

Link utili

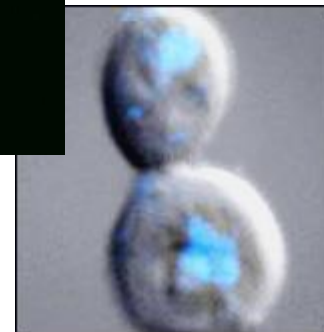
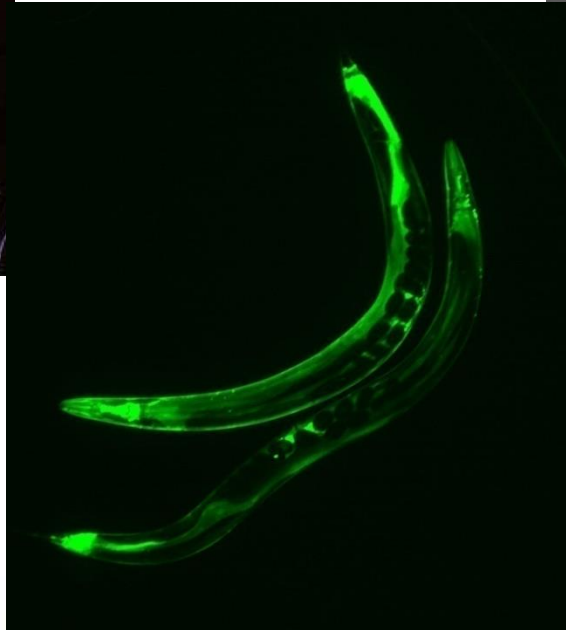
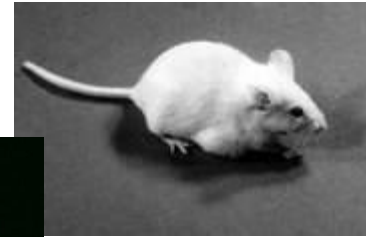
- Developmental Biology – Scott F. Gilbert

<https://archive.org/details/DevelopmentalBiology>

- Molecular Biology of the Cell - 4th edition
Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/?term=molecular%20biology%20of%20the%20cell>

Organismi modelli



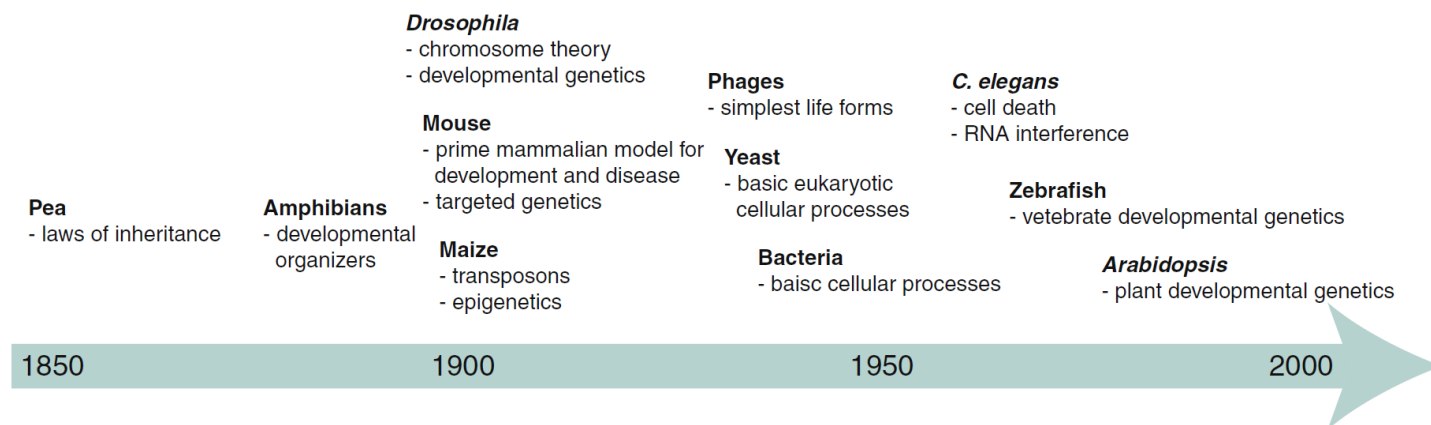


Fig. 2 – Timeline to indicate the emergence of a few model organisms. Keywords referring to the main features of each model organism are added.

Quali caratteristiche deve avere un organismo modello ideale?

- Misura
- Numeri
- Tempo di riproduzione/generazione
- Facilita' di mantenimento/stabulazione
- Capacita' di fare esperimenti difficili e possibilita' di fare esperimenti non eseguibili sul uomo
- Genoma sequenziato

Quale e' il migliore organismo?

- VANTAGGI SPECIE-SPECIFICI
- Misura dell'oocito
- Sviluppo esterno
- Vicino all'uomo
- Possibilita' di fare esperimenti genetici
- Possibilita' di fare esperimenti di microchirurgia
- Possibilita' di ottenere molti oociti contemporaneamente

Table 1 – Proteome coverage for a selection of model organisms. The numbers result from a comparison of experimental data against the hypothetical proteome. The number of protein-coding genes that have orthologs in humans is indicated in the right column.

Organism	Number of protein-coding genes (http://www.ensembl.org/)	Proteome coverage [%]	Orthologs of human genes [162]
<i>E. coli</i>	4237	94 [163]	541
<i>S. cerevisiae</i>	6532	67 [164]	2154
<i>C. elegans</i>	20,158	68 [165]	4649
<i>D. melanogaster</i>	14,076	65 [166]	5527
<i>M. musculus</i>	22,931	34 [167]	16,376
<i>H. sapiens</i>	22,286	67 [167]	
<i>A. thaliana</i>	24,408	50 [168]	3239

PRINCIPALI MODELLI SPERIMENTALI PER LO STUDIO DELLE FUNZIONI GENICHE

INVERTEBRATI

Cenorhabditis elegans

Drosophila melanogaster

VERTEBRATI

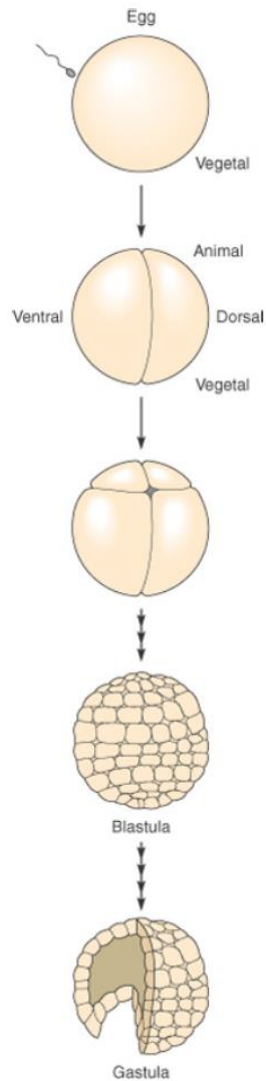
Danio rerio (Zebrafish)

Xenopus

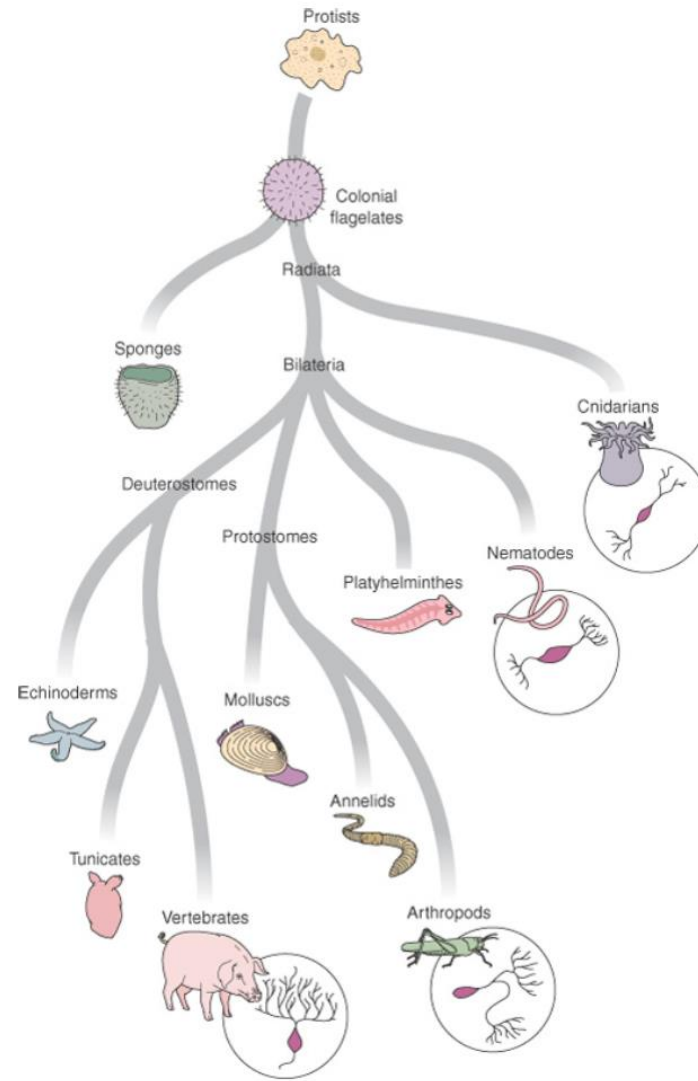
Pollo

Topo

SVILUPPO PRECOCE E FILOGENESI DEI METAZOI



Copyright © 2006 Elsevier, Inc.

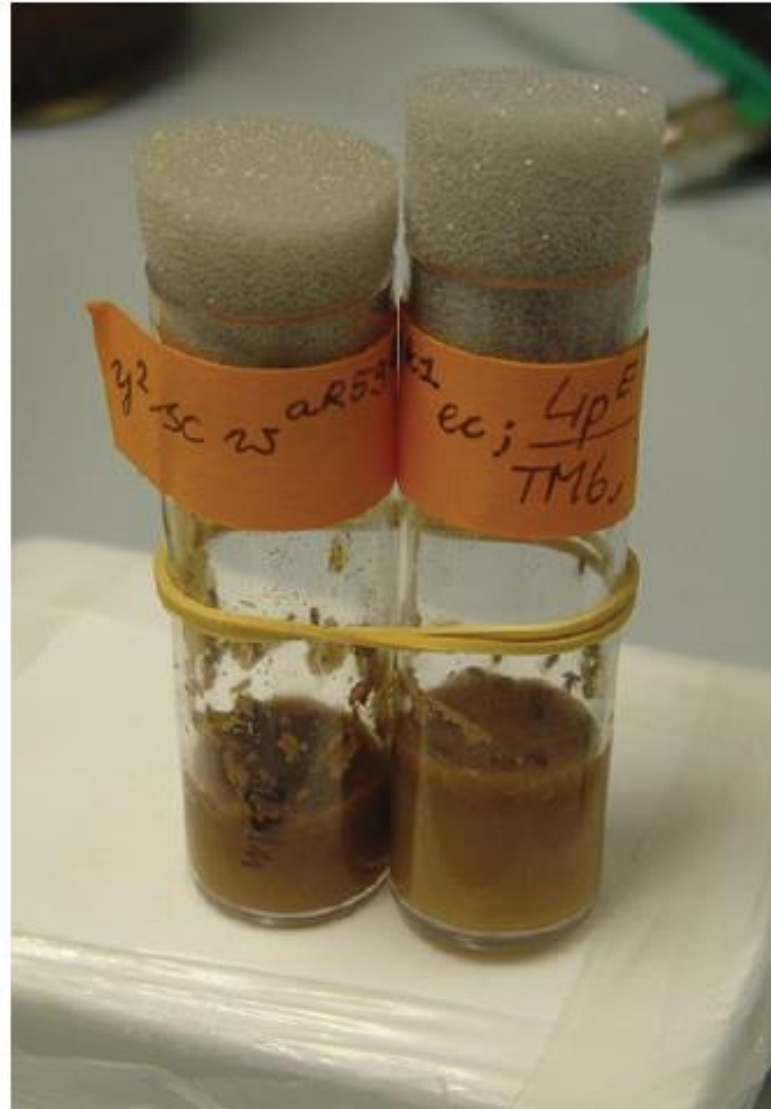


Copyright © 2006 Elsevier, Inc.

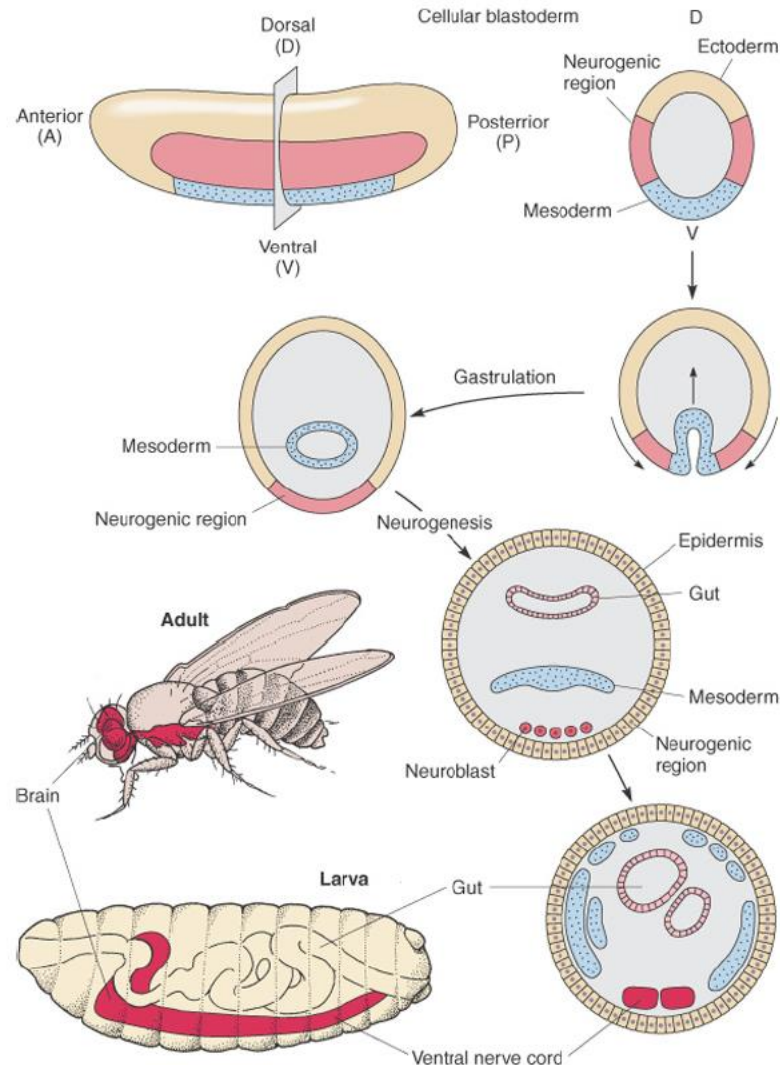
**IL MOSCERINO DELLA FRUTTA *Drosophila melanogaster*
E' UN MODELLO SPERIMENTALE
MOLTO UTILIZZATO PER STUDI GENETICI**



***Drosophila* RAPPRESENTA UN MODELLO CONVENIENTE
ED ECONOMICO PER STUDI DI LABORATORIO**



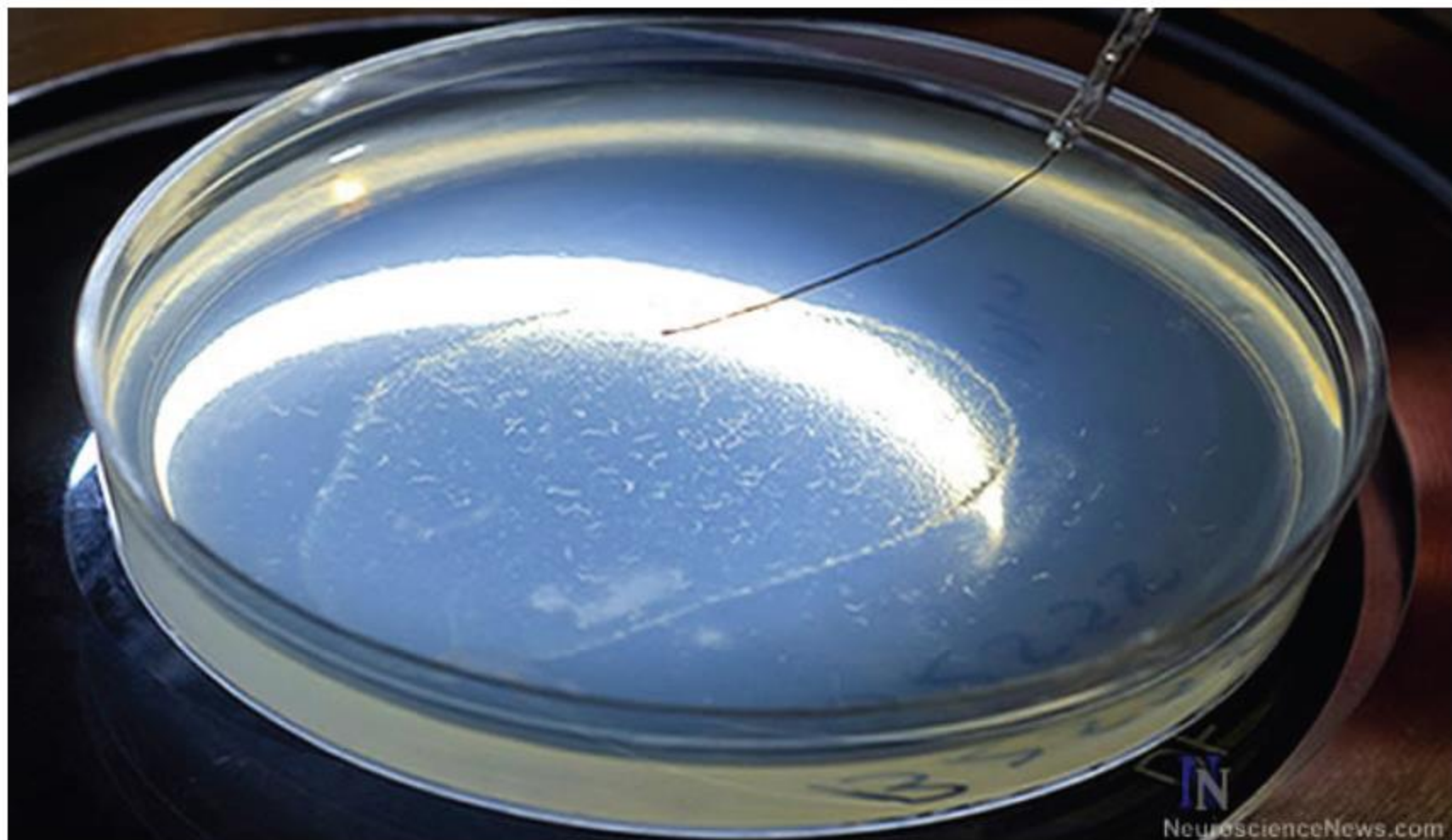
LO SVILUPPO PRECOCE DI *Drosophila* PRESENTA ANALOGIE CON LO SVILUPPO DEI VERTEBRATI



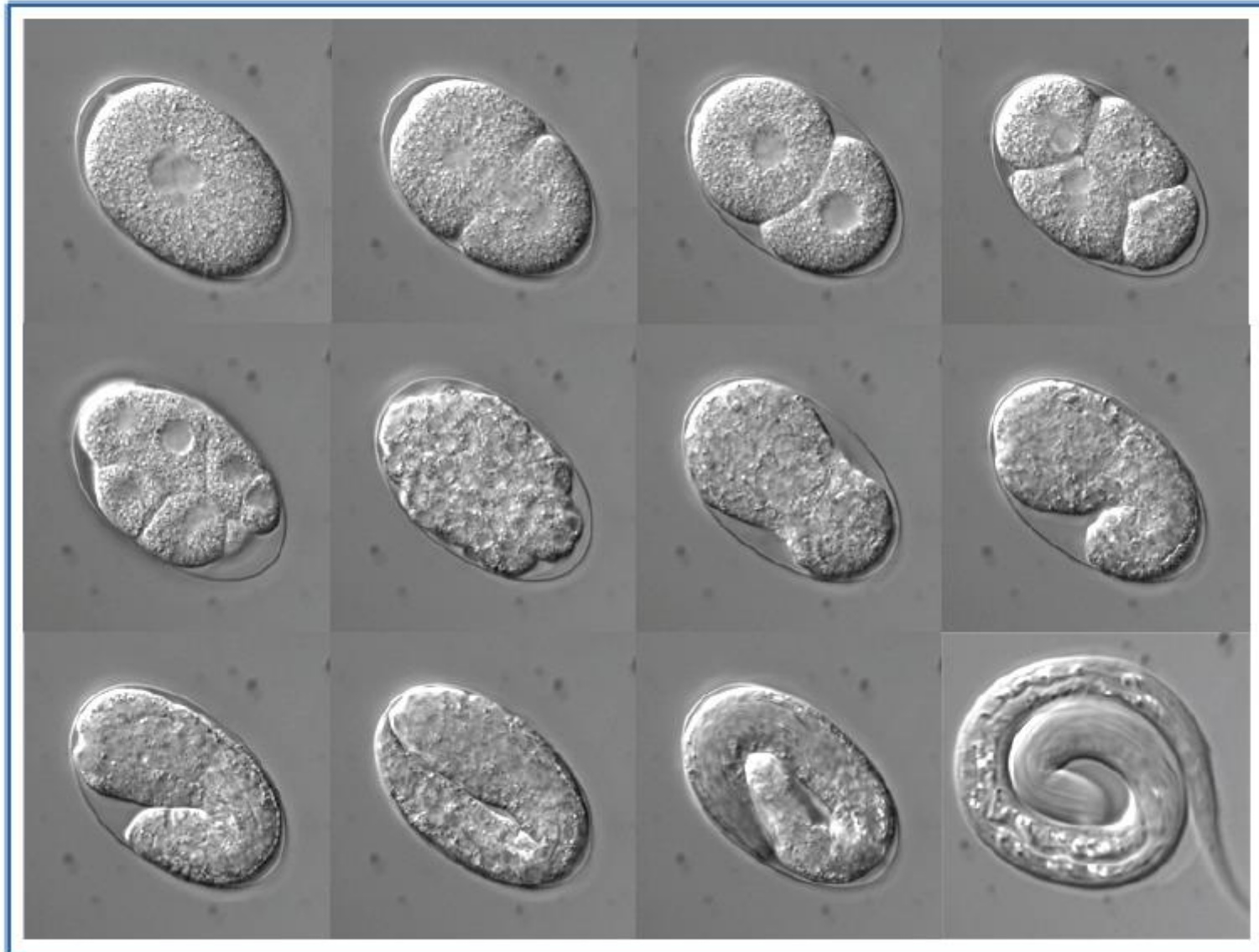
**IL NEMATODE *C. elegans* E' UN MODELLO SPERIMENTALE
MOLTO UTILIZZATO PER STUDI GENETICI**



**NEMATODI *C. elegans* POSSONO ESSERE MANTENUTI IN
LABORATORIO SU PIASTRE PETRI CONTENENTI BATTERI**



**EMBRIONI DI *C. elegans* SONO TRASPARENTI ED E' POSSIBILE
OSSERVARE FACILMENTE AL MICROSCOPIO
IL LORO SVILUPPO IN MODO DETTAGLIATO**



VANTAGGI SPERIMENTALI DEL *C. elegans*, *Drosophila*, ZEBRAFISH

- 1) **Particolarmente adatti per screening genetici: isolamento di ceppi mutanti** (piccole dimensioni e breve intervallo riproduttivo).
- 2) Sviluppo embrionale molto rapido.
- 3) Struttura anatomica relativamente semplice.
- 4) Genoma relativamente compatto.
- 5) Adatti per lo studio delle divisioni e dei movimenti cellulari (trasparenza).

**LO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) E' UN MODELLO SPERIMENTALE
DI VERTEBRATO MOLTO UTILIZZATO PER STUDI GENETICI**



LE DIMENSIONI DI ZEBRAFISH PERMETTONO IL MANTENIMENTO DI POPOLAZIONI NUMEROSE



Due approcci per lo studio gene-funzione

Forward Genetics

- Random mutagenesis
- Transposons

Function

(behavior, disease, phenotype)



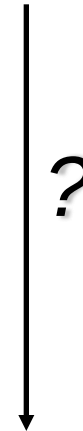
Gene

Reverse Genetics

- PCR identification of rearrangements
(site-directed mutagenesis)
- RNAi

Gene

(tyrosine hydroxylase, P-450, 5HT receptor)



Function

Genetica inversa e genetica classica

- Genetica classica
 - Da fenotipo a gene
 - Non soggetta a bias
 - Può identificare geni di cui non si sospettava
- Genetica inversa
 - Da genotipo e fenotipo
 - Soggetta a bias
 - Applicata per studiare geni noti

C. elegans timeline.

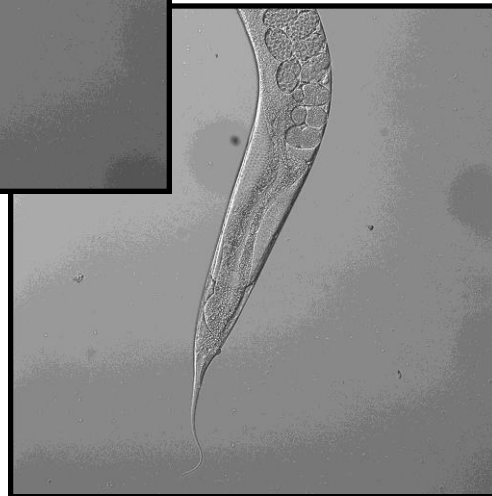
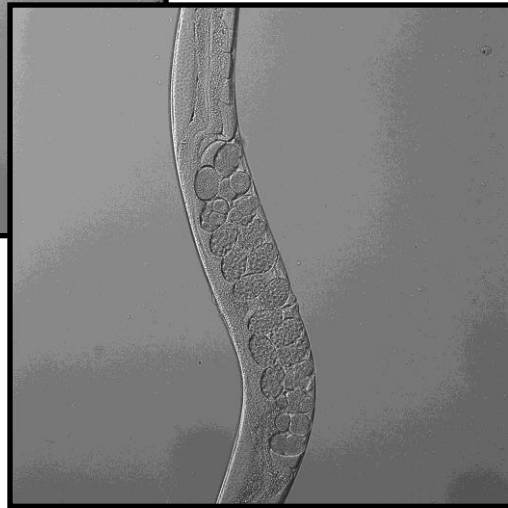
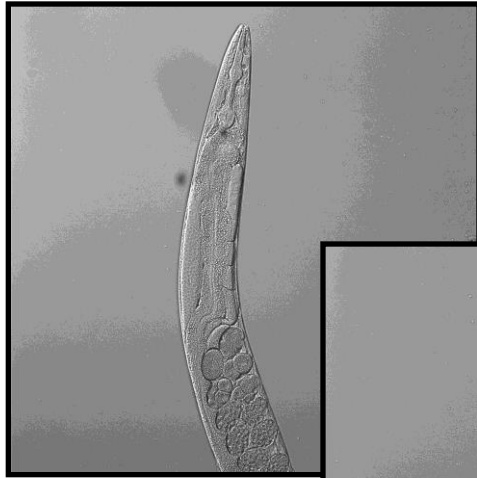
- Developed by Sydney Brenner (1963)
- Mutants published by Brenner (1974)
- 1976 postembryonic cell lineages determined (Sulson and Horwitz)
- 1983 complete embryonic cell lineages determined (Deppe et al., Sulson et al.)
- 1982 "Programmed cell death" (Horwitz et al.) Nobel Prize Brenner, Sulson, Horwitz 2002
- 1986 Complete connectivity of nervous system established (White et al.) "The mind of a worm"
- 1991-98 RNAi and miRNA discovered in worms. Nobel Prize: Fire, Mello 2006
- 1998 First animal genome sequenced (97Mb, now 100.3Mb).
- This is about 1/30 the size of the human genome (3 Gb). *C. elegans* have about 17,500 genes, about half that of humans (30,000-40,000 genes). First animal to be sequenced! Knowing the sequence allows genes of interest to be easily cloned. Also it opened opportunity for reverse genetic approach.

I vantaggi del modello C.elegans

- 15,000/20,000 geni
- Genoma completamente sequenziato
- Veloce riproduzione
- Sviluppo costante: è possibile tracciare le linee cellulari da cui originano tutti i tessuti
- Scoperti i geni che controllano apoptosi
- Scoperto il meccanismo del controllo dell'espressione genica tramite miRNA

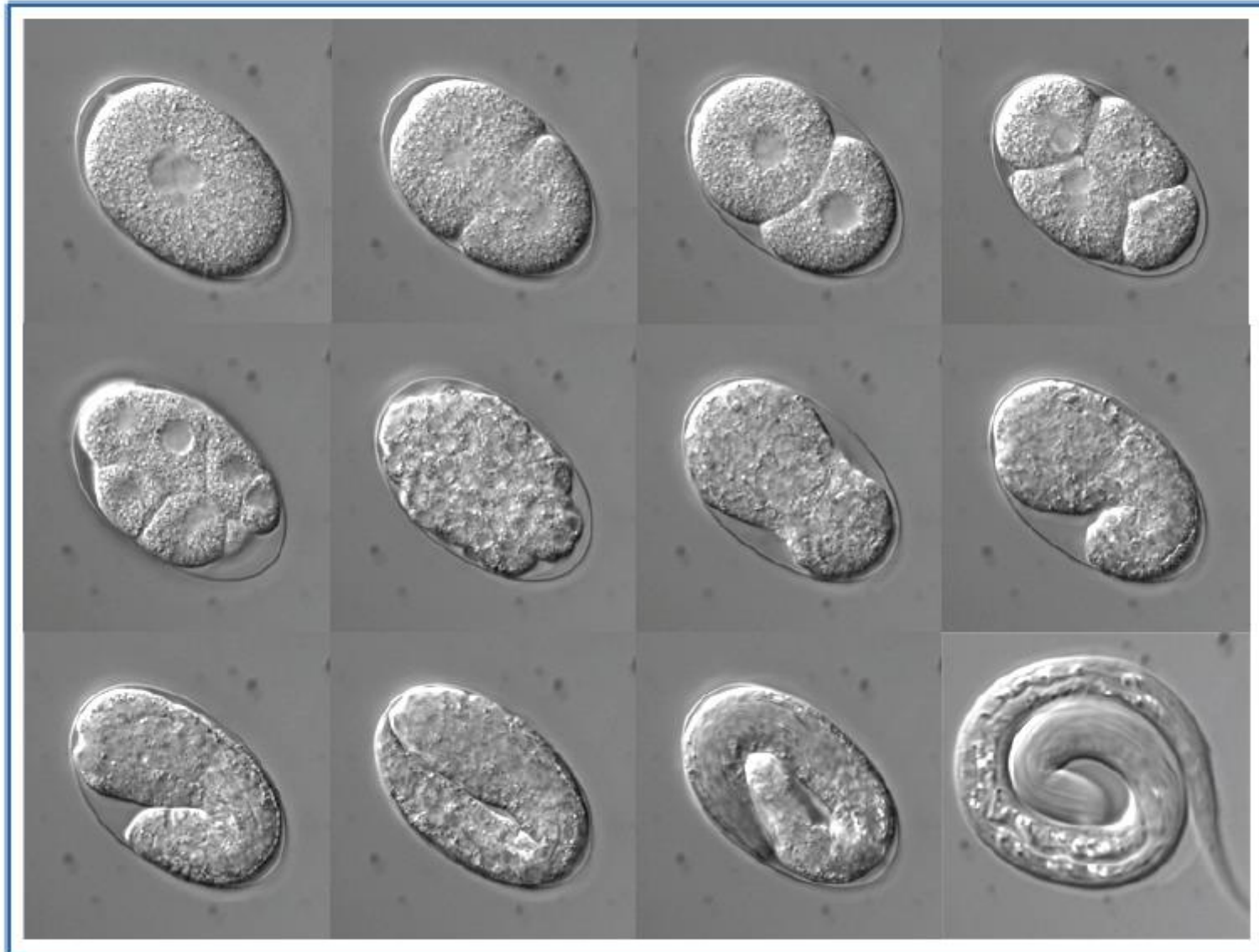
C. (Caenorhabditis) elegans

Introdotta e usata da Sydney Brenner (1963)
per studiare sviluppo e neurologia.



- Adulti lunghi ~1mm
- Crescono su piastre di agar contenenti batteri .
- Breve period generazione (3 giorni dalla deposizione dell uovo)
- Trasparenti, per cui anatomia interna e' facilmente osservabile

**EMBRIONI DI *C. elegans* SONO TRASPARENTI ED E' POSSIBILE
OSSERVARE FACILMENTE AL MICROSCOPIO
IL LORO SVILUPPO IN MODO DETTAGLIATO**



Ciclo vitale del *Caenorhabditis elegans*

Proliferaazione

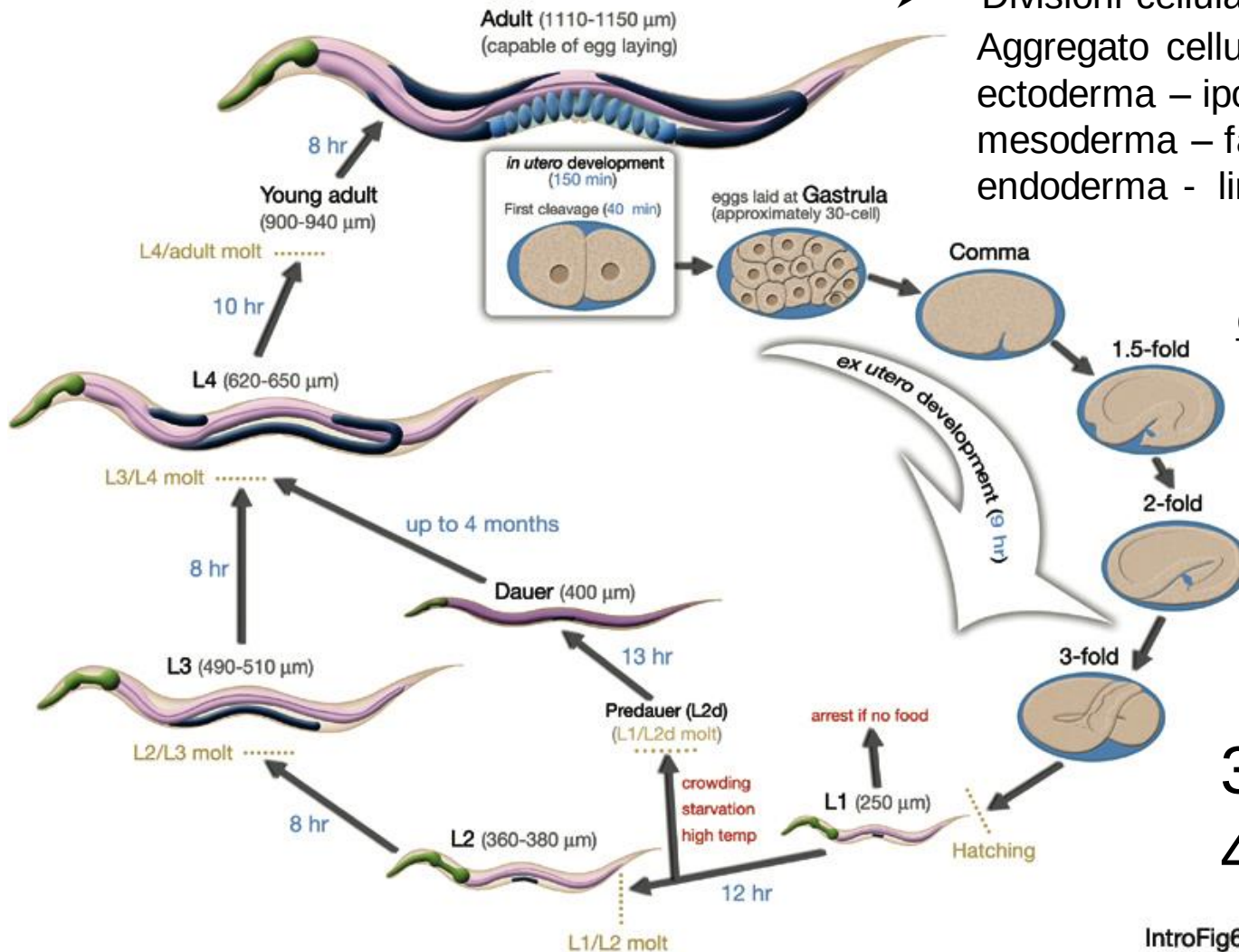
- Generazione cellule fondatrici embrionali
- Divisioni cellulari e gastrulazione.

Aggregato cellulare:

ectoderma – ipoderma e neuroni,
mesoderma – faringe e muscoli,
endoderma - linea germinale e intestino

Organogenesi

Differenziamento terminale

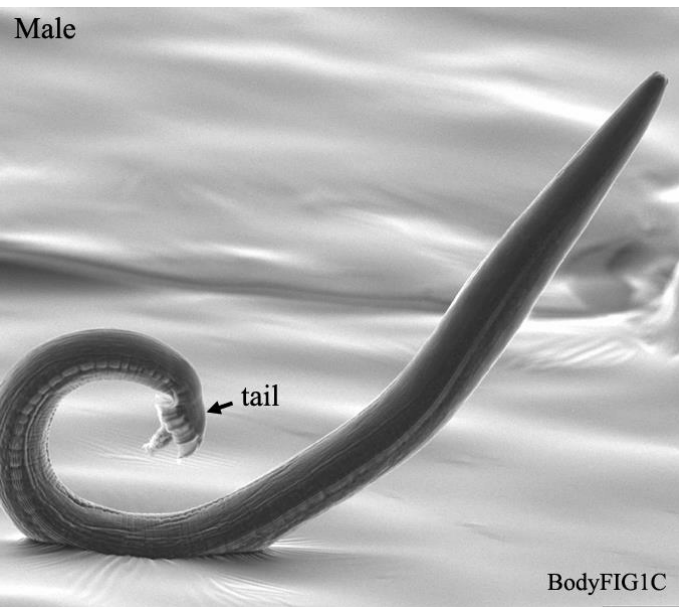


3 giorni a 22C
4 giorni a 20C

Caenorhabditis elegans



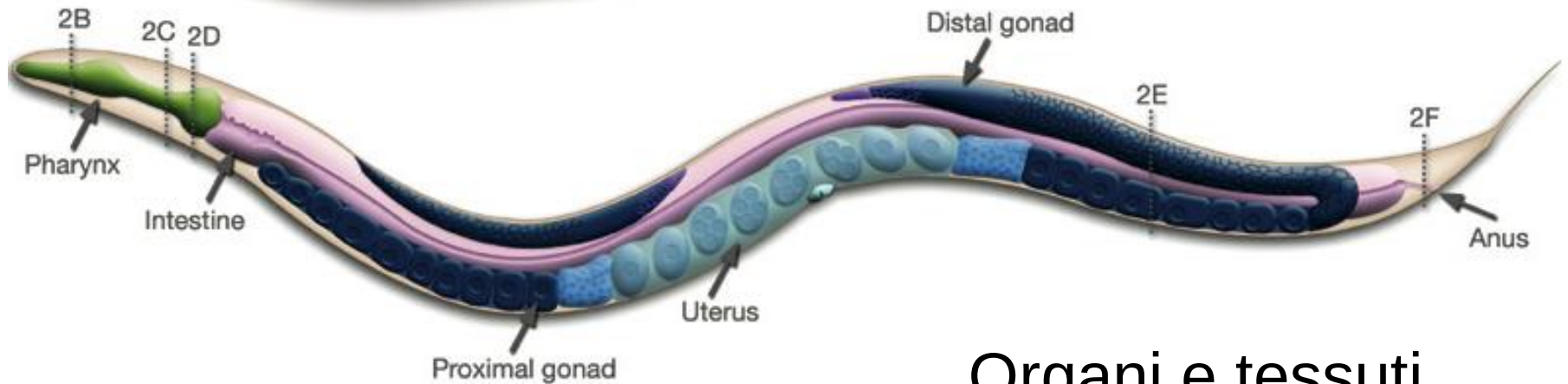
Kariotipo XX
959 somatic cells



Cariotipo XO
1031 cellule

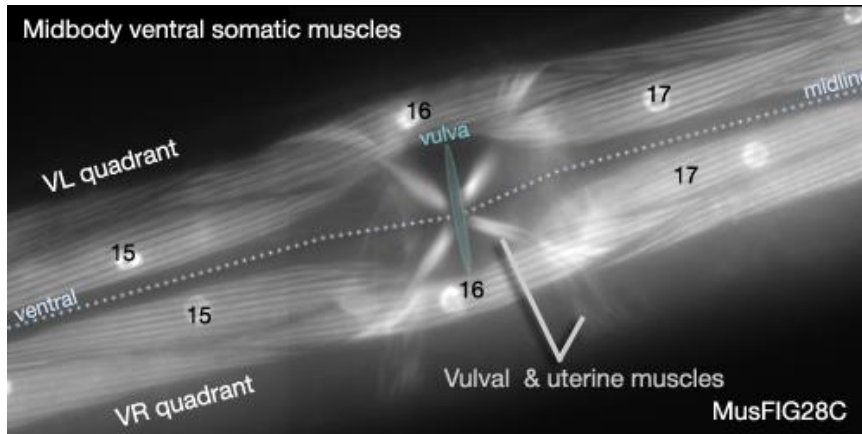
- 5 autosomi I-V e X (6 in tutto)
- XX animals become hermaphrodites
- XO animals become males
- Con un cromosoma di meno, I maschi sviluppano 79 neuron e 25 cellule muscolari di piu' degli ermafroditi, usati per l'accoppiamento
- Gli ermafroditi producono molta progenie
-- 300 worms!
- Gli ermofroditi adulti hanno 959 cellule somatiche, I maschi ne hanno 1031.

Morfologia *C. Elegans*



Organi e tessuti . . .

Muscles



<http://www.wormatlas.org>

Epidermide

Apparato digerente
Apparato riproduttivo
Apparato muscolare
Apparato escretore
Sistema nervoso

Sistema nervoso

Hermaphrodite 302 neurons
 5000 chemical synapses
 2000 neuromuscular junctions

Male 381 neurons

By comparison
 10⁵ neurons in flies, ~300 in worms

Interneurons and motorneurons

Major neurotransmitters:

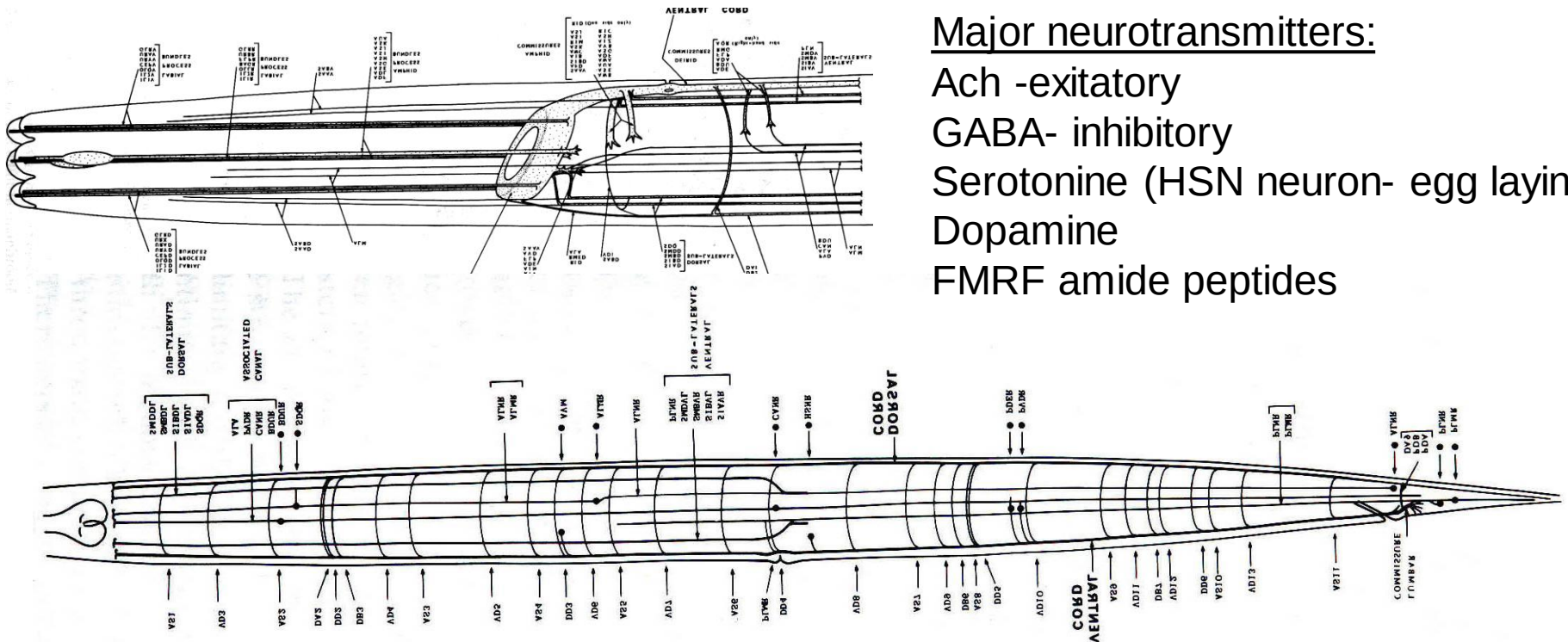
Ach - excitatory

GABA- inhibitory

Serotonin (HSN neuron- egg laying)

Dopamine

FMRF amide peptides



linee cellulari *C. elegans*

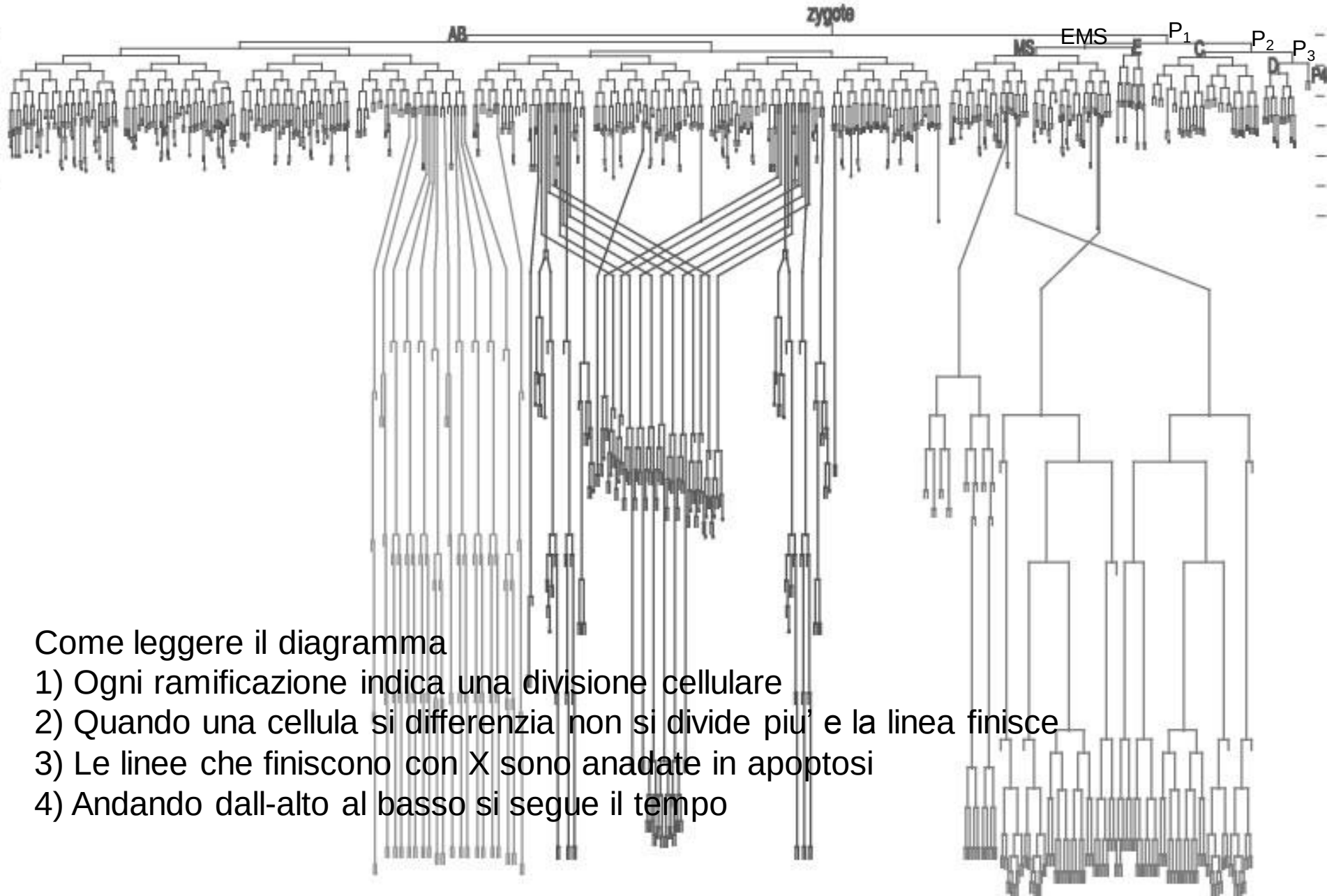
- Il piu' importante e incredibile vantaggio del verme e' che ogni verme ha lo stesso numero di cellule somatiche!

- Larva schiusa = 558 cells
- Maschi (XO) = 1031 cellule somatiche + ~1000 spermatozoi
- Ermafroditi (XX) = 959 cellule somatiche + ~2000 oociti e spermatozoi

- Le cellule somatiche originano da una linea cellular INVARIANTE.

Le divisioni sono invarianti nella forma, tempo e spazio (orientamento)

Le linee cellulari del: *C. elegans*

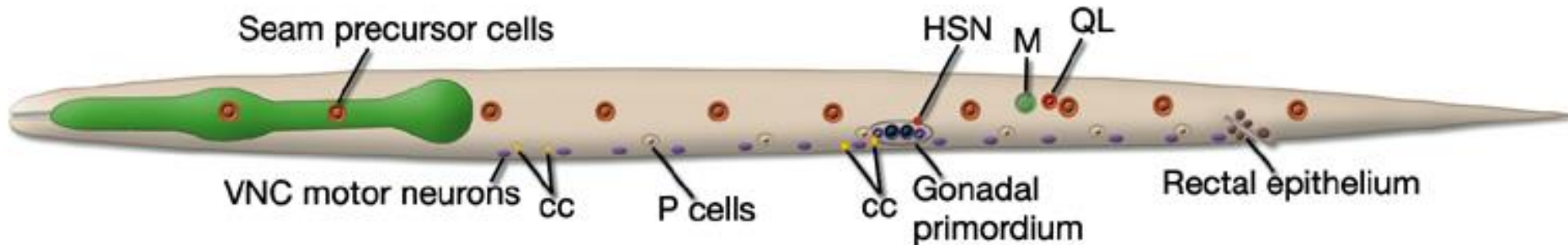


Come leggere il diagramma

- 1) Ogni ramificazione indica una divisione cellulare
- 2) Quando una cellula si differenzia non si divide più e la linea finisce
- 3) Le linee che finiscono con X sono andate in apoptosi
- 4) Andando dall-alto al basso si segue il tempo

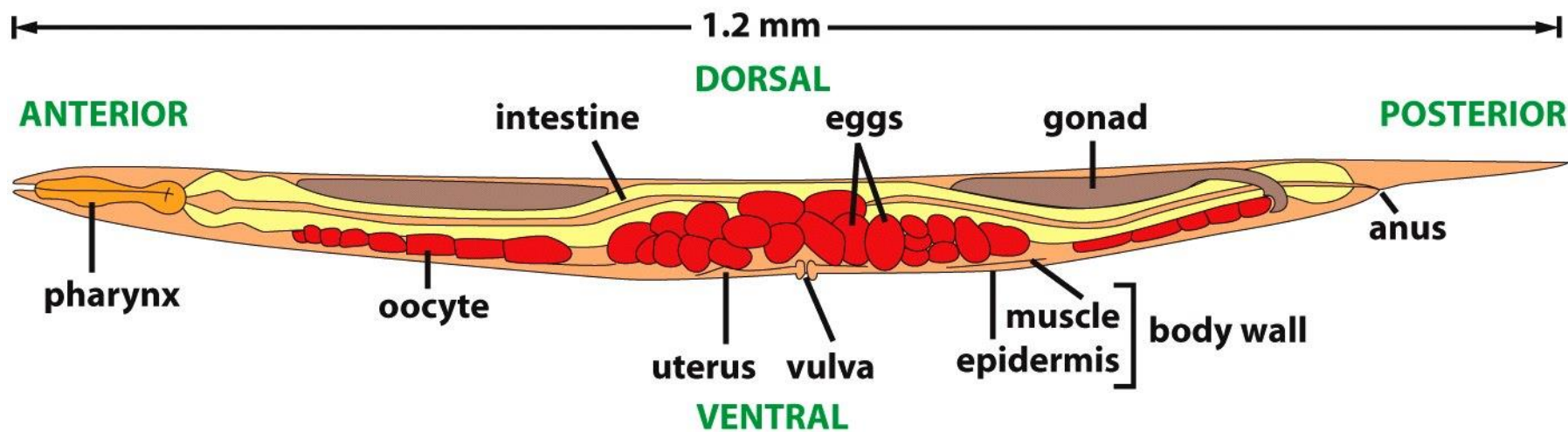
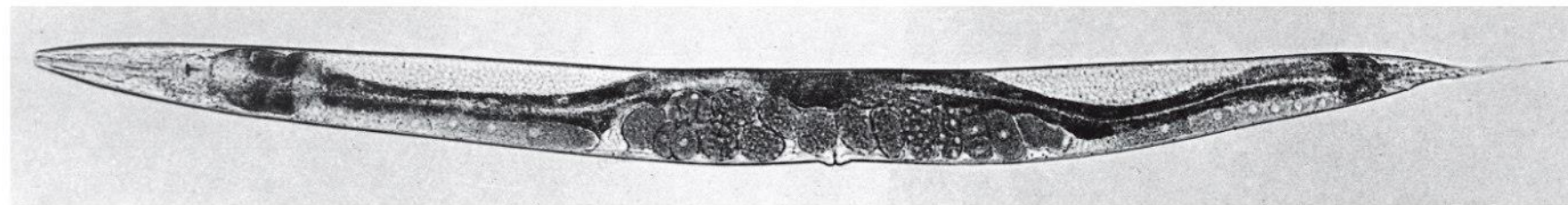
Prima si completano le linee postembrionali

In presenza di cibo, le divisioni cellulari riprendono e 3 ore dopo la schiusa comincia il programma di sviluppo postembrionale. In un primo stadio larvale di circa **671** cellule **113** cellule subiscono apoptosis nel corso dello sviluppo. Circa il 10% delle restanti **558** cellule nella nuova larva che si e' schiusa (51 negli ermafroditi, 55 nei maschi) sono blasti che vanno incontro a ulteriori divisioni.



Divisioni
Migrazioni
Differentiamento
Morte

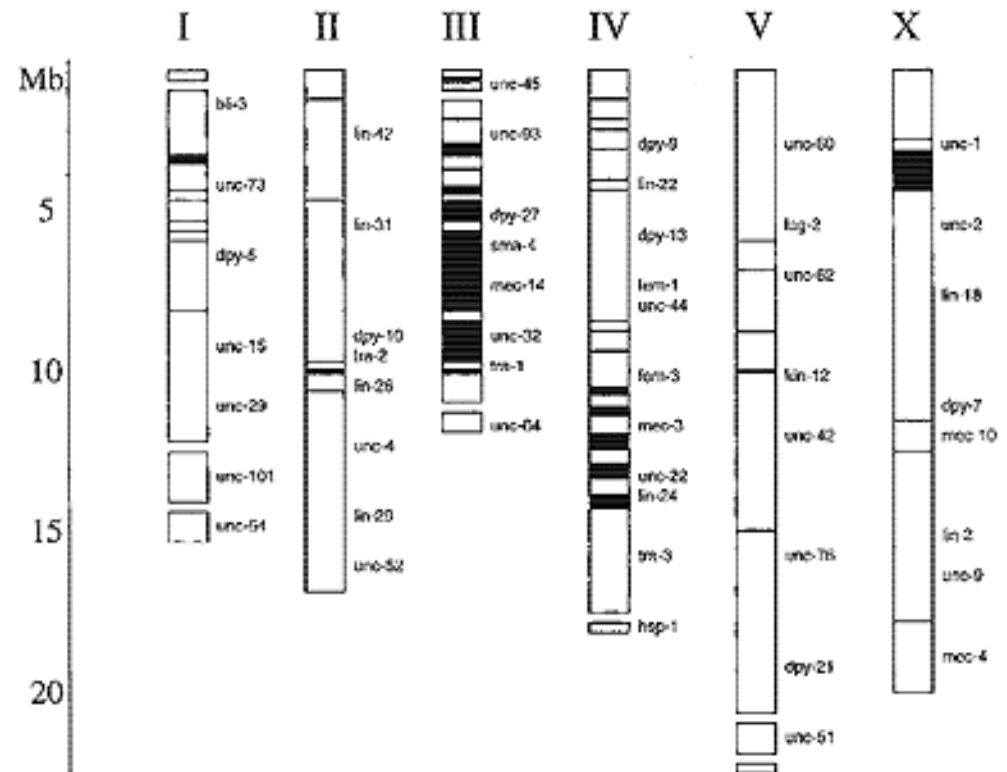
<http://www.wormatlas.org>



Genoma del *C.elegans*

**Cromosomi olocentrici
approssimativamente
della stessa misura
5 autosomi, 1 X.**

✓ **Mappa fisica
basata sul clonaggio**

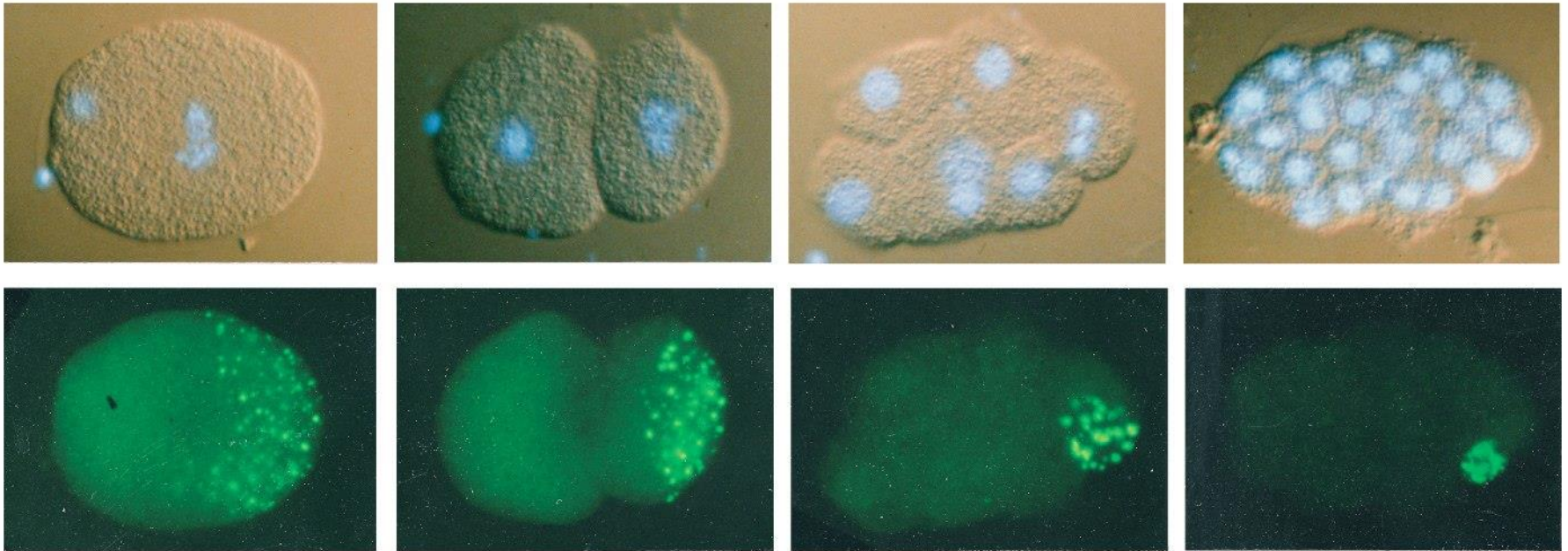


Alan Coulson, John Sulston, Sydney Brenner, and Jonathan Karn (1986)
Toward a Physical Map of the Genome of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. PNAS October 15, vol. 83

I vantaggi del modello C.elegans

- 15,000/20,000 geni
- Genoma completamente sequenziato
- Veloce riproduzione
- Sviluppo costante: è possibile tracciare le linee cellulari da cui originano tutti i tessuti
- Scoperti i geni che controllano apoptosi
- Scoperto il meccanismo del controllo dell'espressione genica tramite miRNA

Asimmetria dell'oocito fecondato serve per impostare l'asse ant/post



Granuli con molecole PAR segregano nella cellula stipite della linea germinale
SPECIFICAZIONE AUTONOMA

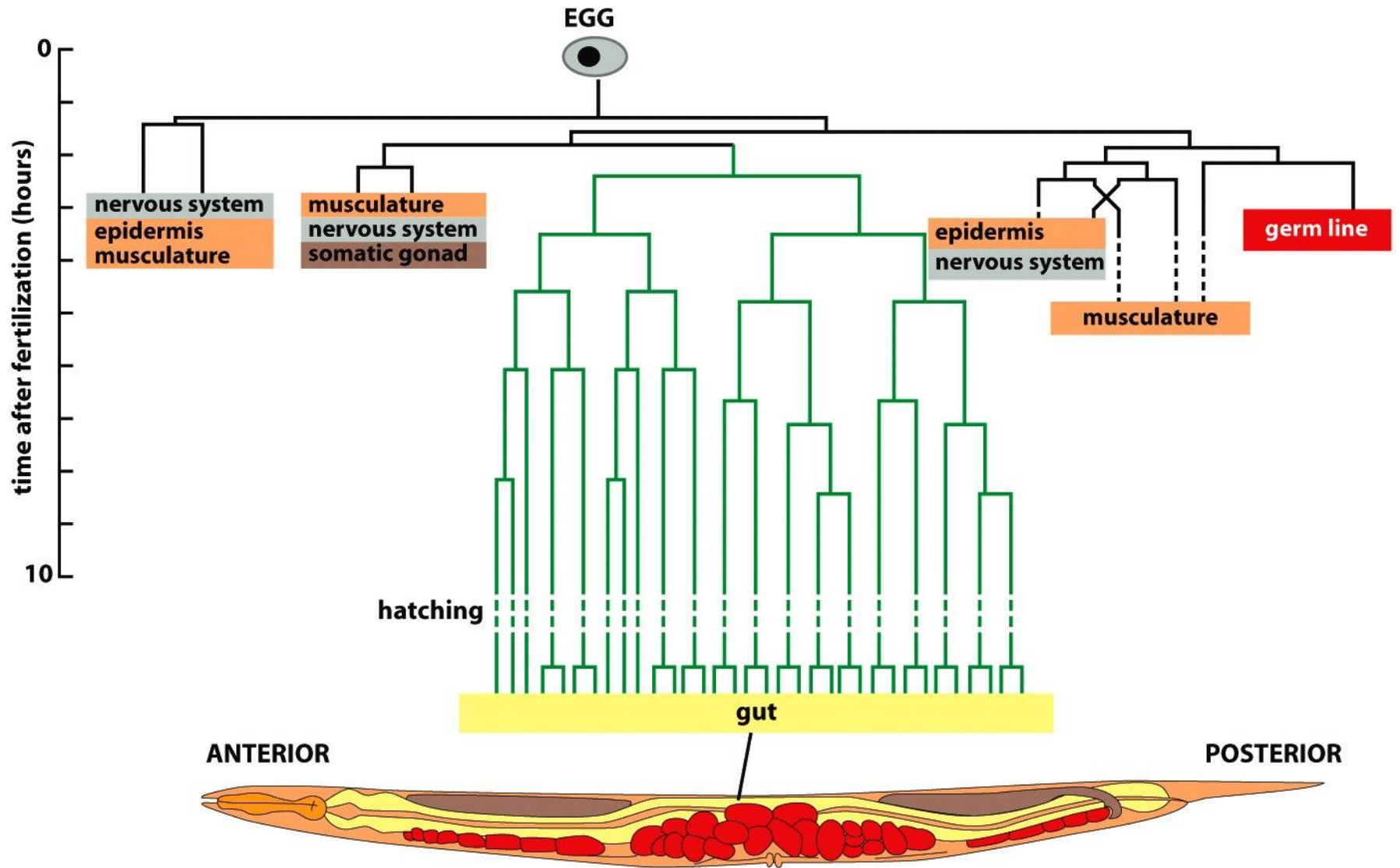


Figure 22-18 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

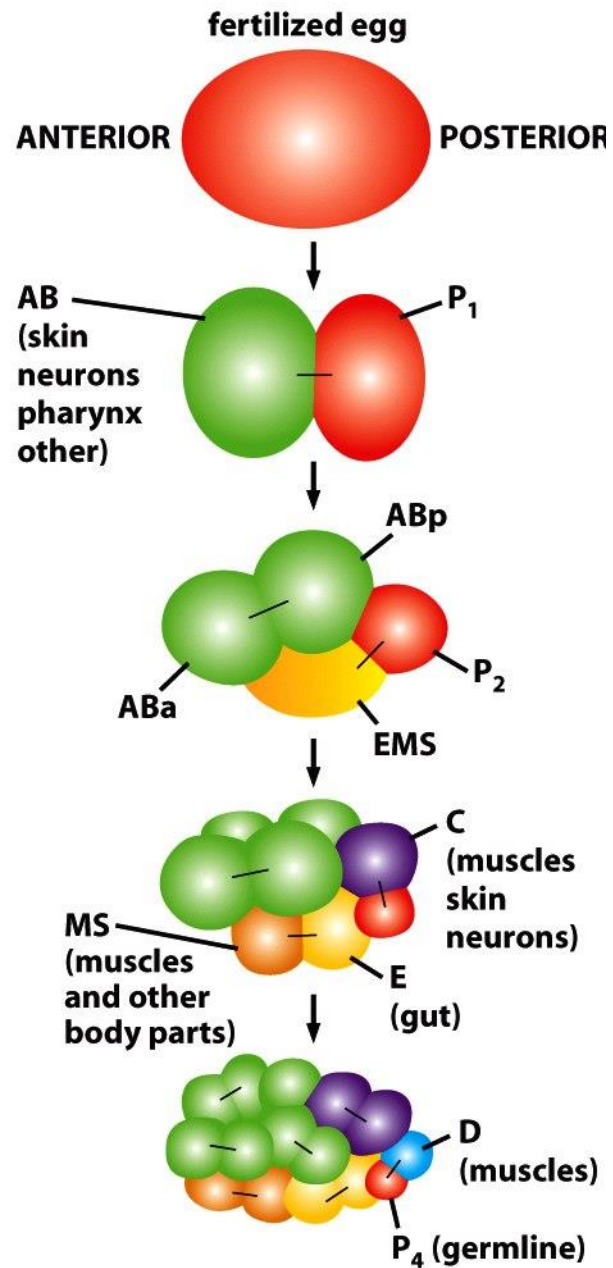


Figure 22-20 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

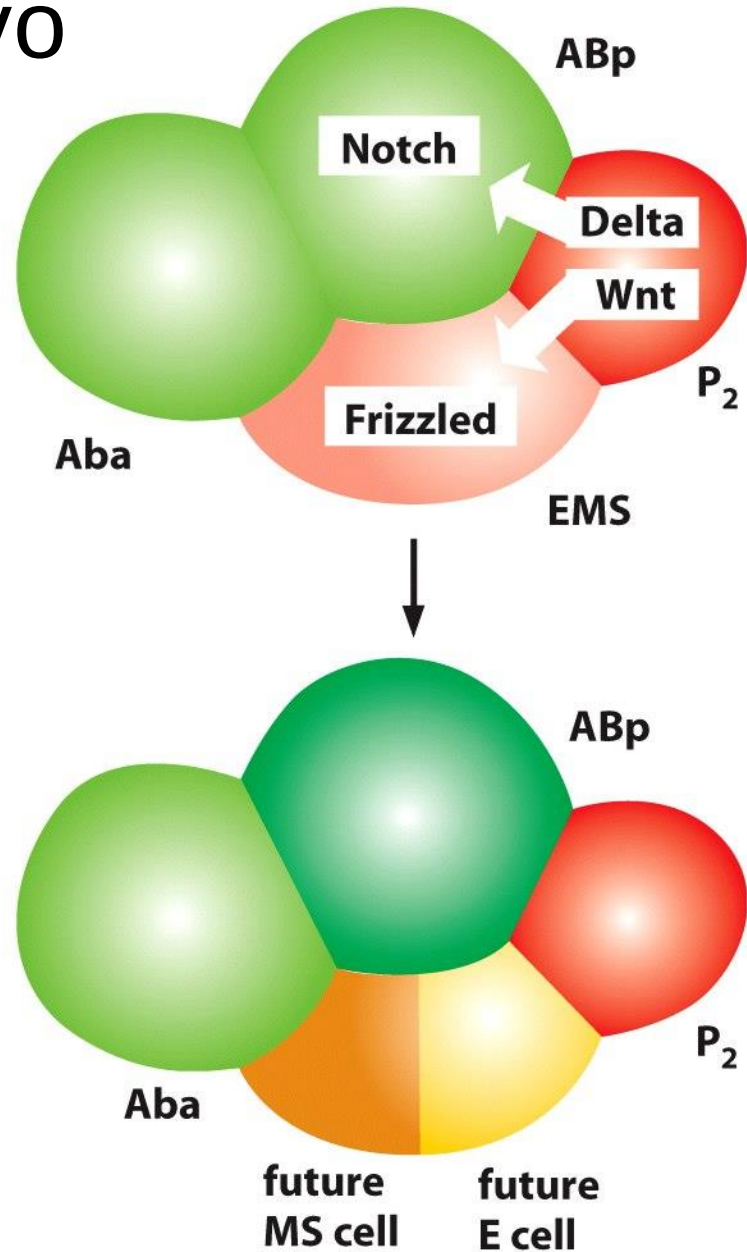
Meccanismo induttivo

Esperimenti di
Microchirurgia

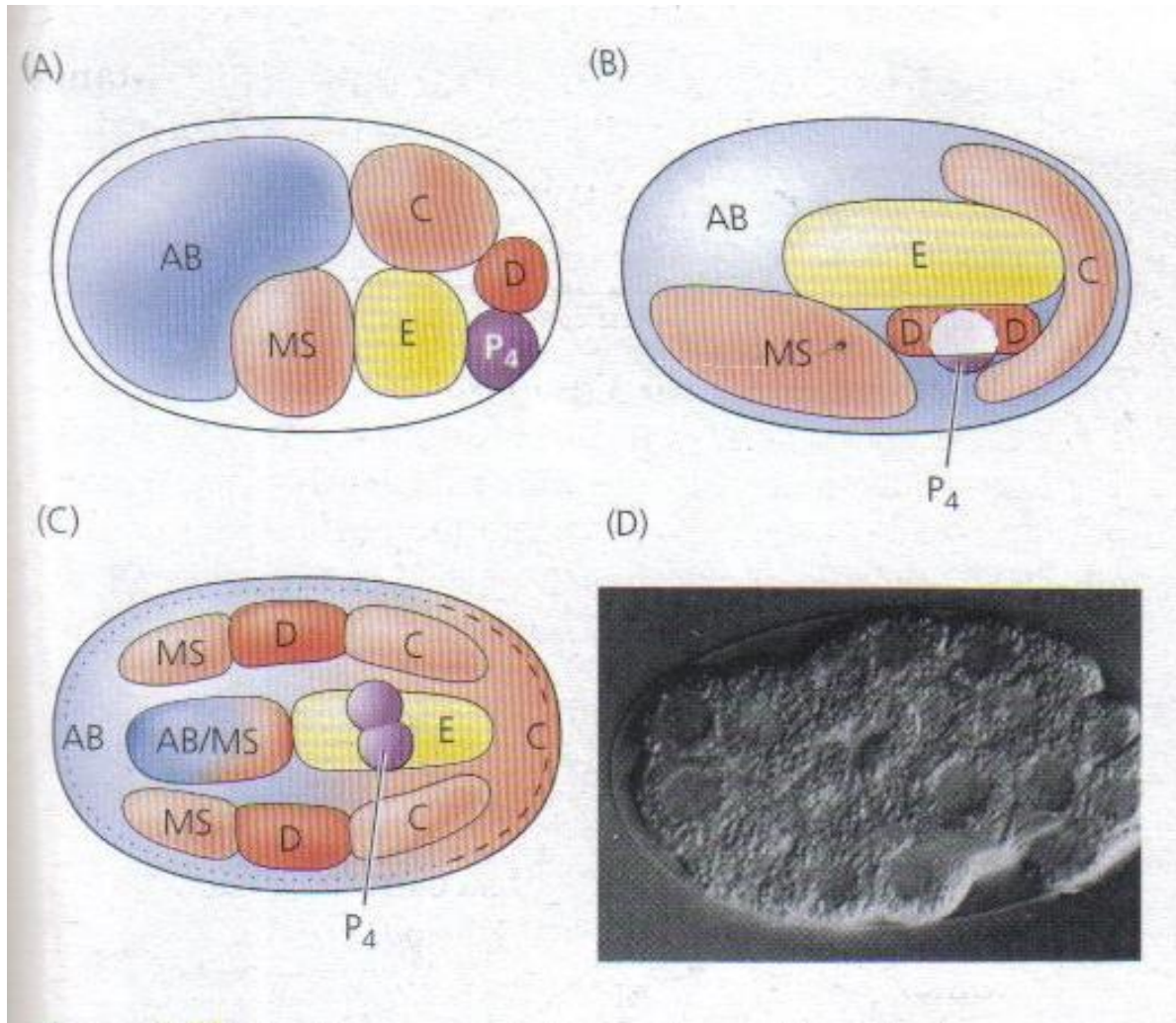
Eliminazione di cellule

Spostamento e
inversione

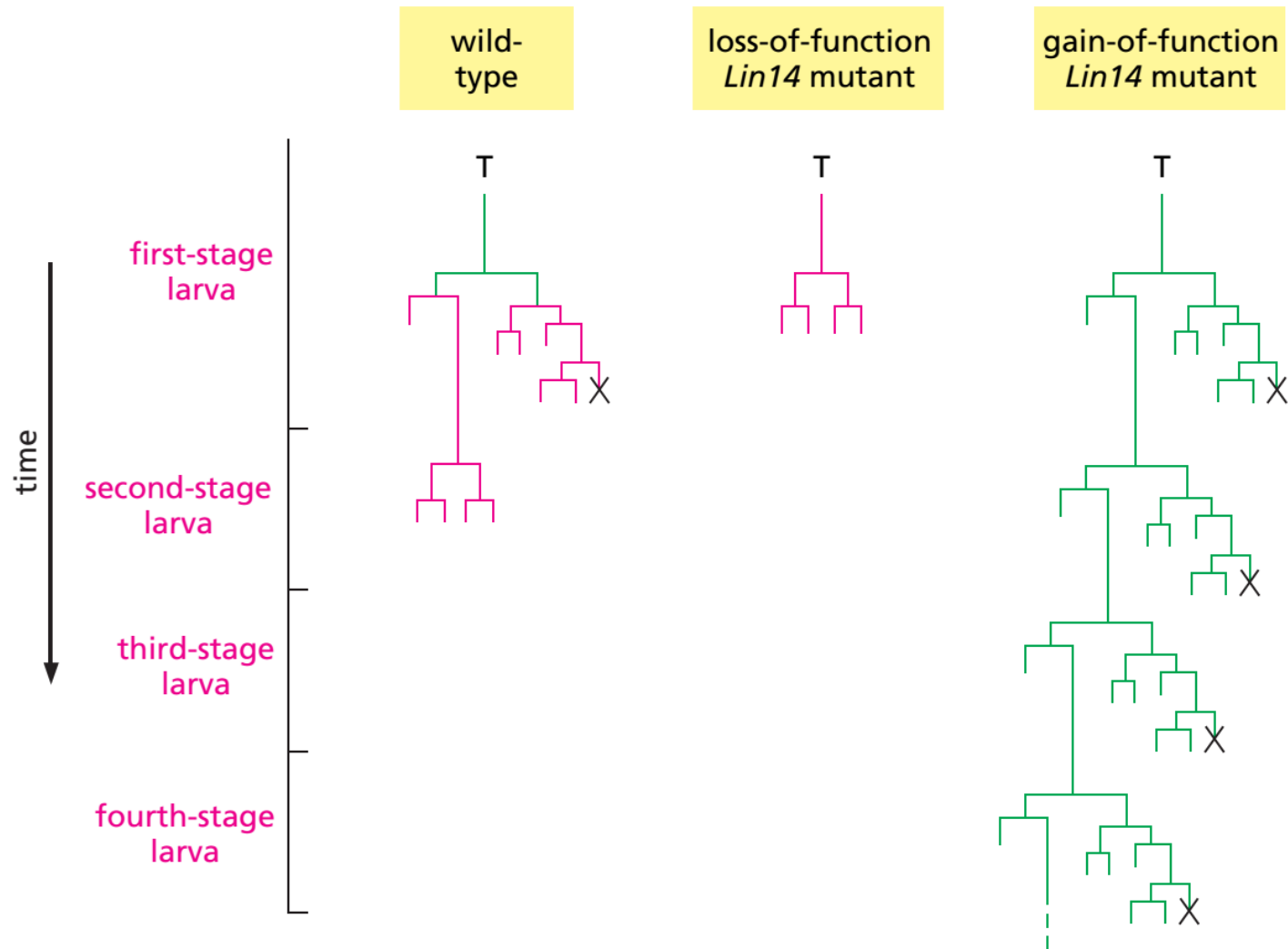
SPECIFICAZIONE CONDIZIONATA



Gastrulazione



miRNA sono I regolatori eterocronici



La funzione di un gene può essere individuata con l'interferenza a RNA

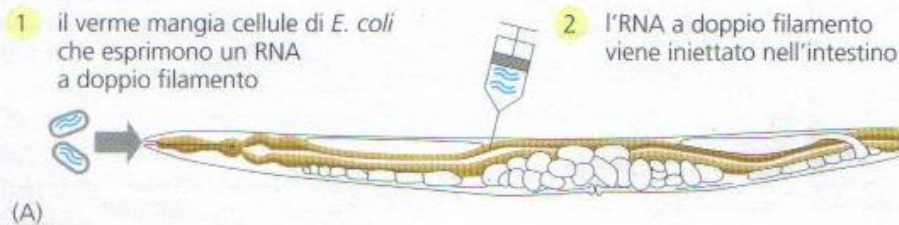
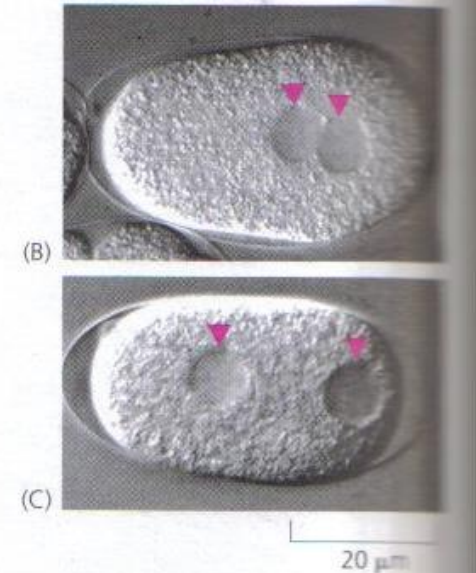


Figura 10.38 La funzione di un gene può essere individuata con l'interferenza a RNA.

(A) Si può introdurre un RNA a doppio filamento (dsRNA) in *C. elegans* (1) nutrendo i vermi con *E. coli* che esprima il dsRNA, oppure (2) iniettando il dsRNA direttamente nell'intestino dell'animale. (B) In un embrione di verme selvatico, i pronuclei dell'uovo e dello sperma (freccette rosse) si spostano insieme nella metà posteriore dell'embrione subito dopo la fecondazione. (C) In un embrione in cui un certo gene è stato inattivato con l'RNAi, i pronuclei non migrano. Questo esperimento rivela una funzione importante, ma precedentemente sconosciuta, di questo gene nello sviluppo embrionale. (B e C, da P. Gönczy et al., *Nature* 408:331-336, 2000. Per gentile concessione di Macmillan Publishers Ltd.)



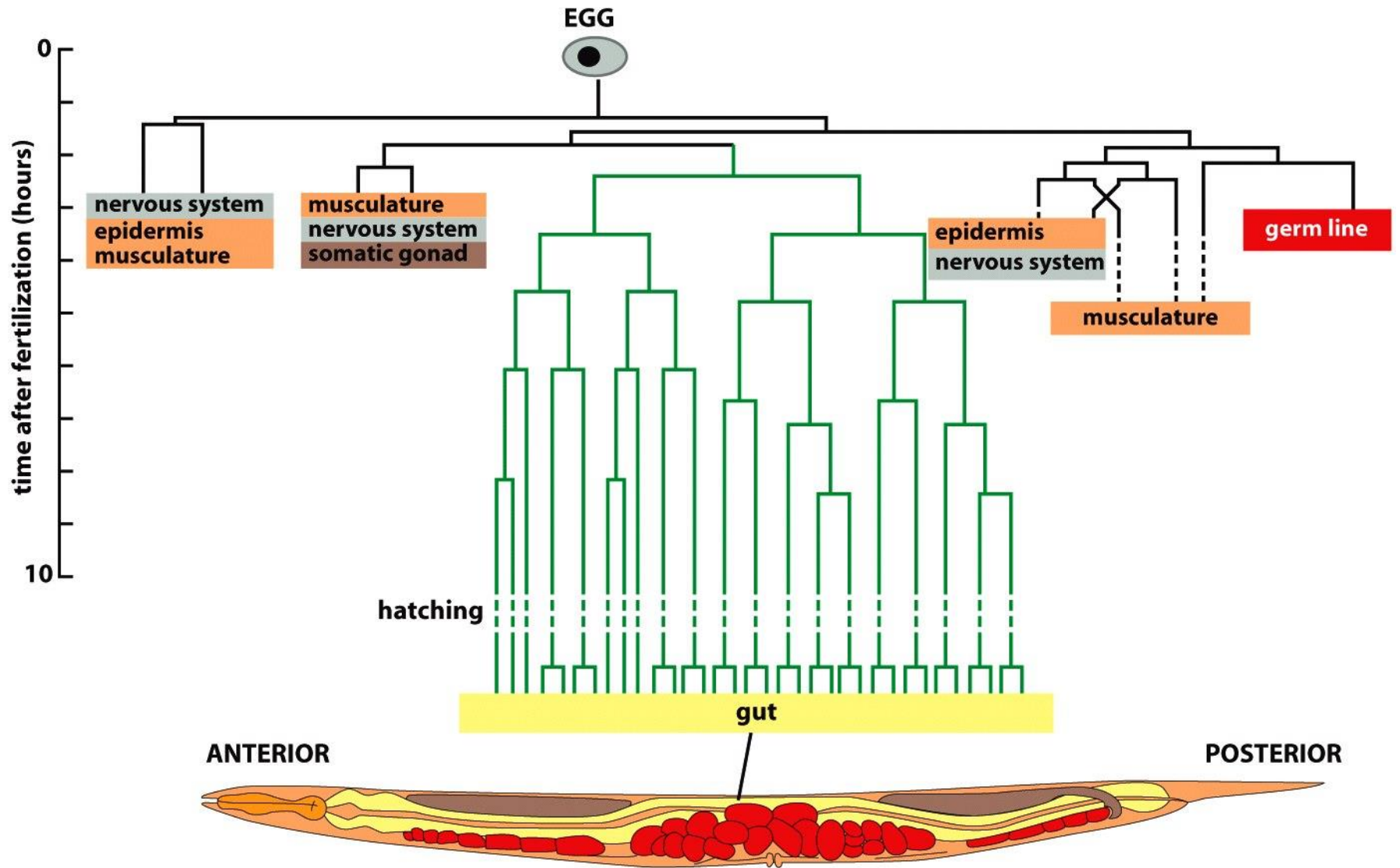


Figure 22-18 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

L'apoptosi nello sviluppo

- Scoperta in *C. elegans*, perché facilmente osservabile (noto destino di tutte le sue cellule durante sviluppo)
- Serve per arrivare ad avere il numero di cellule giusto al posto giusto
- Sviluppo della vulva

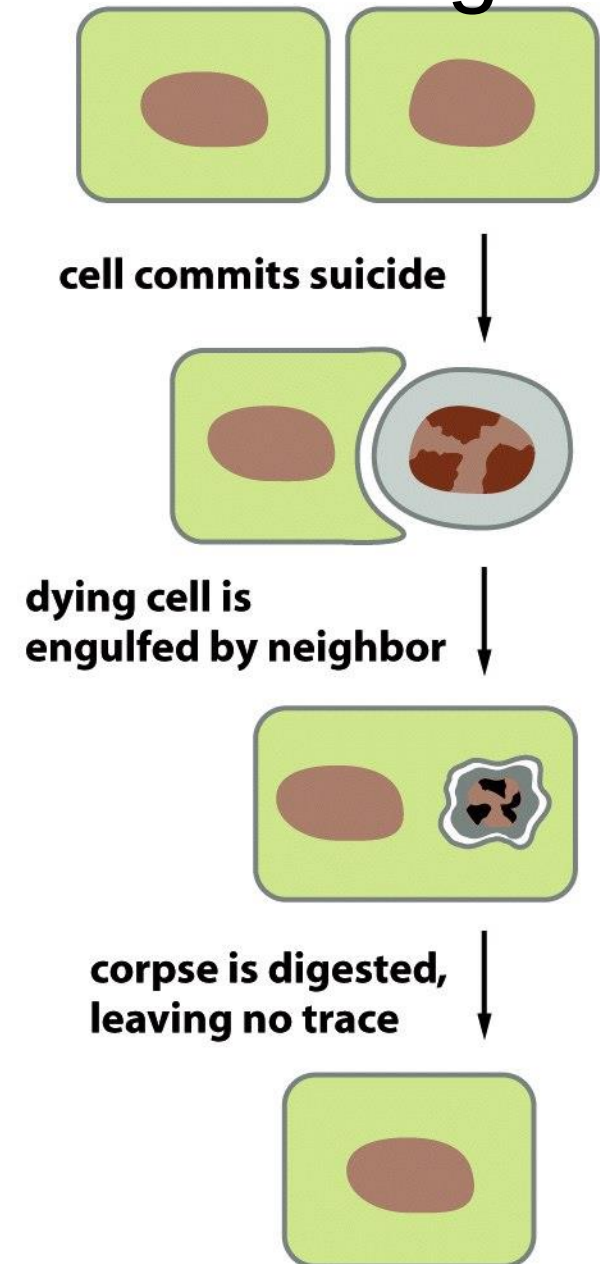
I-apoptosi e' stata scoperta nel C.elegans

Geni proapoptotici
Ced3, Ced4, Egl1

Apaf, Bad

Geni antiapoptotici
Ced9

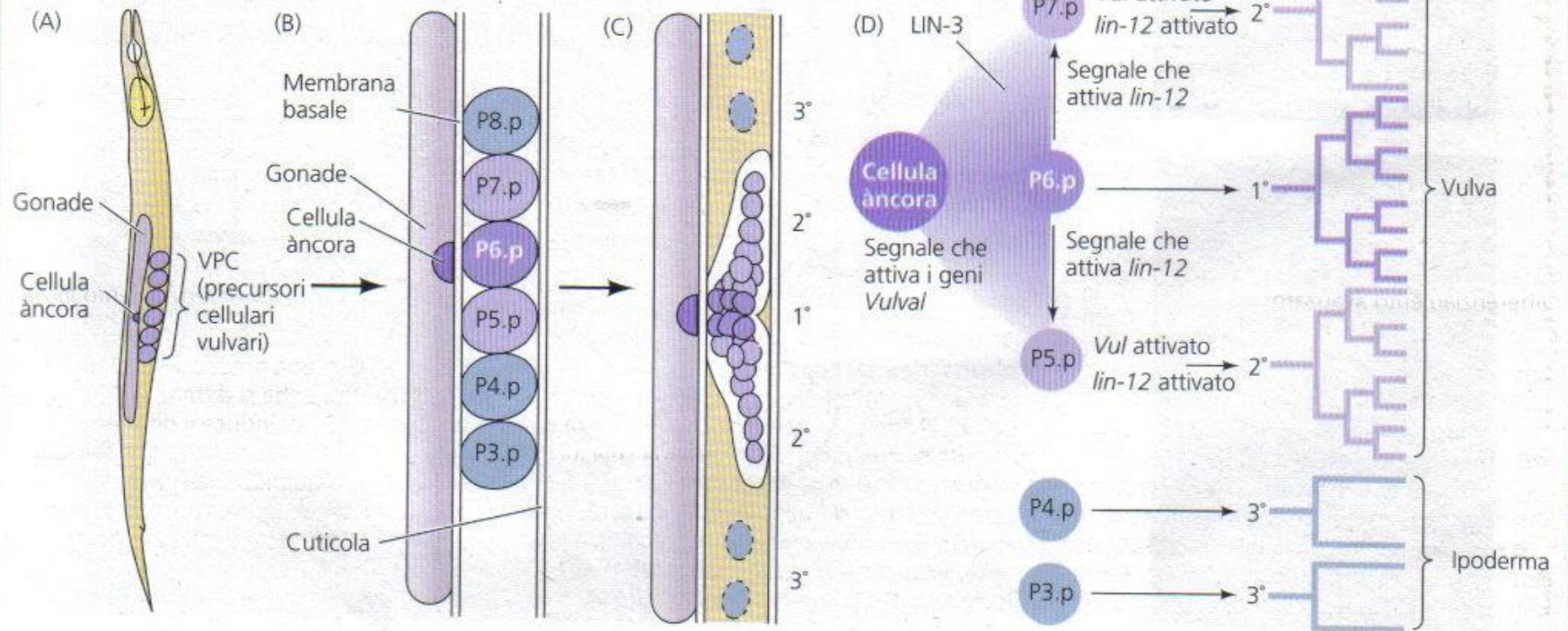
Bcl2



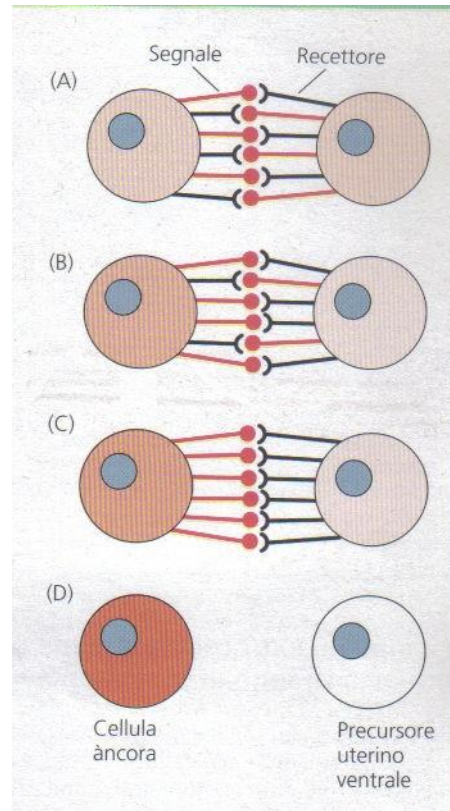
Sviluppo della vulva (C. elegans)

di discendenza di questi. La linea 1° forma le cellule vulvari centrali; la linea 2° costituisce le cellule vulvari laterali; la linea 3° genera cellule dell'ipoderma. (C) Rappresentazione schematica della vulva nella larva al

(colore viola scuro). Concentrazioni minori di LIN-3 inducono le cellule P5.p e P7.p a formare le discendenze di cellule vulvari laterali. La cellula P6.p (linea centrale) secreta anche un segnale iuxtacri-



Meccanismo formazione due cellule diverse (vulva)



LAG-2/
Delta

LIN-12/
Notch