

Zebrafisken som modellorganism

Zebrafisken är en tropisk sötvattensfisk som tillhör familjen karpfiskar. I naturen förekommer arten företrädesvis i områdena i och runt Indien. Det är en aktiv stimfisk som trivs i lugna vattendrag som t.ex. dammar och risfält.



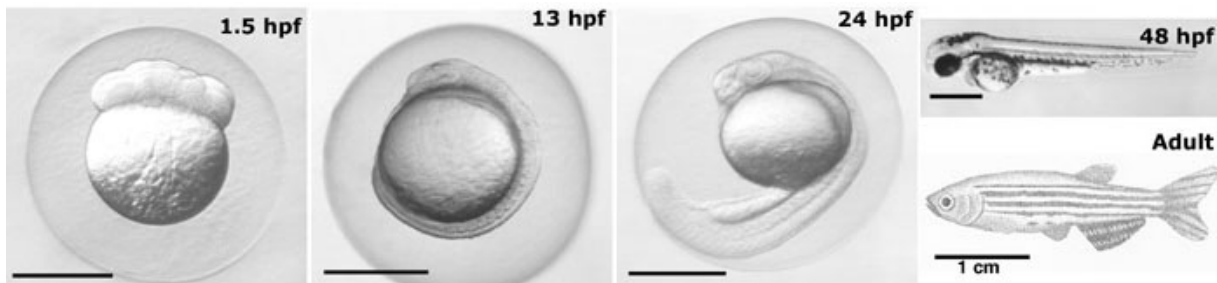
Bilden visar ett vuxet zebrafiskpar. De karakteristiska ränderna på kroppen och fenorna har gett zebrafisken dess namn. Hanen (övre) är långsmal medan honan (nedre) har tjockare buk.

Fullvuxen är zebrafisken ca 3-5 cm lång. Den genomsnittliga livslängden i fångenskap är ca 3 år. Zebrafiskar leker helst under de tidiga morgontimmarna. Arten är en "romrövare", d.v.s. de äter upp sin rom. De lägger därför sina ägg i tät vegetation för att skydda dem. Vid odling låter man zebrafiskarna lägga sina ägg i särskilda lekakvarier som separerar äggen från de vuxna djuren. Kullarnas storlek varierar men uppgår ofta till 300-400 embryon.

Embryonalutvecklingen

Zebrafiskens utveckling är mycket lik embryogenesen hos högre vertebrater, såsom människor. Till skillnad från däggdjur så utvecklas zebrafiskembryos utanför honan vilket gör det möjligt att studera växande embryon i deras "naturliga" miljö. Detta underlättas ytterligare av att embryona är genomskinliga under den första tiden.

Den embryologiska utvecklingen är mycket snabb. Inom 24h har de flesta organ bildats och efter 3 dagar kläcks embryona ur sin skyddande hinna och börjar leta efter mat. Efter 3-4 månader är zebrafisken sexuellt mogen och kan generera ny avkomma.



Zebrafiskens utvecklingsstadier: hpf = timmar efter befruktning. Omarkerad skala indikerar 0.5 mm. (Bild tagen från <http://www.nwfsc.noaa.gov>).

Zebrafisken som modellorganism

Zebrafisken har simmat upp som en vanlig modellorganism. Orsakerna till detta är många. Bland annat kan nämnas att den externa utvecklingen gör det lätt att manipulera embryon, genomskinligheten gör det enkelt att följa utvecklingen utan att alltför mycket interagera med embryot. Zebrafiskens storlek gör att det går att hålla många djur på en liten yta och därmed dras kostnaderna ned. Eftersom det är en vertebrat är det mer troligt att processer fungerar på ett liknande sätt som i högre vertebrater, såsom människa, än om jämförelser görs med andra modellorganismer t.ex. *Drosophila* eller *C. elegans*. Zebrafiskgenomet delar ca 70% homologi med det mänskliga genomet.

Det finns många mutanter tillgängliga som har påverkad utveckling och vissa fungerar som modeller för mänskliga sjukdomar. Dessa mutanter kan hjälpa oss att förstå de genetiska nätverk som ligger bakom många processer under utvecklingen både vad gäller zebrafisk och människa.

Vanliga tekniker

Tekniker som används i zebrafisk fokuserar på två områden: manipulation och visualisering. P.g.a. den externa utvecklingen är det enkelt att exponera embryot för molekyler t.ex. injektion av läkemedel, gifter, DNA, RNA eller morpholinos. En morpholino är en syntetisk oligonukleotid som designas specifikt mot mRNA producerat av en gen. Morpholinon injiceras in i embryot på en-cellstadiet och binder till mRNA och förhindrar proteinuttryck. På det här viset kan man studera avsaknaden av en genfunktion i upp till fem dagar. Ett växande område är screening av läkemedel eller miljögifter. Zebrafisken kan ta upp många ämnen direkt genom huden. Den lilla storleken gör att små mängder av molekylerna behövs och många djur kan screenas parallellt. Dessa egenskaper gör zebrafisken till ett mycket kostnadseffektivt alternativ till dessa tester.

Genom introducering av ett designat konstrukt, som uttrycker ett fluorescerande protein styrt av en specifik promotor, in i embryot kan processer följas visuellt. Om konstruktet integreras in i arvsmassan i könscellerna har en transgen fisklinje producerats. Det finns en rad transgena zebrafisklinjer som används för att studera olika processer inuti och mellan celler.

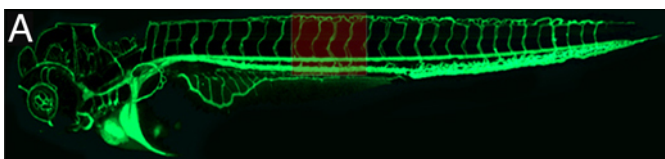
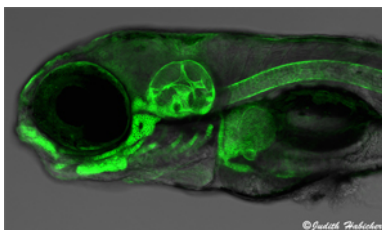


Bild på ett transgent zebrafiskembryo som uttrycker GFP under *fli1a* promotorn. GFP uttryck ses i blodkärl samt vissa delar av käken.



En bild tagen i konfokalmikroskop på en transgen med GFP uttryckt under en collagen-promotor. Uttryck visas i gälbågar och notochord. (Bild: Judith Habicher)

En bra artikel som tar upp och förklarar flera olika metoder i zebrafisk finns på:

<http://www.labome.com/method/Current-Methods-in-Zebrafish-Research.html>

Nedan listas några filmer och bilder som kan användas vid studier av zebrafisk:

Embryonalutvecklingen hos zebrafisk

Det finns många filmer man kan använda för att titta på de tidiga utvecklingsstadierna nedan följer några.

1.

<http://www.youtube.com/watch?v=-f3C7fhSjR4>

Filmen visar zebrafiskutvecklingen från en-cellstadiet till 32-cell stadiet.

Reference. N. Olivier et al Science 20 August 2010: vol 329 no 5994, pp. 967-971

2.

<http://www.youtube.com/watch?v=P5yoVT6AGZQ>

Filmen visar zebrafiskutvecklingen från sphere (4 hpf) till 17 somite stadiet (17,5 hpf). Filmen visar formering av huvudet med inmärkta celler.

3.

<http://www.youtube.com/watch?v=moL5C8SjeJU>

Filmen visar delningar och morfologiska förflyttningar under zebrafiskutvecklingen. Den startar på en-cellstadie och slutar på ca 17 somite stadiet (ca 17 timmar efter befruktning).

Embryonalutveckling hos andra djur

Det finns också filmer som visar embryonalutvecklingen hos andra djur.

<http://www.youtube.com/watch?v=OTppmGEYv0s>

Den tidiga embryonala utvecklingen är mycket lik om man jämför mellan olika vertebrater. I denna länk visas en stillbildsfilm på en kycklings utveckling från ägg till kyckling.

Den tidiga embryonalutvecklingen hos zebrafisken samlad i en artikel

På nätet finns en artikel från Science, 2008 där de på olika sätt har filmat den tidiga embryonalutvecklingen hos zebrafiskar. <http://www.embl.de/digitalembryo/fish.html>.

Förklaringar till bilderna:

För att förstå filmerna som finns i artikeln kan man börja med att titta igenom stillbilderna (<http://www.embl.de/digitalembryo/fish.html#Figures>). En kort förklaring till bild 2, 3, 5, 6, och 8 ses nedan.

Bild 2.

Avbildning och konstruering av zebrafiskens embryogenes (Keller et al, Science 2008)

- A. Max-intensitet projektion (vänster) och digital rekonstruktion (höger) av ett vildtyps zebrafisk embryo som är inmärkt med ett fluoroscerande protein i kärnan (movie 2 och 3). Bilden visar hur embryot ser ut vid olika tidpunkter och utvecklingsstadier. Färgkoder visar rörelsehastigheter: 0 $\mu\text{m}/\text{min}$ = cyan, 1.2 $\mu\text{m}/\text{min}$ = orange. Skalstreck 100 μm .

- B-D.** Närbilder från inramningar i **A** visar subcellulär upplösning av olika delar av embryot. Skallstreck i **B**, 10 μm och i **C** och **D**, 30 μm .
E. Kärnans morfologi i en delande blastomere från movie S7. Skallstreck, 10 μm , *t*, time.

Bild 3.

Spårning och detektion av celler vid celldelningar i det digitala embryot.

- A.** Mikroskopdata (högra delen av embryot, animal vy, maxprojektion) och digitalt embryo (vänstra delen av embryot) med färgkodade migrationsriktningar (movie S9). Färgkod: dorsal migrering (cyan), ventral migrering (grön), mot eller bort från kroppssaxeln (red eller gul), mot gulesäcken (rosa).
B. Delande celler (röda) och deras doterceller (blå). Film S10 och fig S6B visar hela perioden mellan 1.7 -6.7 timmar efter befruktning. Gul, röd och grå överläggning visar utvecklingen av de perifera vågorna av celldelning under delningscykel 12 (pilar visar riktningen på de perifera vågorna: $t_0 = 216$ min, se även fig 4).

Bild 5.

Mesendodermets internalisering och migration i den dorsala och ventrala hemisfären.

Vyer framifrån och från sidan på skivor av den dorsala (shield region, höger) och ventrala (mittemot shield, vänster) hemisfären. Fyra cellpopulationer spårades (film S16): gröna eller gula kärnor är i tidig eller sen embolisk våg, blå kärnor är i den främre delen av epiboly och rosa kärnor är inte internaliserade. Orange och vita pilar indikerar hypoblast och epiblast cellrörelser. Skallstreck, 100 μm .

Det är lättare att förstå bilden och de olika stadierna om man jämför med "panelen av zebrafiskstadier" som finns i en länk längst ber i detta dokument.

Bild 6.

En modell av hur mesendoderm bildas i zebrafisk. Hypoblasten bildas i en synkroniserad internaliseringsvåg runt hela embryokroppen ("deposition"). På den dorsala sidan, blir internaliserade celler fördelade längs med hela framtida kroppssaxeln ("stretching"). På den ventrala sidan, förflyttar sig den internaliserade ringen av hypoblastceller mot den vegetativa polen. Ringen stängs vid den vegetativa polen ("zippering") och avslutar bildningen av hypoblasten. Orange pilar indikerar hypoblastens cellrörelser. grå pilar indikerar epiboly.

Bild 8 (supplementary fig 2): Immunofärgning mot acetylerat tubulin vilket visar nervsystemet på en Medaka fisk. **A.** Huvudvy, visar förhjärna, mellanhjärna, bakhjärna och vänstra ögats retina. **B.** Helkroppsvy i olika vinklar. Uppifrån: dorsal (ryggvy), lateral (sidovy) och ventral (bukvy).

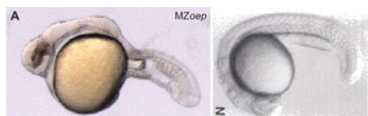
Förklaringar till filmerna:

Movie 2 visar hur cellerna migrerar i den tidiga embryonalutvecklingen. Ett zebrafiskembryo i en-cellstadiet injicerades med H2B:eGFP mRNA. H2B är en gen som uttrycks i kärnan av alla celler och introduktion av H2B:eGFP mRNA innebär att alla celler kommer få GFP (green fluorescent protein) uttryckt i cellens kärna. Filmen snabbspolar igenom den tidiga utvecklingen från 64-cellstadiet till 17 somite stadiet vilket motsvarar ca 17 timmar efter befruktning. Embryot är filmat från två olika vinklar, den animala hemisfären (den övre delen av embryot som innehåller små snabbt delande celler) och den vegetativa hemisfären (den nedre delen av embryot med större mer långsamt delande celler).

Movie 3: Rekonstruering av embryoutvecklingen hos zebrafisk

I movie 3 har man digitaliserat cellerna i movie 2 och sedan färglagt dem beroende på migreringshastighet. Kärnor märkta orange har en medelhastighet på 1,2 $\mu\text{m}/\text{min}$ eller mer, medan en blåaktig kärna i det närmaste står still. Mellanliggande hastigheter visas genom linjär interpolering längs färggradienten.

Movie 4 visar istället en mutant zebrafisks utveckling ur dorsal (ryggperspektiv, visar huvudet och övre ryggdel) och ventral (bukperspektiv, visar svansdel) vinkel. Om man jämför huvudets struktur i movie 2 och movie 4 så kan man se att mutanten har en mindre kompakt struktur, vilket beror på att cellerna inte har migrerat till rätt position. Bilden nedan visar hur mutanten i filmen ser ut 22 timmar efter befruktning jämfört med ett vildtypsembryo.



vänstra bilden: moep mutant, 22 hpf (Londin et al 2005).

Högra bilden: vildtypsembryo, 22 hpf (Kimmel et al 1995).

Movie 7 visar den animala delen av det tidiga embryot, dvs den delen som har celler med hög celldelningshastighet som ska bilda embryot (vänster bild: vy uppifrån, höger bild: vy från sidan). Embryot injicerades i en-cellstadiet med H2B:eGFP mRNA. Filmen startar 1.6 timmar efter befruktning då embryot är i övergången mellan 32- och 64-cellstadiet och slutar då embryot är ca 18 timmar gammalt. Vid 1100 min ser man huvudet och den övre delen av ryggen i den vänstra filmen och embryots rygg från sidan i den högra filmen.

I **Movie 11** har man gjort bakåtkompilering av hur cellerna som ska bilda retinan förflyttar sig under den tidiga utvecklingen. Celler som ska bilda ögats retina har färgats in röda medan övriga celler i det digitala embryot är grå. Cellerna identifierades då de hade nått sin position i ögat och deras förflyttning spårades bakåt för att kunna följa hur de celler som ska bilda ögat uppför sig under utvecklingen.

Filmer på olika organ hos zebrafisk

Zebrafiskens hjärta.

<http://www.youtube.com/watch?v=Hc9TmAxoSEY>

I filmen är myokardiet (hjärtmuskulaturen) färgat grönt medan blodkärl och endokardium (den hinna som skiljer myokardiet och blodet) är färgat rött.

Nervceller.

<http://www.youtube.com/watch?v=sUL8oEhkvv0>

Filmen visar en nervcell från en zebrafisk i en cellkultur. Man ser den dynamiska processen då axonens ”spetscell” aktivt söker av omgivningen för att finna de signaler som dirigerar var den ska migrera.

Immunförsvaret hos en zebrafisk.

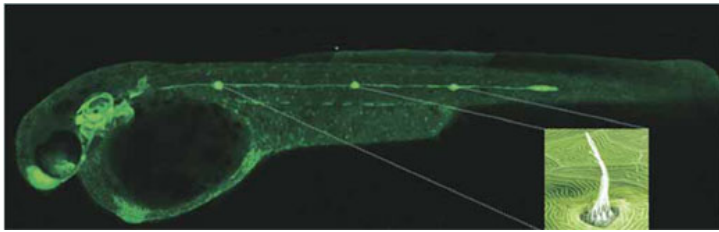
<http://www.youtube.com/watch?v=pqtSuCA0ZjY>

Filmen är tagen under 13 timmar och visar svansvävnad med en sårskada hos en 3 dagar gammal zebrafisklarva. De infärgade gröna cellerna är neutrofiler vilka kan ses vandra mot den skadade svanstippen.

Bildandet av zebrafiskens sidolinje.

<http://www.youtube.com/watch?v=IpmHr8Q3I-Y>

Sidolinjen i zebrafisk är ett känselorgan som består av känsliga receptorer placerade längs med fiskens sida. Receptorena hjälper dem upptäcka rörelser och vibrationer i omgivningen. Filmen visar i hög förstoring under 4 timmar hur dessa celler migrerar längs med kroppen för att bilda zebrafiskens sidolinje.



Bilden visar hur sidolinjen löper längs med zebrafiskens kropp. Den börjar bakom örat och rör sig mot svansen och lämnar ett spår som är ca 2-celler brett. Med jämna mellanrum uppkommer små cellklustrar som med tiden utvecklas till hårcellsorgan, vilket visas i bilden till höger. (bild tagen från <http://www.scienceinschool.org>, visas med tillstånd av Darren Gilmour, EMBL)

Övningar på den tidiga embryonalutvecklingen som kan användas i skolan

<http://zfic.org/virtual%20experiments/index.html>

Det finns en webbsida som heter ZFIC, Zebrafish in the Classroom <http://zfic.org/>

På den sidan finns det två virtuella experiment som man kan låta eleverna genomföra.

Den ena övningen heter *Developmental Staging Experiment*. En övning där embryonalutvecklingen förklaras och där eleverna sedan ska lägga bilder på olika stadier av zebrafiskens embryonalutveckling i ordning.

Den andra övningen heter *casanova Mutation Experiment* Där kan man se hur mutationer påverkar hjärtbildningen i en zebrafisk. Tyvärr tar det ganska lång tid att ladda upp filmerna i den övningen så det är bra att göra det innan man börjar.

Exempel på undersökningar som har gjorts på zebrafiskar

<http://www.jove.com/video/3781/infection-of-zebrafish-embryos-with-intracellular-bacterial-pathogens>

I den här länken infekteras zebrafiskar med patogena bakterier för att förstå hur immunsystemet reagerar på infektionen. Makrofager som uttrycker GFP och bakterier som uttrycker dsRed gör det enkelt att, i mikroskop, följa dess beteende under infektionen.

Här kan det hända att elever reagerar på metoden vilket ger möjlighet att ta upp ” Cell- och molekylärbiologins användningsområden. Möjligheter, risker och etiska frågor”.

Andra artiklar

Inflammation påverkar könet hos fiskar:

<http://forskning.se/nyheterfakta/nyheter/pressmeddelanden/inflammationpaverkarkonethosfiskar.5.624551a313a0929443b28f.html>

En artikel införd i forskning.se 2012-10-04.

Nya rön om zebrafiskens självläkande hjärta:

<http://sverigesradio.se/sida/artikel.aspx?programid=406&artikel=3580983>

Publicerat fredagen 26 mars 2010 på Vetenskap & miljö. Sverigesradio

Panel av bilder på olika zebrafiskstadier

<https://medschool.vanderbilt.edu/pattonlab/zebrafish>

<http://www.ece.ucsb.edu/~sandeepkhat/downloads.html>