



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**CORSO DI LAUREA**  
**SCIENZE BIOLOGICHE**

**Sviluppo e validazione funzionale della linea  
transgenica di zebrafish See-Thru-Gonad**

***See-Thru-Gonad zebrafish line: developmental and  
functional validation***

Tesi di laurea  
di:  
Specchia Vanessa

Docente Referente Chiar.ma  
Prof.ssa:  
Maradonna Francesca

**SESSIONE:** Autunnale (Ottobre 2019)  
**ANNO ACCADEMICO:** 2018/2019

## INTRODUZIONE

- Ci sono molti vantaggi nell'uso dello zebrafish come modello sperimentale: i costi relativamente bassi di mantenimento, breve tempo generazionale, rapido sviluppo embrionale, grandi embrioni trasparenti.
- Per utilizzare il pesce zebra come modello per la biologia riproduttiva, si è creata una linea transgenica, See-Thru-Gonad, di zebrafish trasparente, in cui la linea germinale è fluorescente. Una volta validata, la linea è stata utilizzata per verificare se gli effetti del knockdown genico mirato in un ovario possono persistere nella prole.





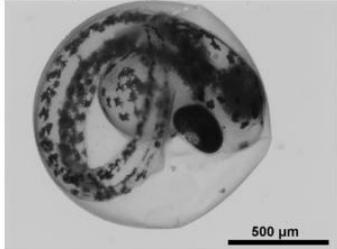
## OBIETTIVI:

- Stabilire un linea solida in biologia riproduttiva.
- Dimostrare l'applicabilità della linea transgenica per studi funzionali sui miRNA.
- Dimostrare che il miR-92a-3p è stato ereditato dalla madre e che l'effetto del knockdown genico mirato viene trasmesso alla generazione successiva.

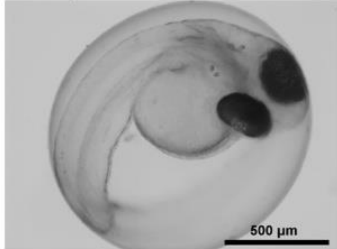
# METODI

## A Screening *nacre* (-/-) and *vasa:vasa-eGFP* 2 days post fertilization: 3000 embryos

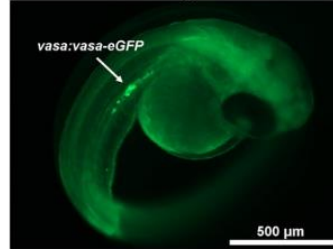
Melanophores present: 2257/3000



Melanophores absent: 743/3000

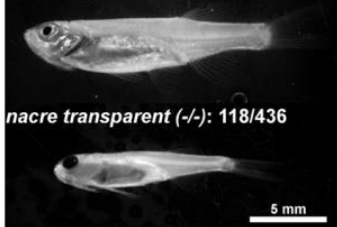


*vasa:vasa-eGFP* signal: 588/743



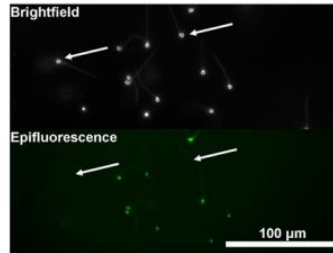
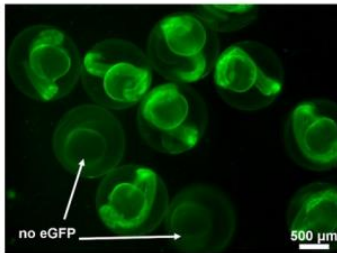
## B Screening *transparent* (-/-) 6 weeks post fertilization: 436 fish

*nacre* (-/-): 318/436



*nacre transparent* (-/-): 118/436

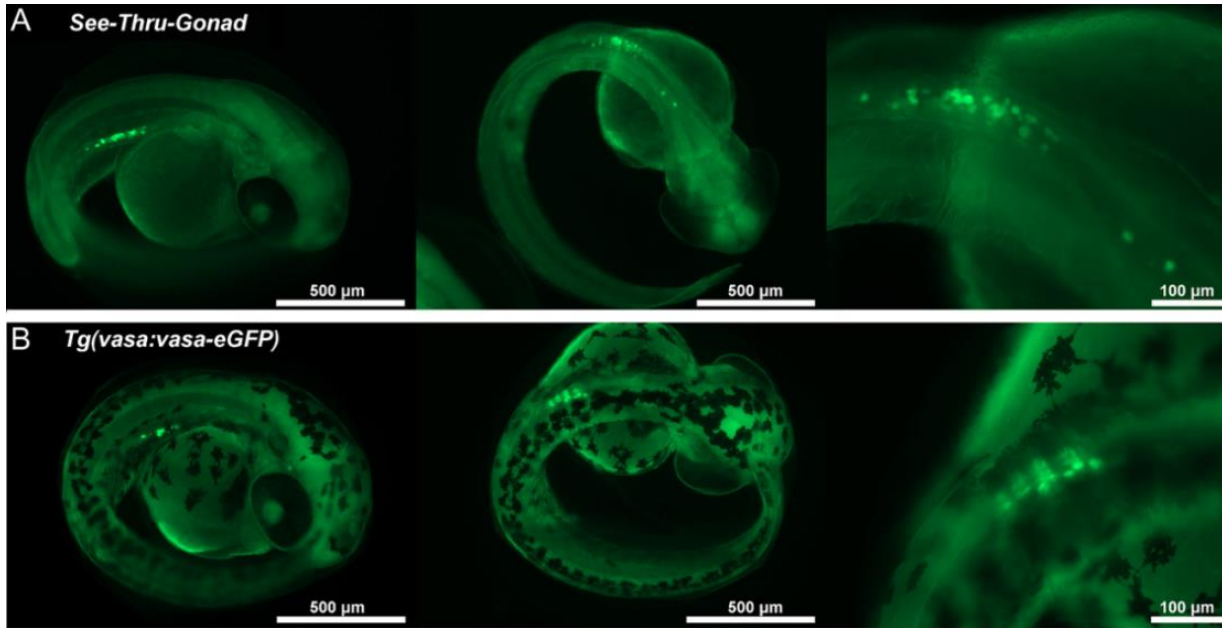
## C Screening *vasa:vasa-eGFP* zygosity



Processo di screening per creare la linea zebrafish See-Thru-Gonad.

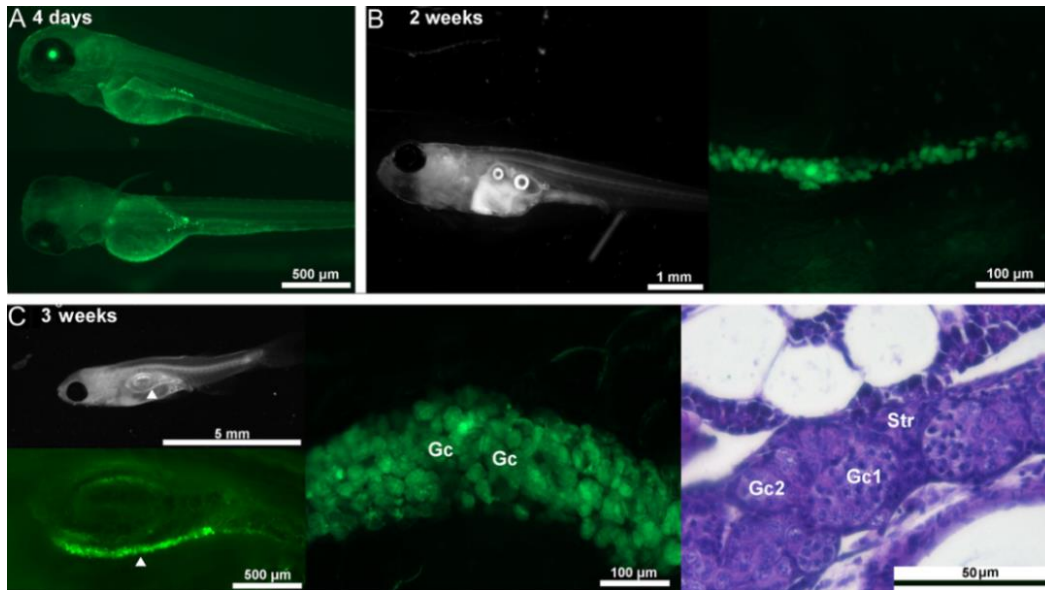
- Creazione della linea See-Thru-Gonad.
- Isolamento di DNA e RNA.
- Sequenziamento.
- Visualizzazione della linea germinale in vivo.
- Istologia gonadica.
- Knockdown di miRNA nel pesce zebra adulto.
- RT-PCR quantitativa in tempo reale.
- Analisi statistiche.

# RISULTATI



Confronto tra cellule germinali primordiali a 2 giorni dopo la fecondazione tra il (A) *See-Thru-Gonad* e (B) *zf45Tg* linee zebrafish.

- Identificazione delle mutazioni della linea transgenica *See-Thru-Gonad*.
- Visualizzazione della linea germinale in vivo.

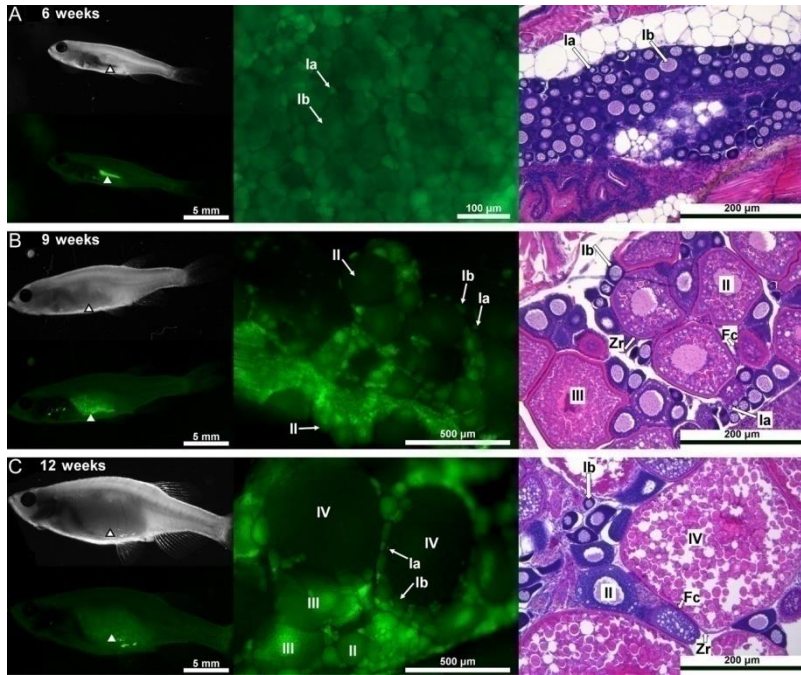


- Knockdown di miR-92a-3p.



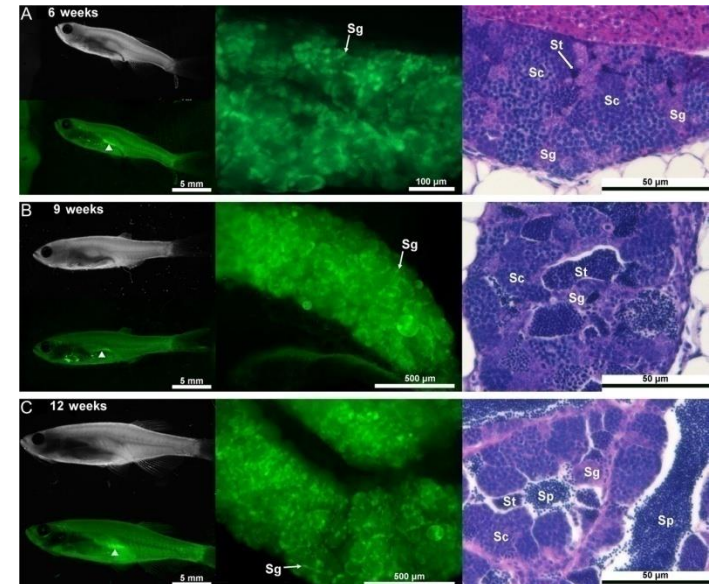
Visualizzazione della linea germinale del pesce zebra prima della differenziazione sessuale.

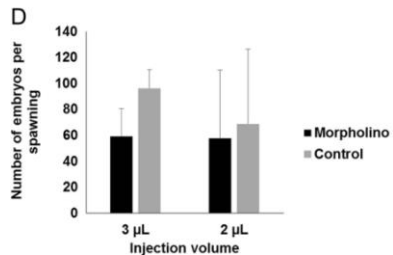
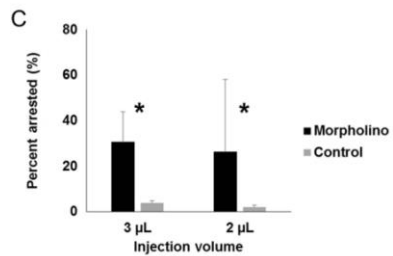
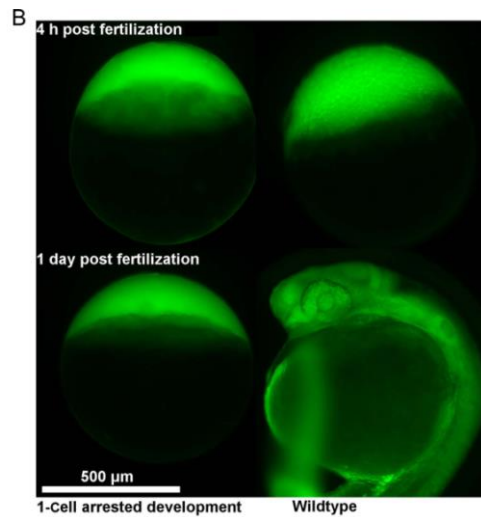
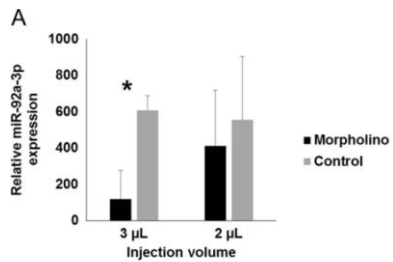




Visualizzazione della linea germinale durante sviluppo ovarico nello zebrafish a 6 (A), 9 (B) e 12 (C) settimane dopo la fecondazione.

Visualizzazione della linea germinale durante sviluppo del testicolo nello zebrafish a 6 (A), 9 (B) e 12 (C) settimane dopo la fecondazione.





Effetti del knockdown genico mirato utilizzando un antisense vivo-morpholinos (VMO) per il microRNA miR-92a-3p iniettato per indurre la maturazione di ovari di zebrafish.



## DISCUSSIONE

- Convalida genomica delle mutazioni di See-Thru-Gonad.
- Tg (vasa: vasa-EGFP) ha un'espressione specifica nella linea germinale durante lo sviluppo.
- See-Thru-Gonad fornisce un modello avanzato per l'osservazione in vivo della linea germinale.

## CONCLUSIONI

- La linea transgenica offre un segnale specifico per la linea germinale durante lo sviluppo del pesce zebra e consente un'alta risoluzione e l'osservazione dello sviluppo delle cellule germinali in vivo.
- Inoltre, l'applicazione della linea transgenica See-Thru-Gonad come risorsa per la biologia riproduttiva, è stata dimostrata eseguendo knockdown genico mirato di miR-92a-3p in ovari maturi.
- La linea See-Thru-Gonad può essere utilizzata con successo per la trasmissione verticale nella prole degli effetti del knockdown genico mirato nell'ovario.