

## LEZIONE 18 - ZEBRAFISH

Cominciamo a parlare di questo organismo del quale la professoressa vi ha già accennato, che è lo zebrafish, che mi piace definire il "pesce scienziato". Ha delle grosse potenzialità delle quali andremo soltanto a scalfire la superficie perché nonostante sia il modello per la biologia dello sviluppo, ha talmente tante caratteristiche che lo rendono positivo in talmente tanti campi che ne parleremmo troppo a lungo.

Vediamo un video di circa 3 minuti in inglese, che si può trovare sul sito de La Roche, una multinazionale farmaceutica e non soltanto.

In questo video si spiegano quali sono le caratteristiche principali del modello zebrafish, quello che l'hanno reso quello che è adesso.

### **VIDEO:**

Drug discovery scientist are increasingly excited about a new research model called zebrafish, which have nothing to do with zebras, the direction of the stripes are different. Zebrafish are tiny inconspicuous fish that live in big numbers in sweet and brackish waters on the Indian subcontinent. Aquarius love them because they are undemanding and thrive in almost all conditions. For drug discovery zebrafish themselves are not that interesting, but their offspring are. A zebrafish pair generates about 200 eggs per week which hatch within to three days to give zebrafish larva. Technically these are not considered laboratory animals, they do not move and do not feed and they are so tiny they can fit comfortably in 96-well plates, the typical format for bioactive compound. If you wonder about the relevance of testing drug candidates on a fish larva, you are not alone. Zebrafish of any age do not look very much like humans. 70% of human coding genes have an equivalent in zebrafish, not too exciting if you consider that this number for mice is around 85% and for chimpanzees greater than 90% and they are not a perfect match either. To understand the interest of scientist you have to remember that the only models with similar scope available so far are a fruit fly or a worm, so a fish being a vertebrae is a gigantic step forward. One important aspect is that embryonal development is very similar throughout the vertebrae kingdom. Zebrafish embryos grow their organs the same way as humans, only 20 times faster. Instead of testing potential drugs for efficacy or safety on cultured cells, as is common today, zebrafish offered those cells within a working organ and that organ can interact and communicate with all other organs around it creating a multi organ culture model with a similar body plan and functional structure as a human being. The effect of a compound can be tested on a beating heart, a metabolizing liver or a secreting kidney. Moreover in the last two years many methods have been published that simplified the genetic engineering of zebrafish you can simulate human diseases by gene mutation or human genes can be put into zebrafish to see how potential medicines work on those proteins, targets of interest can be genetically tagged with fluorescent proteins to track the effects of compounds visually through the larvas transparent skin. You can generate large databases containing effects and side-effects of known drugs that can be used to

classify novel compounds with the advances in genetic imaging and data handling technology. It's not surprising that the field of zebrafish research is exploding and Roche is actively pursuing many possibilities for both efficacy and safety testing in a variety of models and setups meanwhile even Aquarius have taken an interest in the exciting implication of zebrafish engineering. Glofish is a zebrafish that has been genetically modified to express fluorescent proteins in all tissues it comes in a variety of bright colors and glows in the dark. The possibilities are endless, but we prefer to stick to drug discovery for the moment. "Doing now what patients need next".

Questo era per darvi un'infarinatura su quello che è il modello zebrafish e soprattutto se avete notato la cosa intrigante che rende lo zebrafish quello che è, è soprattutto il fatto che riguarda il periodo relativo allo sviluppo embrionale, che è molto rapido ed è trasparente. Quindi noi possiamo guardare dentro tutto quello che succede.

Voglio introdurre un concetto che per quelli che non sono del mestiere non è chiaro: che voi siate una scimmia che è in grado di scattarvi un selfie, come parrebbe essere la foto di sinistra, o che siate voi un pesce, dal punto di vista della normativa nulla cambia, nel senso che tutto quello che volete fare all'animale utilizzandolo per sperimentazione richiede un'autorizzazione ministeriale. "La legge è uguale per tutti" quindi in entrambi i casi, scimmia - pesce, la procedura e le responsabilità sono le stesse. Quindi se voi volete impostare un lavoro, una ricerca sullo zebrafish, che quello in foto, dovete comportarvi in animo come se steste lavorando con scimmie o cani. Bisogna tenere in considerazione questo aspetto, che vi porterà via del tempo per poter essere concepito e sviluppato nel modo opportuno, perché bisogna scrivere il progetto da mandare al Ministero, dovrete appunto interagire eventualmente con il Ministero per eventuali integrazioni, eccetera eccetera. Quindi per scrivere un progetto bisogna avere idee molto chiare relativamente a quanti animali usare e in che modo usarli.

Quindi detto ciò passiamo a cose più specifiche relativamente al modello biologico, poi svilupperemo il concetto dello sviluppo embrionale in quanto legato alla normativa che regola l'utilizzo di animali per la sperimentazione perché gli organismi che si sviluppano esternamente al corpo della madre, come in questo caso, ma che non sono in grado di nutrirsi in autonomia, come per esempio possono essere i primi stadi di sviluppo dello zebrafish, in quanto non ha ancora un apparato digerente sviluppato, non ha ancora una bocca che riesce ad aprire e quindi fisiologicamente non è ancora pronto, e il nutrimento viene fornito dal materiale di riserva che ha lasciato la mamma nell'uovo. Ok finché siamo in questo range temporale in cui il pesce non riesce a nutrirsi da solo, non è considerato un animale.

Quindi in quest'arco di tempo, 5 giorni nel caso dello zebrafish, non è un animale, ergo potete fare della sperimentazione senza necessità di autorizzazione ministeriale.

Vediamo il nostro modello: lo zebrafish.

Lo zebrafish ha un'origine piuttosto particolare perché arriva dal sud-est asiatico.

Ci sono anche gli studi che vengono fatti direttamente sui pesci che vengono presi in natura, ma la percentuale di questi è mostruosamente più bassa rispetto alla

percentuale di pesci che appunto sono allevati da generazioni in laboratorio.

L'ambiente naturale dello zebrafish è costituito da acque abbastanza tranquille con rocce e foggiamie sul fondo. Vi faccio vedere questo video non soltanto perché è carino, ma perché un aspetto fondamentale per tenere gli animali in stabulario è quello di dare loro un ambiente il più possibile prossimo a quello naturale, ma non necessariamente, quantomeno dare all'animale quello che si chiama arricchimento ambientale, per esempio nelle vasche dove c'è lo *Xenopus* (rana) vengono messi dei tubi dove la rana entra dentro e si diverte, i topi vengono messi insieme a materiale per il nido, vengono messi dei giocini, ratti lo stesso.

Per lo zebrafish non si è mai messo nulla, fino a che per le pressanti richieste da parte degli organi competenti si è cominciato a riempire le vaschette con del ciottolato per poter riprodurre l'ambiente naturale.

La situazione naturale, che vediamo qua, la dobbiamo replicare in laboratorio. Vedi l'immagine dell'armadio con una serie di vaschette trasparenti, a circolo chiuso nel senso che l'acqua è sempre la stessa, viene trattata con gli UV per evitare appunto che si possano formare dei microrganismi dannosi, ogni tanto viene cambiata l'acqua con una certa percentuale, quindi non influisce in modo particolare, ma vedete a quali condizioni controllate dobbiamo tenere lo zebrafish, la maggior parte delle quali le controlla l'armadio, alcune, come la luce-buio, le controlliamo noi o il timer della stanza nella quale sono alloggiati questi animali.

Comunque quello che mi interessa far vedere fundamentalmente qua è che la temperatura dell'acqua è a 28°, nel sud-est asiatico questa è la temperatura che trovate in quel boschetto nel fiumiciattolo che abbiamo visto prima.

Quindi queste condizioni ottimali fanno parte di quel pacchetto di condizioni ideali nelle quali voi volete tenere i vostri zebrafish per poter rendere la loro vita la più appagante possibile, in modo tale che facciano quello che sono lì apposta per fare cioè produrre embrioni.

Quindi tutte queste condizioni tutti questi parametri vengono controllati per garantire il massimo del benessere all'animale, che quando sta benissimo produce embrioni a vagonate: ogni femmina può deporre anche centinaia di uova per ogni accoppiamento.

Aspetto fondamentale dello zebrafish è il suo ciclo vitale, che non è particolarmente impressionante per quanto riguarda il raggiungimento dello stadio adulto, cioè della maturità sessuale. Lo zebrafish riproduce intorno ai 90 giorni di vita, non sono nulla di eccezionale rispetto anche ad altri modelli di vertebrati superiori, vediamo il topo che si riproduce anche prima, ma quello che è eclatante e che dovete tenere assolutamente sotto controllo è la prima parte di questo orologio: si può dare un occhio per la trasparenza, ma la cosa importante è che a 24 ore avete un micro pesciolino che ovviamente ha ancora le caratteristiche larvali, tipo il materiale di riserva che vedete sotto forma di quella grossa palla, che è appoggiata sul petto del pesciolino, ma a parte queste caratteristiche avete già gli assi del dell'organismo ben definiti, anteriore, posteriore, destro o sinistro e gli organi principali presenti che poi si svilupperanno durante le fasi successive.

immaginate di voler studiare l'effetto di una particolare sostanza, piuttosto che della

inattivazione / sovra espressione di un gene sullo sviluppo dell'orecchio, questa cosa è possibile farla subito dopo la fecondazione e a 24 ore di distanza potete andare a vedere se il pesciolino ha o meno un problema all'orecchio.

Lo zebrafish è un vertebrato quindi che noi se ne dica siamo parenti anche piuttosto stretti, poi vi do qualche numero, ma non siamo molto distanti, quindi è facile, è molto plausibile, riuscire a traslare il risultato ottenuto in zebrafish a organismi superiori, ci sono delle delle situazioni verificate che quello che viene indotto dal trattamento o dalla misregolazione genica nello zebrafish, viene replicato nell'uomo. Qualche caratteristica del nostro pesca l'abbiamo già detta, ma ve le elenco in modo tale da essere magari più chiara:

- abbiamo centinaia di embrioni per accoppiamento per ogni singola femmina
- la femmina ogni 7-10 giorni può accoppiarsi di nuovo, teoricamente potete farli accoppiare tutti i giorni perché lo zebrafish non è stagionale, o meglio nel sud-est asiatico preferisce accoppiarsi durante la stagione dei monsoni, in laboratorio si accoppia 365 giorni all'anno
- lo sviluppo embrionale è molto rapido
- sono trasparenti e vi faccio vedere
- sono manipolabili, nel senso che già il fatto di essere trasparenti potrei metterle l'embrione nel microscopio e vedere cosa succede all'embrione.

Le uova sono relativamente piccole, non come quelle degli anfibi che venivano utilizzate come modello d'elezione nei primi anni del '900 quando si facevano esperimenti di embriologia sperimentale con strumenti relativamente grezzi, ad oggi ovviamente gli strumenti sono migliorati, non sono difficili da reperire e neanche particolarmente costosi.

Nello zebrafish possiamo andare a fare veramente tantissime cose, anche solo mettendo una sostanza nell'acqua in cui crescono: possiamo anche andare a fare della misregolazione genica, possiamo in modo veloce e transiente up-regolare l'espressione di un gene microiniettando un messaggero sintetico, piuttosto che down-regolare l'espressione iniettando degli oligomeri antisenso che vanno a targhettare in modo specifico il messaggero di interesse impedendone la traduzione. Quindi queste cose le possiamo fare in laboratorio su base giornaliera.

- Un'altra cosa molto forte di questo sistema è che ci sono disponibili migliaia di mutanti che sono disponibili senza nessun tipo di problema per la comunità scientifica, questo perché lo zebrafish è stato utilizzato come una sorta di drosophila dei vertebrati, cioè è stato sottoposto negli anni a screening di mutagenesi random nei quali sono stati prodotti tantissimi mutanti alterati nelle loro fasi di sviluppo e da questi mutanti si è cercato, con l'avanzare della tecnologia, di capire quali fossero i geni che erano stati mutati.

Quindi è un grosso vantaggio perché potete chiedere a un gruppo, piuttosto che un altro, mi dai quel mutante, piuttosto che un altro.

- Qualcosa particolarmente intrigante è il fatto che abbiamo a disposizione l'intero genoma del DNA, quindi non sta me spiegarvi perché questa cosa è importante, lo zebrafish è stato inserito nel Progetto Genoma già ho tanti anni

fa, ha visto il suo genoma sequenziato e rielaborato tante volte tant'è che siamo già arrivati all'undicesima release, quindi siamo molto aggiornati per quanto riguarda la sequenza le annotazioni relative al genoma.

Lo zebrafish è un modello che si sta costantemente affermando, dall'anno '90 quando i paper relativi allo zebrafish erano praticamente pari a zero la situazione è cambiata molto in quanto i paper relativi allo zebrafish sono aumentati di molto.

Queste sono alcune delle caratteristiche che sono state dette nel filmato:

- **Indipendente:** crescono al di fuori del corpo della mamma  
La femmina depone l'uovo non fecondato e subito dopo il maschio lo feconda. Quindi nella vostra bacinella quando mettete in accoppiamento gli zebrafish vedrete degli embrioni che cominciano a svilupparsi all'esterno del corpo della madre, per questo vuol dire che se studiate qualsiasi cosa, lo fate senza sacrificare la madre, questo non vale per tutti gli altri animali modello, come il topo perché il l'embrione è all'interno della madre. Nel caso dello zebrafish l'uovo viene deposto e viene fecondato, tutto quello che succede durante lo sviluppo lo vedete direttamente al microscopio.
- **Equivalgono all'uomo:** 70% dei geni codificanti per l'uomo sono equivalenti nello zebrafish  
Tra l'altro, aggiungo io, 85% circa dei geni malattia individuati nell'uomo, cioè di quei geni che se mutati o alterati nella loro espressione causano malattie hanno un omologo in zebrafish. Questo ci permette di traslare i risultati ottenuti su zebrafish anche per organismi superiori.
- **Resistente:** lo zebrafish può far ricrescere parte del suo cuore.  
Se voi tagliate una pinna allo zebrafish adulto per esempio in 15 giorni lui l'ha già rigenerata e si è veramente disinteressato di tutto ciò che è accaduto. Quindi è fondamentale per quanto riguarda la possibilità di studiare la rigenerazione.
- **Si illuminano al buio:** attraverso modificazioni genetiche puoi rendere lo zebrafish fosforescente in diversi colori  
La trasparenza e la manipolabilità messe insieme mi consentono di fare delle splendide linee reporter, che consentono di rendere fosforescente diverse parti del pesce.
- **Crescita veloce:** gli embrioni dello zebrafish crescono i loro organi come gli umani, solo 20 volte più velocemente e un accoppiamento di zebrafish può generare circa 200 uova a settimana
- **Vertebrati:** l'aspetto degli organi e il piano del corpo è molto simile allo zebrafish perchè è un vertebrato.

Durante l'accoppiamento una femmina passa attraverso le pianticelle e rilascia le uova, che sono quelle cosine bianche che vedete fluttuare nell'acqua, e immediatamente dopo passerà il maschio che rilascia gli spermatozoi che andranno a fecondare le uova. Quindi c'è questa vaschetta nella quale mettiamo i pesci separati da un separè in plexiglass, i pesci condividono però la stessa acqua, mettiamo un alberello per un po' di romanticismo, nell'acqua vengono rilasciati gli ormoni, eccetera. La mattina dopo togliamo il separè e i pesci si incontrano e fanno

quello che avete visto.

Una cosa da far notare, che si vede meglio a destra, è che la vasca in realtà è dentro un'altra vaschetta che è tutta bucherellata sul fondo, questo perché i pesci non hanno in animo di prendersi cura della prole, tant'è che se lasciate lì gli embrioni vengono fagocitati, cannibalizzati dai genitori, quindi quella è la piccola rete per far passare le uova fecondate nella parte inferiore della vaschetta e impedire agli stessi di arrivarci e mangiarle. Il tutto avviene molto rapidamente: la femmina è questa con la pancia perché all'interno dell'ovario della femmina abbiamo le uova e non essendo stagionale, produce uova in tutto l'arco dell'anno. Quindi abbiamo all'interno del suo corpo le uova a tutti gli stadi di sviluppo, è un ciclo continuo e quindi più non si accoppia con regolarità più ha la pancia, anzi attenzione perché i pesci vanno comunque messo in accoppiamento, anche se non avete bisogno delle uova, per una questione di benessere dell'animale, altrimenti questo quantitativo esorbitante di uova rischia di ingolfare la femmina e quindi comincia a stare male, poi bisogna intervenire manualmente per liberare la femmina dalle uova in eccesso. Qual è l'aspetto del vostro embrione? Ci vuole un minimo di conoscenza di queste caratteristiche perché ci sono degli aspetti che potrebbero intervenire nella vostra ricerca, quindi la prima la prima cosa che voglio farvi notare è la presenza di un corio, cioè di un involucro che sta intorno ad avvolgere l'uovo deposto, questo è un involucro coriaceo, è esterno all'uovo, vedete che c'è lo spazio perivitellino quello che ho colorato in rosa, che sta tra la cellula uovo e il corion. La cellula uovo è quella in giallo, la parte in azzurro è il blastodisco, cioè l'unica parte che darà origine all'embrione, tutto il resto, la stragrande maggioranza, dell'uovo è composto da materiale di riserva dal vitello, yolk, che è quello che servirà all'embrione nelle prime fasi di sviluppo per portare avanti la sua crescita.

Questo corion è una struttura coriacea che ha la funzione di proteggere l'embrione durante le fasi dello sviluppo, tra l'altro questa struttura che è già coriacea, lo diventa ancora più dopo la fecondazione. Lo spermatozoo per arrivare alla cellula uovo entra dall'unico pertugio che esiste nel corion ed è indicato come micropilo

### Fish in a dish

In questa capsula Petri possiamo vedere gli zebrafish, tanto per dare l'idea della misura è più piccolo di un millimetro. Per alcuni utilizzi il corion dobbiamo levarlo, quindi dovete essere in grado come vedete in questo filmatino di andare a liberare i vostri campioni.

La trasparenza è una caratteristica chiave: se guardiamo lo shield a 6 ore dalla fecondazione, corrisponde al momento in cui è visibile l'organizzazione nei tre foglietti embrionali, durante la gastrulazione.

In 24 ore si possono vedere all'incirca 20 somiti, che sono delle masserelle mesodermiche che daranno origine anche i muscoli, che utilizziamo contandoli per datare con precisione l'embrione, quando siamo a questo stadio che abbiamo già tutto in esposizione. dalla 24° ora comincia la pigmentazione, però attenzione trattando opportunamente con dei chemical che non sembrano aver nessun effetto per quanto riguarda la normalità dello sviluppo embrionale possiamo procrastinare la

comparsa del pigmento, cioè utilizzando questa sostanza che si chiama PTU, impediamo al pigmento di intervenire, quindi abbiamo degli embrioni trasparenti oltre le 24 ore.

Nel video: avete visto che, come dicevo prima, la soltanto la parte superiore dell'uovo fecondato si divide a dare l'embrione, il resto è il materiale di riserva, che viene utilizzato dal pesciolino man mano per per nutrirsi.

Il Progetto Genoma: già nel '96 al secondo congresso sullo zebrafish al Cold Spring Harbor laboratory si pensava già a inserire lo zebrafish come sistema modello all'interno del Progetto Genoma e tanto è che si è raggiunto dal sequenziamento totale del genoma. Siamo già arrivati come dicevo all'undicesima release, quindi sappiamo già bene qual'è la sequenza.

La cosa che volevo dirvi riguarda questa frase: "for some like 3k human genes zebrafish has an average of 2.28", per qualcosa come 3000 geni umani lo zebrafish, non ha una singola copia, ma ne ha 2. La cosa è importante, prima vi dico però perché è successa questa cosa. Perché a livello del genoma dell'organismo che ha originato i pesci teleostei, cioè i pesci con uno scheletro osseo, di cui fa parte zebrafish, c'è stata una ulteriore duplicazione del genoma. Cioè tra 280 milioni e 350 milioni di anni fa, l'organismo che stava alla base della variazione che portò ai pesci teleostei è andato incontro a tetraploidia, cioè tutto suo genoma è stato duplicato, quindi il pesce si è ritrovato ad avere la doppia copia di tutti i geni. Ma da quegli anni ad oggi evolutivamente sono un tempo relativamente ragionevole per poter passare dalla tetraploidia ottenuta per duplicazione dell'intero genoma a una diploidia, dove le coppie di geni possono essere andate incontro a diversi destini, spesso e volentieri avete due copie di un gene una non vi serve, la perdete. Nel nostro organismo vengono conservate tutte e due le copie di un gene e tutt'e due copie fanno la stessa cosa. Se nello zebrafish volete studiare la funzione di un determinato gene e con degli approcci, che ancora non conosciamo blocchiamo l'espressione di questo, andando a vedere cosa succede vediamo che non succede assolutamente niente, perché c'è un altro genere, una copia dello stesso gene che "annulla" il vostro blocco. Ecco perché quando voi vi imbarcate nello studio di una qualsivoglia problematica di ordine biologico che preveda l'alterazione in genere o l'alterazione della sua espressione state attenti perché potrebbe esserci un'altra copia che fa la funzione della prima e non vi fa vedere un accidente. Quindi visto che avete a disposizione la sequenza del genoma andate a sincerarvi di questa cosa, fate un Blast. Un Blast su una sequenza genomica, di zebrafish in questo caso, vuol dire: immaginiamo che ci interessi studiare funzioni determinato gene x in zebrafish e non abbiamo la sequenza, ma l'abbiamo nel topo, prendiamo la sequenza del gene del topo e la confrontiamo con tutta la sequenza del genoma di zebrafish, sulla base della similitudine presumibilmente il nostro gene di topo sarà in grado di identificare il suo omologo in zebrafish. Come ho detto prima può esserci stata una duplicazione di questo gene, allora facciamo un Blast con la sequenza di zebrafish e vediamo se ce n'è un'altra per similitudine. Nel momento in cui scopriamo che del gene di interesse ci sono due copie dobbiamo pensare a inattivare entrambe le copie, se

vogliamo studiare cosa succede senza la sua funzione, questo vale per tutti gli organismi che hanno eventualmente subito questo tipo di destino durante l'evoluzione. Se non tenete conto di questa di questa situazione potreste incorrere in cantonate clamorose. Per quanto riguarda lo screen di mutagenesi che vi ho accennato prima, è proprio un utilizzo dello zebrafish come fosse una Drosophila. Sapete che la drosophila è stata usata per indurre delle mutazioni su larga scala per poi isolarne i mutati. La stessa cosa è stata fatta in zebrafish andando a cercare dei mutanti a caso. Parliamo ora di ibridazione in situ, è l'interazione tra due molecole di acido nucleico basata sulla complementarità, non sto a scendere nei dettagli, ma diciamo che più due sequenze sono tra loro complementari e più sarà stabile questa interazione. Proprio su questo concetto si basa l'ibridazione, cioè voi avete una molecola di acido nucleico marcata che potete riconoscere e andate a ibridarla con la sua controparte complementare, se la controparte è altamente complementare questo legame sarà stabile, se invece la parte marcata, che chiameremo sonda, non è sufficientemente complementare al target al bersaglio il complesso non si formerà e non avremmo ottenuto nulla. Quindi se utilizziamo questo concetto per l'ibridazione in situ possiamo dire che abbiamo una sonda marcata ed è dal punto di vista della sequenza complementare al messaggero che ci interessa vedere, di cui ci interessa capire la presenza o meno, questo per andare a fare uno studio di espressione. L'ibridazione in Northern Blot si utilizza per andare a vedere se un gene è espresso, cioè se un gene ha prodotto il messaggero. Con questa tecnica facciamo interagire la nostra sonda che è specifica per un singolo messaggero con tutti i messaggeri che otteniamo da una cellula o da un tessuto, e se il nostro gene è attivo, il nostro messaggero è presente e la sonda si unirà al messaggero e avremo un segnale viceversa no. Questo concerto lo possiamo spostare in zebrafish in situ cioè ciò che solitamente si fa sulla cellula intera piuttosto che sulla fettina di tessuto, noi lo possiamo fare sull'embrione intero utilizzando una sonda marcata con digossigenina. La possiamo utilizzare per andare a vedere nell'embrione sacrificato se il gene è espresso o no grazie alla colorazione che l'embrione assume sulla base della presenza o meno di questa sonda, in questo modo le possiamo andare a capire in quale punto dell'embrione il nostro gene è espresso. Lo stesso concerto applicabile all'immunoistochimica (si basa sulla proprietà dell'anticorpo di andare a riconoscere il proprio antigene), nel senso che noi possiamo andare a utilizzare l'immunoistochimica sviluppando degli anticorpi che vanno a riconoscere delle proteine specifiche di nostro interesse. Questo in zebrafish possiamo estenderlo all'embrione in toto cioè possiamo andare a utilizzare un anticorpo specifico, l'anticorpo primario, che riconosce una proteina di interesse, questo è riconosciuto a sua volta da un anticorpo secondario, che è per esempio fluorescente, può venire colorato e quindi mi dà la colorazione nel punto in cui questa proteina è presente. Queste tecniche è possibile usarle contemporaneamente per vedere contemporaneamente messaggeri e proteine, questo quindi mi dà una perfetta fotografia di quello che accade all'interno dello zebrafish, questo grazie alla sua trasparenza. Questo ci consente anche di fare dei bellissimi lavori per quanto concerne la produzione di animali transgenici. L'animale transgenico è

fondamentalmente un animale che porta nel suo genoma qualcosa che non ne fa parte. Quello che facciamo è costruirci del DNA in laboratorio e in qualche modo lo infiliamo nel cromosoma del nostro organismo. Come si fa a mettere dentro il pezzettino di DNA affinché possa essere integrato nel genoma? Questo è l'apparato di cui abbiamo bisogno: prendiamo le cellule appena fecondate, allineiamo le nostre uova e ci mettiamo dentro quello che vogliamo, in questo caso il nostro costrutto. Come facciamo a iniettarlo? Abbiamo uno stereomicroscopio e un microiniettore, cioè un piccolo piccolo braccio con un ago, un capillare che è connesso alla macchina lettore che regola il flusso, inteso come quantità, volume, tempo e durata e vi consente quindi iniettare del materiale all'interno dell'embrione. Quel DNA che abbiamo messo dentro, se siamo fortunati, va integrarsi nel genoma dell'embrione. Tutte le cellule che deriveranno da questa cellula durante lo sviluppo embrionale saranno positive per questo transgene e quindi alla fine avremo il nostro bellissimo pesciolino transgenico. Lo zebrafish è stato il primo animale transgenico ad essere venduto in un negozio di animali e quello che si chiamava "glowfish". La tecnologia ci consente di fare quelli che sono degli "animali reporter". Il concetto è sempre lo stesso: mettere un reporter fluorescente sotto il promotore del gene di interesse per vedere dov'è questo gene si è effettivamente espresso in vivo. Vediamo la GFP sotto al comando di un promotore che espresso nei neutrofili, cellule che accorrono per prime sul punto dell'insulto chimico/meccanico per cercare di tamponare la situazione. Un altro esempio riguarda il tubo neurale del sistema nervoso centrale i motoneuroni e il cuore. Anzitutto vi ho detto che iniettiamo il DNA che vogliamo inserire nel genoma all'interno dell'embrione in modo tale che si integri nel genoma e in questo modo le cellule che deriveranno dall'embrione saranno positive. Secondo voi il fenomeno dell'integrazione del DNA all'interno del genoma della cellula uovo fecondata è un evento che si verifica spesso o poco spesso? Si verifica molto poco, quindi per riuscire a ottenere un pesce transgenico dovrete iniettare tonnellate di uova, abbiamo dei modi per aumentare l'efficienza di integrazione del DNA all'interno del genoma. Il primo utilizza la meganucleasi Sce1, è una DNA nucleasi, che taglia il DNA. Vuol dire che ai lati della della sequenza che ci interessa integrale, cioè la codificante più il promotore, ci metto due sequenze di 18 nucleotidi che sono il sito che viene riconosciuto dalla meganucleasi. Quindi inoculo all'interno della cellula uovo fecondata il mio costrutto che porta ai lati queste due sequenze e la proteina meganucleasi, che riconosce le due sequenze ai lati del nostro costrutto e le taglia, rende le estremità dell'inserto molto più capaci di integrarsi nel genoma. Non si sa bene come funzioni perché la percentuale di trovare questa sequenza è bassissima. Un altro modo invece si basa su un aspetto fisiologico di un altro pesce, il Medaka, cioè quello che utilizza i trasposoni. Nel genoma di Medaka è stato isolato un trasposone, un pezzettino di DNA limitato da due sequenze, L200 e R150, che vengono riconosciute dalla Tol2, che è una trasposasi e consentono al DNA di uscire dal punto in cui è nel genoma di Medaka e di entrare in un altro. Questo piccolo complesso dove c'è una sequenza codificante che produce la proteina che va riconoscere le due sequenze ai lati della codificante per questa proteina, le unisce e fa un anello che viene portato in un altro punto del genoma. Noi

possiamo utilizzare a nostro vantaggio questa situazione in questo modo: prendiamo il nostro il trasposone e all'interno della sequenza L200 e R150 ci piazziamo il nostro transgene (GFP e messaggero per le Tol2), per esempio un promotore o la GFP. Questo transgene in presenza della trasposasi sarà in grado di integrarsi nel DNA. In questo modo potrete con molta efficienza ottenere degli animali transgenici. L'inserzione con queste tecniche è facilitata, però rimane casuale.