

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



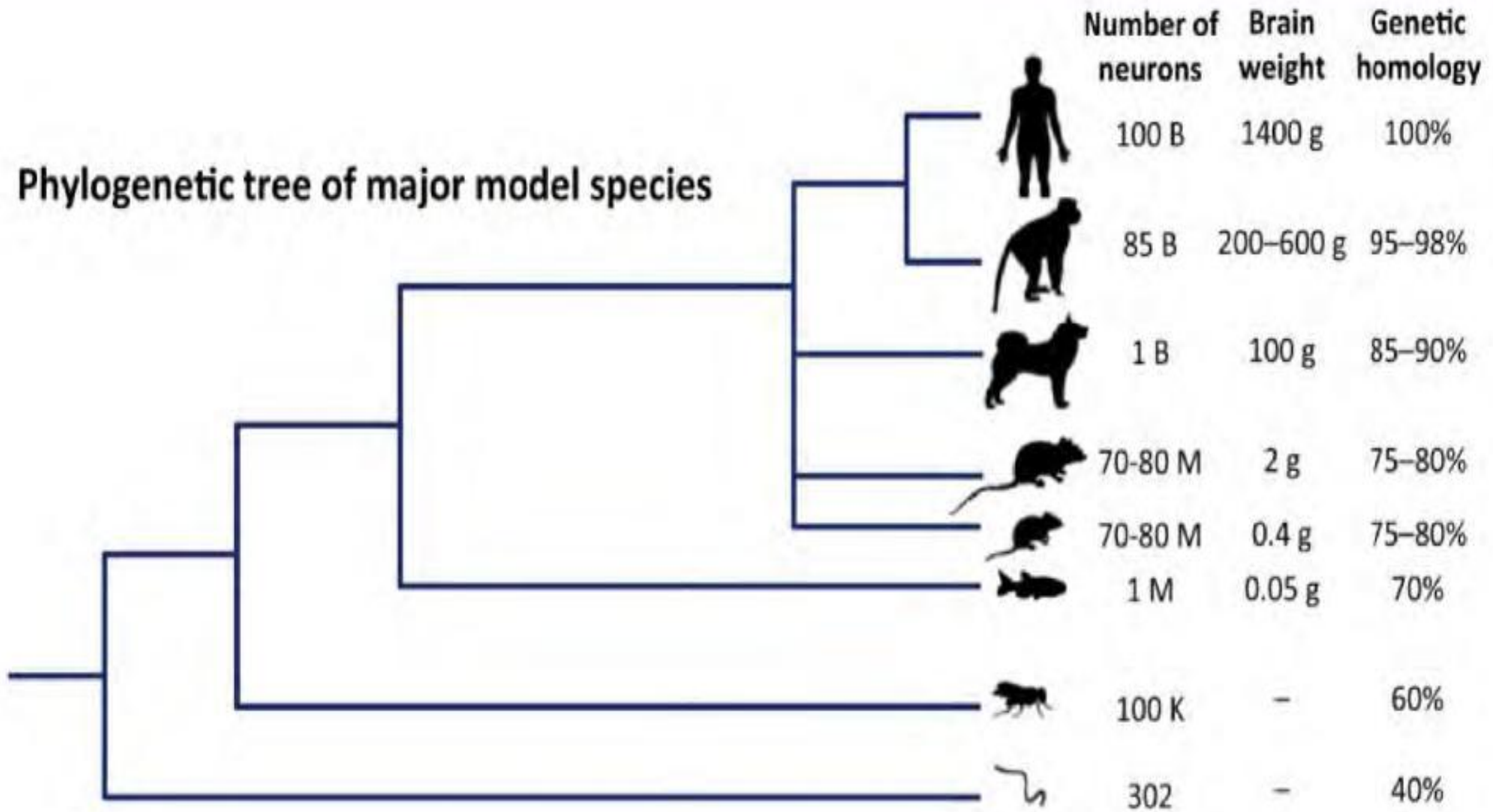
Tipi di organismi modello



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.

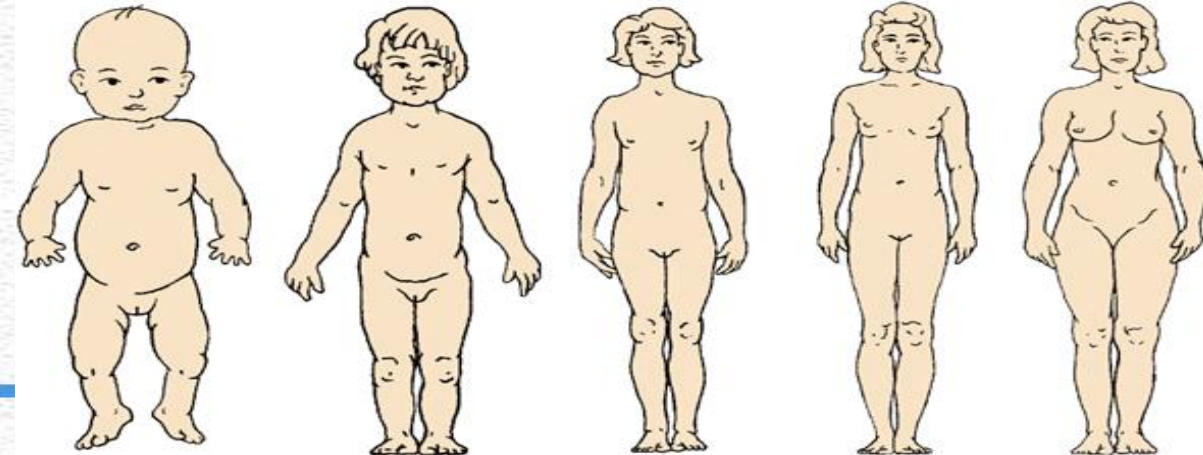
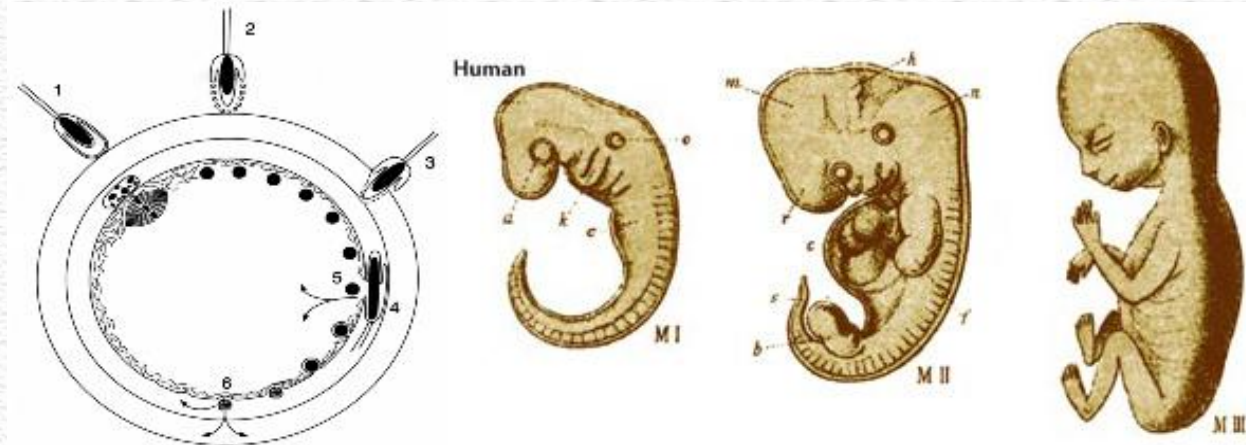


Phylogenetic tree of major model species

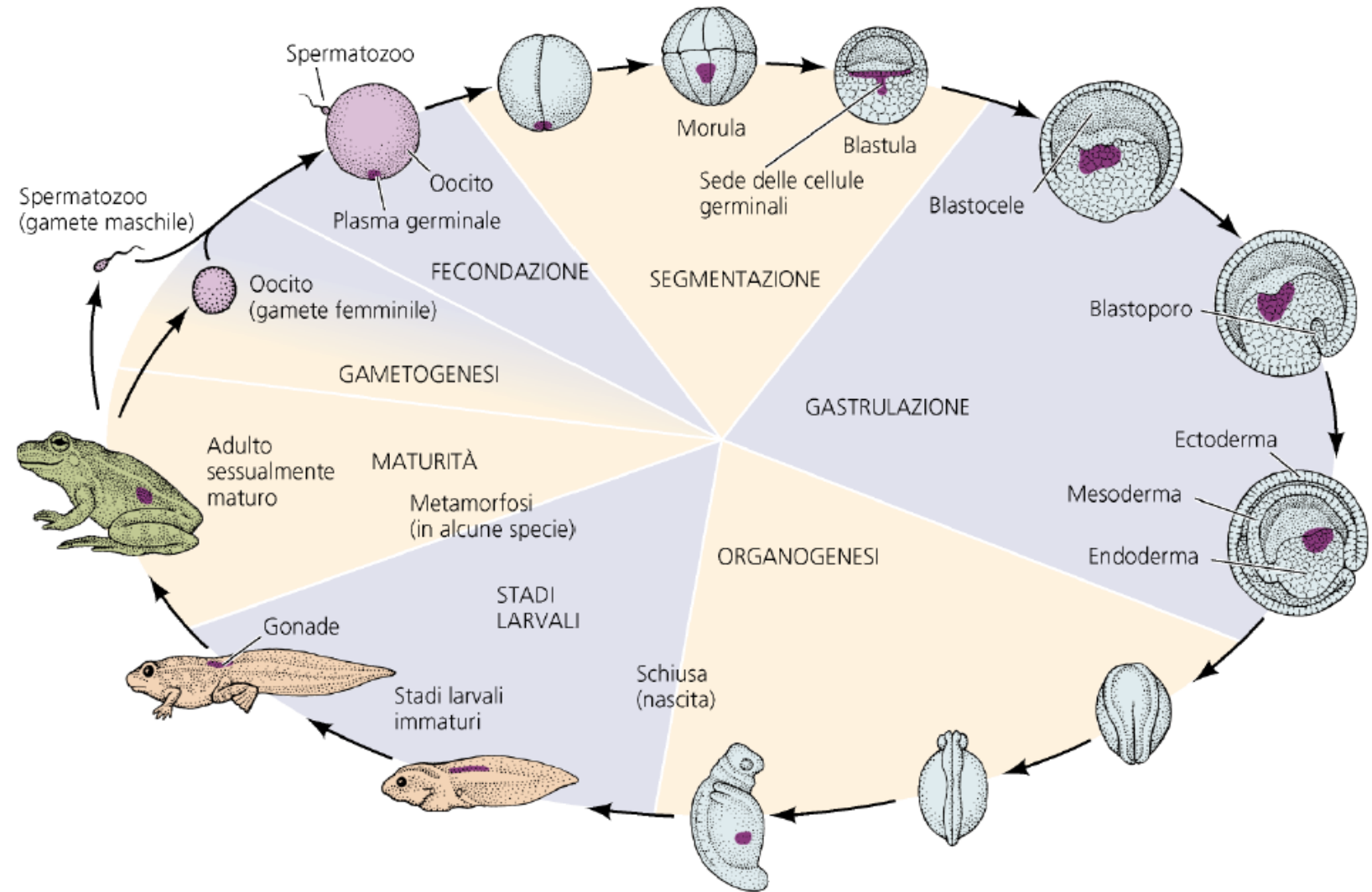


BIOLOGIA DELLO SVILUPPO

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

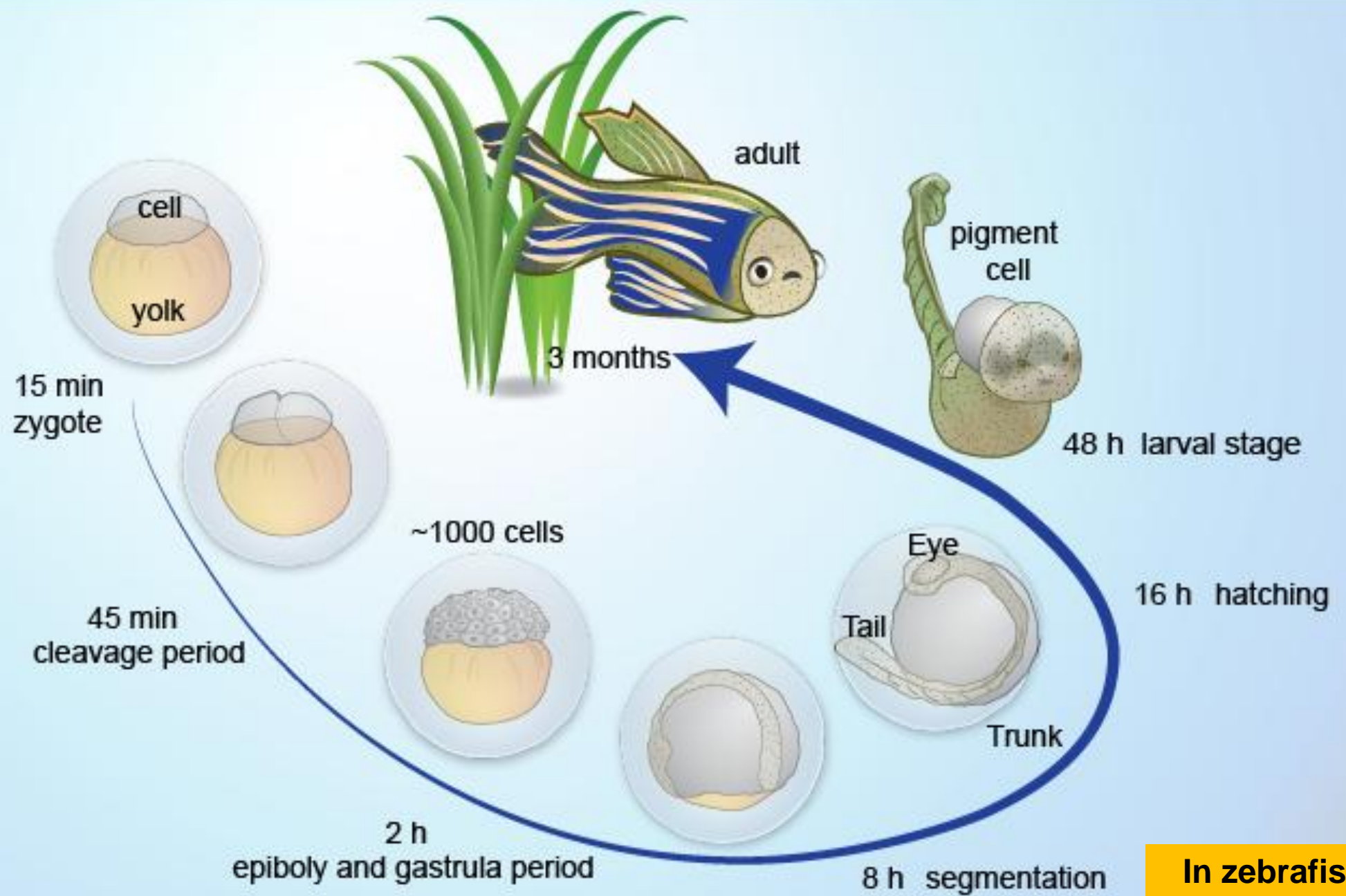


Il ciclo della vita: gli stadi dello sviluppo animale





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



In zebrafish l'intero ciclo dura 90 gg

FECONDAZIONE

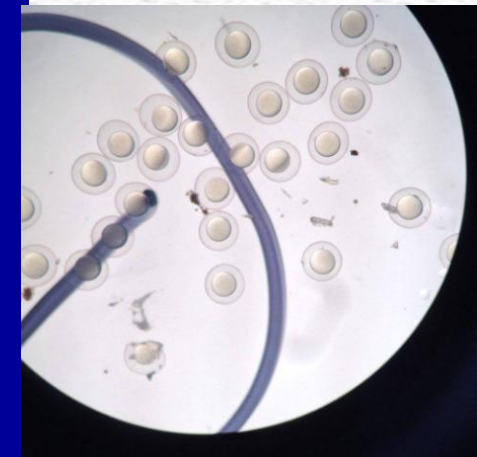
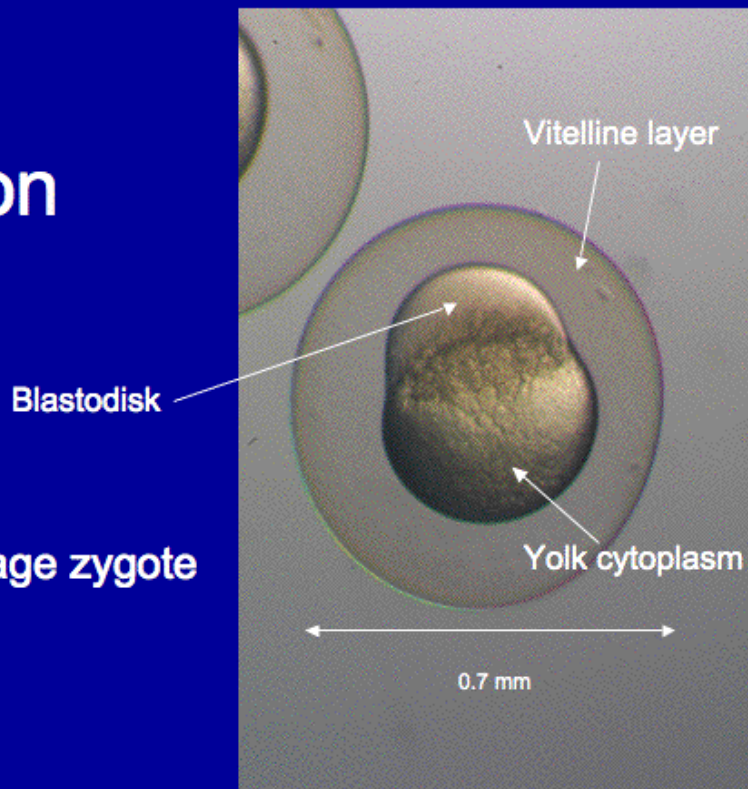
Dal singolo uovo fecondato (lo **zigote** unicellulare) si origina un n° enorme di diversi tipi cellulari con le più disparate funzioni. Tutte queste cellule contengono il medesimo patrimonio genetico.



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

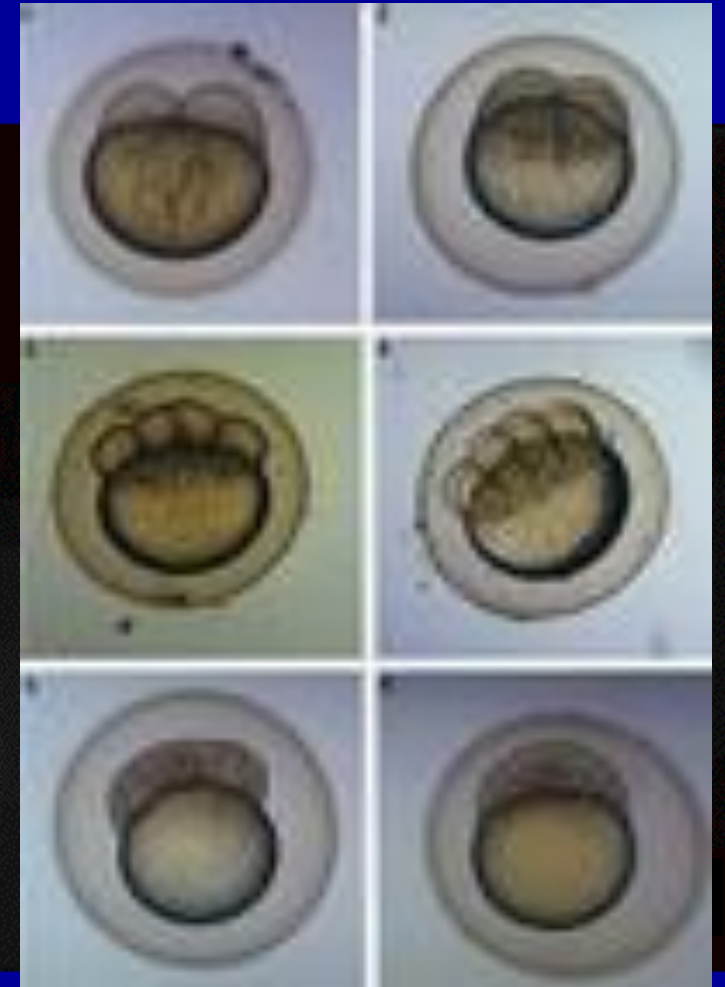
Fertilization

1 cell stage zygote



Developmental Timetable

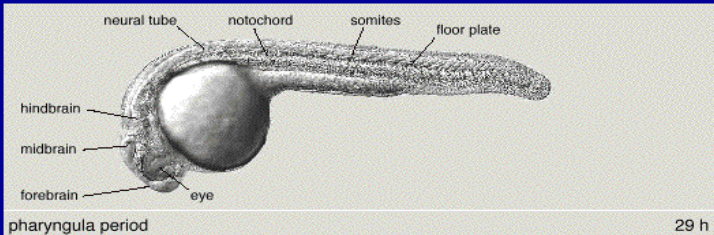
Zygote	0-0.75 hr
Cleavage	0.75-2.25 hr
Blastula	2.25-5.25 hr
Gastrula	5.25-10 hr
Segmentation	10-24 hr
Pharyngula	24-48 hr
Hatchling	48-72 hr
Larval Fish	72 hr



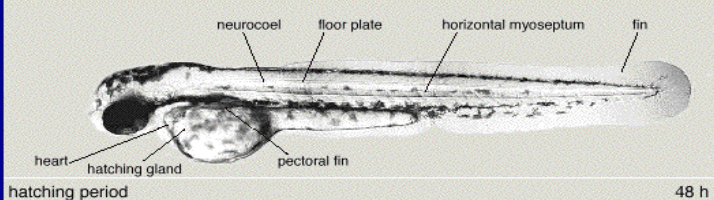
17 Hours of Development



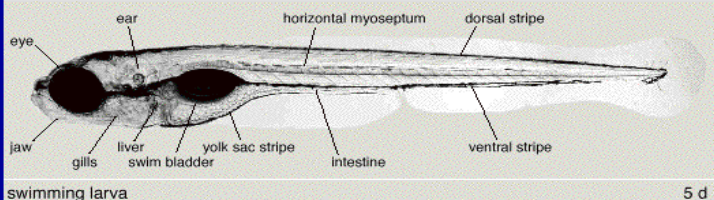
Pharyngula

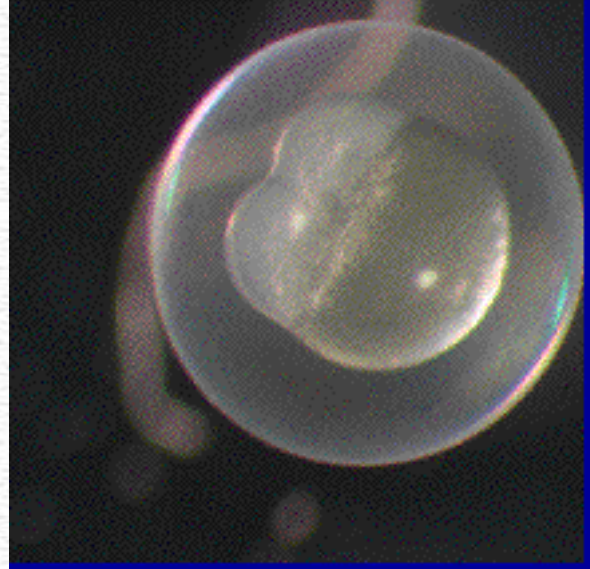


Hatchling



Larva

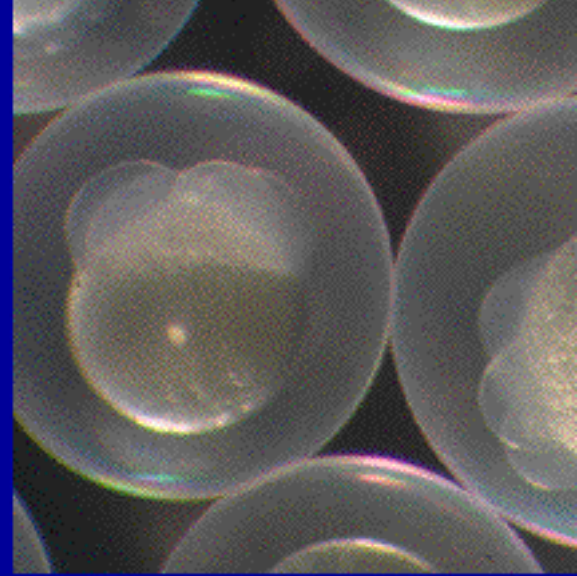




2



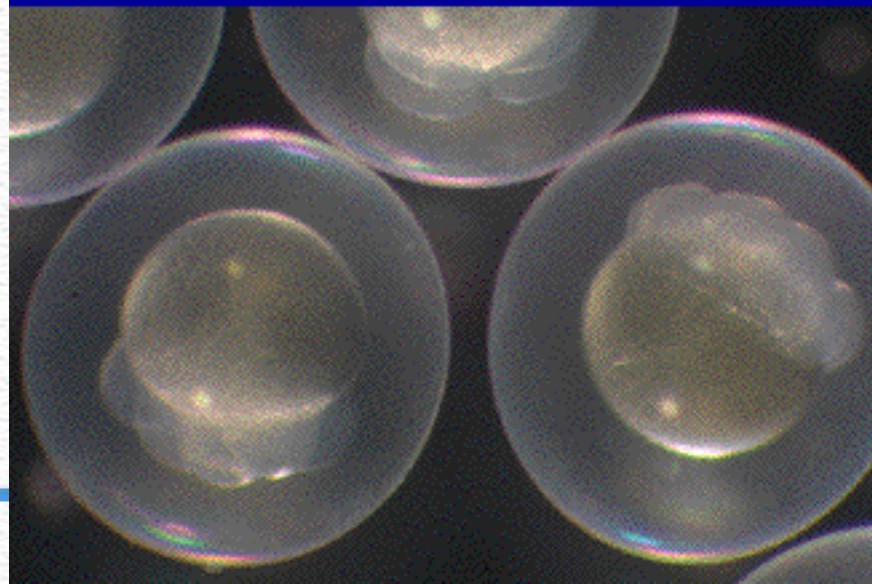
4



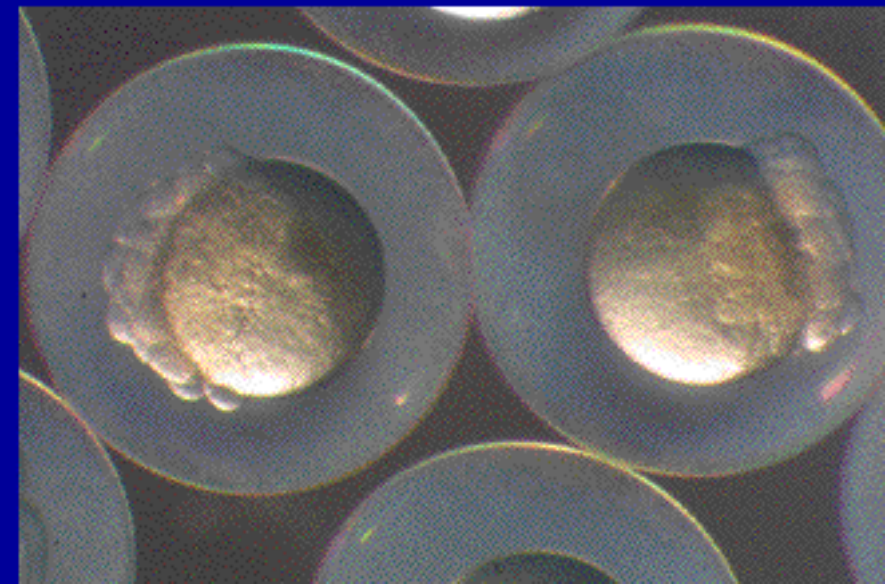
Cleavage

of the Blastodisk Cytoplasm

8



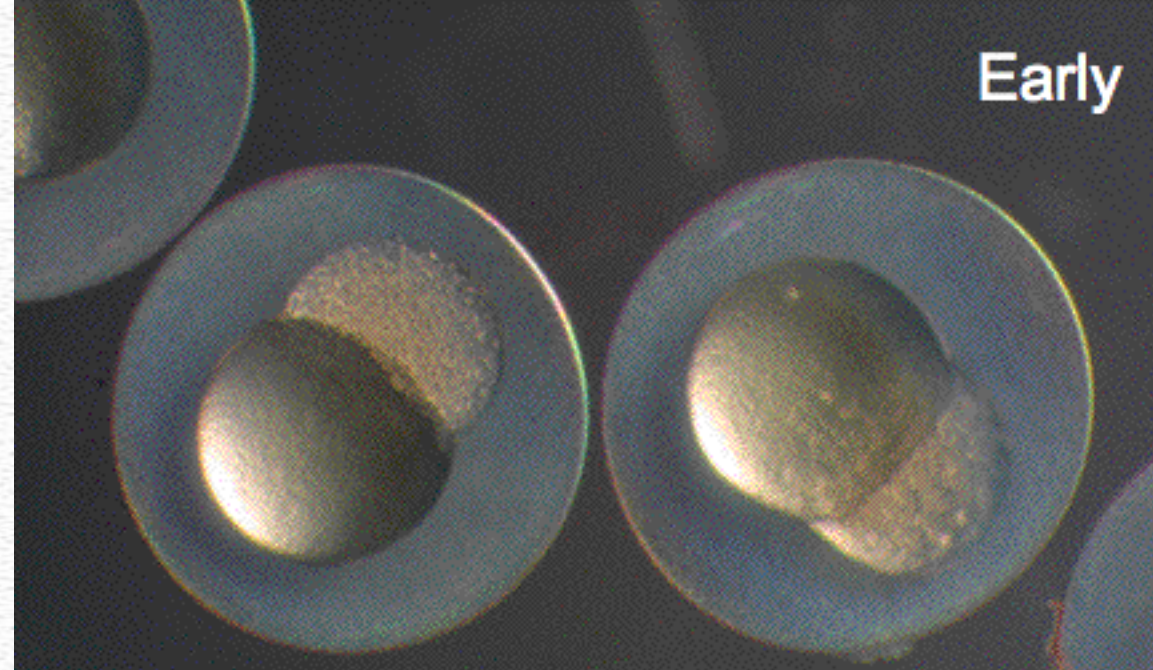
32



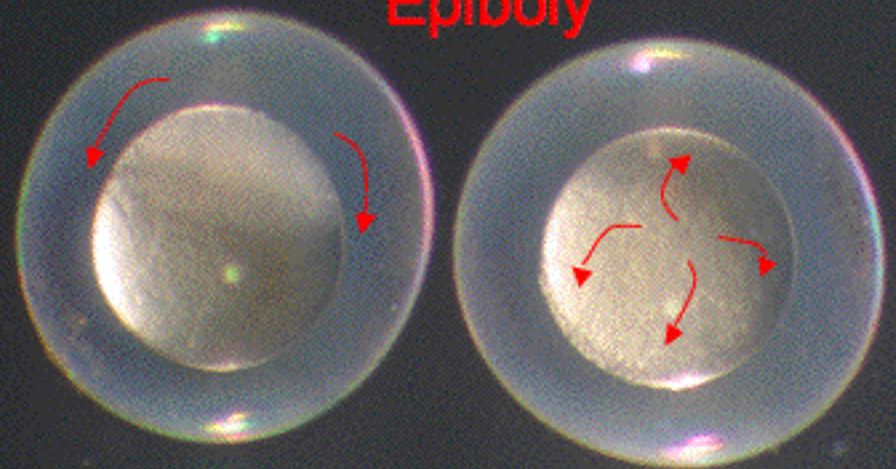


Early

Blastula



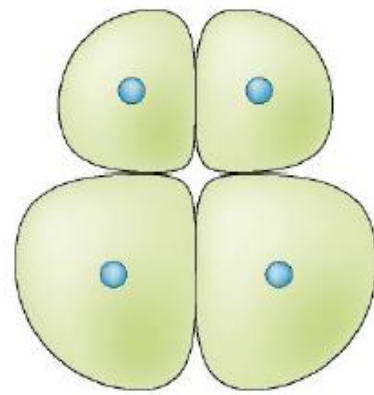
Epiboly



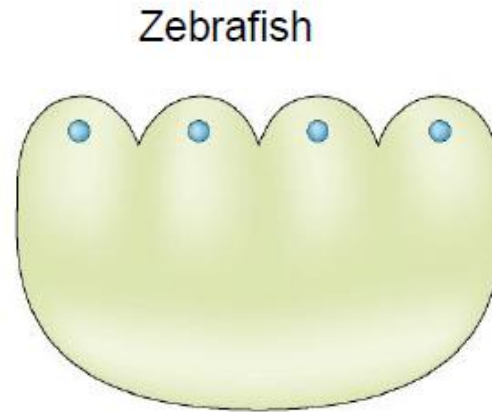


Zebrafish egg development over 24 hours.mp4

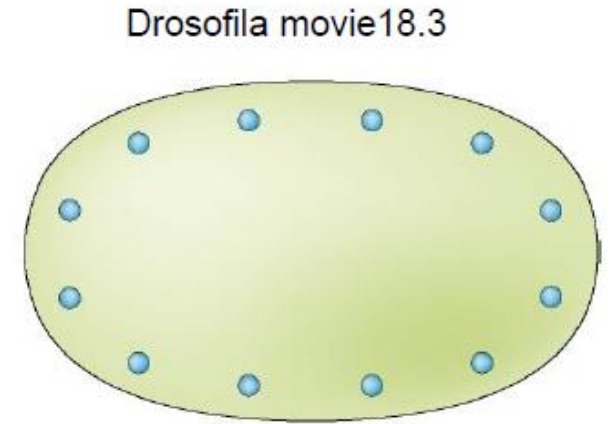
Segmentazione



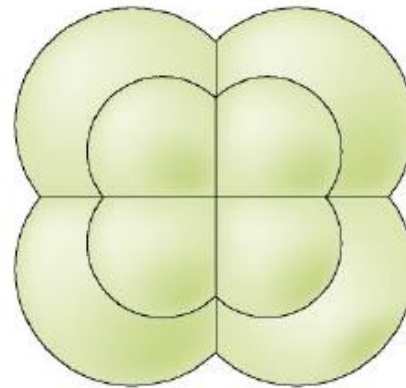
(a) Oloblastica
Xenopus



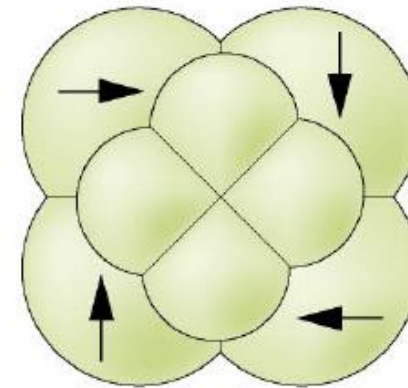
(b) Meroblastica
Discoidale



(c) Superficiale



(d) Radiale
echinodermi

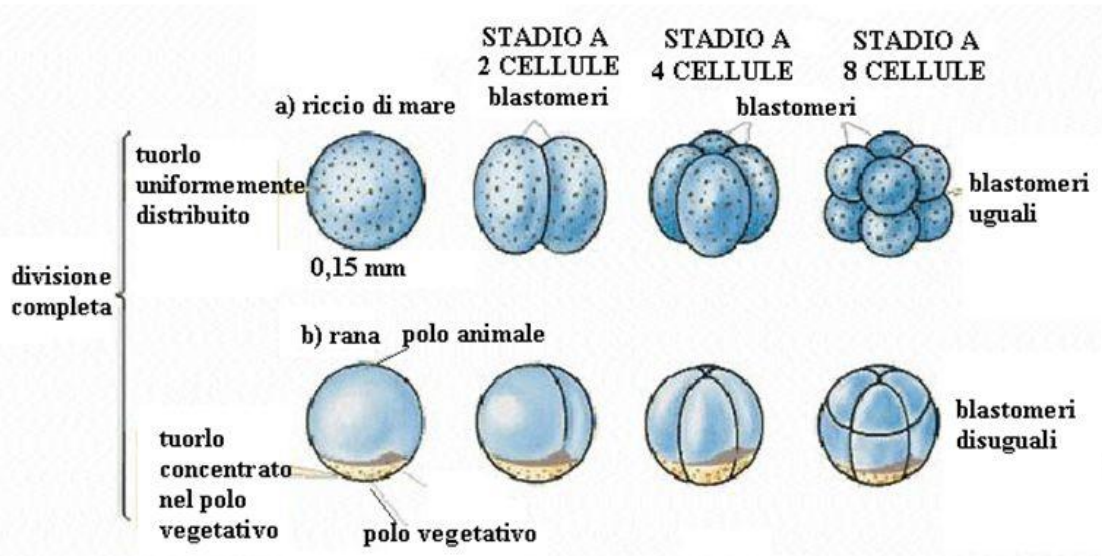


(e) Spirale
molluschi

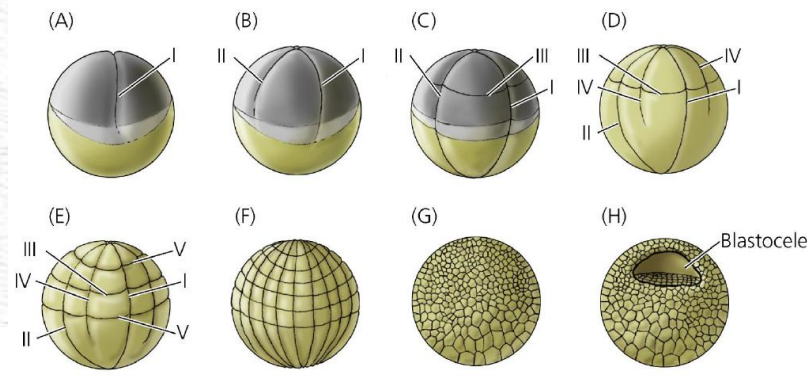


Uova oligolecitiche (mammif, riccio di mare): i blastomeri sono tutti uguali → seg. totale uguale

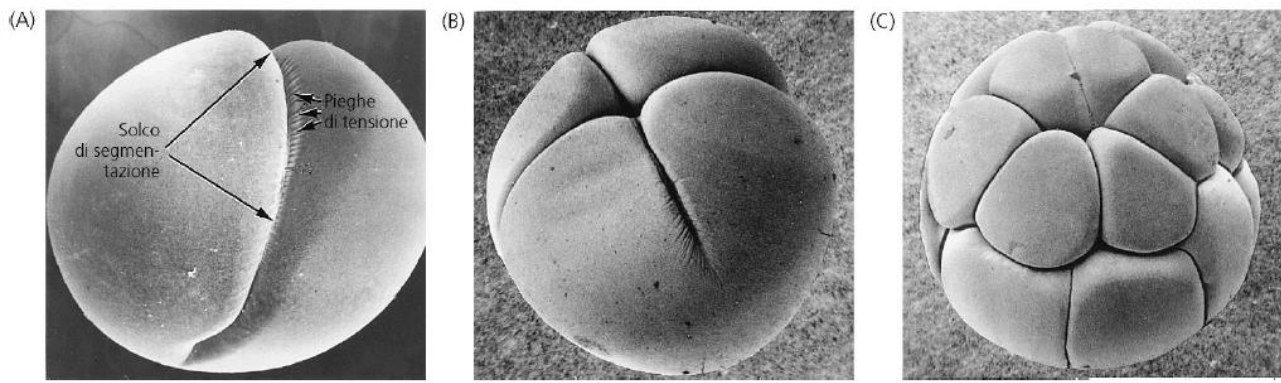
Uova telolecitiche (tuorlo localizzato nel polo vegetativo) (anfibi): seg. parziale

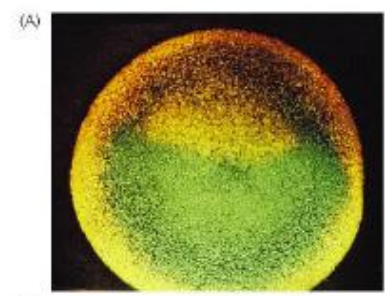


Segmentazione oloblastica dell'uovo di rana



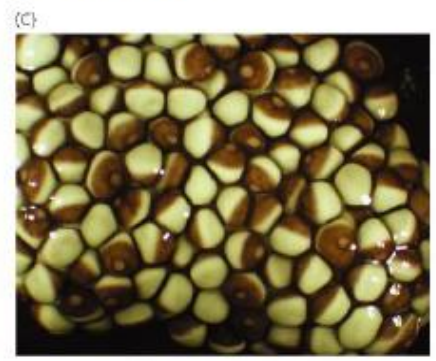
Segmentazione oloblastica



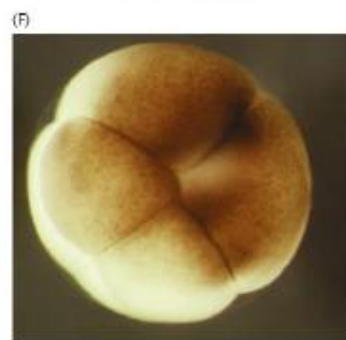
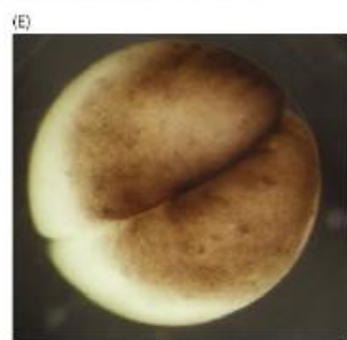
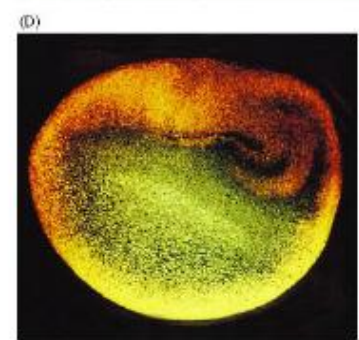


La segmentazione produce molte cellule da una iniziale

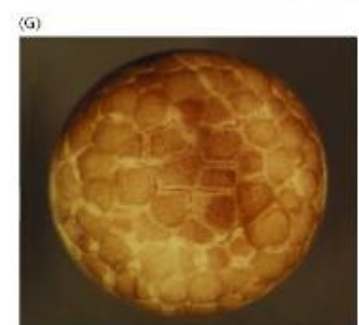
Xenopus laevis



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*)



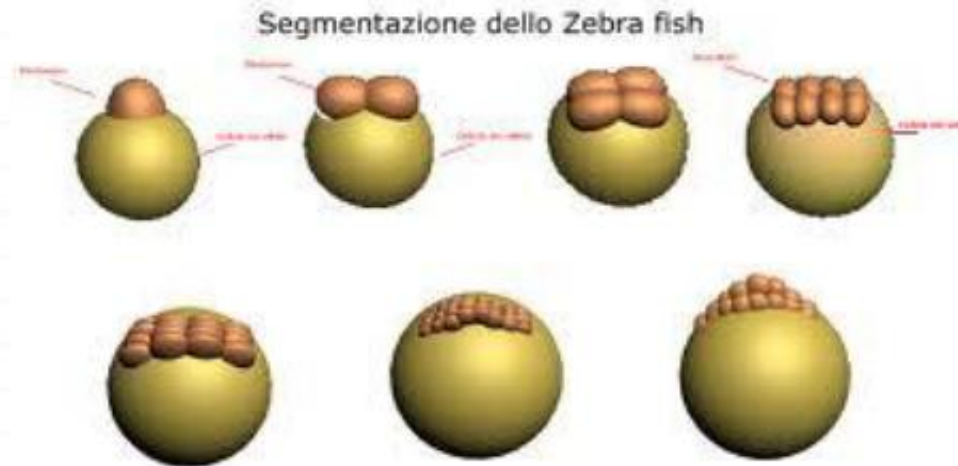
Blastula

Segmentazione in Zebrafish

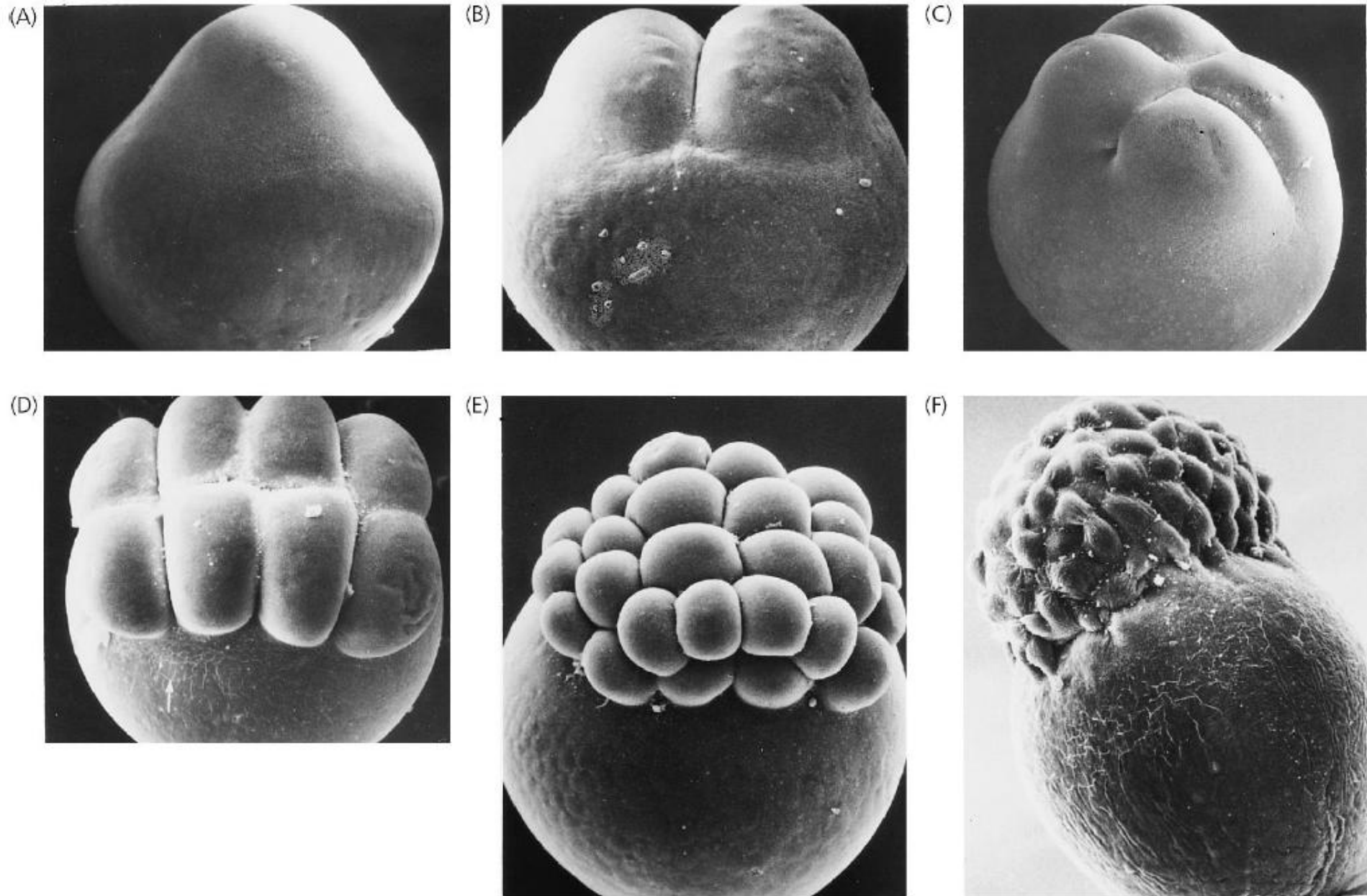
Uovo Telolecitico



Segmentazione
Meroblastica Discoidale



Segmentazione meroblastica discoidale nell'uovo di pesce zebra





Fertilizzazione



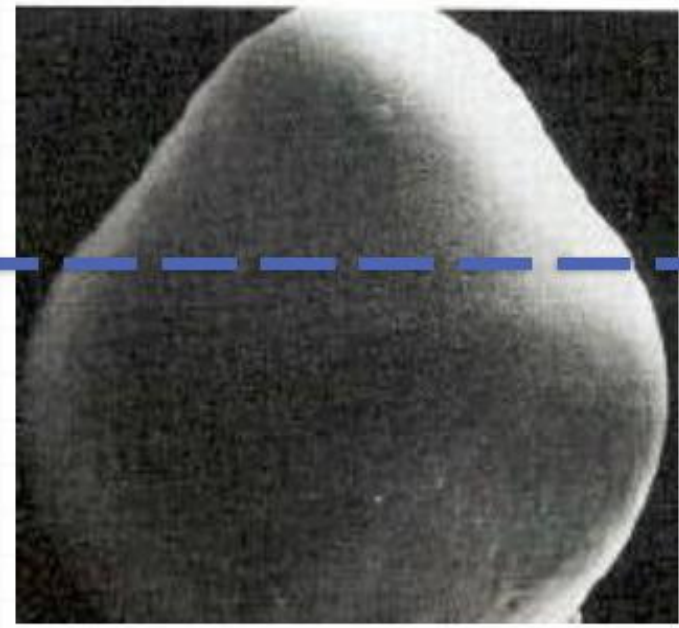
Aumento
Calcio Intracellulare



Contrazione
Citoscheletro actinico



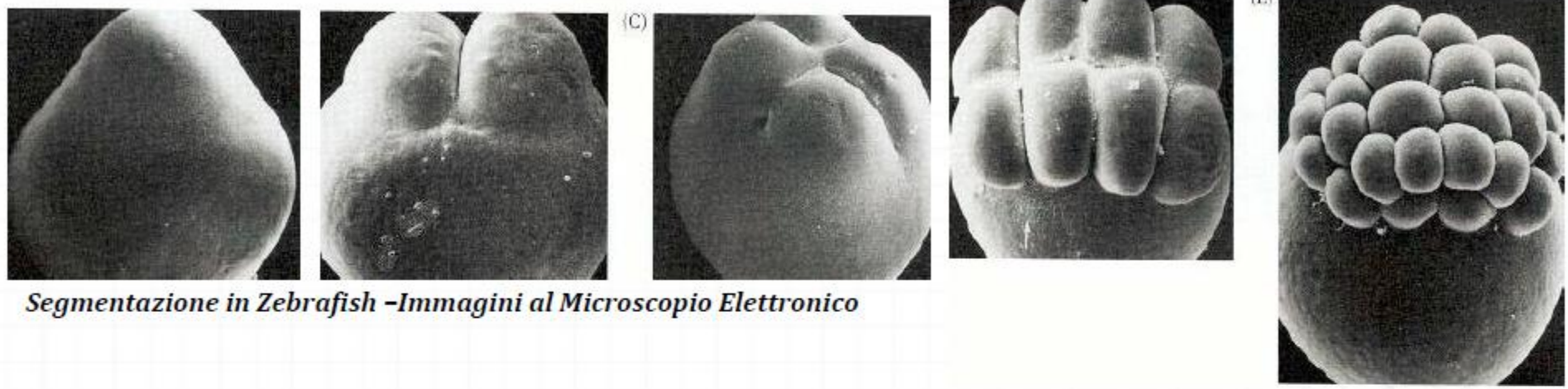
Il citoplasma privo di
vitello viene spinto
verso il polo animale



Blastodisco

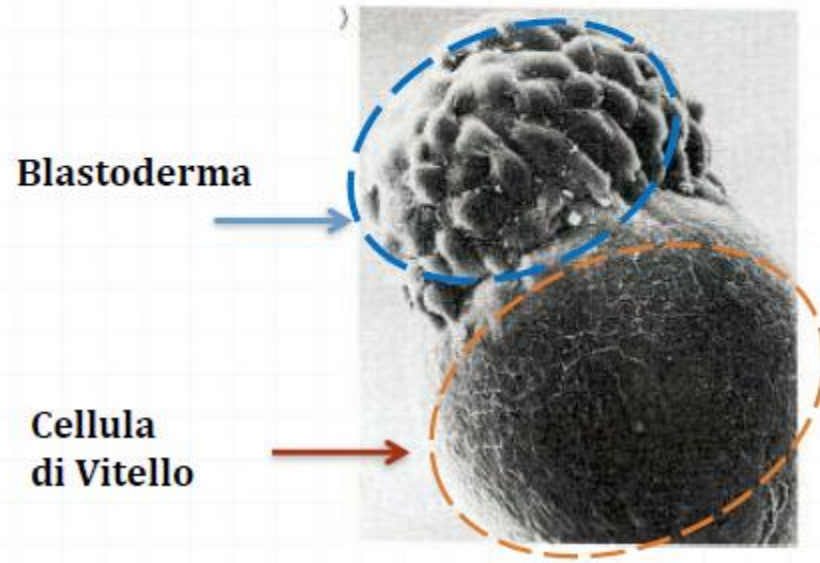
Vitello

Zigote con forma piriforme



Segmentazione in Zebrafish - Immagini al Microscopio Elettronico

Le prime 12 divisioni sono sincrone ad intervalli di 15 minuti



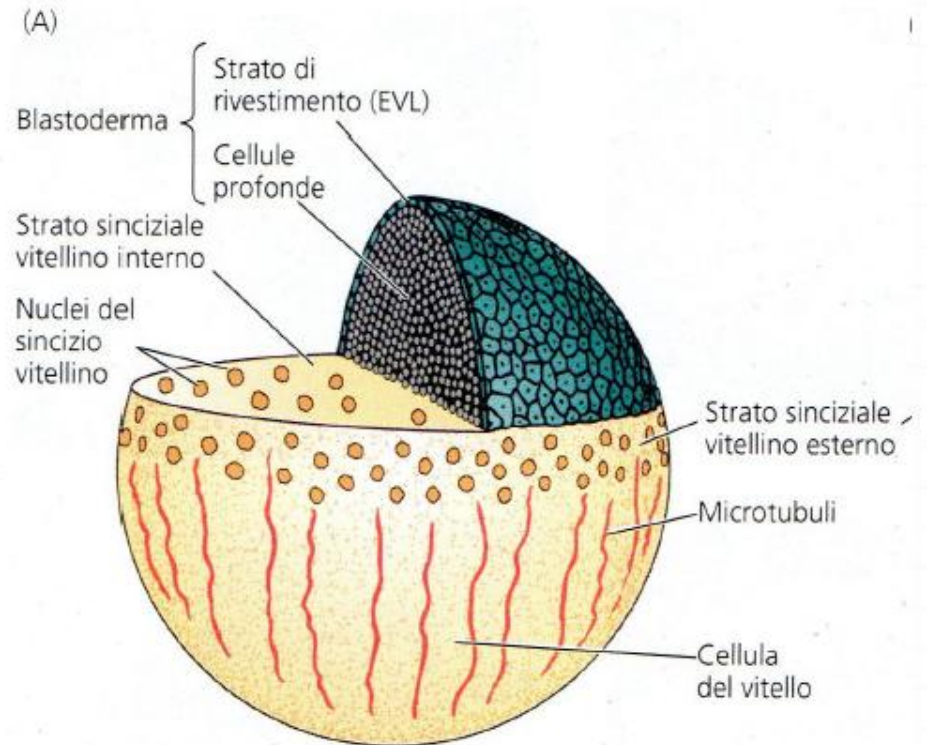
A partire dalla 10 divisione si ha MBT e le divisioni cellulari rallentano

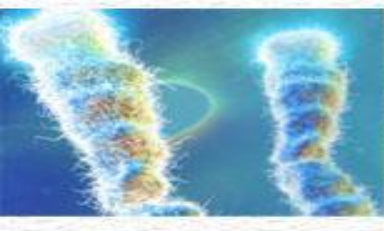
Transizione della Blastula Intermedia = MBT.

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

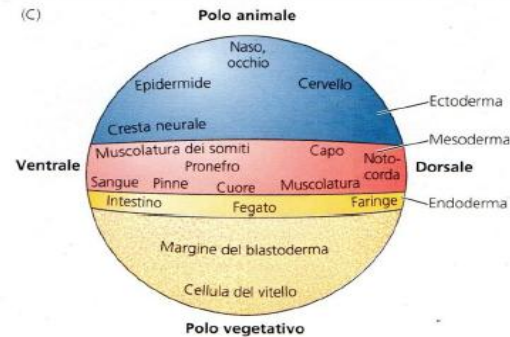
Strato di rivestimento

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

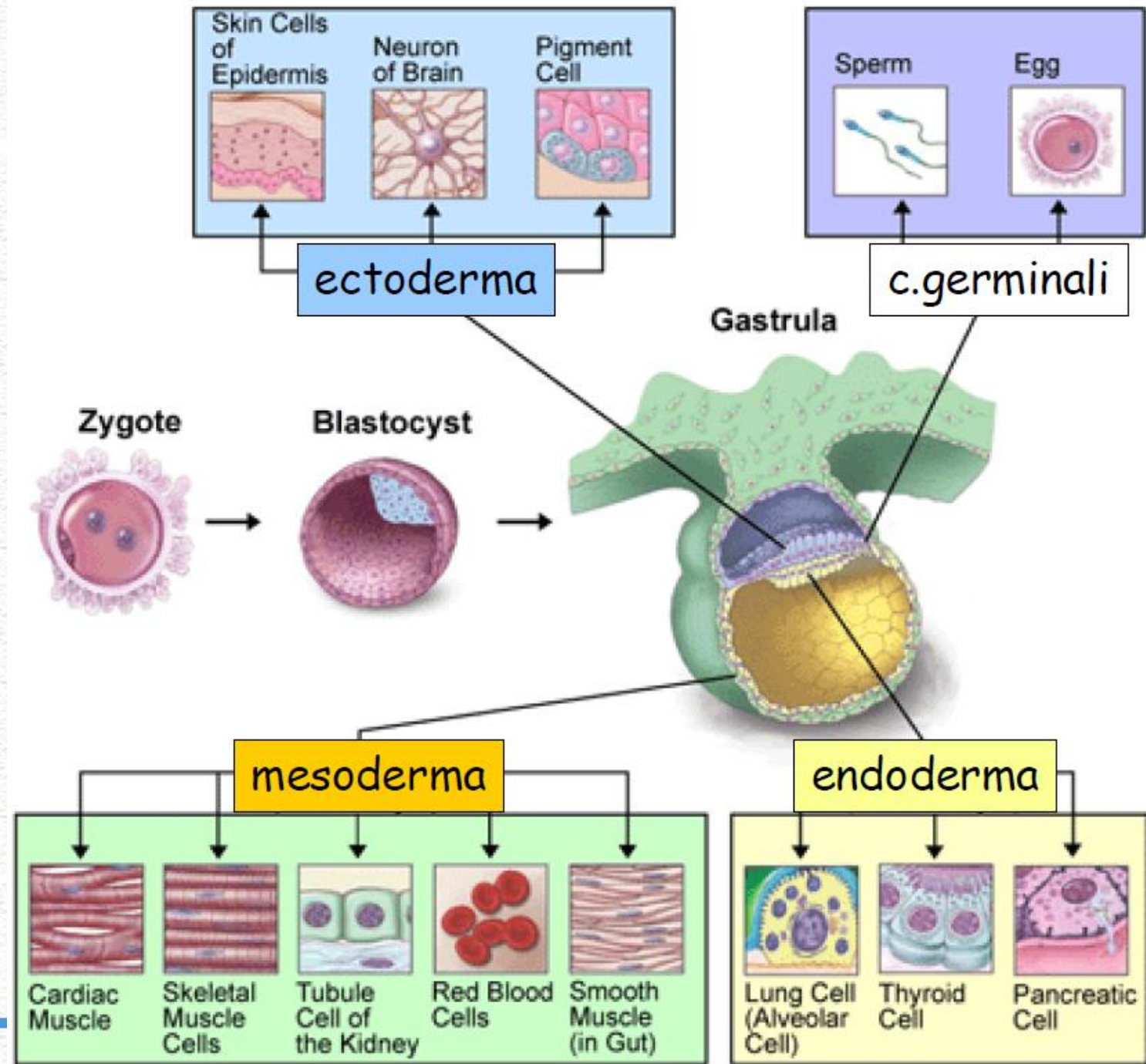


Mappa presuntiva delle cellule profonde al termine del mescolamento



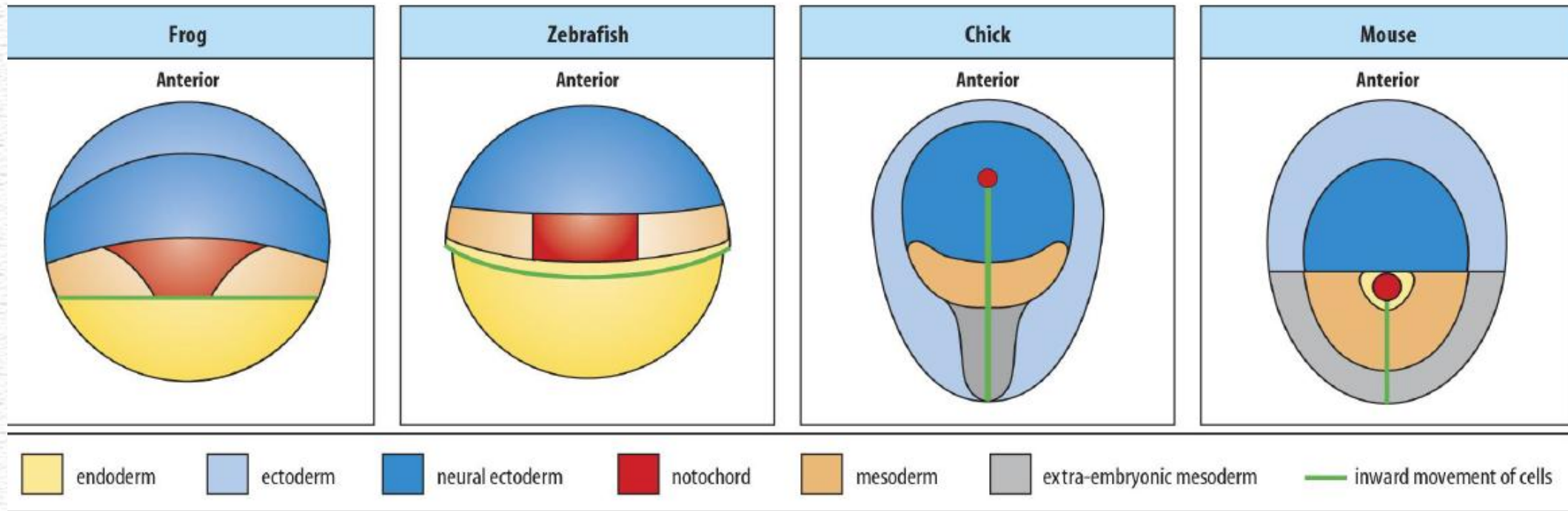
Gastrulazione:

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

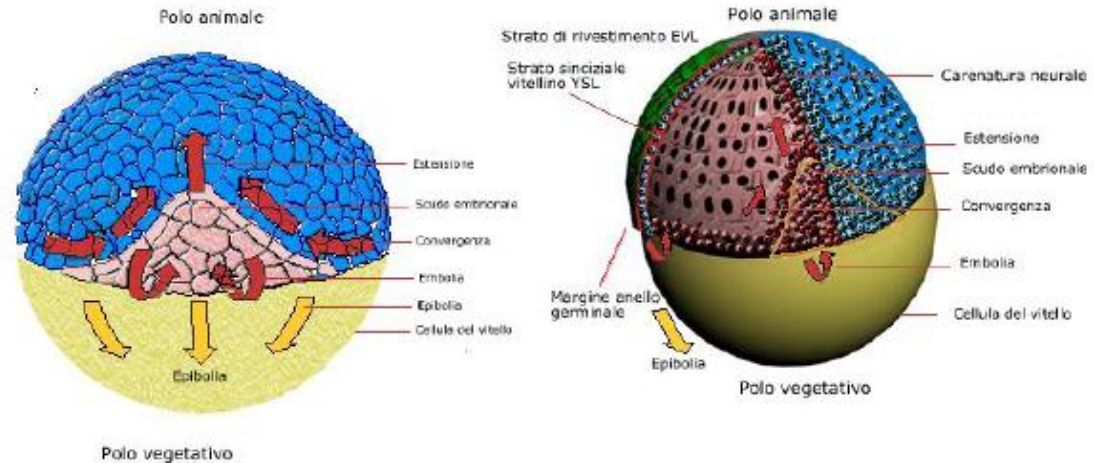
Sempre il mesoderma si suddividerà in tante piccole vesciche che daranno origine ai somiti

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

Gastrulazione in Zebrafish

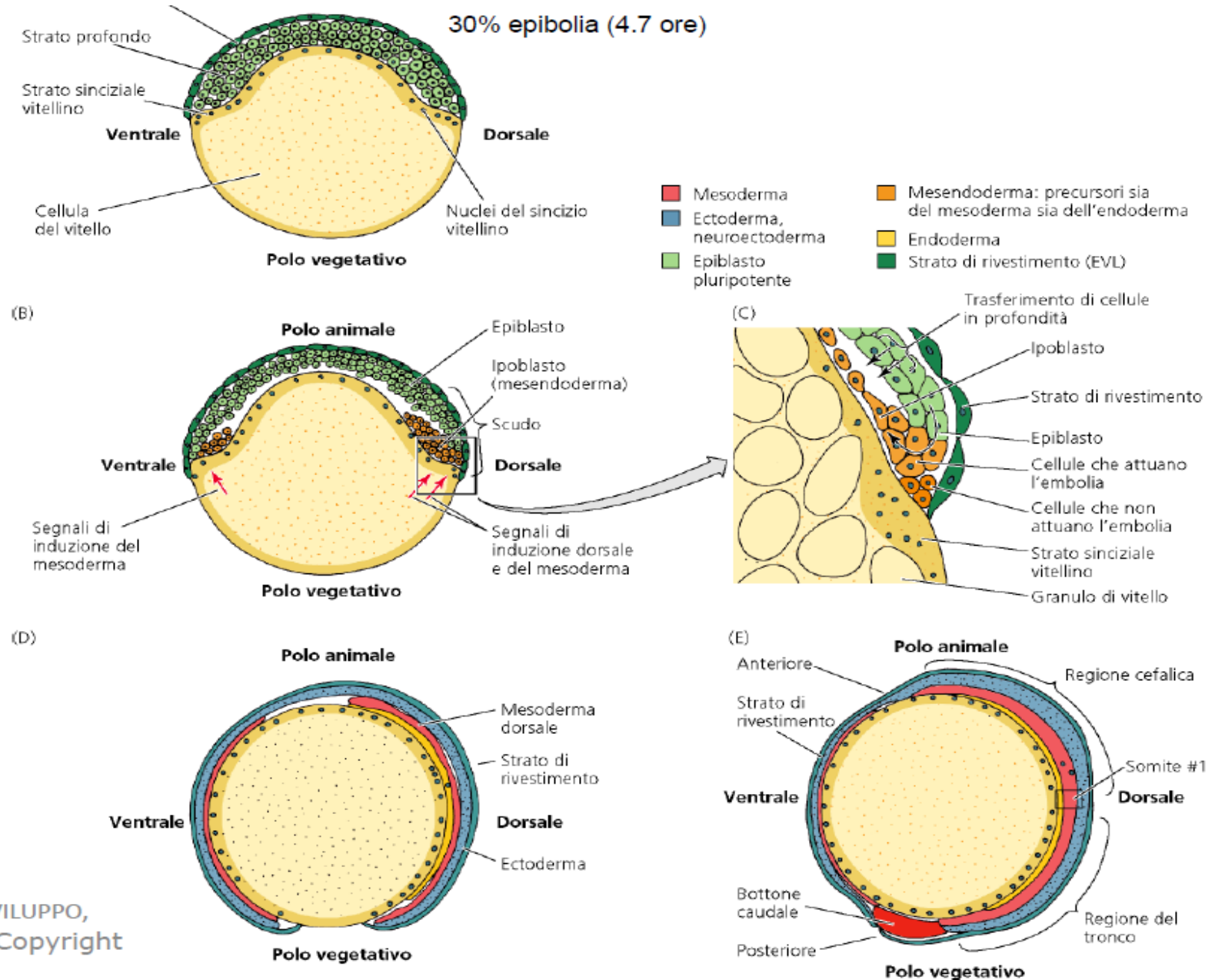
La gastrulazione dei pesci inizia con l'epibolia delle cellule del blastoderma al di sopra del vitello

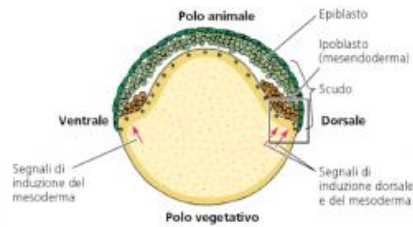
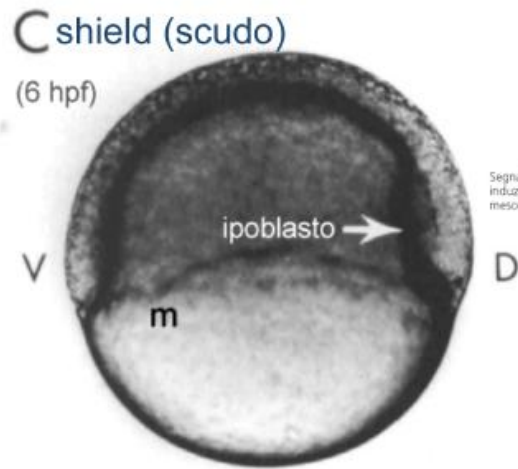
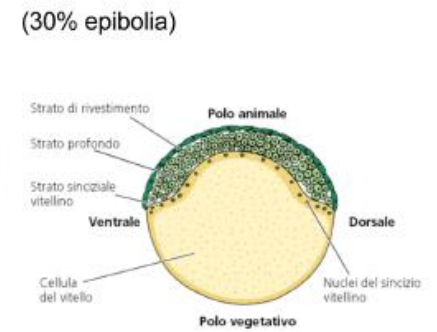
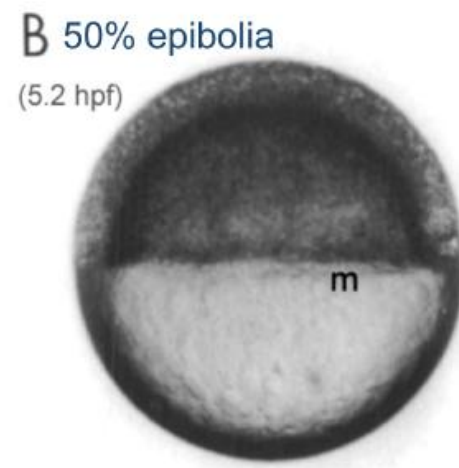
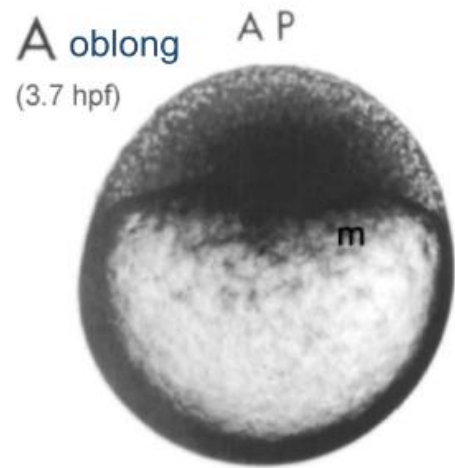
Gastrula di Zebra fish allo stadio iniziale



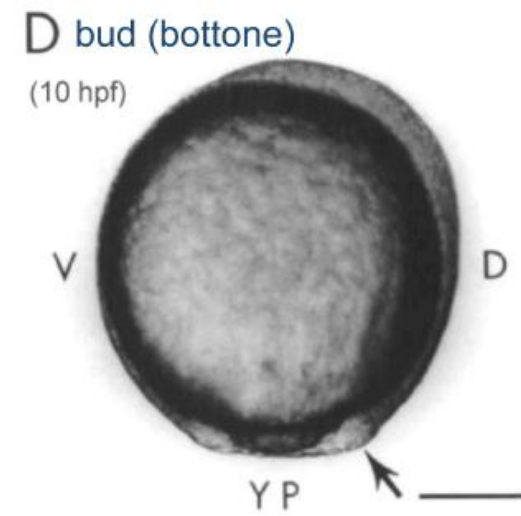
Movimenti cellulari durante la gastrulazione

- 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



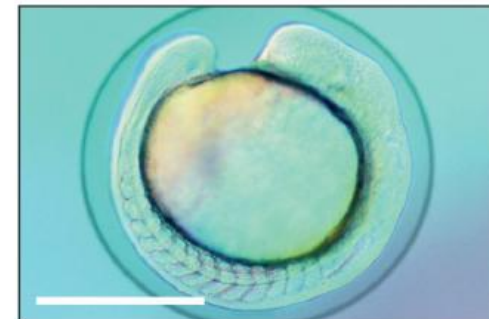
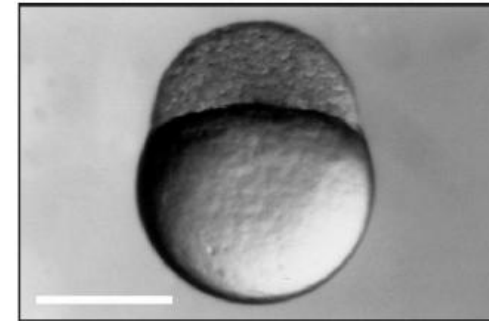
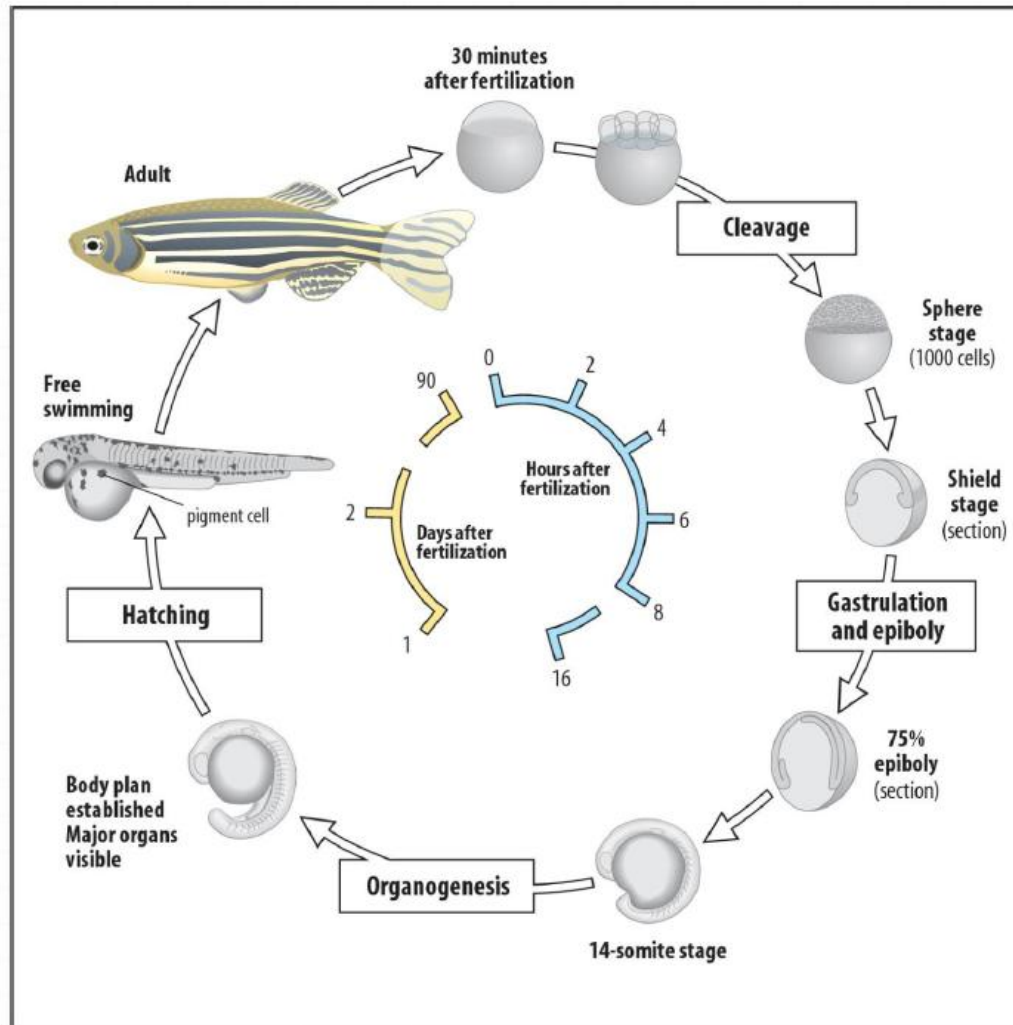


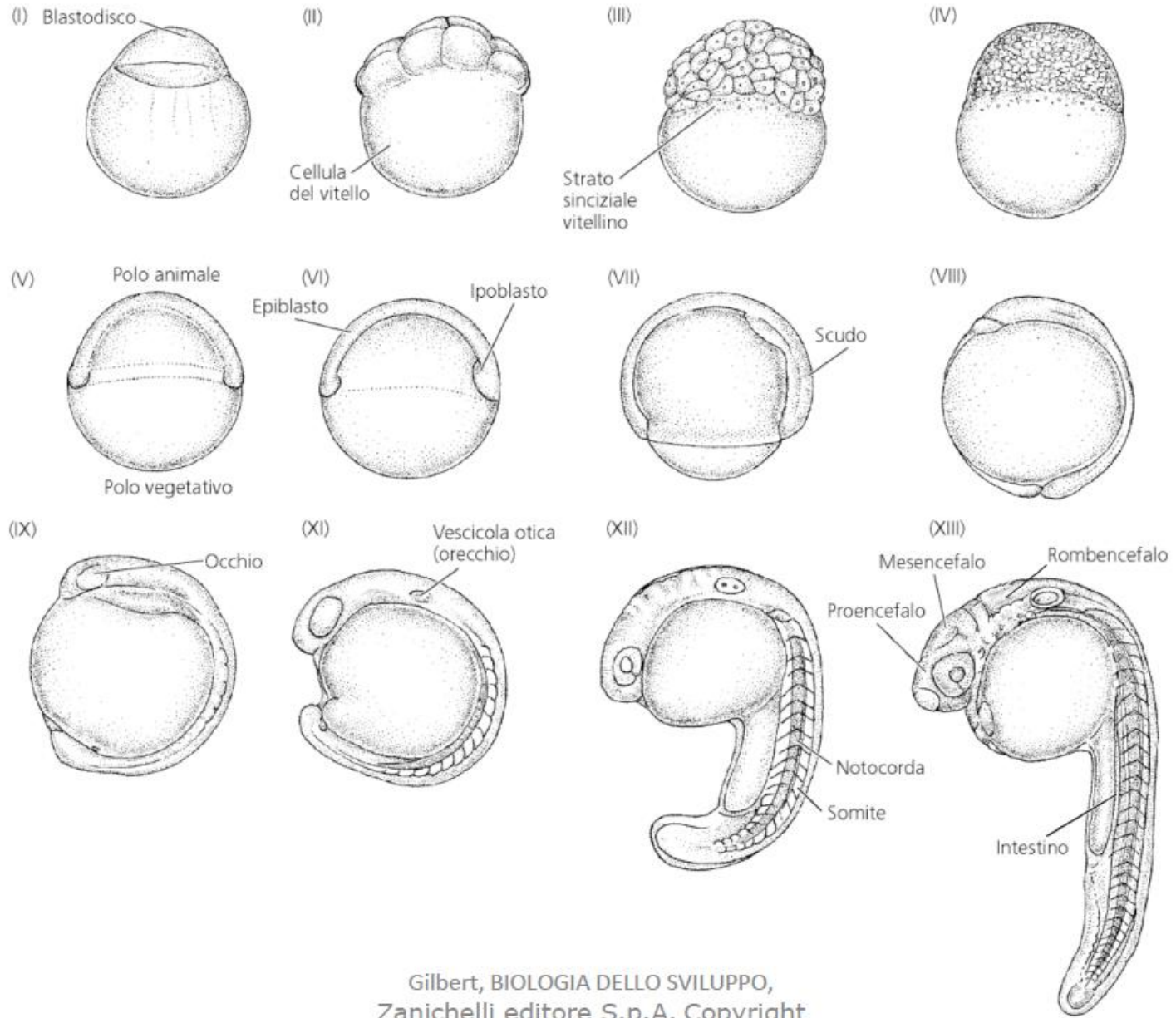
m = margine del blastoderma



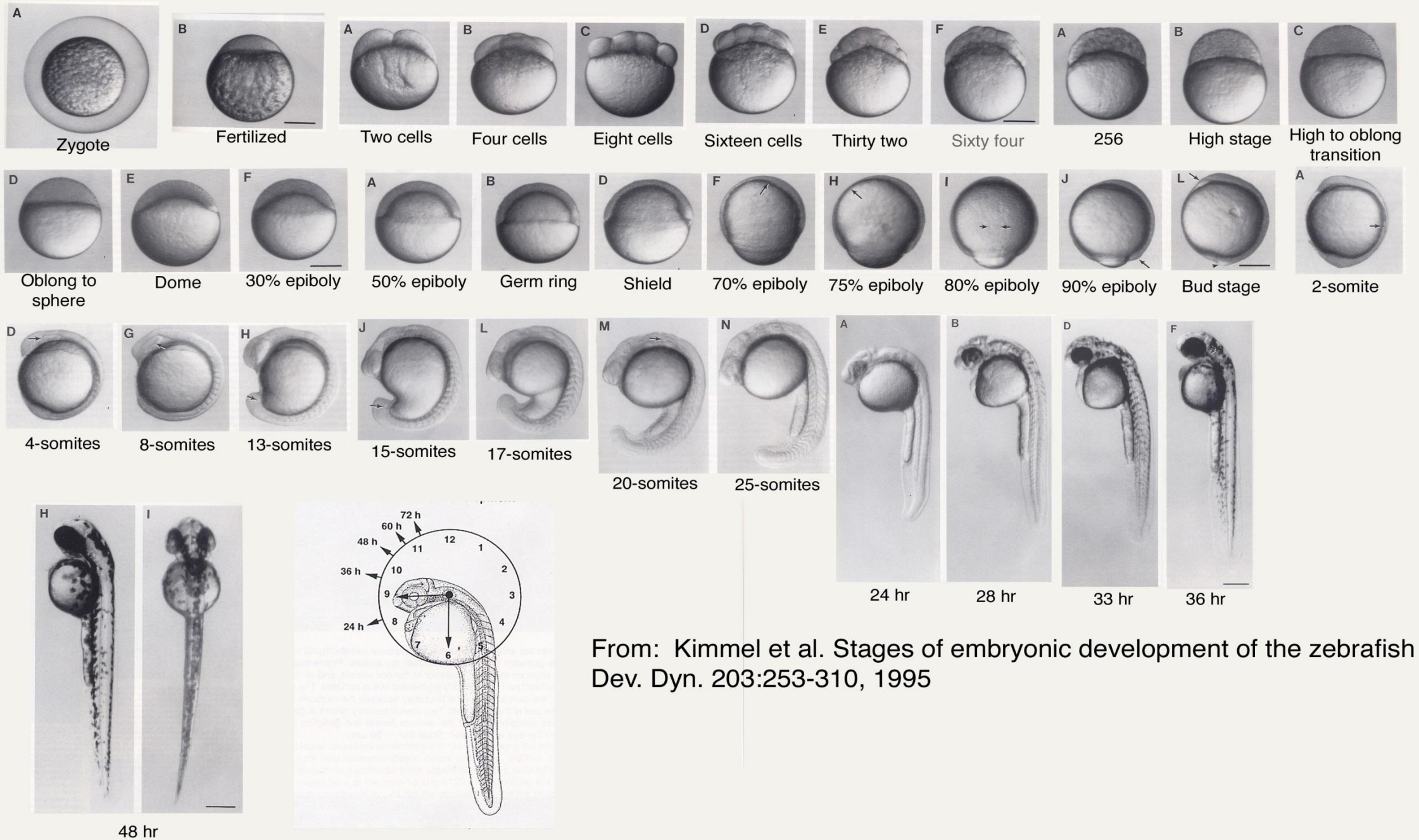
Sviluppo di Zebrafish

SCIENCE



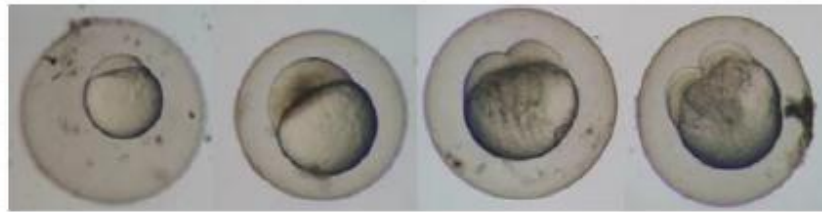


Gilbert, BIOLOGIA DELLO SVILUPPO,
Zanichelli editore S.p.A. Copyright
© 2005

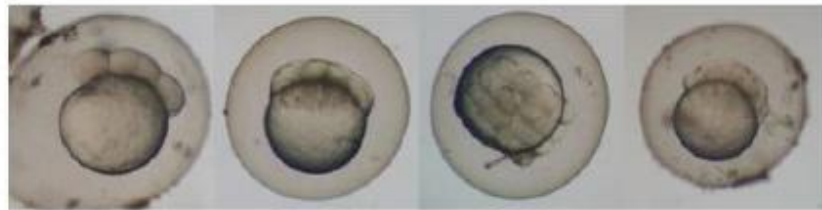


From: Kimmel et al. Stages of embryonic development of the zebrafish
 Dev. Dyn. 203:253-310, 1995

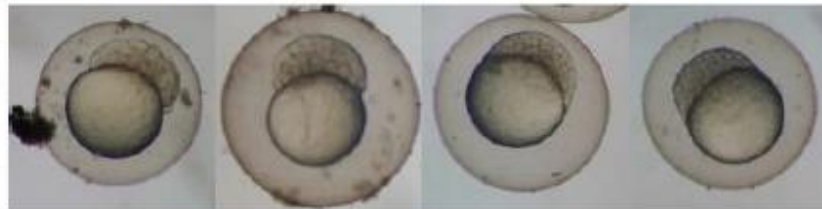
Primi Stadi di Sviluppo di Zebrafish



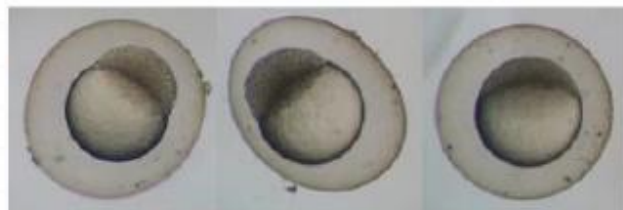
zygote 1-cell 2-cell 4-cell



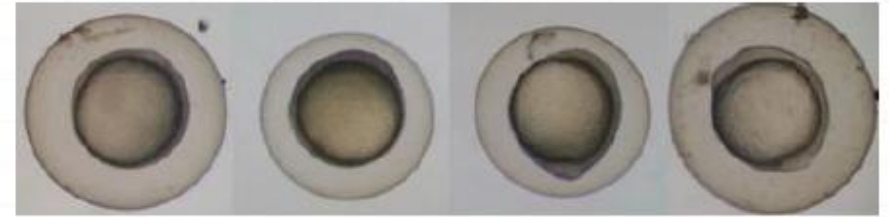
8-cell 16-cell 16-cell 32-cell



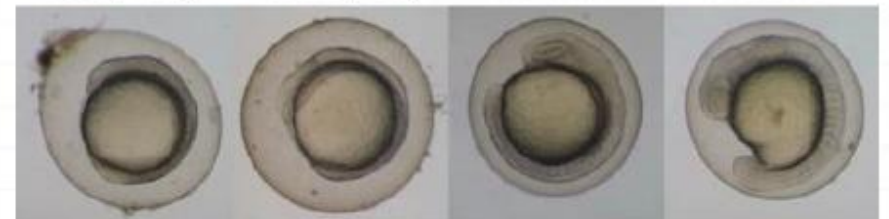
64-cell 128-cell 256-cell 512-cell



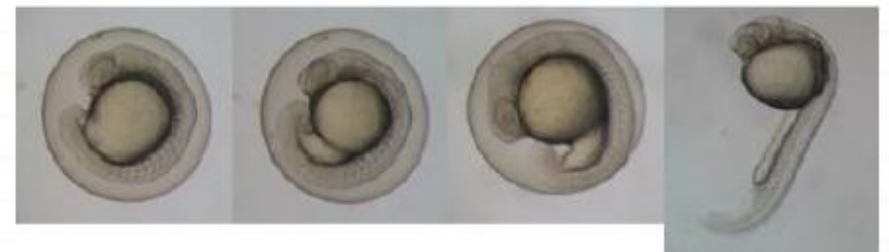
1K-cell 2K-cell oblong



80% epiboly 90% epiboly tailbud 2-somite



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



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

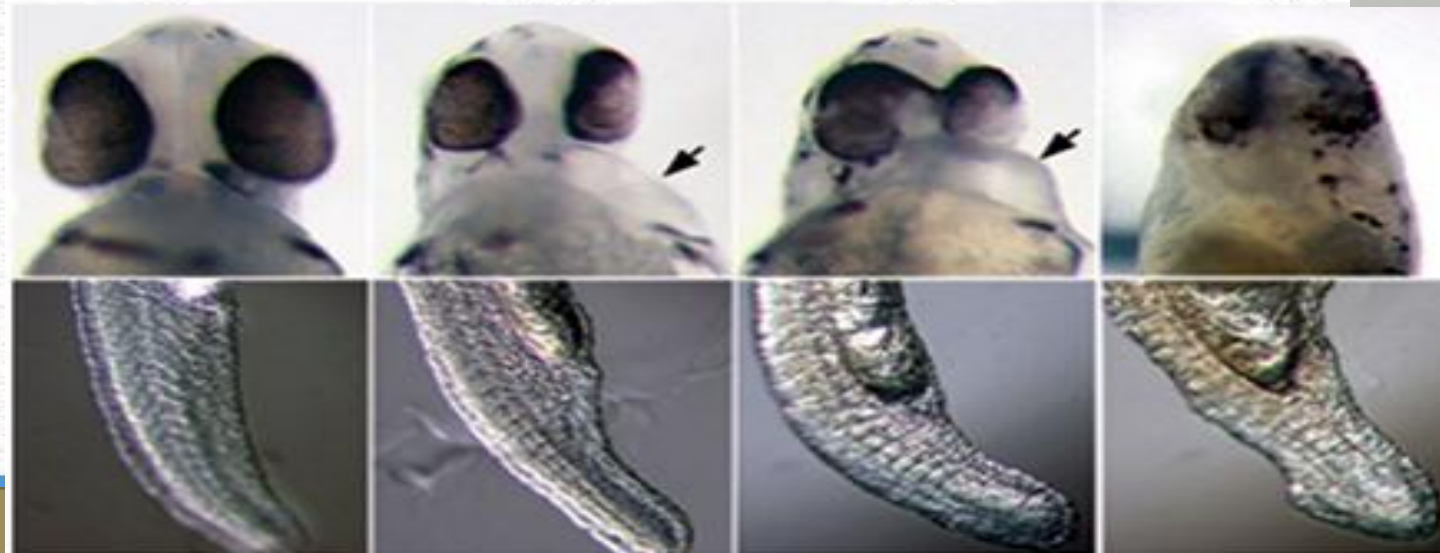
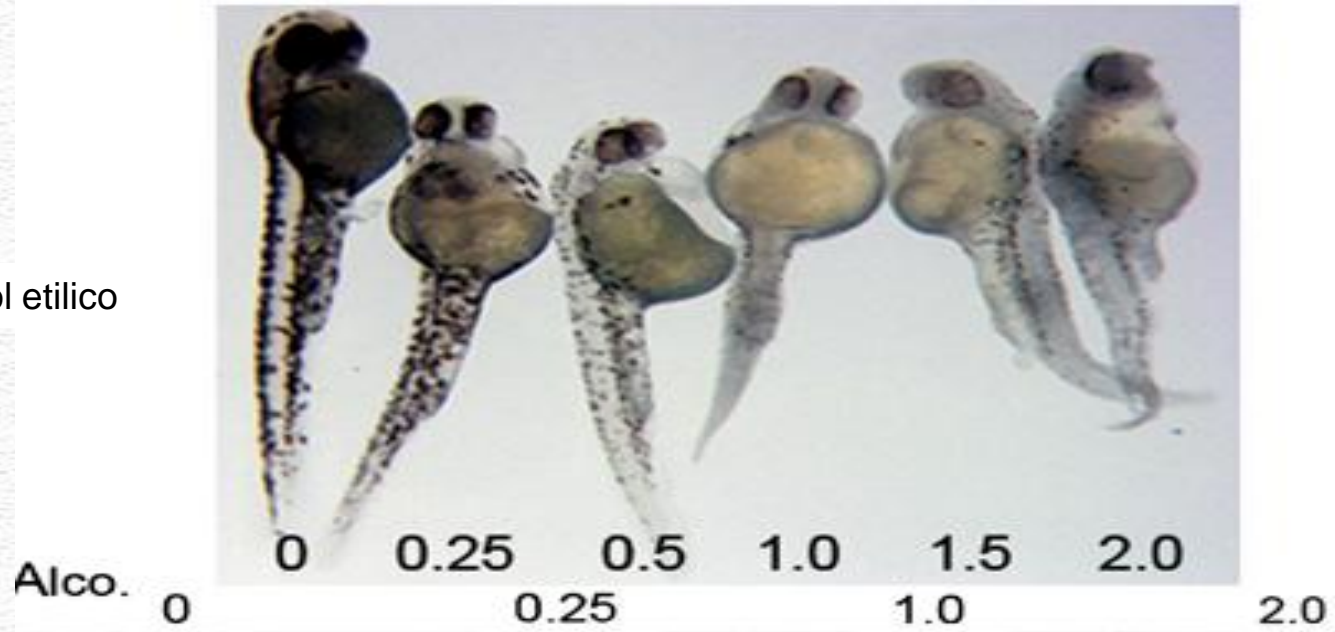


prim-11 48-hour 72-hour

L'AMBIENTE INFLUENZA LO SVILUPPO



Alcool etilico





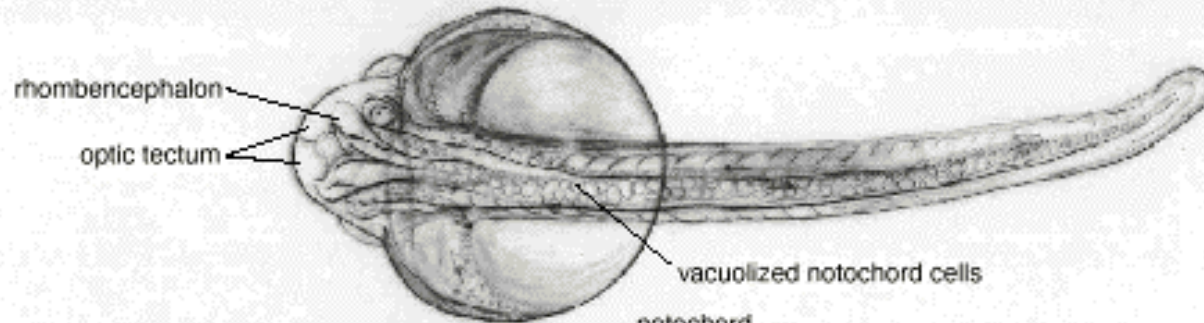
G4100027.AVI

Organi che è possibile evidenziare in embrione di zebrafish

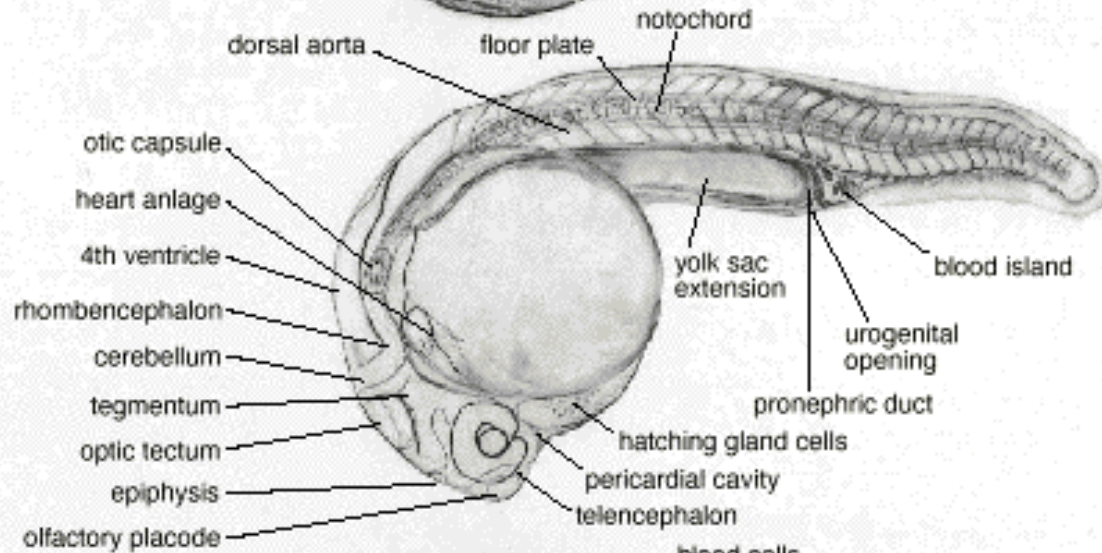
24 h EMBRYO

2A

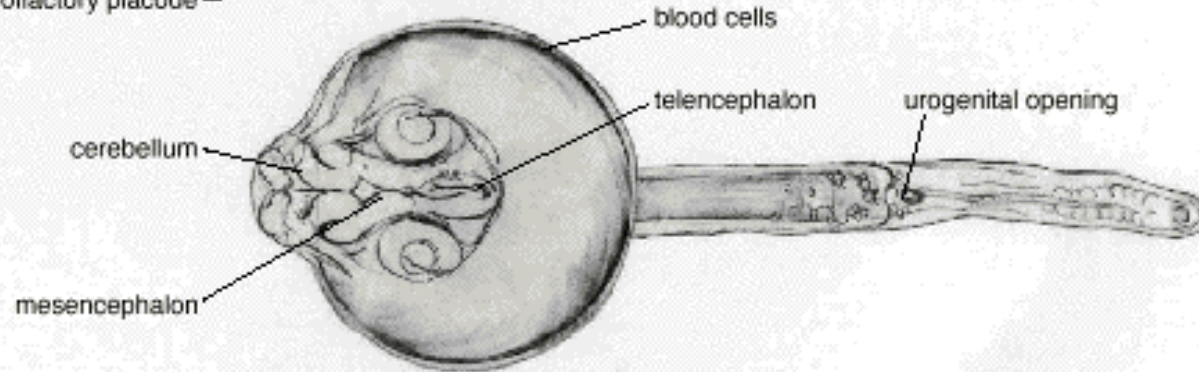
dorsal



lateral

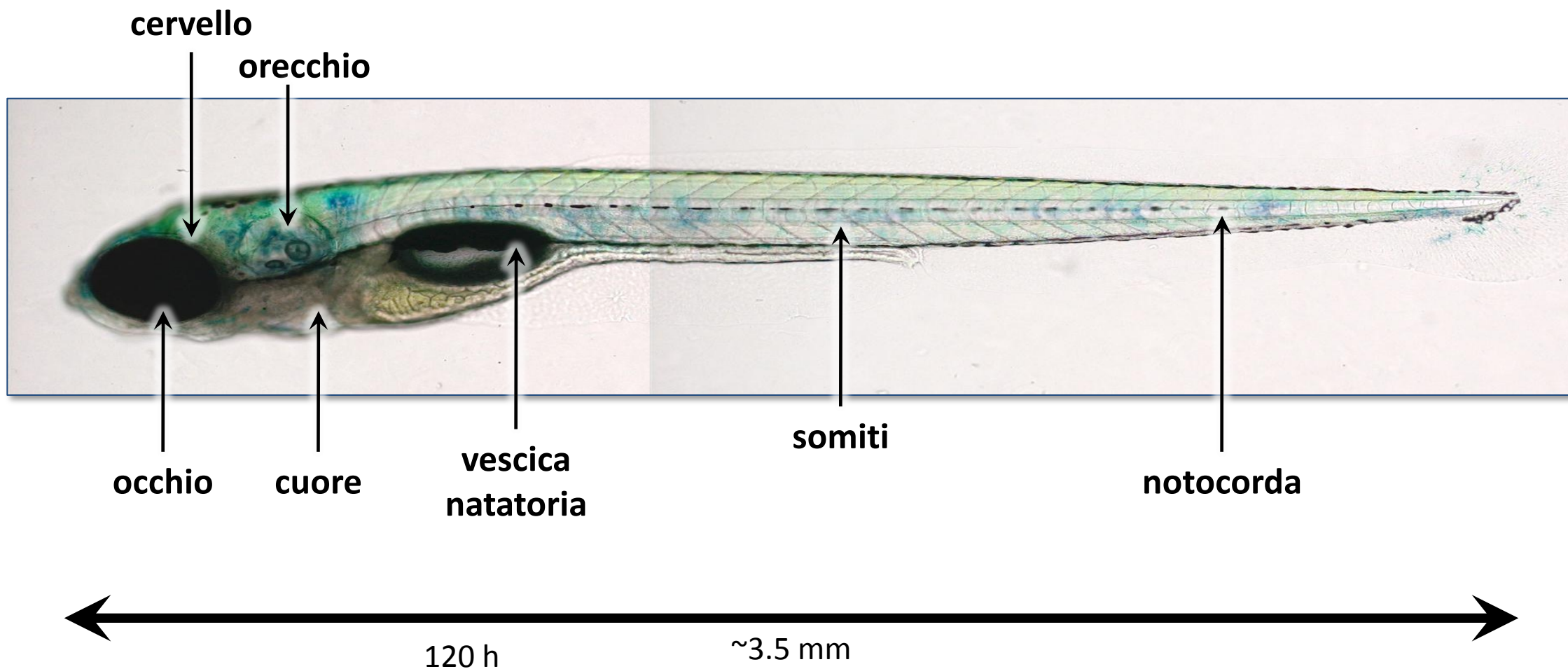


ventral





Embrione di zebrafish



Assenti : stomaco, polmoni, prostata, tessuto mammario

ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

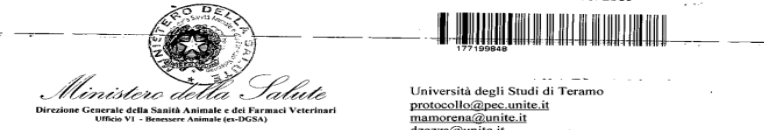


Fonte: Braunbeck *et al.* (2004)



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

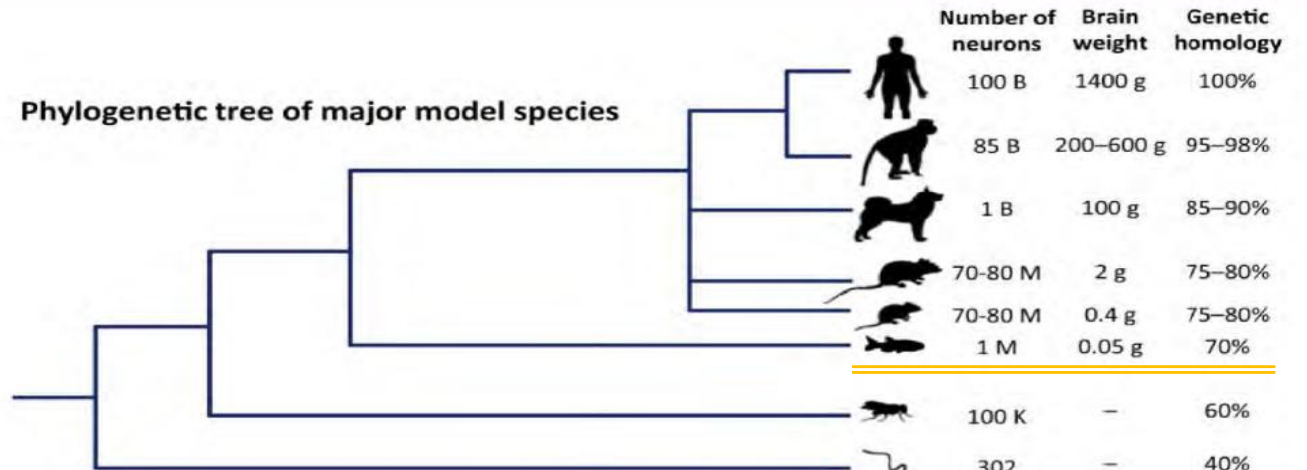
Oggetto: D.lgs 26/2014 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.
Trasmissione autorizzazione ai sensi dell'articolo 20.
Autorizzazione n. 02/2016-UT (risposta a DGSAP/ 0020361-A del 03/08/2015)

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



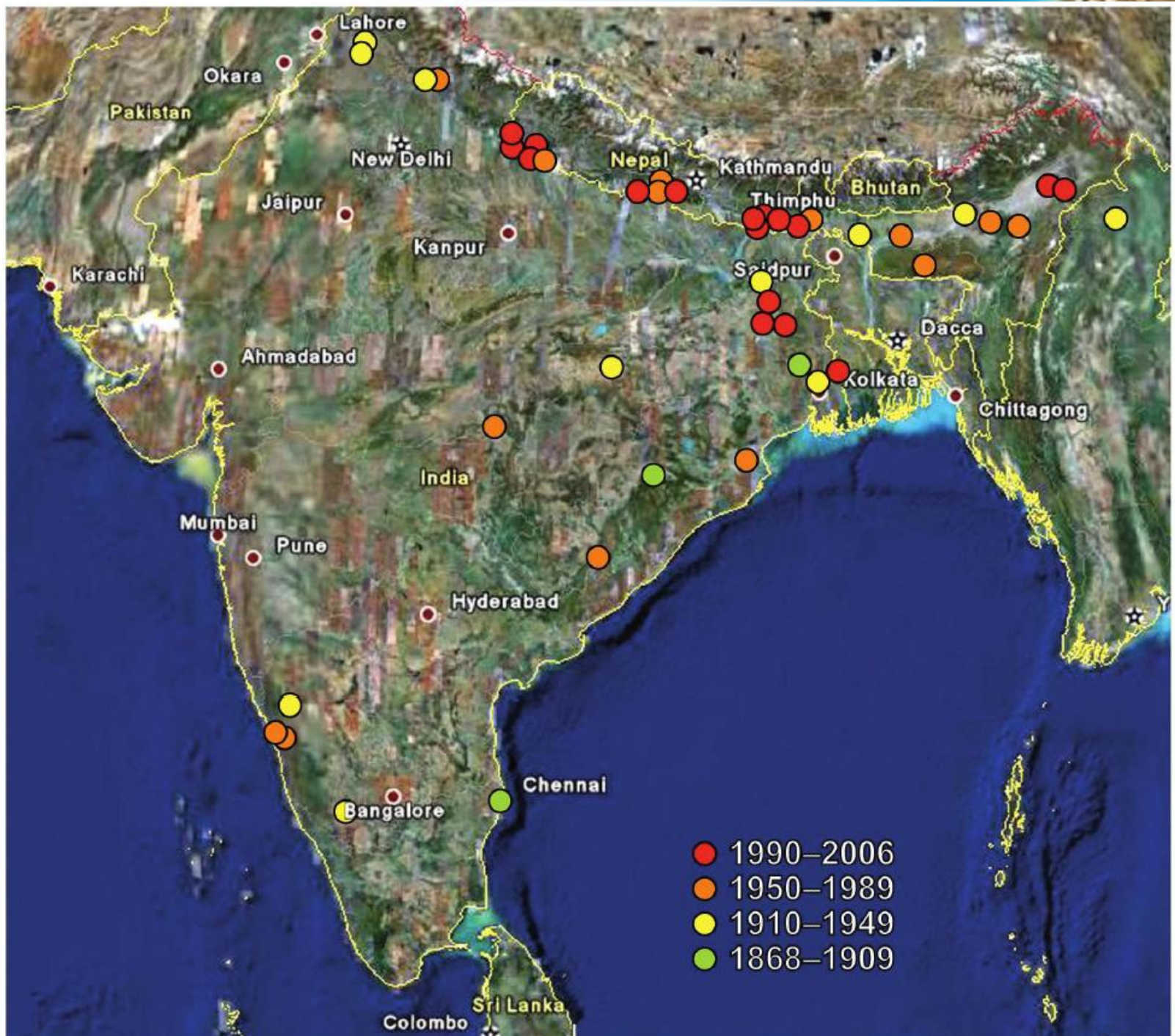
Chi è Zebrafish ?

- ***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





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.

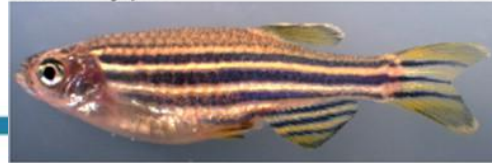


Zebrafish strain

- ❖ Wild type
- ❖ Mutant
- ❖ Transgenic



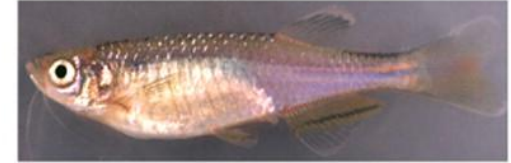
wild-type WT



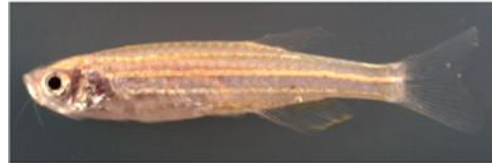
duchamp/+ DU



D. albolineatus Da



albino A



ednrb1 E



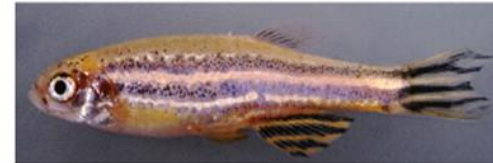
D. choprae Dc



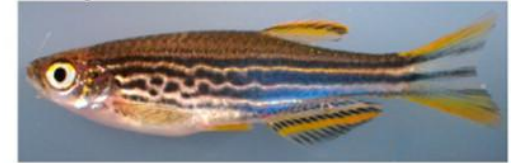
csf1r C



kit K



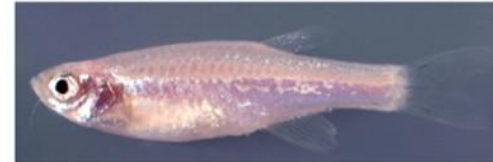
D. kyathit Dk



csf1r; ednrb CE



mitfa M



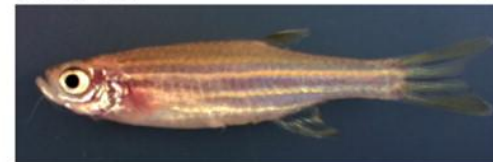
D. nigrofasciatus Dn



csf1r; kit CK



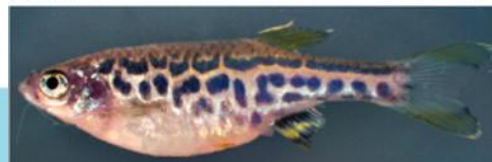
oberon O



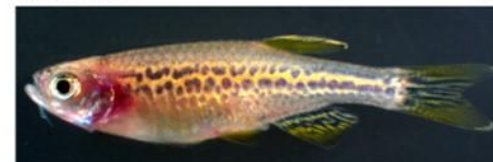
De. shanensis Ds



dali/+ DI



seurat S





Laboratory strains

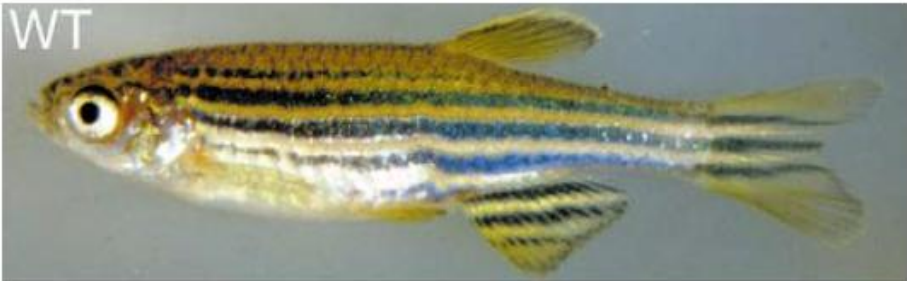


AB

(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

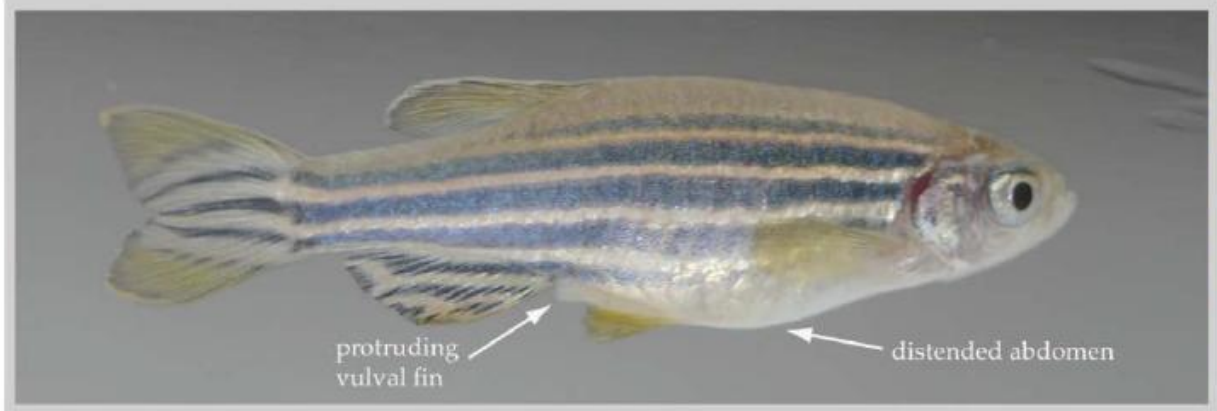
zebrafish
Zebrabärbling
poisson-zèbre
pez cebra

(in older literature also
Brachydanio rerio)



MALE

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

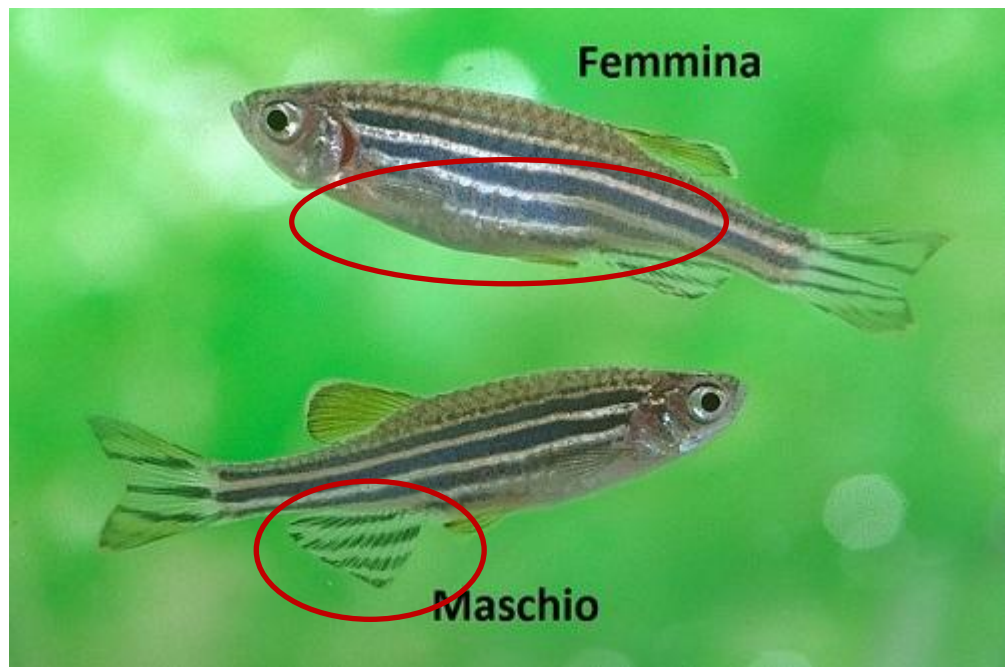


FEMALE

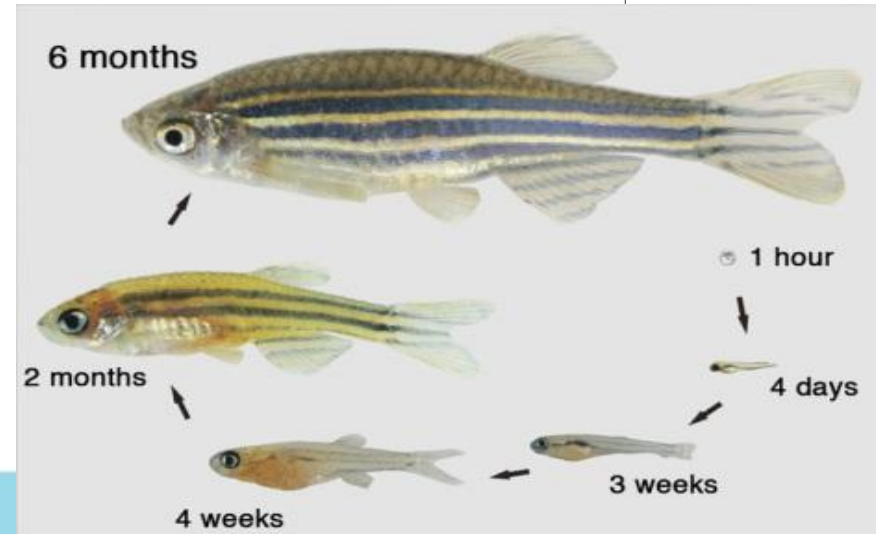
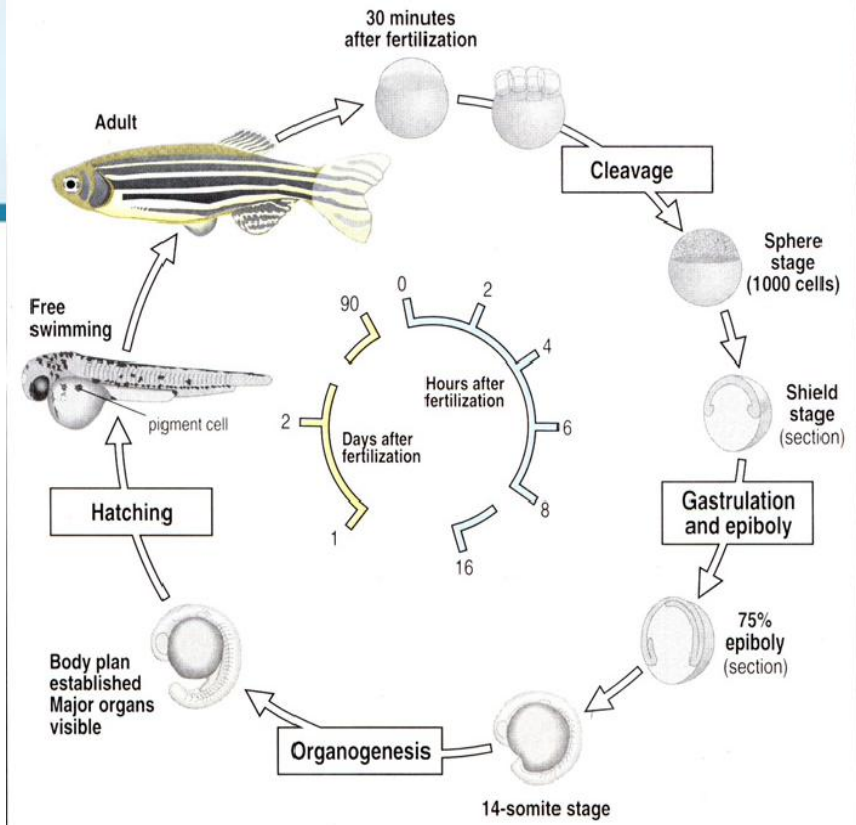
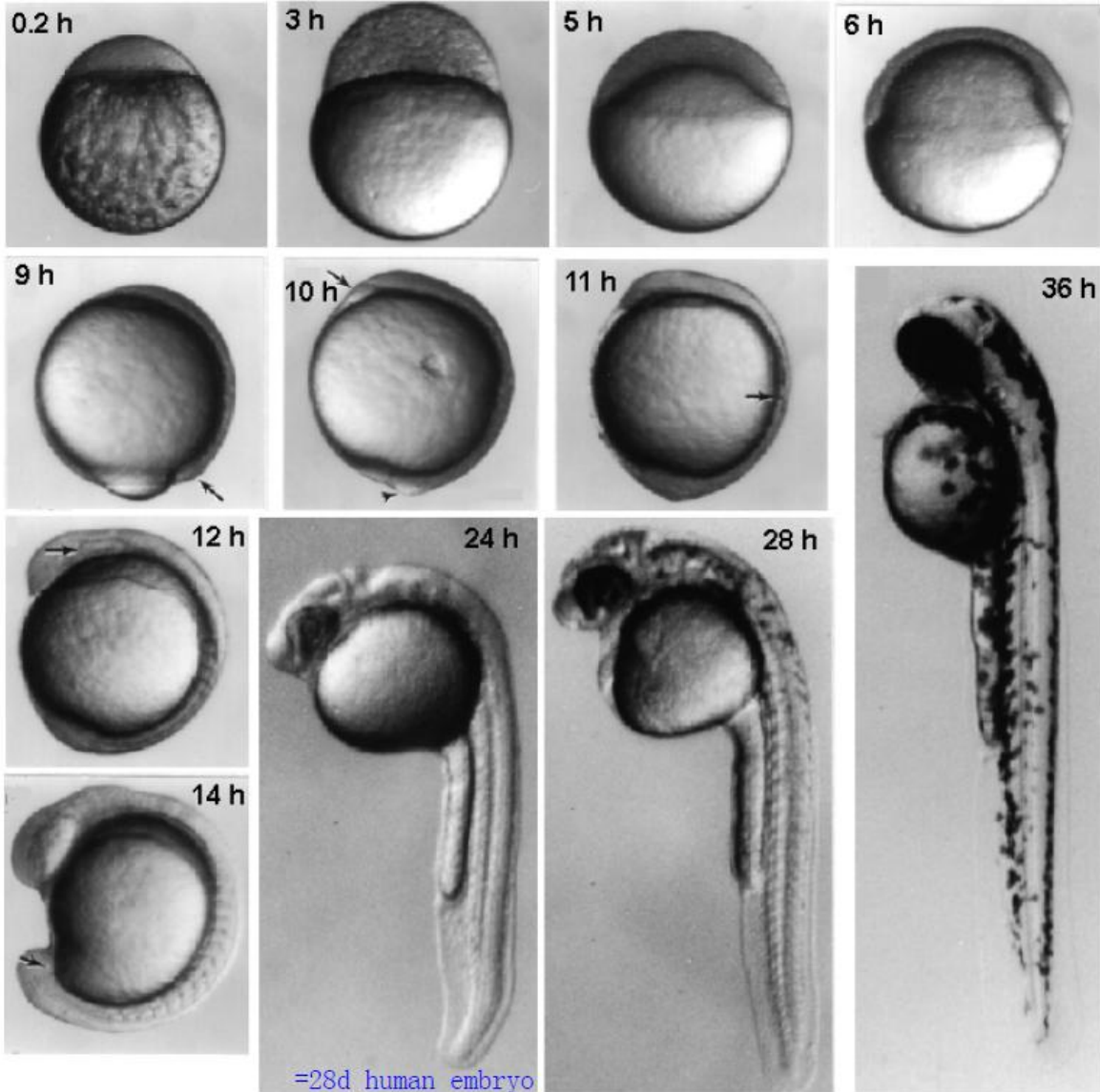
- more grey / silver in colour
- slower and fatter



Dimorfismo sessuale

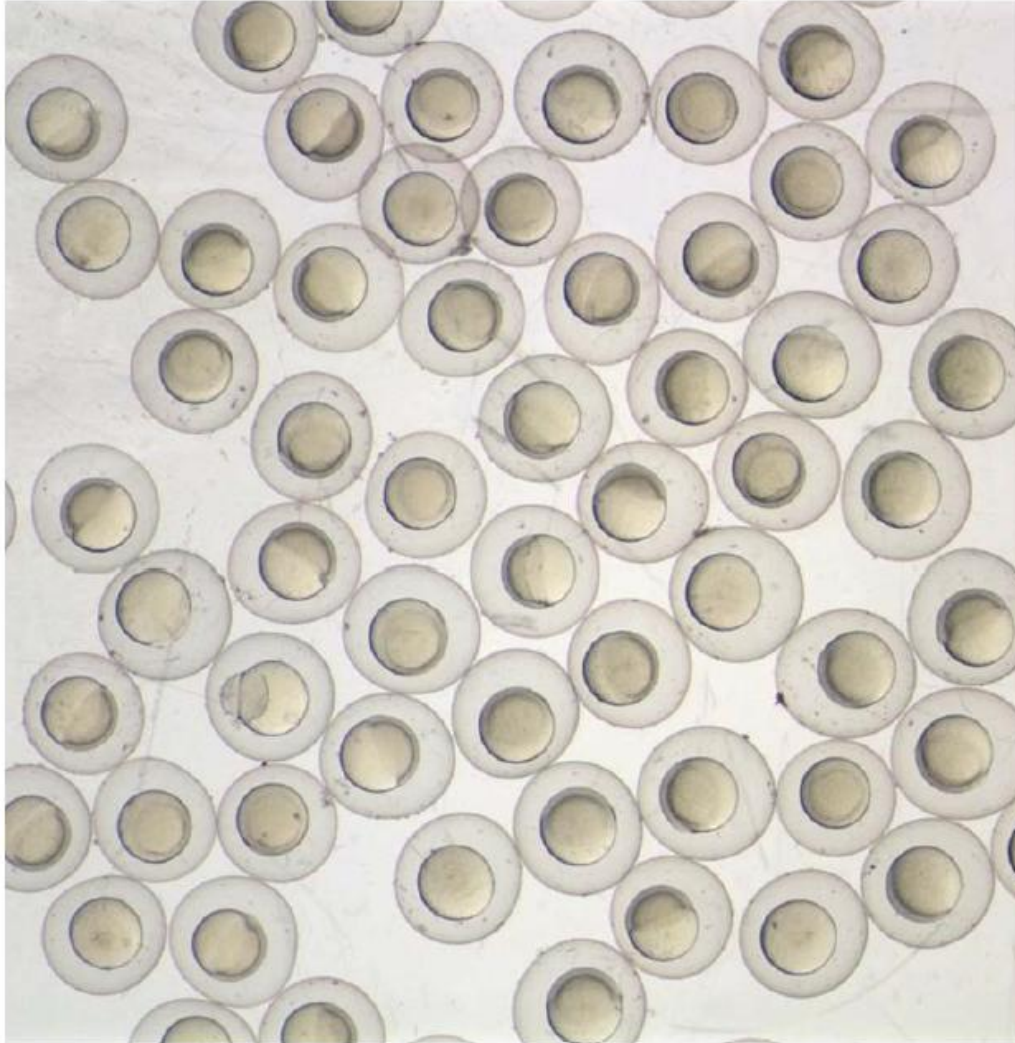


1. Rapid development





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

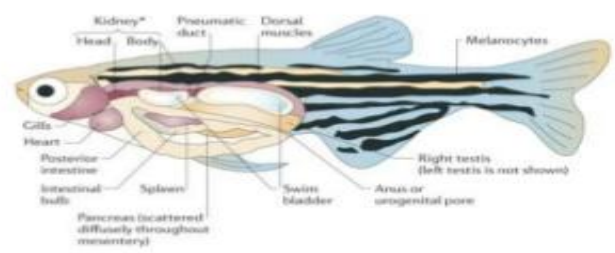


Organismo modello per studi di cancerogenesi



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

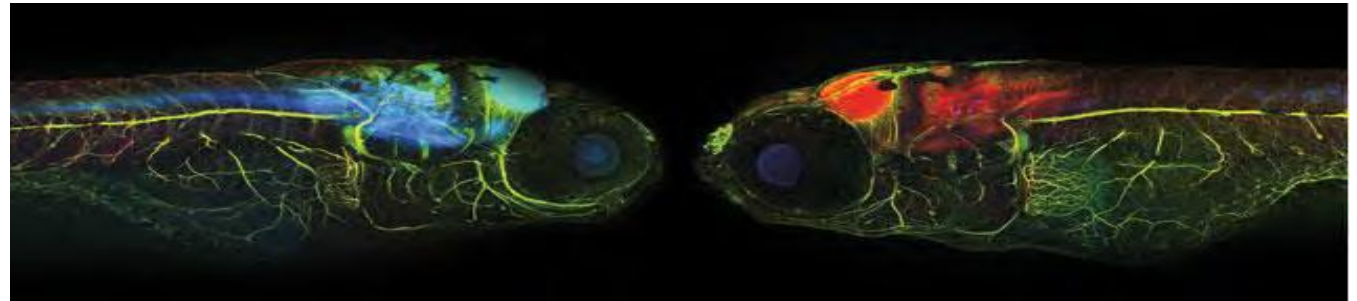


Organismo modello di malattie genetiche



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.



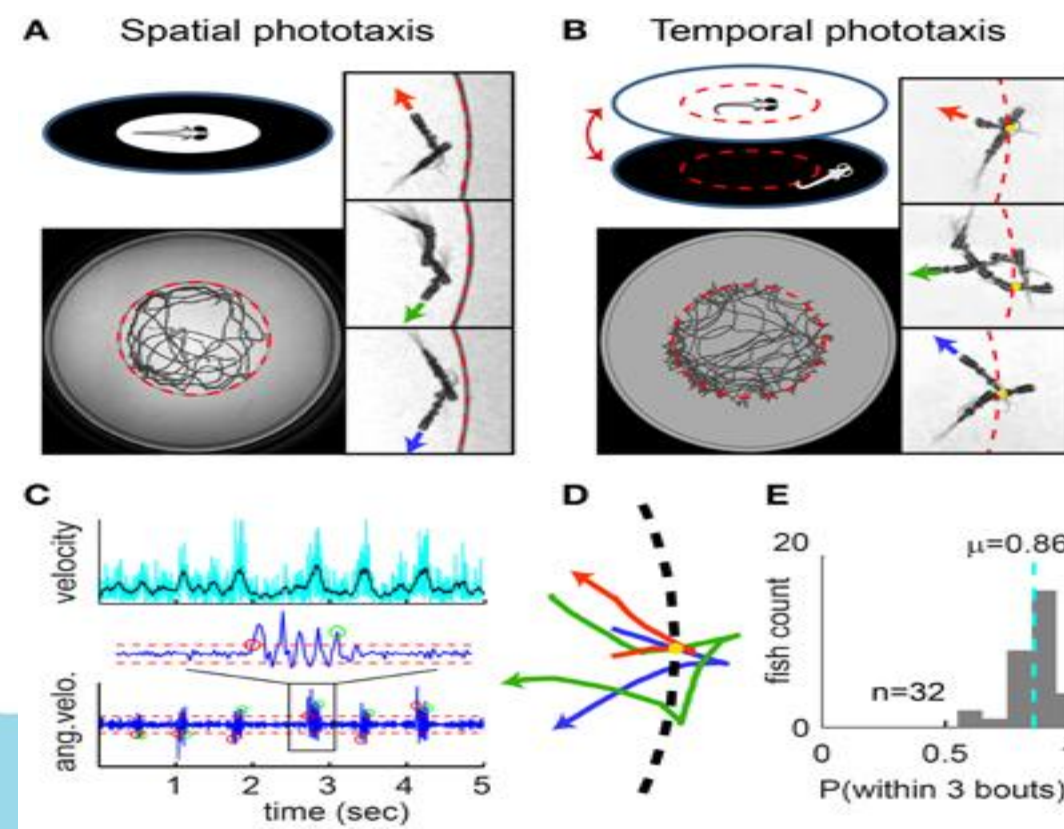
Organismo modello in neuroscienze



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)

