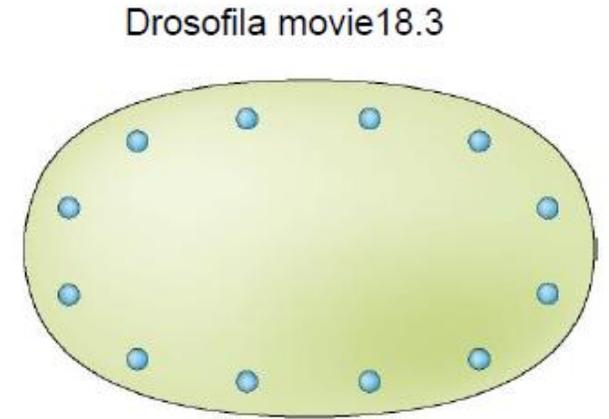
# Segmentazione



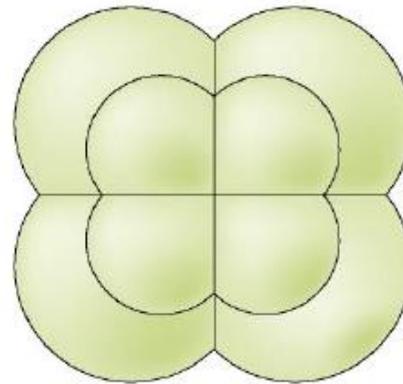
**(a)** Oloblastica  
Xenopus



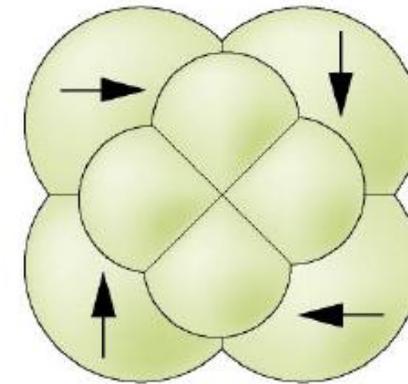
**(b)** Meroblastica  
Discoidale  
Zebrafish



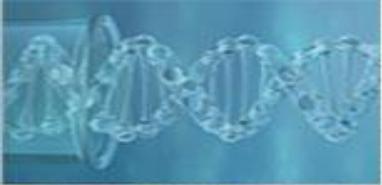
**(c)** Superficiale  
Drosophila movie18.3



**(d)** Radiale  
echinodermi

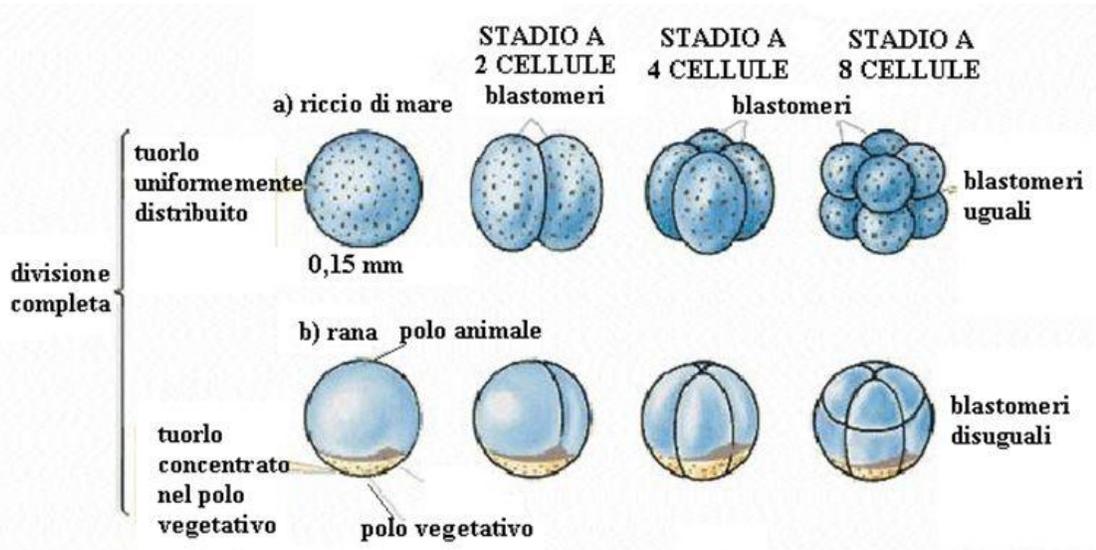


**(e)** Spirale  
molluschi

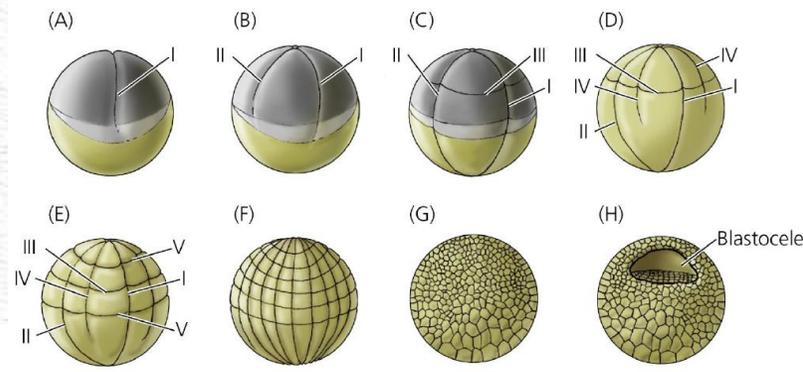


Uova oligolecitiche (mammif, riccio di mare): i blastomeri sono tutti uguali → seg. totale uguale

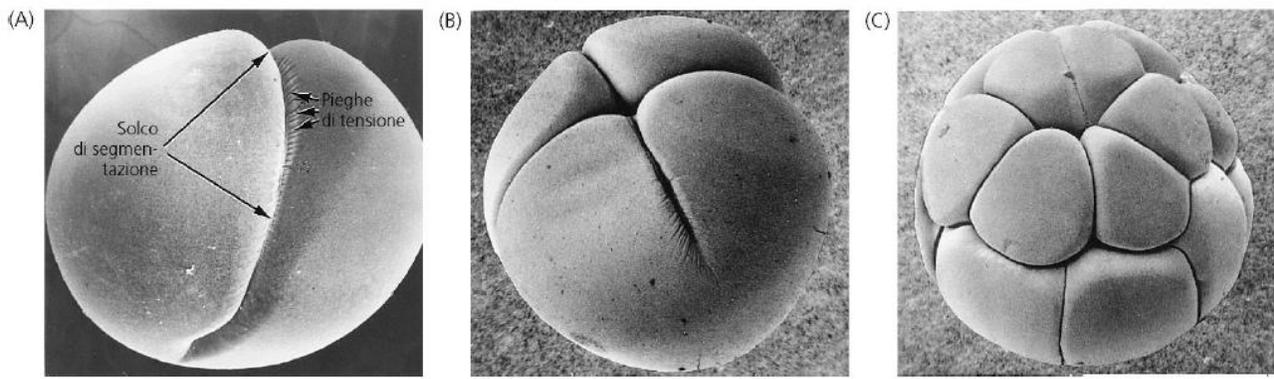
Uova telolecitiche (tuorlo localizzato nel polo vegetativo) (anfibi): seg. parziale

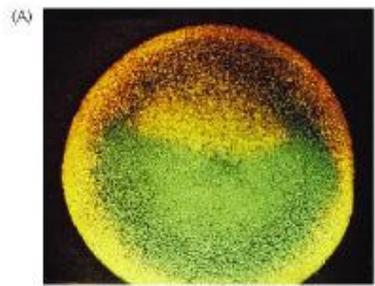
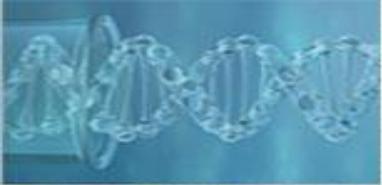


Segmentazione oloblastica dell'uovo di rana



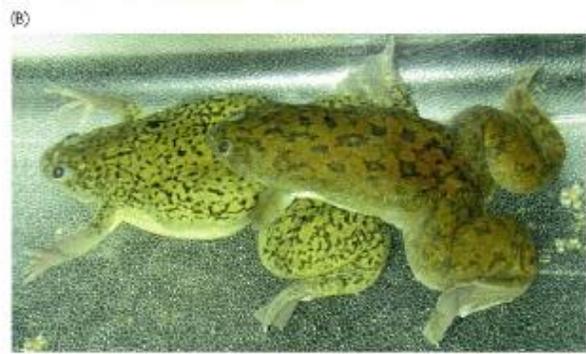
Segmentazione oloblastica



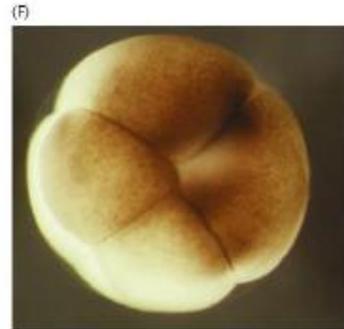
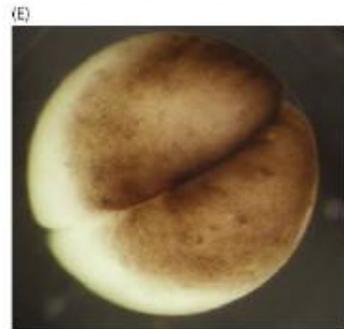
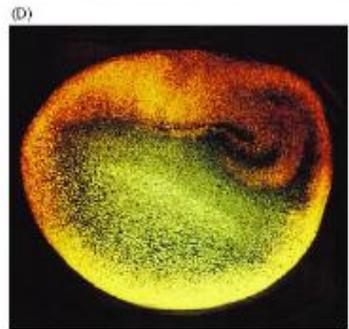


La segmentazione produce molte cellule da una iniziale

*Xenopus laevis*



Polo (emisfero) animale e vegetale



Durante la segmentazione, al centro si forma una cavità piena di liquido, il blastocele (importante per consentire i movimenti cellulari che avvengono nella *gastulazione*)



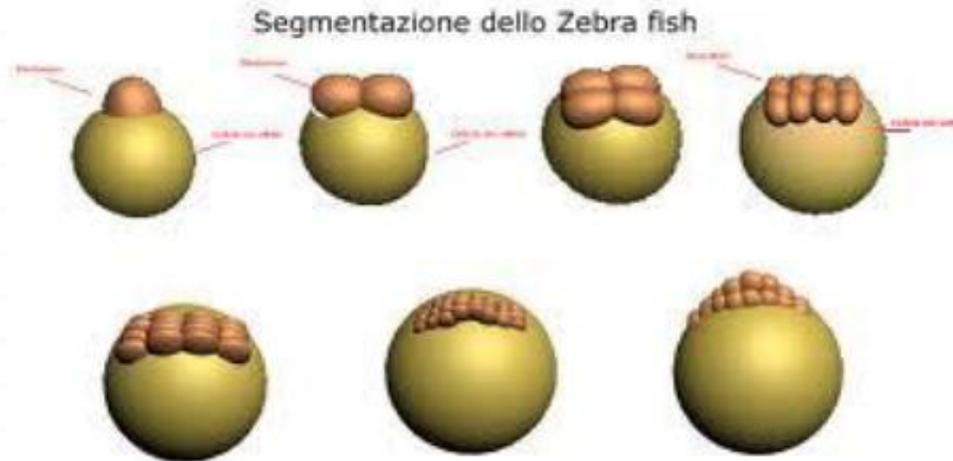
**Blastula**

# Segmentazione in Zebrafish

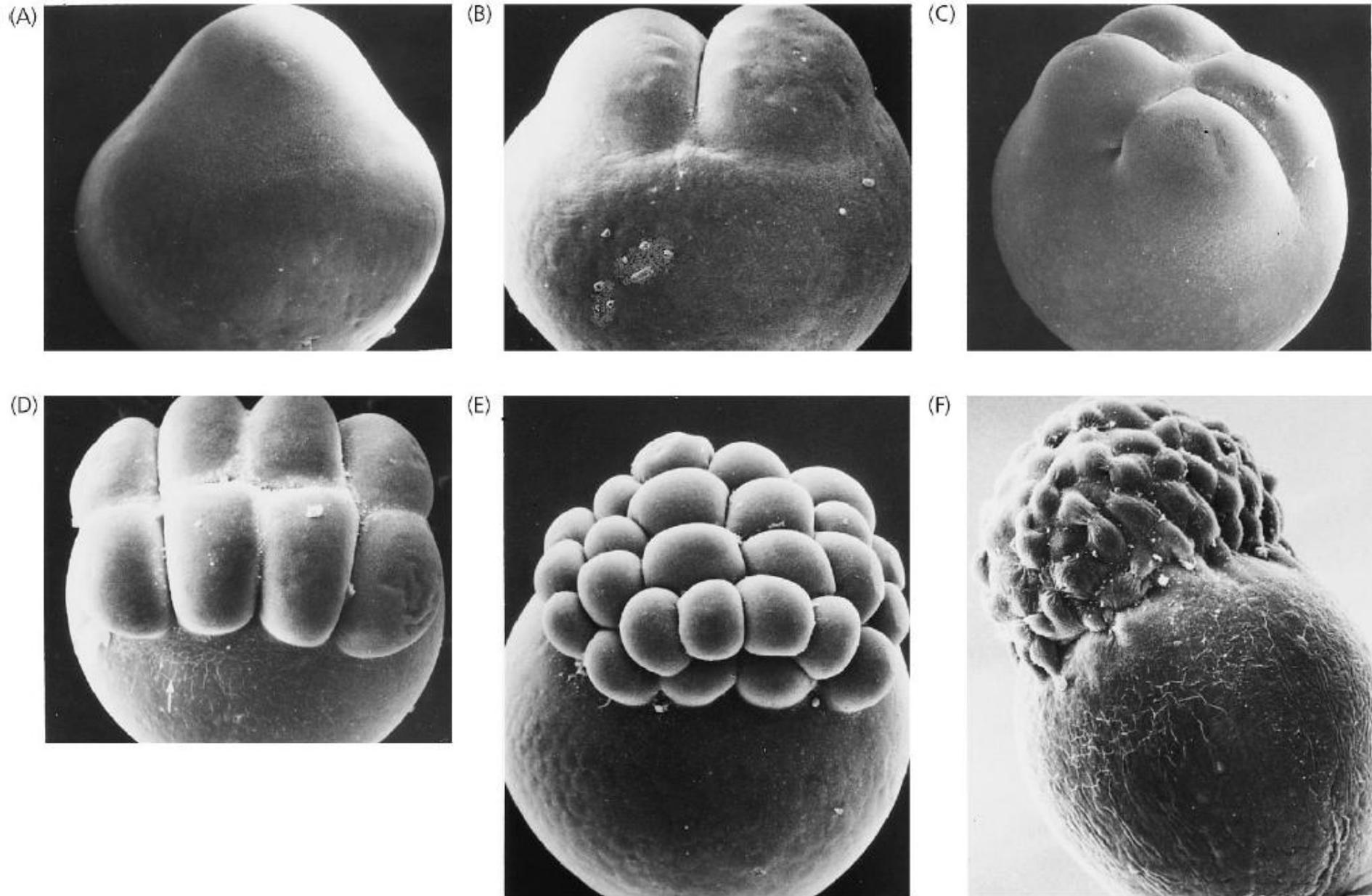
Uovo Telolecitico



Segmentazione  
Meroblastica Discoidale



# Segmentazione meroblastica discoidale nell'uovo di pesce zebra





Fertilizzazione



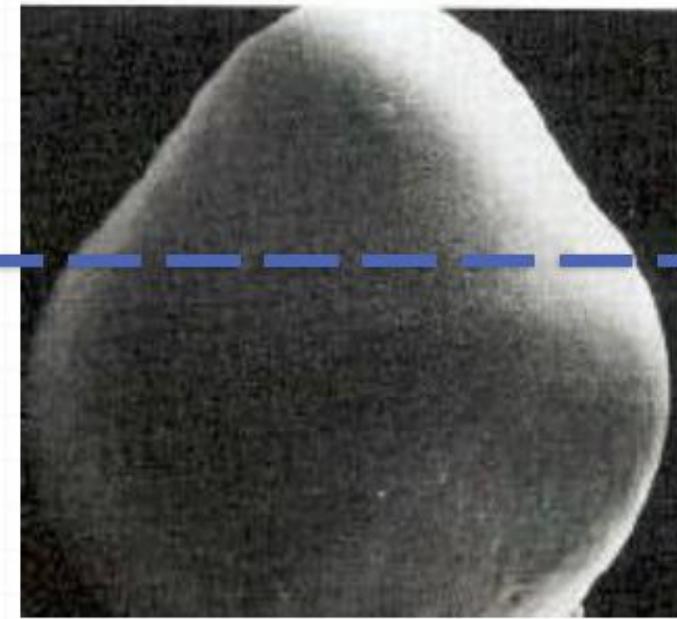
Aumento  
Calcio Intracellulare



Contrazione  
Citoscheletro actinico



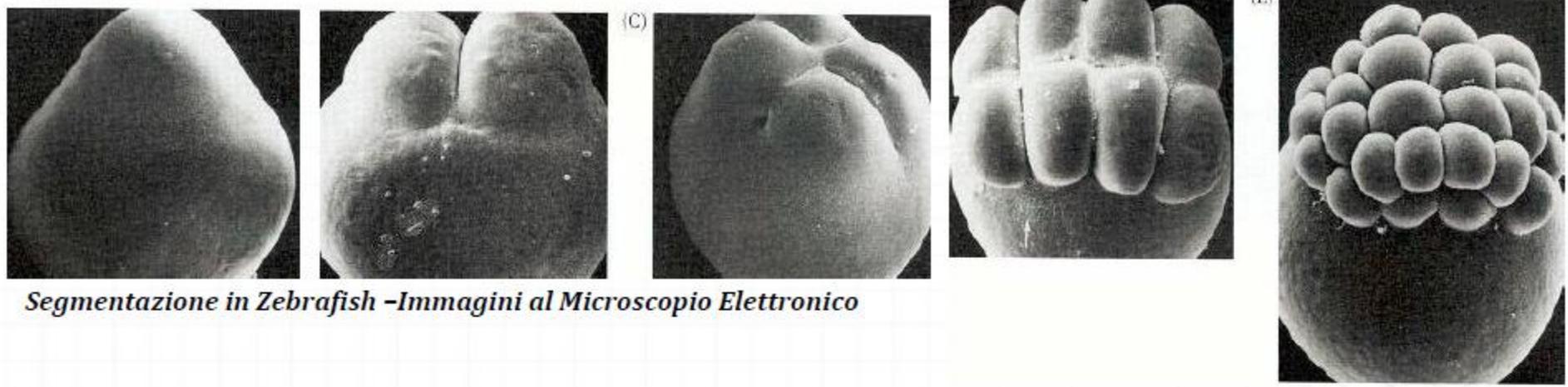
Il citoplasma privo di  
vitello viene spinto  
verso il polo animale



**Blastodisco**

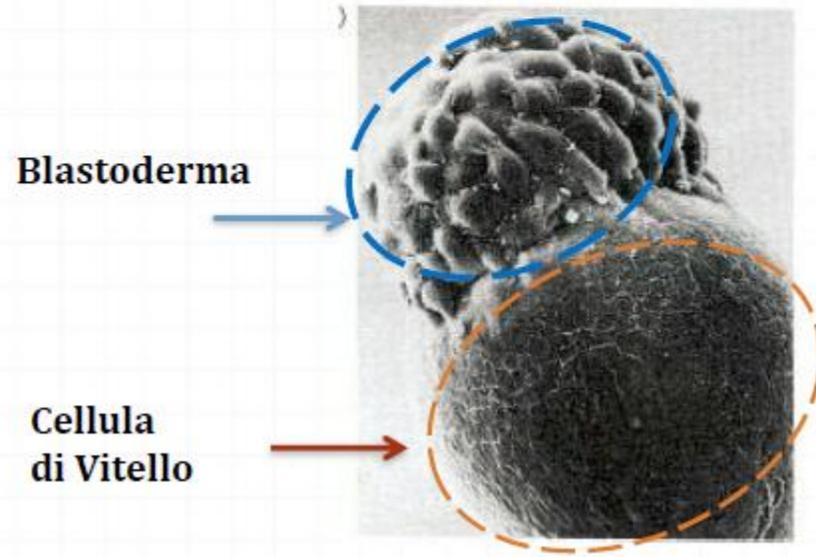
**Vitello**

**Zigote con forma piriforme**



*Segmentazione in Zebrafish - Immagini al Microscopio Elettronico*

Le prime 12 divisioni sono sincrone ad intervalli di 15 minuti



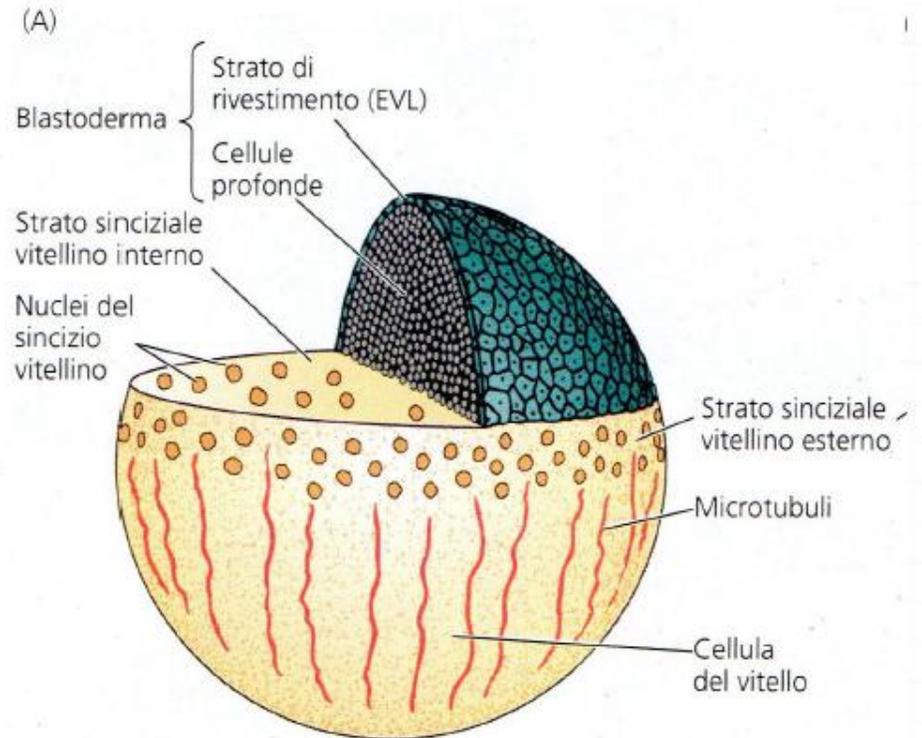
A partire dalla 10 divisione si ha MBT e le divisioni cellulari rallentano

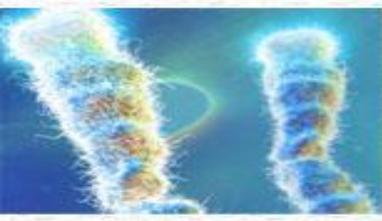
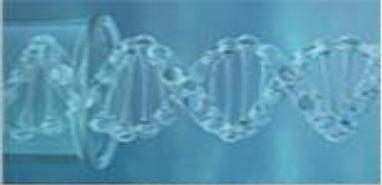
Transizione della Blastula Intermedia = MBT.

# Segmentazione

Nella Blastula si distinguono 3 popolazioni cellulari:

1. Strato sinciziale vitellino (YSL)
2. Strato di Rivestimento (EVL)
3. Cellule Profonde





## Strato sinciziale del vitello

È diviso in strato interno e strato esterno e servirà per dirigere alcuni movimenti in fase di gastrulazione

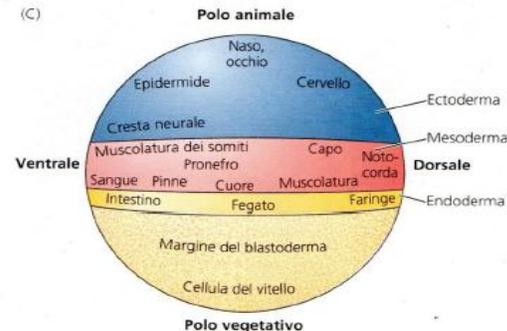
## Strato di rivestimento

È un rivestimento protettivo extraembrionale che poi si distaccherà durante la fase di sviluppo successiva

## Cellule Profonde

○ Sono poste tra YSL e EVL

○ Daranno origine all'embrione vero e proprio

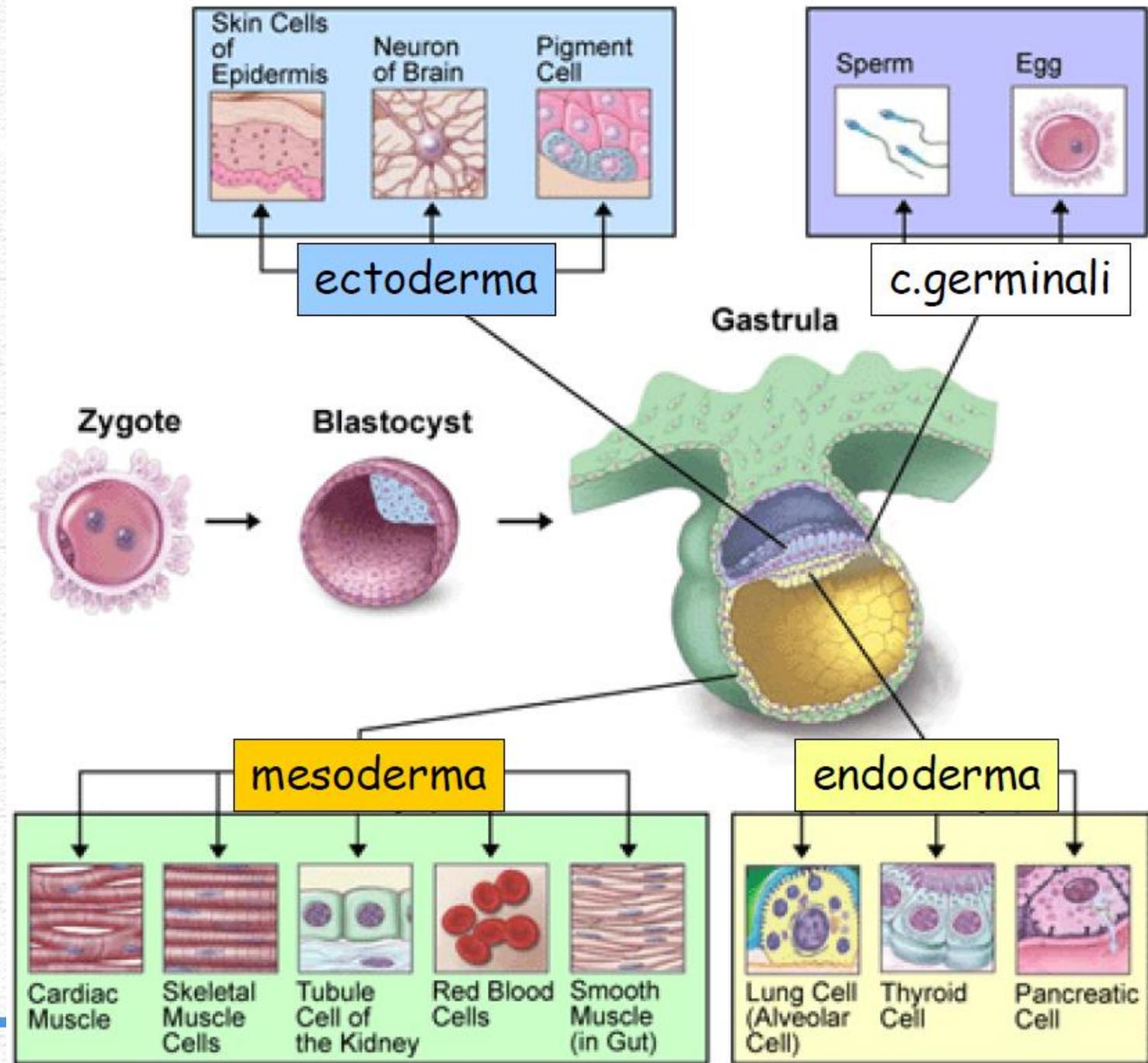


Mappa presuntiva delle cellule profonde al termine del mescolamento



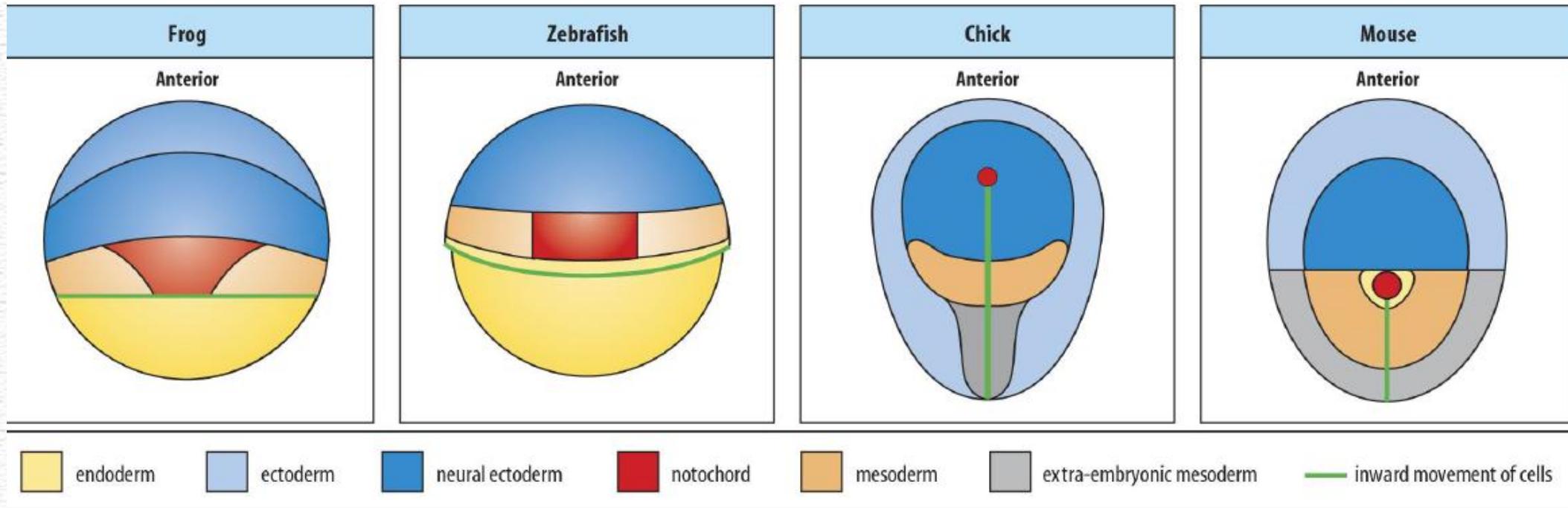
## Gastrulazione:

Le cellule formate in segmentazione si muovono in modo coordinato, ridistribuendosi. Con la gastrulazione si formano i tre foglietti embrionali, Ectoderma, Mesoderma, Endoderma, che daranno origine, successivamente, alle strutture di competenza



## Differenze tra specie nell'organizzazione dei tre foglietti germinativi primari

### Uova telolecitiche



In posizione dorsale la parete del mesoderma formerà la corda dorsale

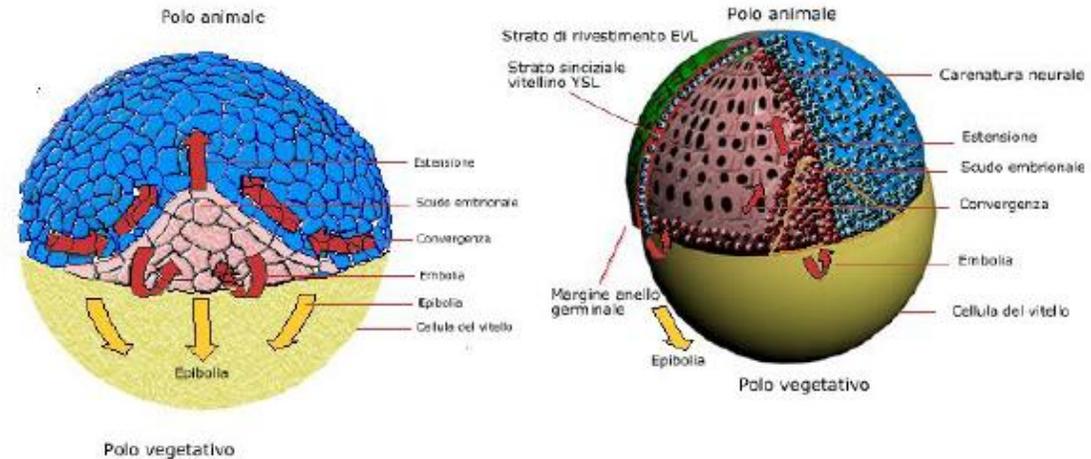
Sempre il mesoderma si suddividerà in tante piccole vesciche che daranno origine ai somiti

Al termine della gastrulazione l'embrione già possiede un intestino primitivo

# Gastrulazione in Zebrafish

La gastrulazione dei pesci inizia con l'epibolia delle cellule del blastoderma al di sopra del vitello

Gastrula di Zebra fish allo stadio iniziale





# Movimenti cellulari durante la gastrulazione

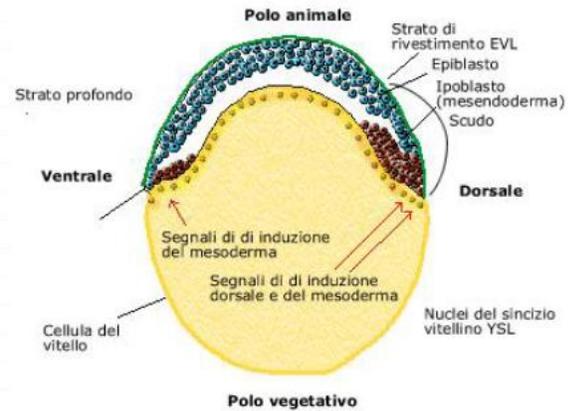
Epibolia → Espansione del blastoderma al di sopra del vitello

↓  
Ispessimento del blastoderma  
**Anello germinativo**

↓                      ↓  
**Ipoblasto**                      **Epiblasto**

↓  
Movimento sul lato  
dorsale dell'embrione

↓  
Ispessimento localizzato  
**Scudo embrionale**



80% epiboly

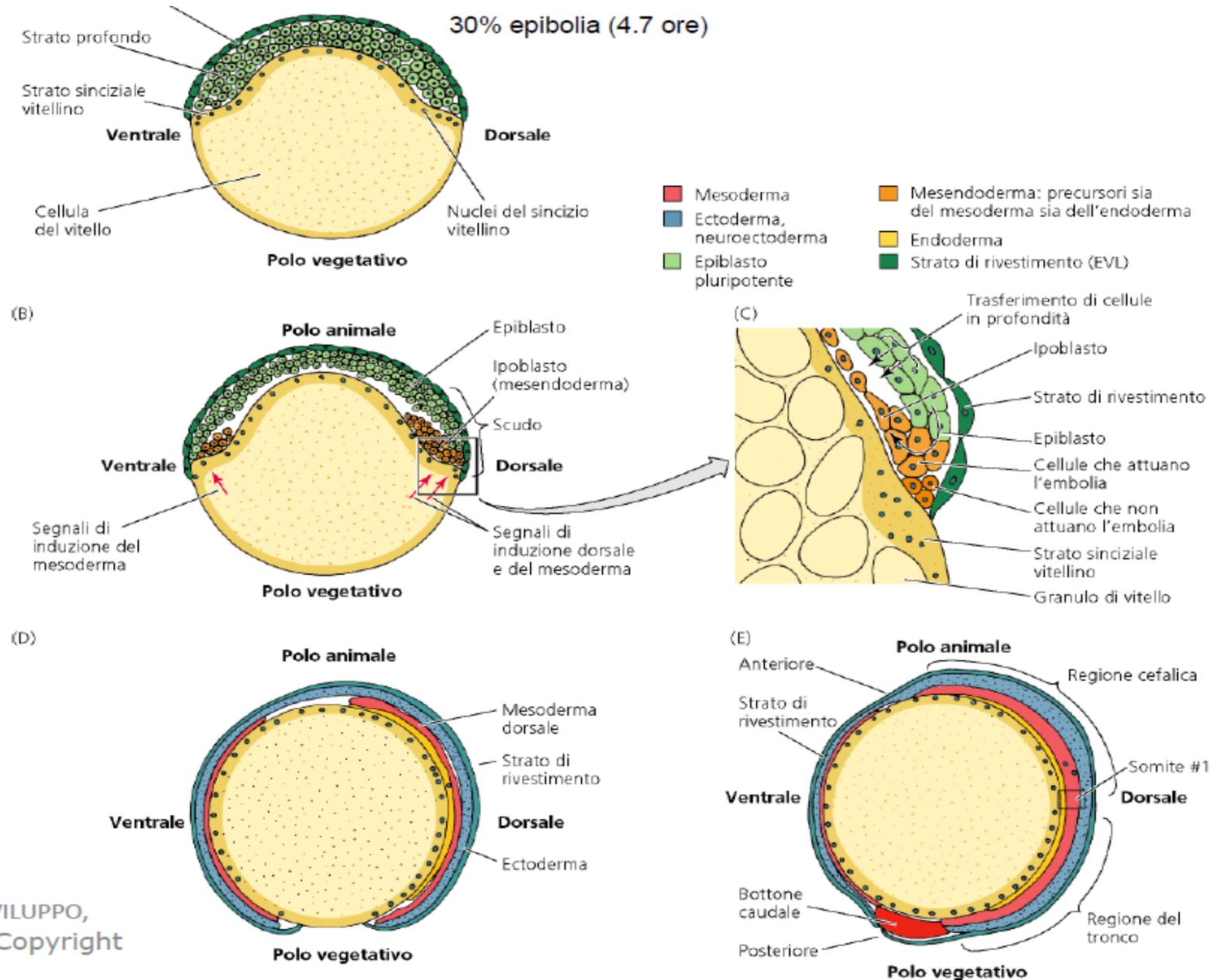
90% epiboly

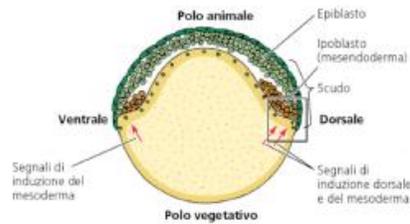
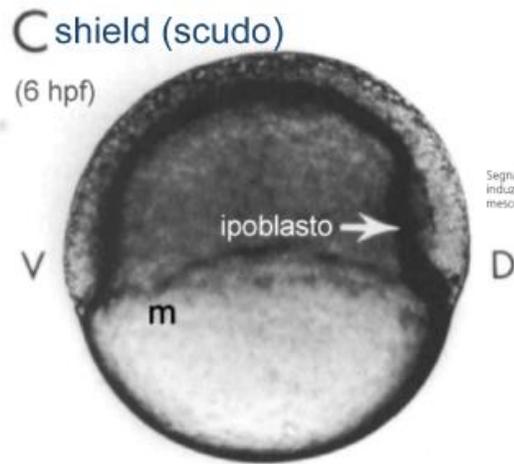
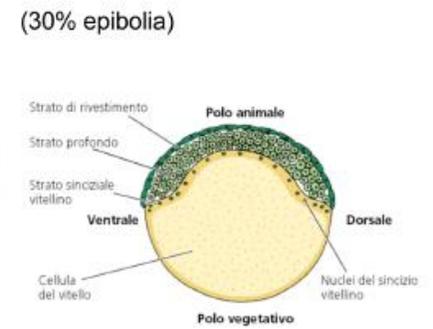
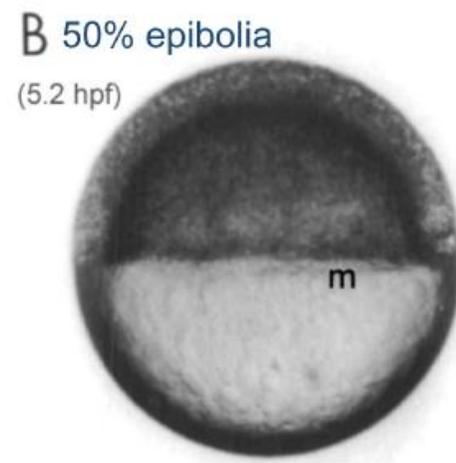
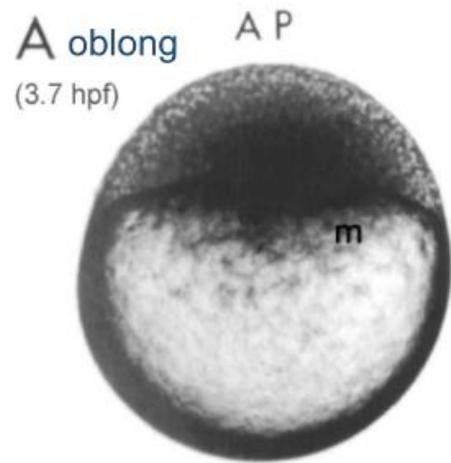
tailbud

2-somite

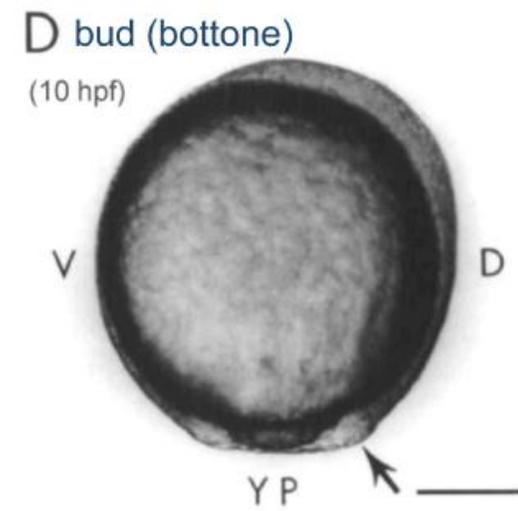
# Movimenti cellulari durante la gastrulazione

- A. Blastoderma – stadio 30% epibolia
- B. Formazione dell'ipoblasto
- C. Immagine ingrandita della regione marginale
- D. Stadio 90% epibolia, presenza di mesoderma attorno al vitello, tra endoderma e ectoderma
- E. Gastrulazione completata



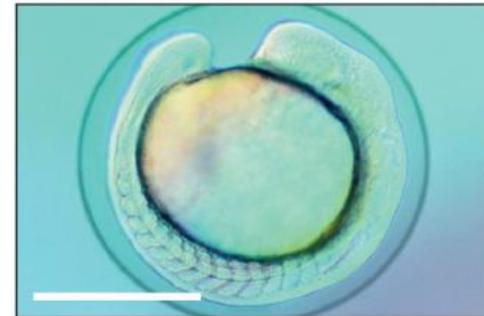
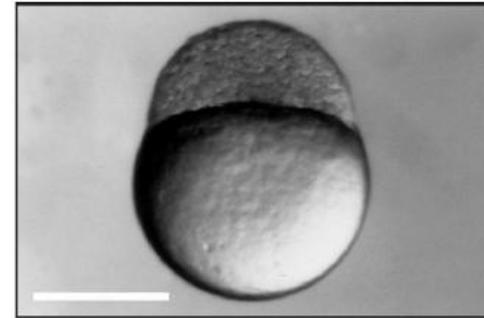
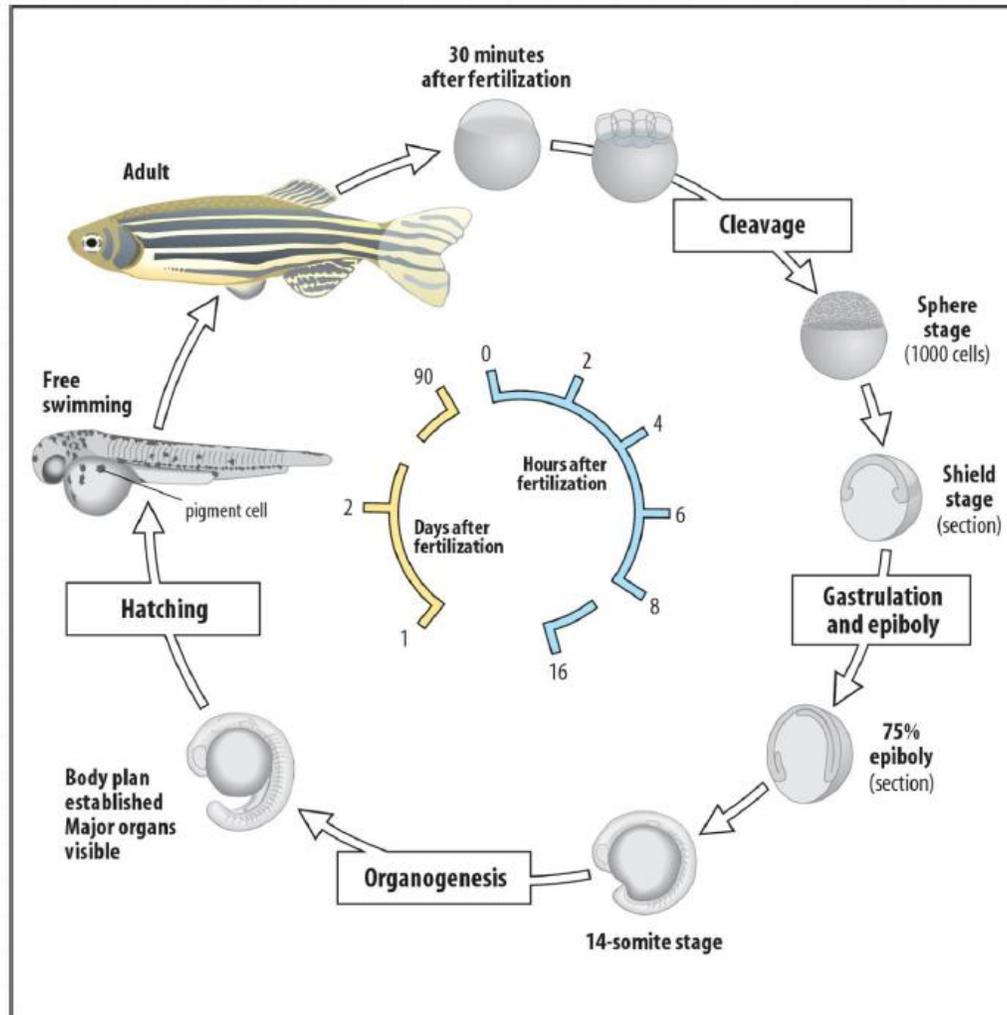


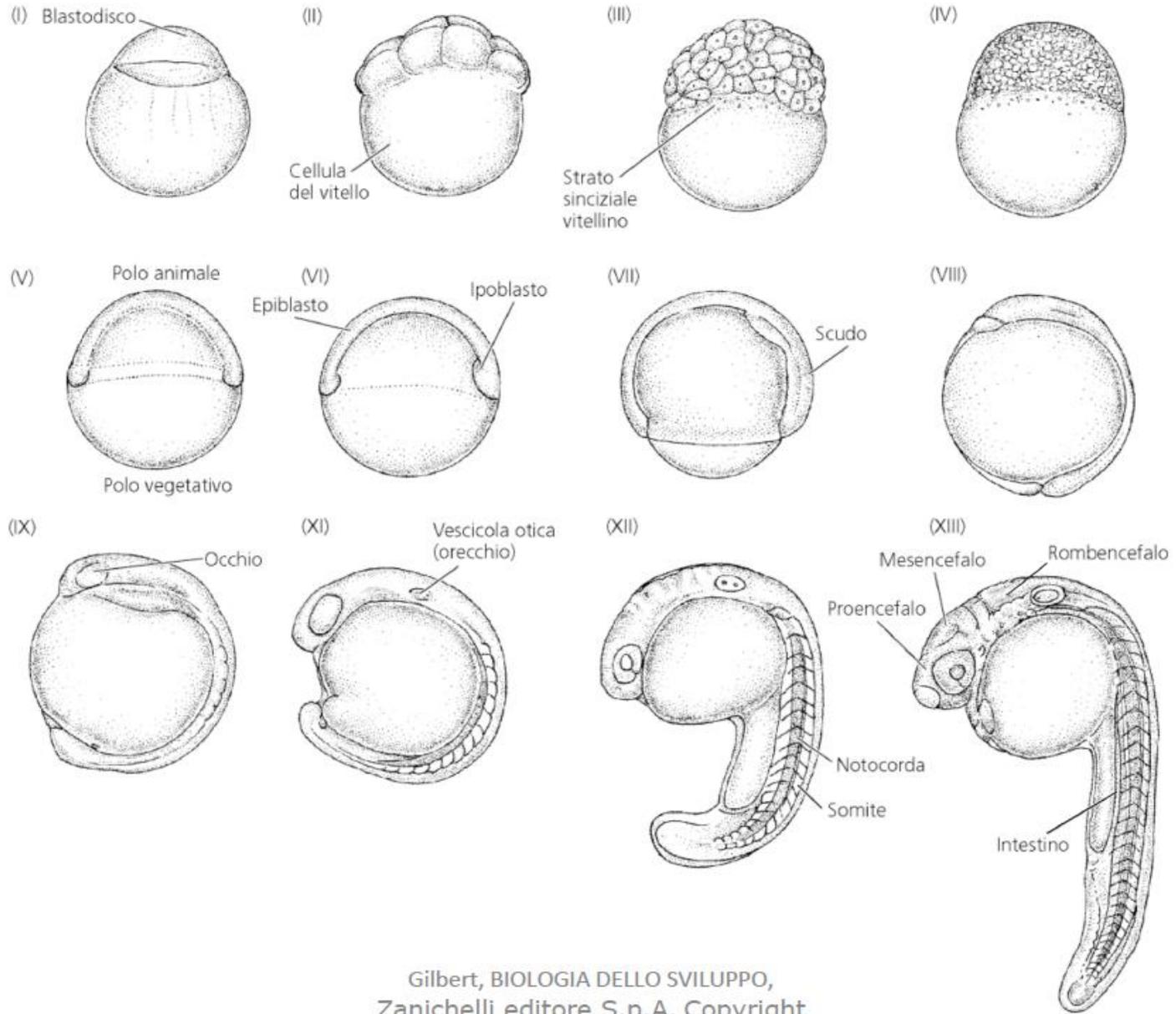
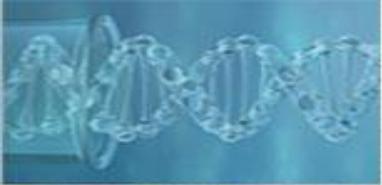
m = margine del blastoderma



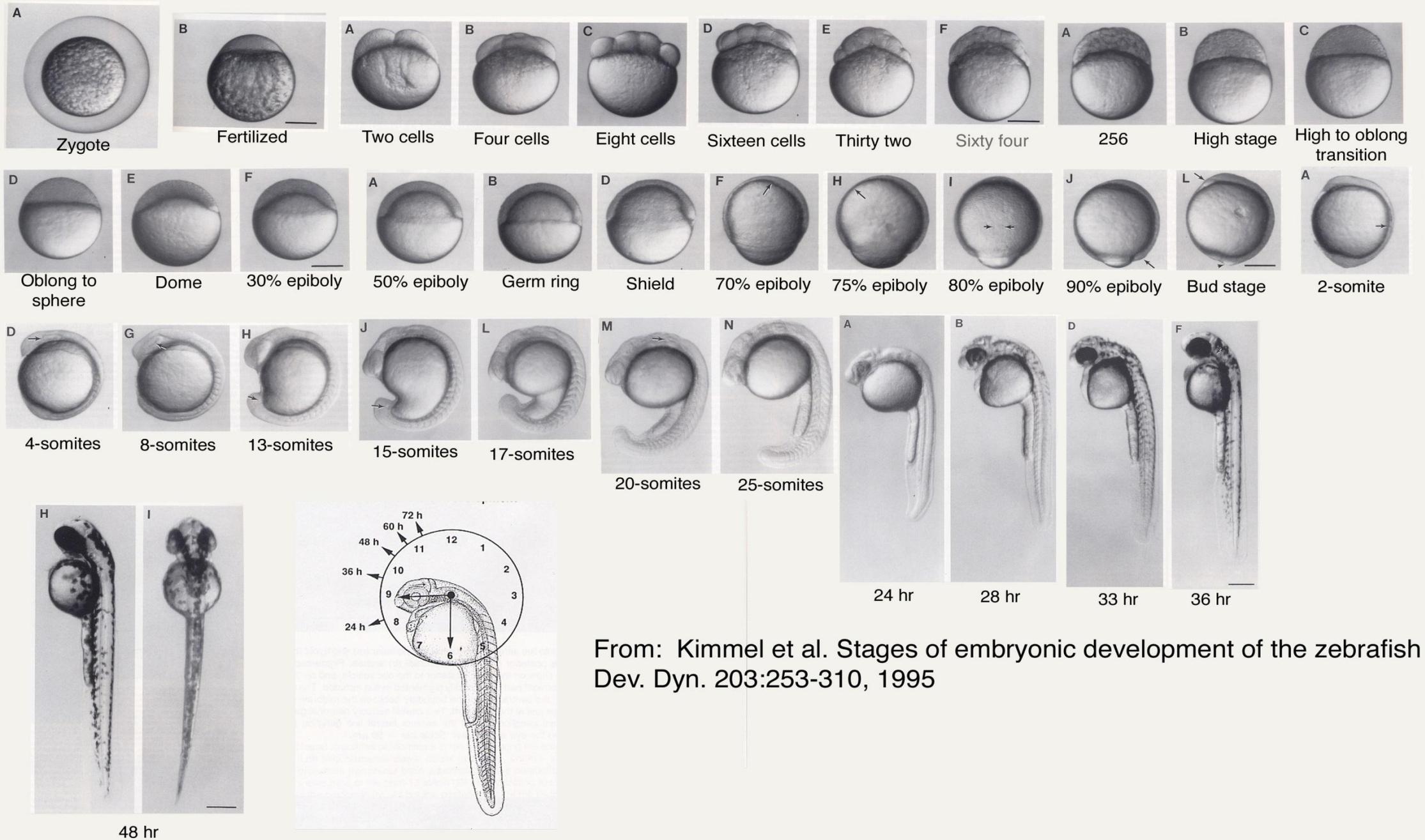
# Sviluppo di Zebrafish

SCIENCE



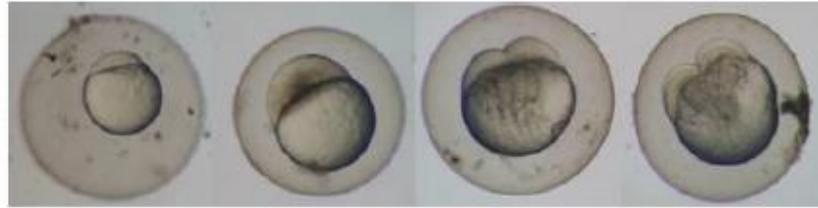


Gilbert, BIOLOGIA DELLO SVILUPPO,  
Zanichelli editore S.p.A. Copyright  
© 2005

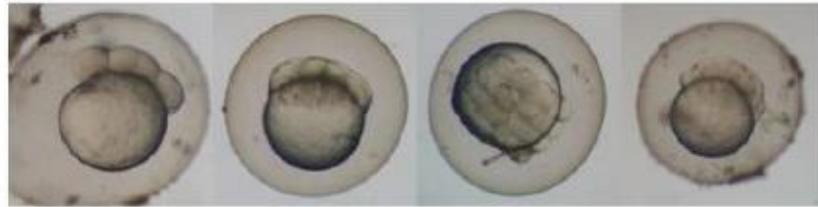


From: Kimmel et al. Stages of embryonic development of the zebrafish  
 Dev. Dyn. 203:253-310, 1995

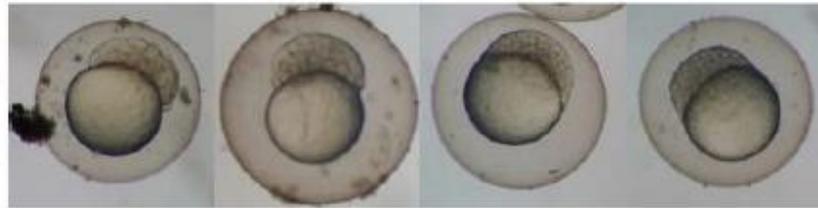
# Primi Stadi di Sviluppo di Zebrafish



zygote      1-cell      2-cell      4-cell



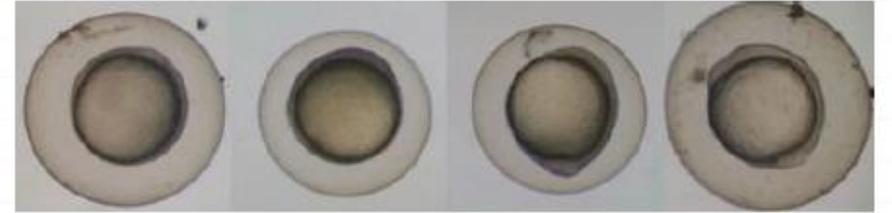
8-cell      16-cell      16-cell      32-cell



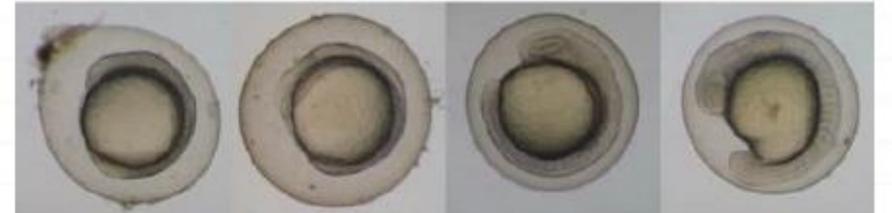
64-cell      128-cell      256-cell      512-cell



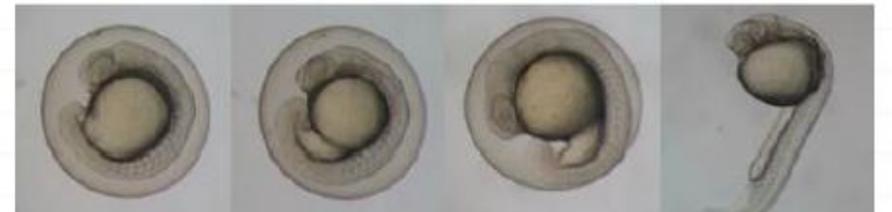
1K-cell      2K-cell      oblong



80% epiboly      90% epiboly      tailbud      2-somite



5-somite      10-somite      12-somite      14-somite



17-somite      18-somite      20-somite      prim-5

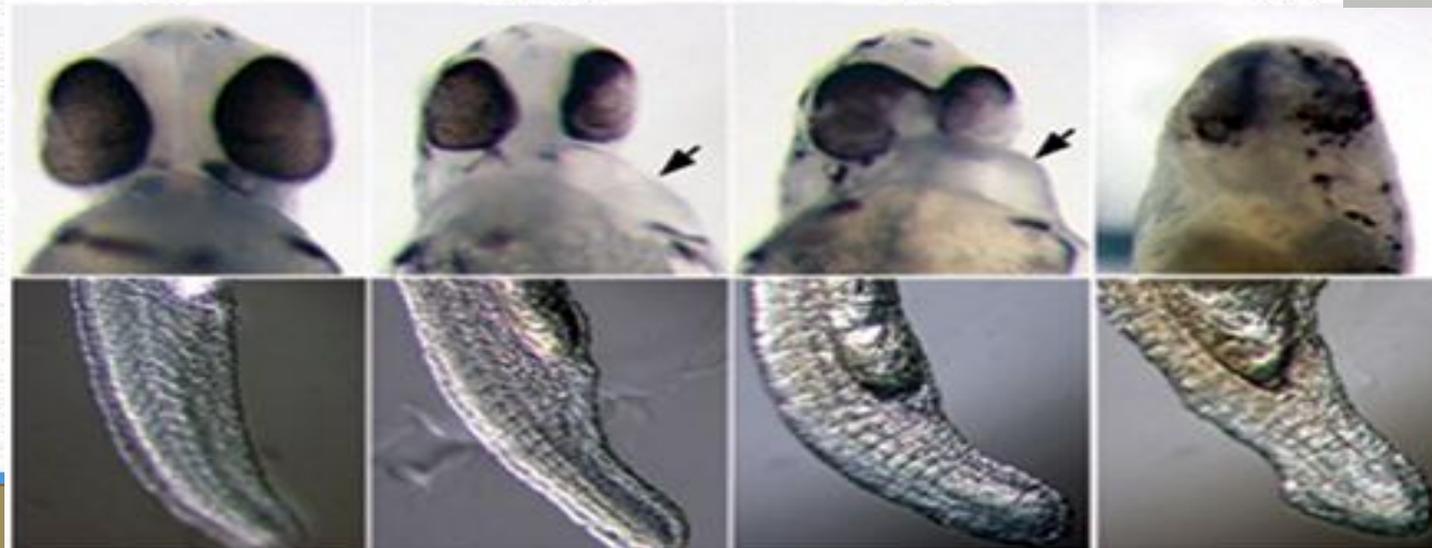
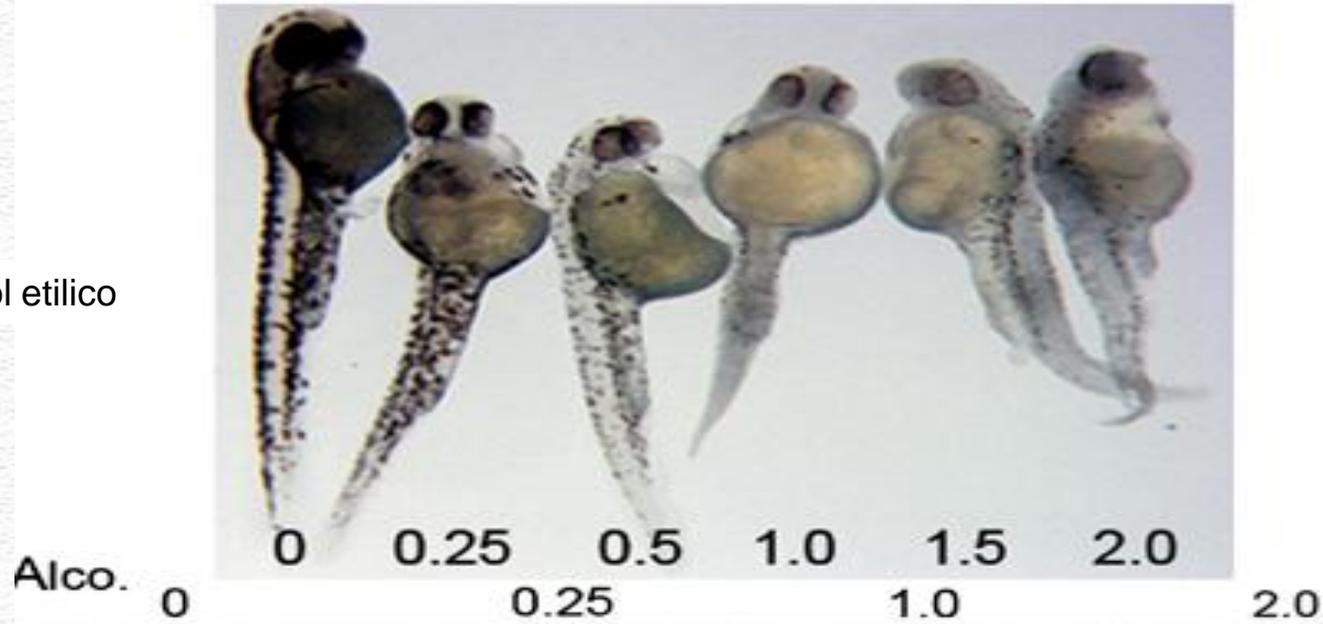


prim-11      48-hour      72-hour

# L'AMBIENTE INFLUENZA LO SVILUPPO



Alcool etilico





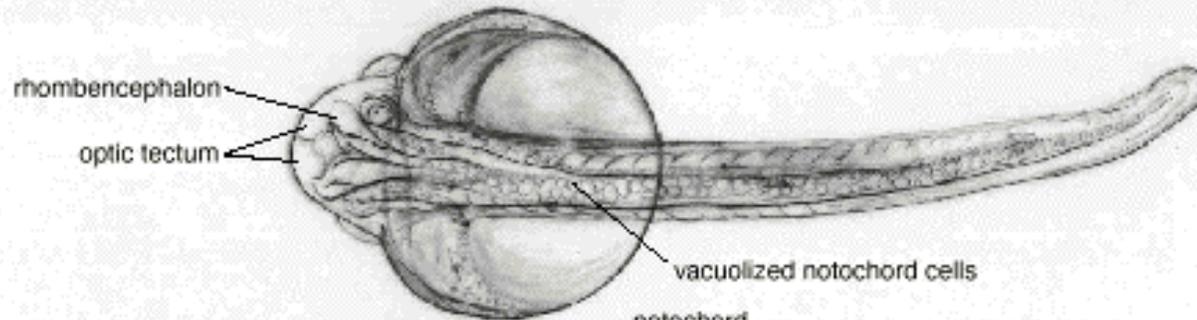
G4100027.AVI

# Organi che è possibile evidenziare in embrione di zebrafish

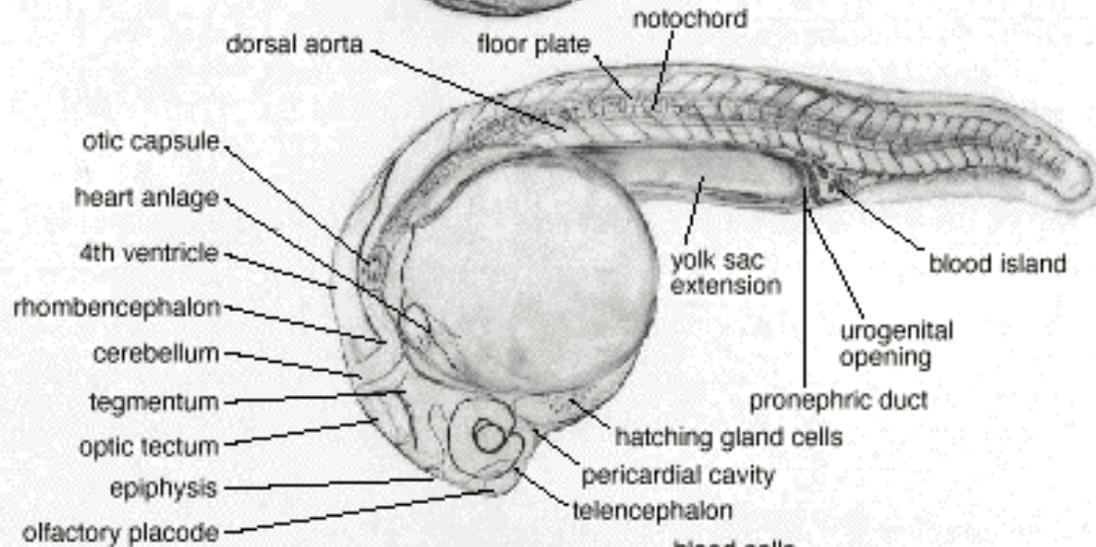
24 h EMBRYO

2A

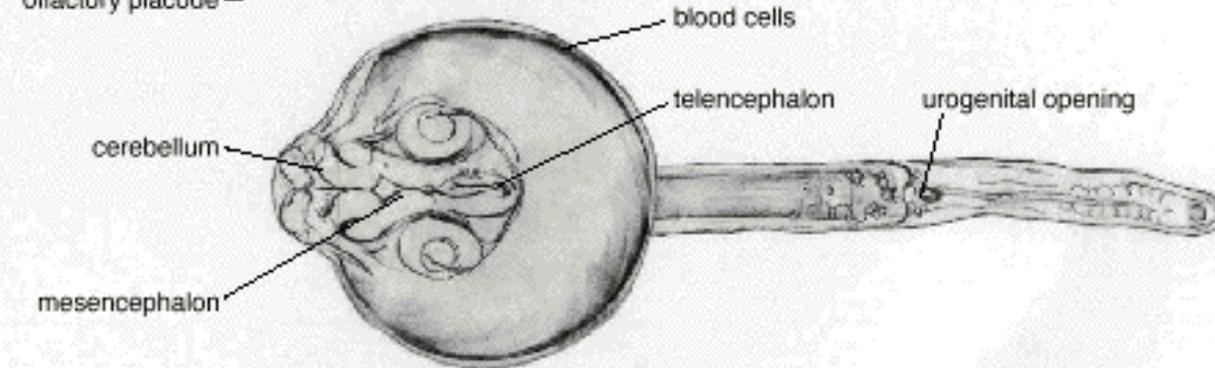
dorsal



lateral

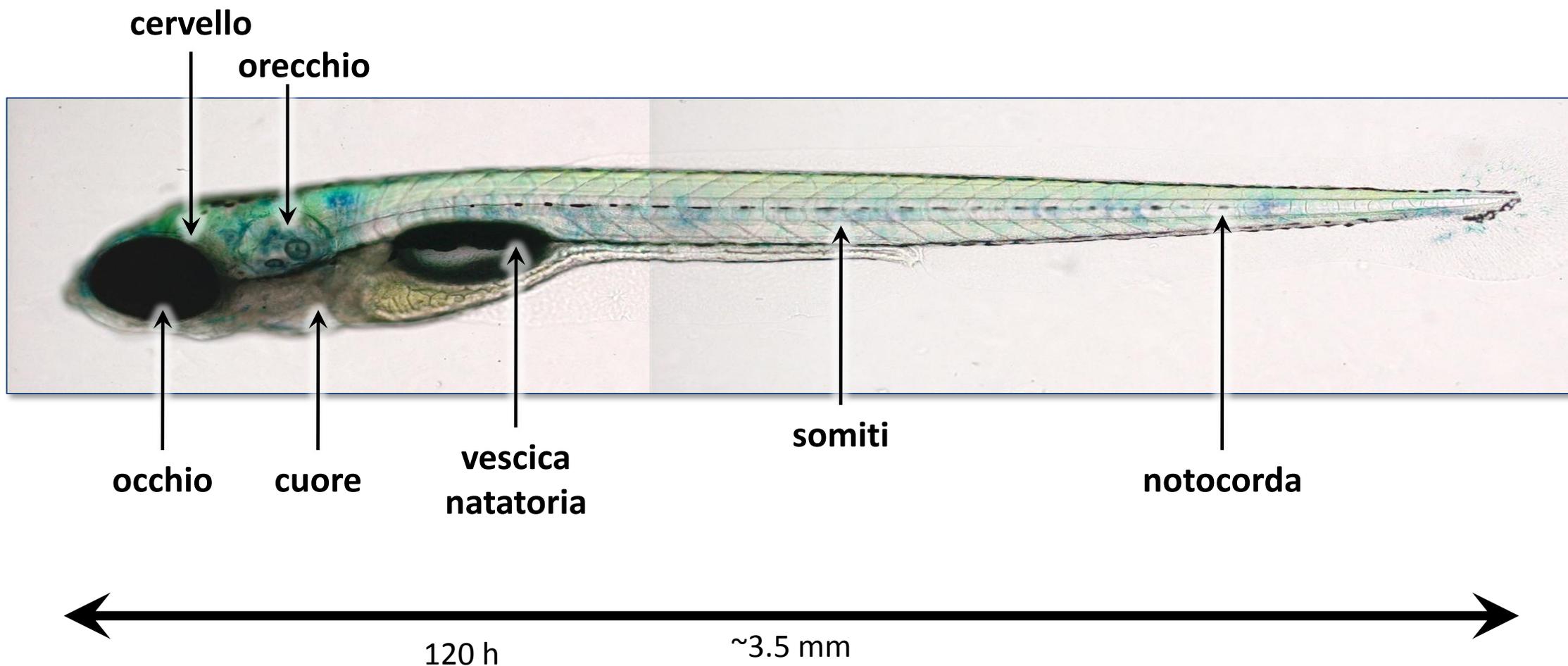


ventral





# Embrione di zebrafish



**Assenti : stomaco, polmoni, prostata, tessuto mammario**

# ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

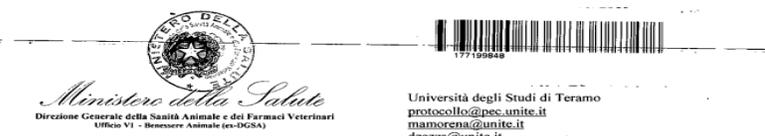
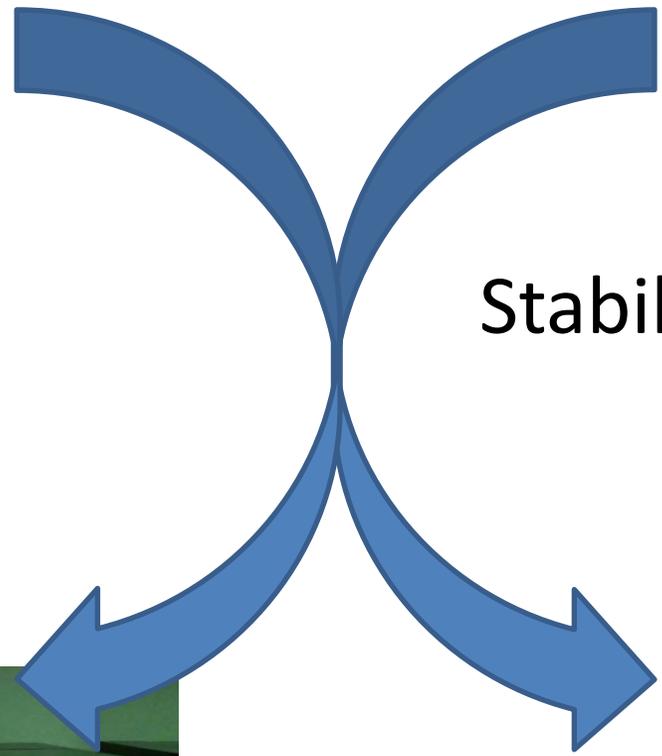


Fonte: Braunbeck *et al.* (2004)



## Stabilimento utilizzatore per la specie zebrafish

## Stabilimento allevatore per la specie zebrafish

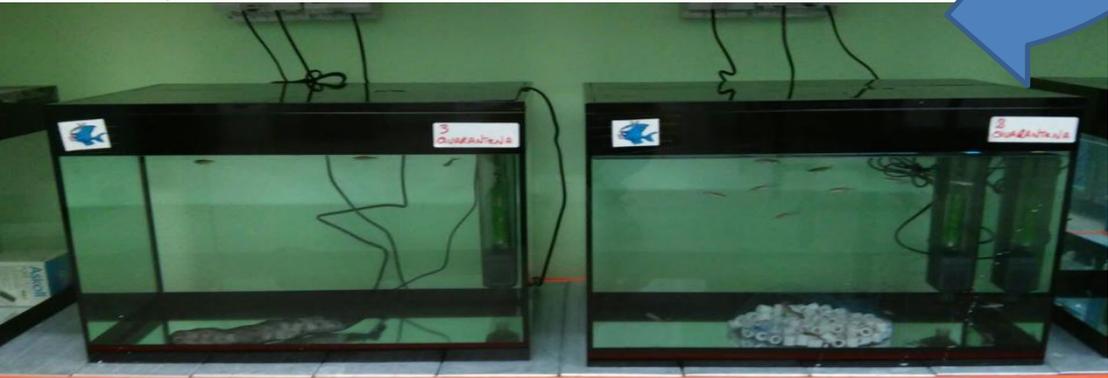


Università degli Studi di Teramo  
protocollo@pec.unite.it  
mamorena@unite.it  
dzezza@unite.it

e, per conoscenza  
ASL di Teramo  
Servizio Veterinario  
c.a. Dr. Pasquale STRIGLIONI  
e-mail: pasquale.striglioni@aslteramo.it  
angelo.cameli@aslteramo.it

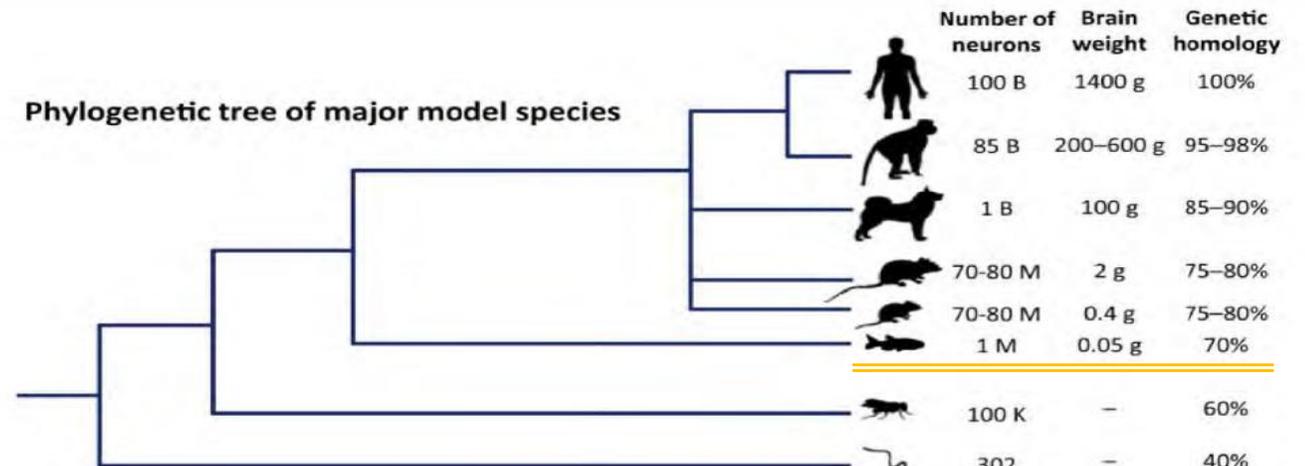
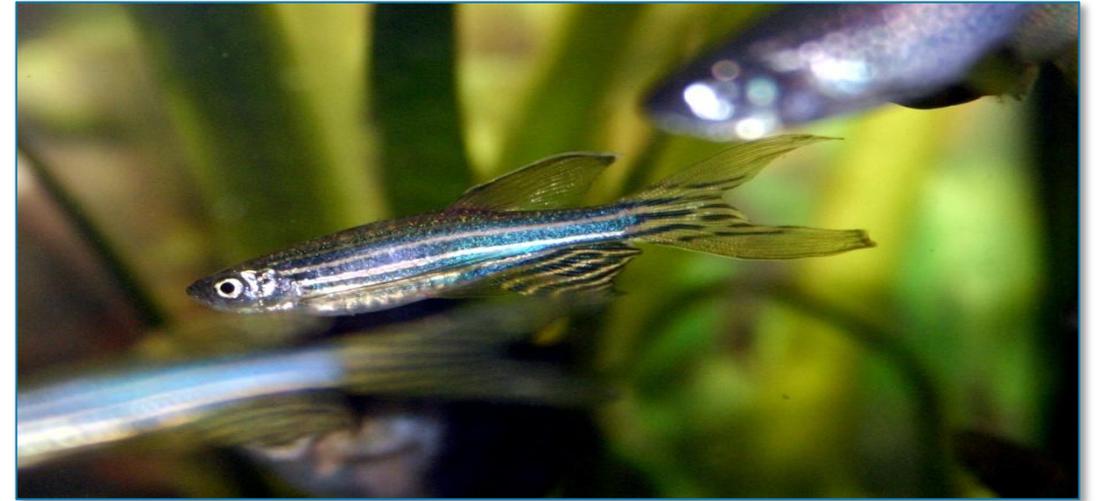
**Oggetto:** D.lgs 26/2014 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.  
Trasmissione autorizzazione ai sensi dell'articolo 20.  
Autorizzazione n. 02/2016-UT (risposta a DGSAP/ 0020361-A del 03/08/2015)

Si trasmette l'autorizzazione n° 02/2016-UT, rilasciata in data 11 marzo 2016, ai sensi dell'art. 20 del D.lgs 26/2014.



# Chi è Zebrafish ?

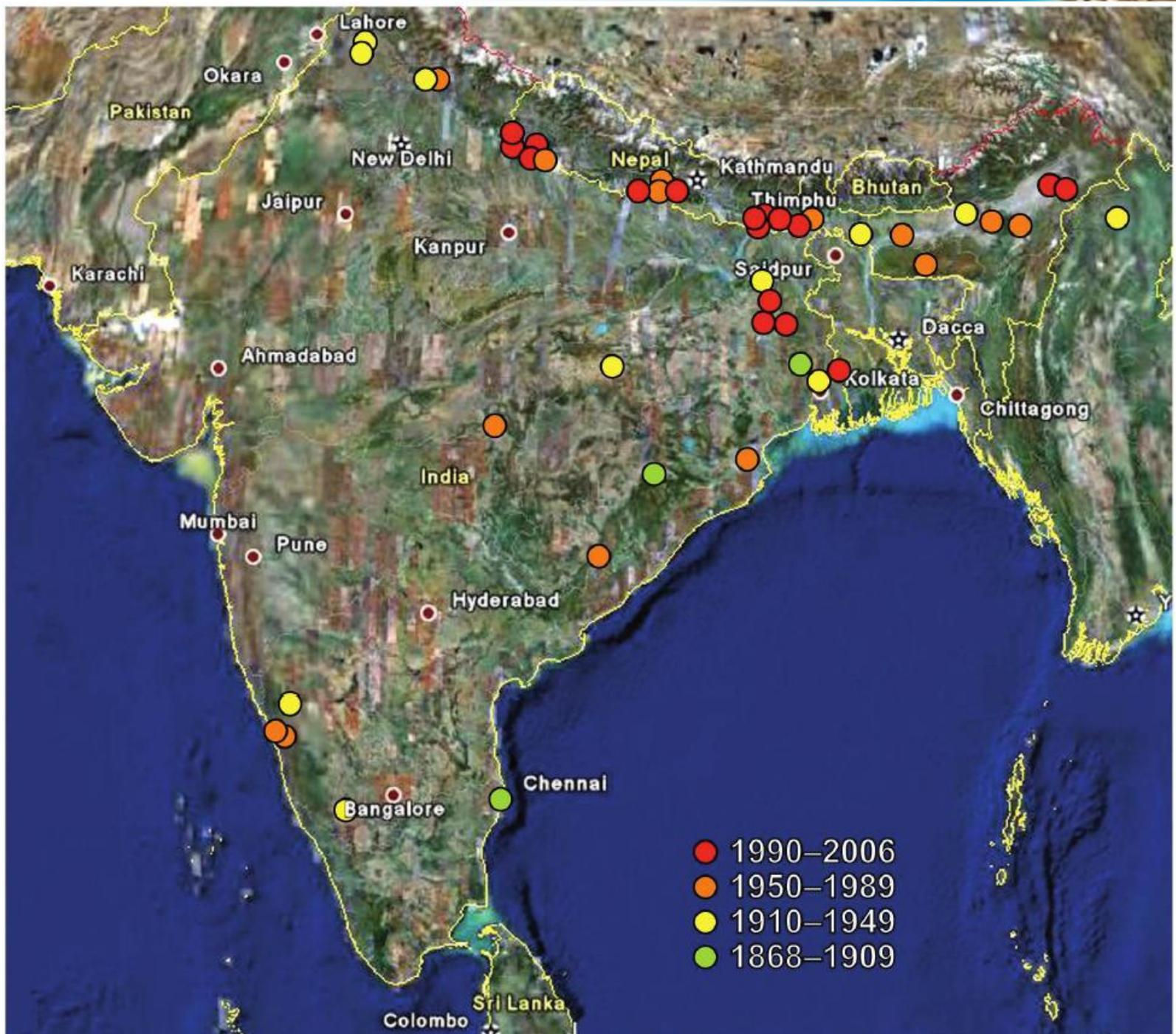
- ***Danio rerio***
- Piccolo pesce tropicale di acqua dolce
- Teleosteo
- Originario dell'Asia del sud
- A sessi separati
- Modello di replacement perché condivide comuni pathways molecolari con i mammiferi



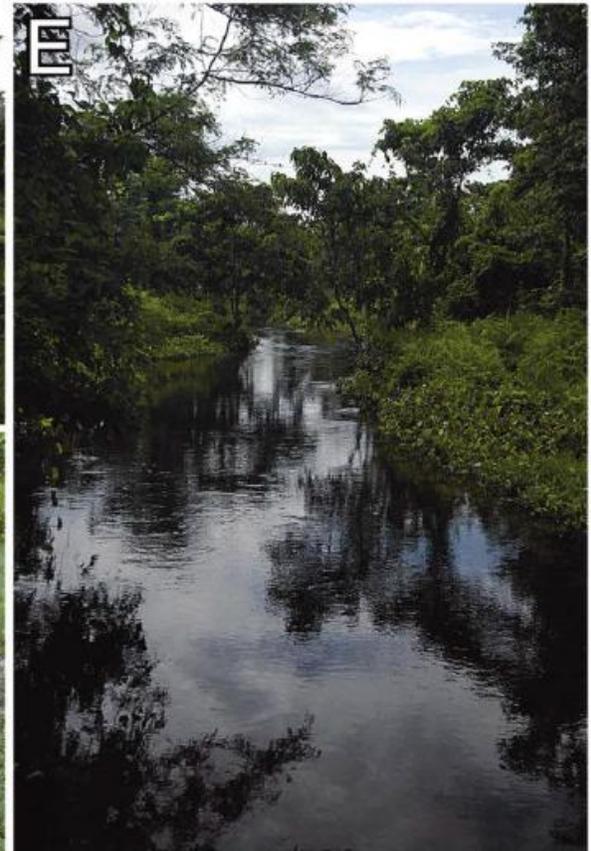


UN  
DDN  
DI

# Where is zebrafish in the world



# Natural habitats of zebrafish



still water (currents, 0 m–sec to 0.1 m–sec) at 27° C to 34° C and pH 7.9–8.2; widths of water bodies ranged from 1 to 12 m, and depths ranged from 16 to 57 cm; water was relatively clear (transparent to 35 cm). 5-6 months for sexual maturation.



# Zebrafish strain

- ❖ Wild type
- ❖ Mutant
- ❖ Transgenic



wild-type WT



*duchamp/+* DU



*D. albolineatus* Da



*albino* A



*ednrb1* E



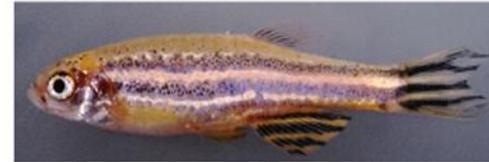
*D. choprae* Dc



*csf1r* C



*kit* K



*D. kyathit* Dk



*csf1r; ednrb* CE



*mitfa* M



*D. nigrofasciatus* Dn



*csf1r; kit* CK



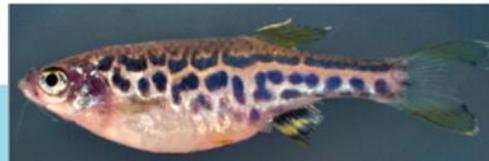
*oberon* O



*De. shanensis* Ds



*dali/+* DI



*seurat* S





# Laboratory strains



AB

(pet shop derived)



TÜ



WIK

(Wild type India Kolkata)

They may look the same, but are genetically different!  
WIK was used for mapping mutations from the first mutagenesis screens



# Allevamento/vantaggi



Facilità di manipolazione embrioni per creare linee transgeniche

Alta densità di allevamento

Taglia piccola e resistente

Elevata produzione  
di uova

In laboratorio

Longevo (2 anni)

Uova facilmente manipolabili

Bassi costi di mantenimento

Disponibilità di oltre 1000 linee transgeniche

17/04/2013 Genoma sequenziato viene reso pubblico



# Ciclo riproduttivo

- Assenza di stagionalità/riproduzione tutto l'anno
- Tempo di generazione : circa 3-4 mesi
- Intervallo di ovodeposizione 2-3 giorni
- Alta fecondità (200 uova/week)
- Uova trasparenti e non aderenti al substrato
- Ciclo luce/buio: 14/10h
- Sviluppo embrionale rapido (T° ottimale 26° - tollerata 23-33°)



# The zebrafish

*Danio rerio* Hamilton 1822

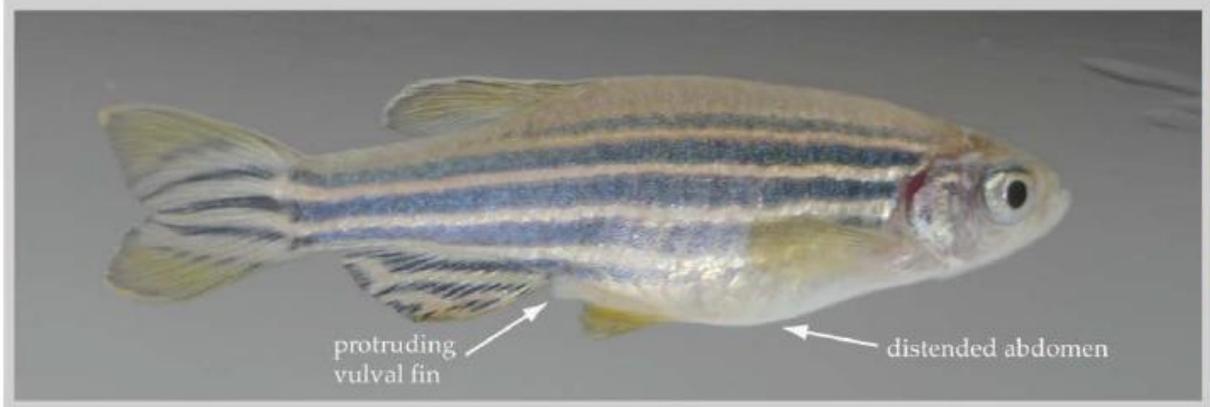
zebrafish  
Zebrabärbling  
poisson-zèbre  
pez cebra

(in older literature also  
*Brachydanio rerio*)



**MALE**

- faster and more slender in shape
- darker and more red in colour

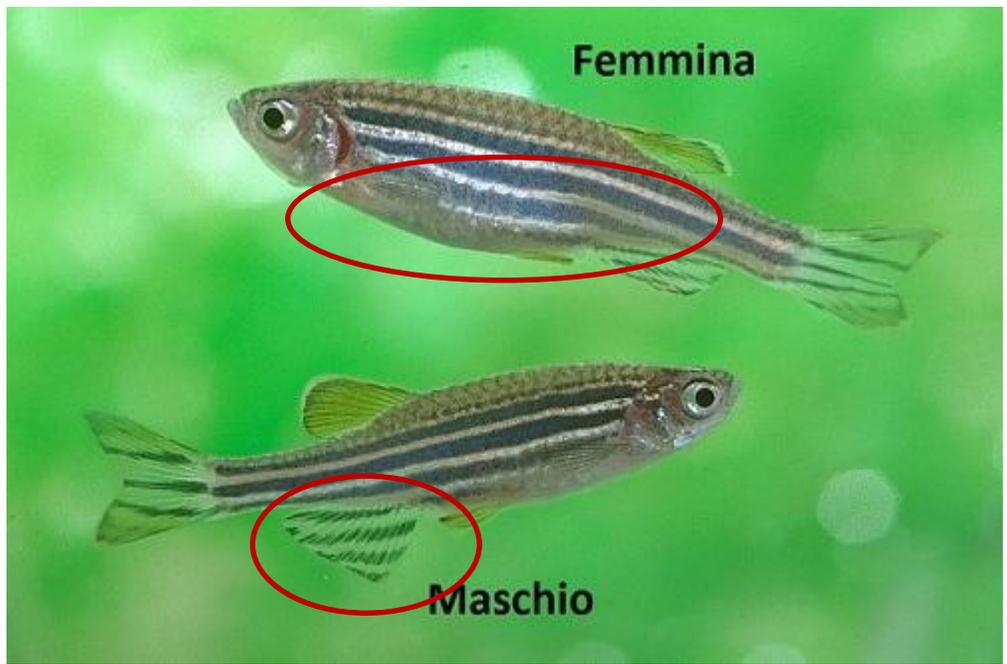


**FEMALE**

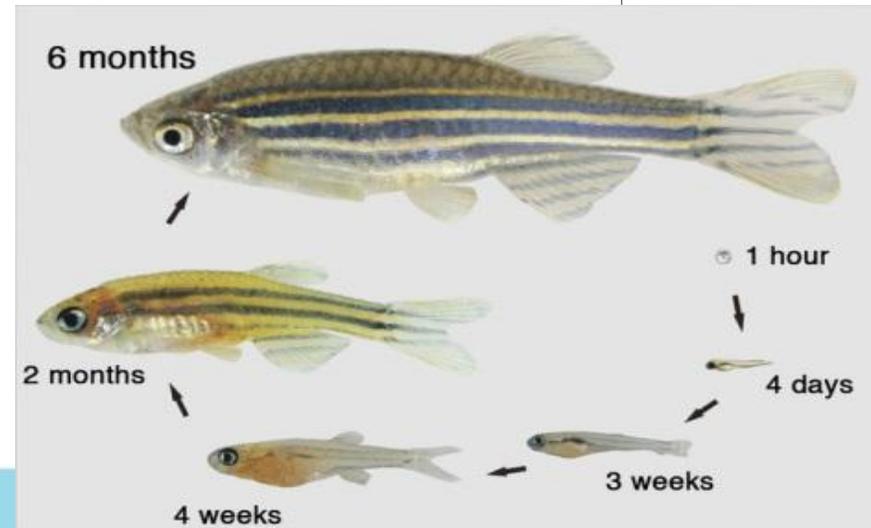
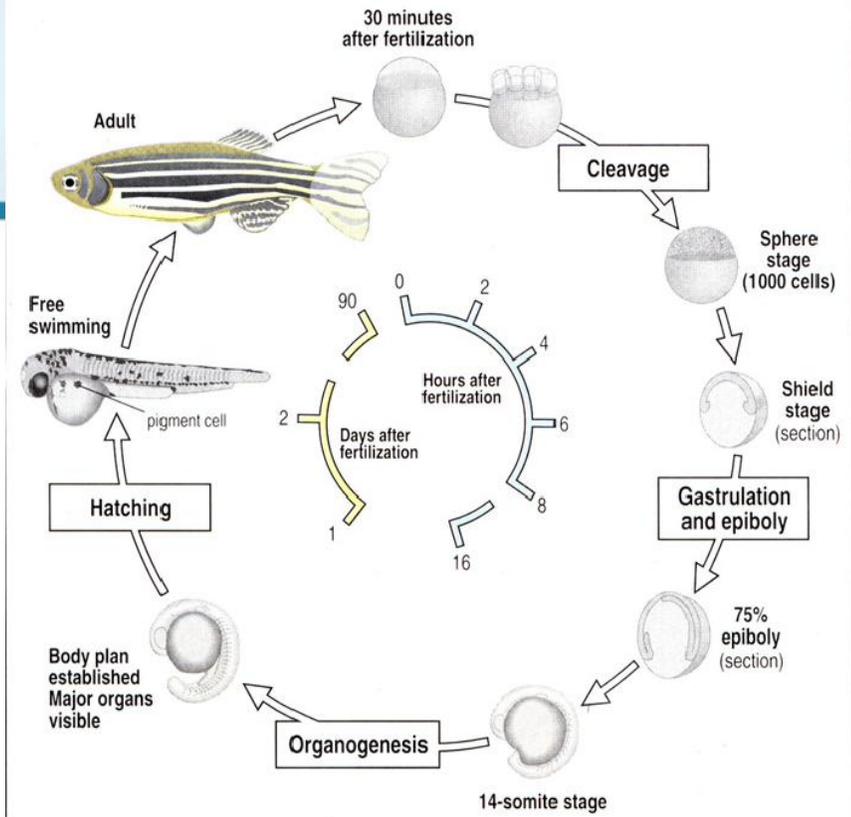
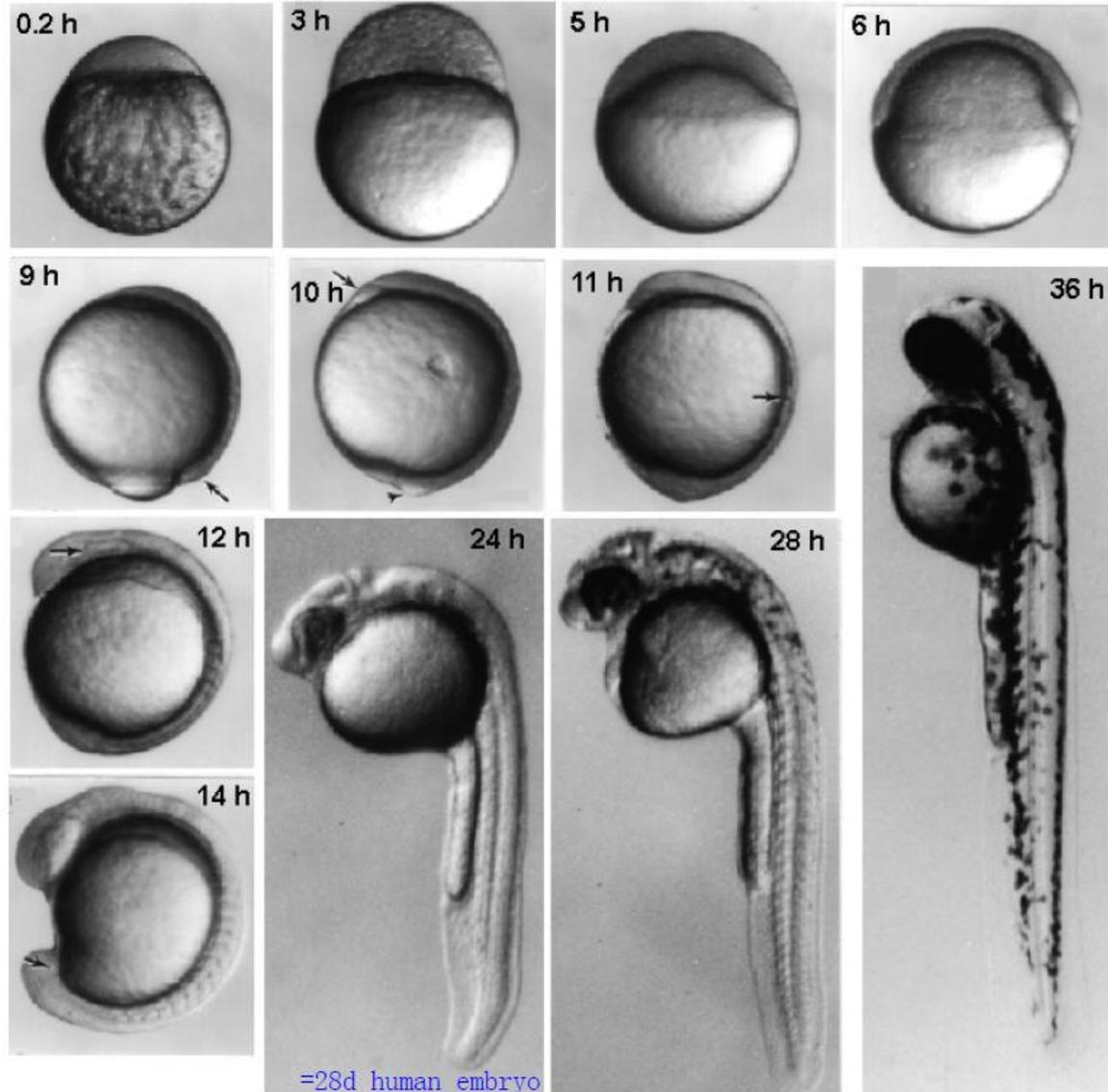
- more grey / silver in colour
- slower and fatter



# Dimorfismo sessuale

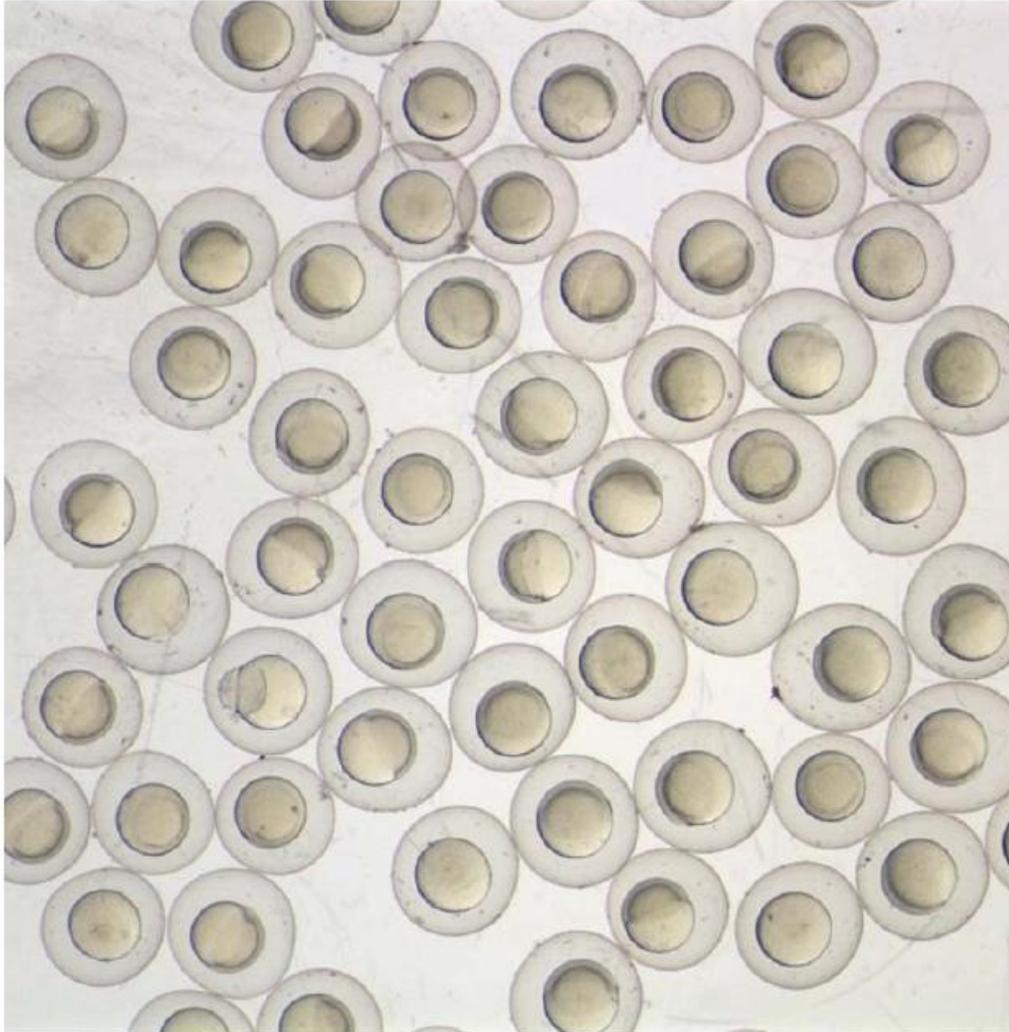


# 1. Rapid development





## 2. High reproductivity



- 🧠 A few hundreds of eggs per female
- 🧠 Laying weakly
- 🧠 Controllable laying time
- 🧠 External fertilization and development
- 🧠 Transparent embryos for easy observation



# 3. Small size and easy raising





# Organismo modello per studi di cancerogenesi



1. Sviluppa tumori spontanei, che sono istologicamente e geneticamente simili a quelli dell'uomo.
2. Transgenesi su larga scala (impiegando centinaia di embrioni al giorno) consente una caratterizzazione funzionale delle alterazioni genetiche.
3. Trasparenza di embrioni e adulti per la visualizzazione in vivo di tumori e progressione alla risoluzione di una singola cellula

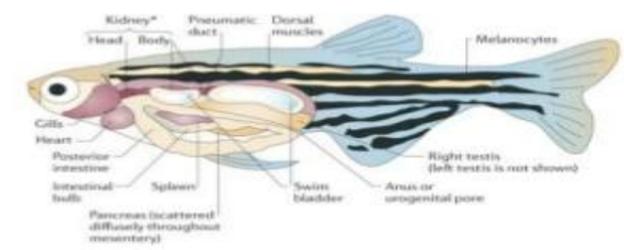


# Organismo modello per studi di cancerogenesi



- Screening per identificare molecole e pathways rilevanti per lo sviluppo di tumori nell'uomo, e test di molecole che sono già in trial clinici.
- Screening su larga scala di fenotipi geneticamente mutati.
- Xenotrapianti

## Cancer Research



- Shares most of their organs with mammalian counterparts
- Differently aged animals each offers distinct advantages for cancer-relevant phenotypes

Embryos: 1-4 days	Juveniles: 10-45 days	Adults: 2-24 months
<b>Cancer-related developmental phenotypes</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cell cycle and genomic instability</li> <li>• Stem or progenitor specification programmes</li> <li>• Developmental effects of transplanted human cancer cells</li> <li>• Chemical and genetic screens</li> </ul>	<b>Cancer imaging</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• In vivo imaging of cancer initiation and early progression</li> <li>• Embryo-adult cell type transitions</li> <li>• Transplantation of human cells</li> </ul>	<b>Adult cancer models</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Transgenic-, mutagen- and transposon-based penetrant cancers</li> <li>• Genetic modifier screens</li> <li>• Cross-species oncogenomics</li> <li>• In vivo imaging of cancer progression and metastasis</li> </ul>

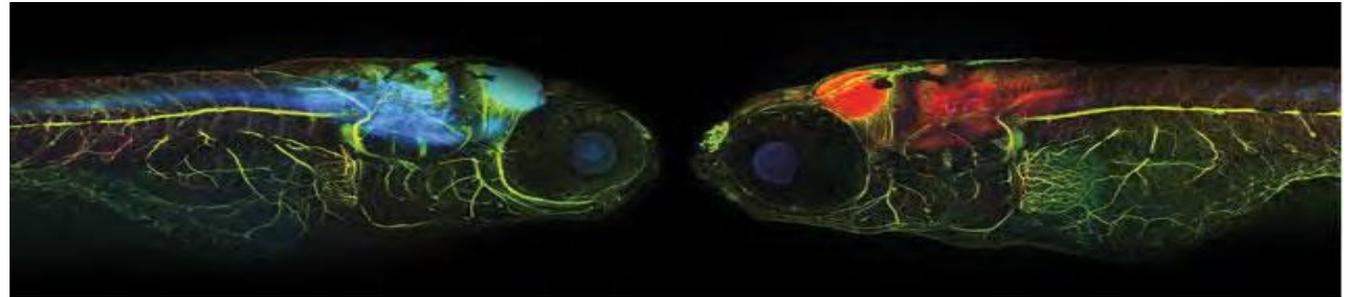


# Organismo modello di malattie genetiche



1. Genoma completamente sequenziato
2. 69% dei geni ha un ortologo nel genoma umano e vi sono oltre 10.000 geni che sono condivisi tra uomo, *Danio*, topo e pollo
3. Zebrafish mutanti sono stati prodotti x studiare malattie umane quali

- Alzheimer
- Rene policistico
- Melanomi maligni
- Malattie cardiache congenite
- leucemie



4. Utilizzando individui mutati in grado di esprimere proteine fluorescenti in determinati cellule/tessuti c'è la possibilità di seguire lo sviluppo di singole cellule e singoli neuroni.



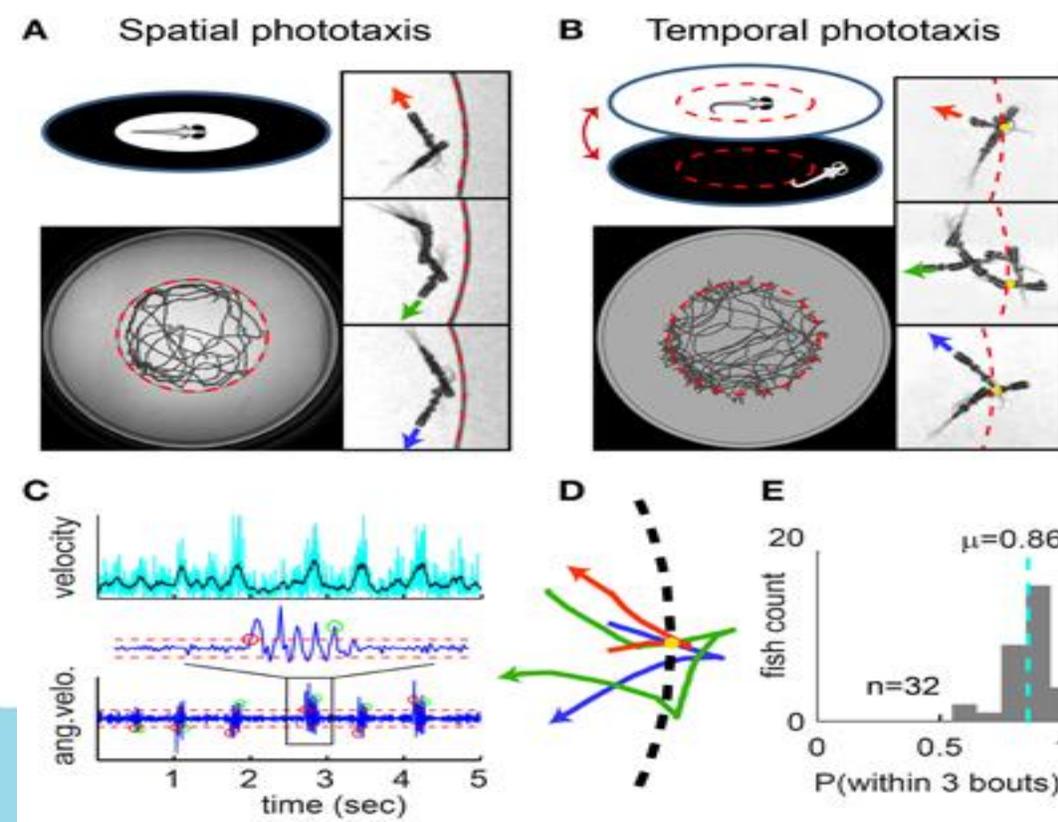
# Organismo modello in neuroscienze



Valutazione di comportamenti (semplici/complessi) sia di larve sia di adulti con specifici software

**EthoVision XT**

- Track in all wells simultaneously
- Control light stimulus
- Analyze distance moved, velocity, etc.
- Over 1500 users worldwide





# Organismo modello di drug discovery



- In quanto vertebrato, possiede una fisiologia piuttosto complessa (organi escretori, sistema cardiocircolatorio, etc), benché adattata alla vita acquatica.
- Processi metabolici simili all'uomo
- Proteine ortologhe di zebrafish sono simili a quelle umane, soprattutto all'interno dei domini funzionali (es. recettori tiroidei di zebrafish sono 91% uguali a quelli dell'uomo).
- Numerose le molecole testate in zebrafish fino ad oggi.

# Organismo modello per test di tossicità *in vivo*

***La trasparenza dell'embrione consente di valutare:***

- la morfologia degli organi interni;
- processi necrotici, che determinano un'opacità nell'embrione;
- difetti di circolazione (edemi, emorragie)

