

Onderzoek naar het ontstaan van darmontstekingen: het zebravismodel

Sylvia Brugman, Maria Forlenza, Geert Wiegertjes

Leerstoelgroep Celbiologie en Immunologie, Departement Dierwetenschappen, Wageningen Universiteit en Research; sylvia.brugman@wur.nl

Inleiding

De laatste jaren is het gebruik van de zebra-*vis* als proefdier toegenomen. Eerst werd de zebra-*vis* vooral gebruikt door de ontwikkelingsbiologie, maar de laatste jaren zien we een toename van het gebruik van de zebra-*vis* voor toxicologisch en immunologisch onderzoek.

In de eerste weken van het leven is de zebra-*vis*larf transparant. De karakteristieke zebra-strepen verschijnen pas later. Tegenwoordig zijn er veel verschillende 'transgene' vissen te verkrijgen. Transgene vissen hebben een fluorescent label aan bepaalde eiwitten of cellen die het visje maakt. Dit maakt het mogelijk om -vooral in de eerste weken waarin de zebra-*vis* nog transparant is- bepaalde cellen of eiwitten met behulp van de fluorescentiemicroscopie in levende dieren te bestuderen (afb. 1).

*Afbeelding 1: mpx:eGFP,mpeg:mCherry dubbel transgene zebra-*vis*. De afweercellen hebben een fluorescent label; neutrofielen een groen en de macrofagen een rood label (clusters worden geel).*



Voor het bestuderen van de darm zijn deze transgene vissen een uitkomst. In dieren, maar ook mensen, met darmontstekingen weten we vaak niet goed wat de oorzaak van de ontsteking is. Bij mensen met chronische darmontstekingen (IBD), zoals de ziekte van Crohn of colitis ulcerosa, spelen genetische gevoeligheid en omgevingsfactoren een rol, die voor elke patiënt anders kunnen zijn. Als patiënten in het ziekenhuis komen is er al sprake van darmontsteking en is het erg lastig de oorzaak te achterhalen. Ook weten we niet welke cellen een rol hebben gespeeld bij het ontstaan van de ontsteking. Was er een probleem met de darmbarrière en de darmwandcellen waardoor de ontsteking onstond of waren het bepaalde afweercellen die een ontstekingsreactie veroorzaakten? Voor dit soort vragen doen we onderzoek met behulp van de zebrafish. Hieronder zullen we korte voorbeelden geven van ons onderzoek.

Onderzoek naar genetische aanleg voor darmontstekingen

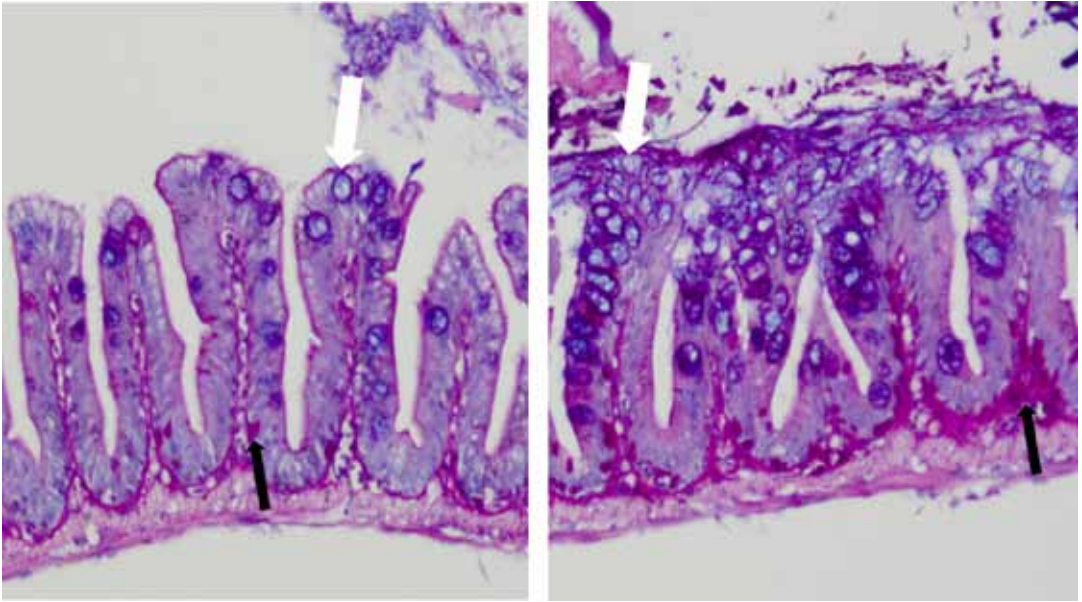
Genetisch onderzoek bij mensen met chronische darmontstekingen (IBD) heeft aangetoond dat er meer dan 160 genen in het DNA geassocieerd worden met de darmontsteking (1). Dit betekent dat mutaties in deze genen bij deze mensen het risico verhoogt op het krijgen van een darmontsteking. Van veel van deze genen is de functie bekend, alleen weet men vaak niet waarom een mutatie in een bepaald gen de gevoeligheid van de persoon voor het ontwikkelen van darmontstekingen vergroot. Met behulp van diersystemen kunnen we de mutaties namaken en kijken wat het effect is van de mutatie op de darmgezondheid. Een vereiste is dan natuurlijk wel dat het gen geconserveerd is in het proefdier. Met andere woorden: heeft het proefdier hetzelfde gen en heeft dat gen dan ook dezelfde functie? Alleen wanneer aan deze voorwaarden is voldaan, heeft het zin om een proefdier te gebruiken om de genetische gevoeligheid te bestuderen.

Wij hebben recent onderzoek gedaan naar een mutatie in het gen voor macrofaag-stimulerend eiwit (Msp). Mutaties in dit gen worden geassocieerd met chronische darmontsteking in mensen. Het gen speelt een rol bij het gezond houden van de darmwand en is betrokken bij de functie van bepaalde afweercellen: de macrofagen. In zebrafish is het gen aanwezig en lijkt dezelfde rol te vervullen. In ons onderzoek hebben we een mutatie aangebracht in het Msp-gen en gekeken naar de ontwikkeling van de darm. Na bestudering van de darmweefsels van volwassen vissen werd duidelijk dat met name de speciale darmwandcellen aangedaan leken (2). De slijmbekercellen, die de darmwand voorzien van een beschermende slijmlaag, leken meer geactiveerd te zijn in de vissen met de mutatie in Msp dan in vissen zonder de mutatie (afb. 2). Op dit moment kijken we naar het effect van de mutatie op de macrofagen in transgene vissen waarin de macrofagen een fluorescent label hebben.

Met behulp van de nieuwe techniek CRISPR-Cas9, waarmee het mogelijk wordt heel specifieke mutaties aan te brengen in het DNA van de zebrafish, kunnen we nog veel meer genen die geassocieerd zijn met darmontstekingen onderzoeken. In combinatie met de transgene zebrafish kunnen we de invloed van deze mutaties in de toekomst dus ook in levende dieren bestuderen.

Onderzoek naar de rol van de darmbacteriën op het ontstaan van darmontstekingen

De laatste jaren is duidelijk geworden dat de darmflora een belangrijke rol speelt in de gezondheid van mens en dier. Verstoringen van de samenstelling van de darmflora waarbij mogelijke pathogene bacteriën uitgroeien of verstoringen in de interactie tussen de gastheer en de bacteriën, worden in verband gebracht met ziekten zoals diabetes en multiple sclerose (MS) maar ook met obesitas (zwaar overgewicht). Men denkt dat in subgroepen van patiënten met chronische darmontsteking de genetische gevoeligheid in samenspel met de samenstelling van de darmflora een rol speelt bij het ontstaan van de darmontsteking. Behandeling van deze patiënten met antibiotica vermindert soms de ontstekingsklachten en recent is er klinisch onderzoek gedaan waarbij patiënten met een chronische darmontsteking (IBD)



Afbeelding 2: Histologie van de darm van 14 week oude zebravissen. *Msp*^{+/+} (wildtype) links en *Msp*^{-/-} (vissen met mutatie in *Msp*) rechts. Witte pijlen: Slijmbekercellen, Zwarte pijlen: afweercellen.

een poeprtransplantatie ondergingen en hiermee in remissie (een ontstekingsvrije periode) terecht kwamen (3). Het idee van de poeprtransplantatie is dat de darm van de patiënt eerst leeg wordt gemaakt; alle eigen -mogelijke verstoorde- darmflora worden verwijderd. Vervolgens krijgt men via een slangetje poep van een gezond persoon toegediend. Een gezonde darmflora kan zich nu vestigen en dit zou de ontsteking tegengaan. Ook in muismodellen voor IBD is aangetoond dat de samenstelling van de darmflora een rol speelt bij het ontstaan van darmontsteking. Wij hebben aangetoond dat dit ook in zebravissen het geval is. De gevoeligheid voor darmontsteking is veel minder in zebravissen die het antibioticum 'vancomycine' kregen toegediend. Deze vissen hadden na het antibioticum een gezonde darmflora die gedomineerd werd door *Cetobacterium somerae*, een in zoetwatervis veelvoorkomende bacteriesoort (4).

Door kiemvrije zebravissen op te kweken (zebravissen zonder bacteriën op en in het lijf) kunnen we het effect van verschillende bacteriën op het ontstaan van darmontstekingen tot in detail onderzoeken.

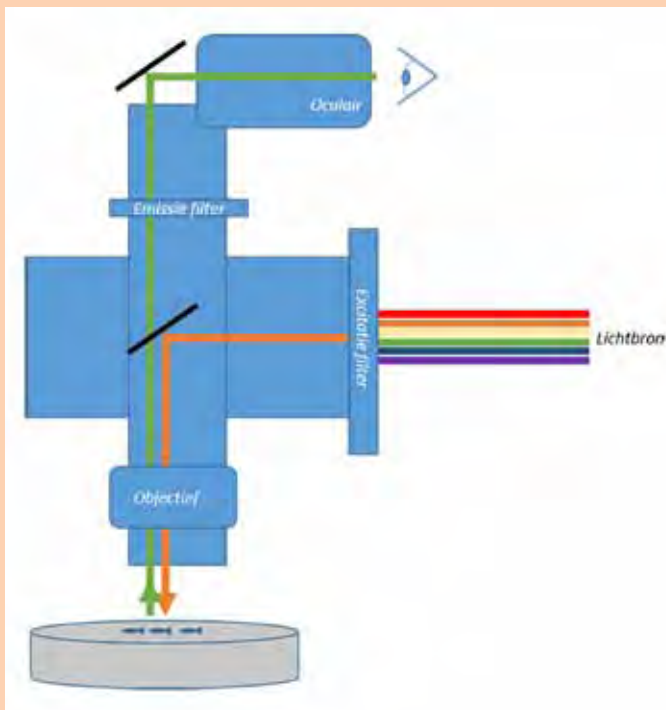
Onderzoek naar de rol van voedingsstoffen op het ontstaan van darmontstekingen

Met de toename van de wereldbevolking neemt de voedselvraag, en daarmee de vraag naar dierlijke eiwitten, toe. Deze ontwikkeling heeft wereldwijd geleid tot een toename van de consumptie van kweekvis. Kweekvis wordt met name gevoerd met vismeel (gemalen vissen). Echter, voeren van vismeel is niet duurzaam. Om 1 kg zalm te voeren heeft men 1,4 kg vismeel nodig. Met de toename van de kweekvisindustrie wordt de vraag naar vismeel steeds groter. Het vismeel wordt schaars en duur. Daarom is de kweekvisindustrie al tientallen jaren op zoek naar een goed alternatief voor vismeel. Men dacht dit gevonden te hebben in sojameel. Echter, toen veel van de dierlijke eiwitten van het vismeel vervangen werden door soja eiwitten ontstond er een probleem. Sommige kweekvissen kregen darmontstekingen van het sojameel. Na onderzoek werd aangetoond dat vooral de in het sojameel aanwezige saponinen de boosdoeners waren. In ons nieuwe project, gehonoreerd door NWO (Nederlandse Organisatie >>

voor Wetenschappelijk Onderzoek), gaan we samen met een visvoerproducent op zoek naar beter voer voor kweekvissen. In dit project willen we met behulp van zebravissen bepalen of nieuwe voeders darmontsteking kunnen veroorzaken of juist gezondheid-bevorderende effecten hebben. We gebruiken hiervoor de transgene vissen om te kijken naar de reactie van afweercellen onder de microscoop. Ook kijken we naar de darmpermeabiliteit (als maat voor schade) en naar de darmflorasamenstelling. Met behulp van de zebravis zijn we in staat om voeders te testen voordat het grootschalig wordt toegepast op kweekvis. Hiermee hopen we een steentje bij te dragen aan de gezondheid van kweekvissen wereldwijd.

Conclusie

Het gebruik van zebravissen als model voor de immunologie neemt hand over hand toe. De ontwikkeling van allerlei biotechnische hoogstandjes zoals CRISPR-Cas9, geavanceerde microscopische technieken en het ontwikkelen van verschillende transgene vissen heeft ervoor gezorgd dat we het afweersysteem in detail kunnen bestuderen. Zoals we hebben geprobeerd te illustreren in dit artikel, stelt de zebravis ons in staat meer te begrijpen van darmontstekingen en hoe deze tegen te gaan, door zowel op het fundamenteel-wetenschappelijke als op het toegepaste vlak veel kennis toe te voegen. De zebravis heeft zijn strepen zo wel verdiend!



Bekijken van levende zebravissen onder de fluorescentie microscoop

Voor het bestuderen van levende zebravissen onder de fluorescentie microscoop verdooven we de vissen eerst met een gebufferde oplossing van MS-222 (Tricaine). Vervolgens bedden we de larven in agarose gel in. Hiervoor gebruiken we een ultra-pure variant met een lage smeltemperatuur. De visjes worden, als ze verdoofd zijn, met pincetten zorgvuldig gepositioneerd zodat de darm goed zichtbaar is. De vissen liggen op hun zij in de gel. Vervolgens bekijken we de vissen onder de fluorescentie microscoop. De fluorescentie microscoop maakt gebruik van het feit dat sommige stoffen geabsorbeerde energie

binnen zeer korte tijd weer uitzenden als licht. Dit licht heeft een andere golflengte dan het aanstralende licht. We noemen de lichtbron die naar het preparaat wordt gezonden 'excitatie' en het licht dat vervolgens weer wordt uitgezonden 'emissie'. Door gebruik te maken van verschillende filters kunnen we verschillende fluorochromen zichtbaar maken. In ons geval produceert de zebravis GFP ('Green Fluorescent Protein, red.) een fluorochroom in de neutrofiele en MCherry (een ander fluorochroom) in de macrofagen. Door de visjes te beschijnen met excitatielicht en deze door verschillende filters op het

>>

preparaat te laten vallen, kunnen we de verschillende emissies (kleuren) waarnemen. GFP zendt een ander emissiesignaal uit dan MCherry waardoor we het ene fluorochroom als groen fluorescerend licht waarnemen (GFP) en het andere fluorochroom als rood fluorescerend licht (MCherry). De twee foto's die we vervolgens maken (eentje met GFP zichtbaar, de ander met MCherry) kunnen we softwarematig over elkaar heen leggen, waardoor we zien waar de twee celtypen zich bevinden in de vis.

CRISPR-Cas9

CRISPR staat voor Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. Het zijn kleine stukjes DNA afkomstig van virussen die bacteriën infecteren. Het is eigenlijk een soort afweersysteem van de bacterie. Als een bacterie wordt geïnfecteerd door een virus, knipt de bacterie de genomische informatie van het virus kapot en zet hiervan stukjes in een bepaalde regio van zijn eigen genoom (erfelijke informatie); in zogenaamde CRISPR regio's. Als het virus een volgende keer binnenkomt, herkent de bacterie dit specifieke virus doordat de eiwitten die gemaakt worden door de CRISPR regio direct kunnen binden aan het virus. Cas9, een enzym, herkent dan deze binding aan een zogenaamde PAM sequentie en knipt deze stukken doormidden. Het virus wordt dan dus snel gedood. Door dit mechanisme te gebruiken kunnen we nu in andere organismen dan bacteriën DNA op specifieke plekken knippen. Door in een cel met behulp van micro injectie het Cas9 enzym en een stukje RNA specifiek voor het gen dat je wilt muteren met een PAM sequentie in te spuiten, creëer je mutaties in het erfelijke materiaal. In onze zebravissen gaat dit als volgt: na bevruchting van het zebraviseitje ontwikkelt zich binnen een half uur de eerste cel. Men injecteert het Cas9 enzym en een zogenaamde guide-RNA (dit is een stukje RNA dat specifiek bindt aan een bepaald gen in het genoom; bevat PAM sequentie). Het guide-RNA bindt aan het genoom en het Cas9 enzym herkent de PAM sequentie. Dit is voor het Cas9 enzym het signaal dat het moet knippen op de plek waar het guide-RNA gebonden is. De mutatie is nu gemaakt in de eerste cel van het organisme, en deze cel deelt vervolgens totdat er een compleet organisme ontwikkeld is. Omdat in die eerste cel het DNA is gemuteerd, hebben ook alle andere cellen, die afstammen van deze eerste cel, deze mutatie. Het hele dier heeft nu een mutatie in een specifiek gen. Hiermee kunnen we de functie van dit gen bestuderen.



»

Literatuur

1. Liu TC en Stappenbeck TS (2016) *Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease*. Annual Review of Pathology 11: 127-148.
2. Witte M, Huitema LF, Nieuwenhuis EE en Brugman S (2014) *Deficiency in macrophage-stimulating protein results in spontaneous intestinal inflammation and increased susceptibility toward epithelial damage in zebrafish*. Zebrafish 11: 542-550.
3. Borody TJ en Khoruts A (2011) *Fecal microbiota transplantation and emerging applications*. Natural Reviews. Gastroenterology & Hepatology 9: 88-96.
4. Brugman S, Liu KY, Lindenbergh-Kortleve D et al. (2009) *Oxazolone-induced enterocolitis in zebrafish depends on the composition of the intestinal microbiota*. Gastroenterology 137: 1757-1767 e1751.



Triple A Trading



*Geen papier meer in uw lab, verhoog de efficiency en reduceer fouten.
Server communiceert rechtstreeks met de cage talker op uw kooi en de cage talker
communiceert rechtstreeks met uw server.
Past op ieder type kooi of tank.*

www.tripleatrading.nl