



De zebravis heeft een streepje voor

Vrijwel iedere Nederlandse universiteit heeft tegenwoordig zebravissen voor genetisch, embryologisch of farmaceutisch onderzoek. “Mensen vragen me wel eens: hoe kan je nou vissen als medisch model gebruiken?”

Tekst Arno van 't Hoog **Fotografie** Bram Bokkers, Ruid Koppenol, Dominik Paquet en Rob Willemsen

Het ruikt en klinkt er als een vissenspecialzaak, maar we dragen een witte jas en blauwe overschoenen, want dit is het proefdierverblijf van het Erasmus MC in Rotterdam, een van de grootste medische faculteiten van Nederland. Er staan honderden aquaria. Zebravisjes (*Danio rerio*) krioelen per tien a twintig stuks per bakje van twee liter. In het rek staan tweehonderd van dergelijke bakjes, allemaal aangesloten op een automatische circulatie- en filtersysteem.

“Kijk, deze hebben net gepaaid”, zegt celbioloog dr. Rob Willemsen van de afdeling Klinische Genetica. Hij pakt een van de vijf glazen bakjes met daarin drie visjes. Op de bodem van het bakje rollen tientallen bevruchte eitjes, door een roostertje afgeschermd van de hongerige ouders. “Die zijn klaar voor het onderzoek.”

In de aangrenzende kamer staan nog drie rekken met

vissen. In de bakjes zitten duidelijk verschillende kweeklijnen. Sommige vissen hebben lange sluiervinnen en vage strepen, andere hebben korte vinnen en een duidelijk streep patroon. Er zijn zelfs streeploze albino's.

De dierverzorger hoeft om te voeren alleen maar regelmatig een wolk zelfgekweekte pekelkreeftjes in de bakjes te deponeren.

Computercamera's

Willemsen introduceerde in 2002 de zebravis als onderzoeksmodel in Rotterdam. Zijn onderzoeksgroep richt zich op neurogenetisch onderzoek van onder meer het fragiele X-syndroom, de meest voorkomende vorm van een aangeboren verstandelijke handicap.

De onderzoekers hadden een muismodel gemaakt, waarin het fragiele X - gen (FMR1) gen was uitgeschakeld. “Maar

de rol van het fragiele X eiwit tijdens de embryonale ontwikkeling van de muizenembryos is lastig te bestuderen omdat die plaats vindt in de baarmoeder van de moeder-muis. Toen moesten we een nieuw diertype kiezen en zijn we begonnen met hobbyaquaria met zebravissen.”

Een promovendus bracht de zebravisvariant van het

De zebravis heeft alle belangrijke ziektegenen die de mens ook heeft.

FMR1-gen in kaart en vervolgens kon zij bekijken waar dit gen tijdens de embryonale ontwikkeling van de hersenen zijn werk doet. Willemsen: “Dat is het grote voordeel van de zebravis. De embryonale ontwikkeling vindt plaats in maar drie dagen tijd en doordat de eitjes doorzichtig zijn kun je het hele proces blijven volgen. Bij muizen moet je na een aantal dagen de zwangerschap afbreken” Tegenwoordig zijn er ook zebravislijnen beschikbaar die het lichtgevend kwalleneiwit green fluorescent protein (GFP) tot expressie brengen in bijvoorbeeld zenuwcellen, bloedcellen of botcellen. Die lichten op onder een UV-lamp.

In het begin stonden collega's van Willemsen van een afstandje belangstellend toe te kijken hoe zijn groep investeerde in materiaal en kennis van technieken, zoals microscopen en kostbare apparatuur om zebraviseitjes te injecteren en computercamera's die het zwemgedrag vastleggen. Inmiddels ziet iedereen de waarde ervan en worden zebravissen in Rotterdam gebruikt voor onderzoek naar bijvoorbeeld tumorgroei, vaatafwijkingen en de ziekte van Parkinson.

Parkinson

Met zebravissen is het mogelijk om in het genetisch onderzoek binnen een week resultaten te boeken. Bevruchte zebravisembryo's worden daarvoor geïnjecteerd met zogenaamde morfolino's: kleine stukjes synthetisch DNA die de aanmaak van een eiwit kunnen blokkeren. Als er daardoor afwijkingen in de ontwikkeling ontstaan geeft dat aanwijzingen voor de functie van het eiwit.

Het is niet zo dat in het onderzoek de zebravis de muis vervangt, relateert Willemsen. “Het is eerder een aanvulling, waardoor je uiteindelijk wel minder muizen gebruikt en minder kosten maakt. Als je de functie van een nieuw ontdekt gen in een muis wil onderzoeken door het gen uit te schakelen, dan kost dat minstens een jaar.”

Willemsens groep heeft een zebravismodel ontwikkeld voor de menselijke hersenziekte Parkinson. Net als mensen hebben die mutante visjes bewegingsafwijkingen, ze bewegen minder dan normale soortgenoten. In samenwerking met Portugese onderzoekers zullen 1280 verschillende stoffen aan het aquariumwater worden toegevoegd, om te kijken of er één tussen zit die deze bewegingsafwijkingen kan verminderen of herstellen. Zo hopen de onderzoekers nieuwe geneesmiddelen voor de ziekte van Parkinson op het spoor te komen. Ze ontvingen daarvoor onlangs 1,3 miljoen euro Europese subsidie.

Zebravisgenoom

Ook prof. dr. Michael Richardson, hoogleraar evolutionaire ontwikkelingszoölogie in Leiden onderzoekt de mogelijkheden van zebravissen voor screening van potentiële geneesmiddelen.

Tot zes jaar terug deed hij vooral embryologisch onderzoek met kippenembryo's. Inmiddels geeft hij leiding aan een groot SmartMix project met zebravis in de hoofdrol, waarvoor de overheid 14 miljoen euro beschikbaar heeft gesteld.

Richardson: “Mensen vragen wel eens: hoe kan je nu vissen als medisch model gebruiken? De laatste gemeenschappelijke voorouder van mens en vis leefde immers zo'n 450 miljoen jaar geleden. Het lijkt misschien alsof zebravis en mens heel ver van elkaar af staan, maar nu we het zebravisgenoom en mensengenoom kunnen vergelijken, blijken er grote overeenkomsten te bestaan. Voor zover we kunnen zien heeft de zebravis alle belangrijke ziektegenen die de mens ook heeft.”

De zebravis is daarom een goed model, dat bovendien veel goedkoper is, zegt Richardson. “En omdat we embryo's van vijf dagen oud gebruiken zijn de kosten veel lager. Een muis kost 45 euro per jaar aan voer en huisvesting; de zebravis hooguit 15 euro, en die legt zo'n 200 eitjes per keer. Die aantallen zijn zo groot dat de kosten per dier heel laag worden.”



Rob Willemsen bezig in het zebravislab.



Zebrafisjes worden steeds vaker voor wetenschappelijk onderzoek gebruikt.

Kleurvoorkeuren

Voor het onderzoek worden vrijwel altijd visjes van hooguit vijf dagen oud gebruikt, embryo's die nog in het ei zitten of minuscule larfjes van twee millimeter groot. "Die hebben al allerlei complexe gedragspatronen, ze reageren op licht en op verschillende stressoren. Ze kunnen gestresst raken als je plotseling het licht uitdoet." Als de onderzoekers cafeïne in het water doen worden ze actiever. Door valium kalmeren ze juist. "Je ziet dus effecten op gedragingen in een heel jong visje, die overeenkomen met gedrag in de mens, en dat geldt voor veel meer stoffen die we hebben onderzocht." Dat soort fundamentele gedragingen zijn vroeg ontstaan in de evolutie, zegt Richardson, en daarom kun je ze ook in een zebrafislarve onderzoeken, in plaats van een muis of rat. In een aangrenzend lab onderzoekt een aio van Richardson petrisschaaltjes met zebrafislarven. In een opstelling wordt gekeken naar kleurwaarneming en kleurvoorkeur van zebrafissen door het schaalpje op een ondergrond met verschillende kleurvlakken - rood, geel, groen, blauw - te zetten. Een camera gekoppeld aan een computer analyseert vervolgens waar het visje zich de meeste tijd ophoudt en boven welk vlak hij zich blijkbaar het veiligst voelt en welke hij juist vermijdt. Blauw is duidelijk niet favoriet. Het gebruik van kleine vissenlarven als onderzoeksmodel heeft een paar grote voordelen. Het eerste is dat vissenlarven voor de proefdierwetgeving pas een proefdier worden als de dooierzak op is en ze zelfstandig gaan eten, en dat is pas op dag vijf. Dat betekent dat de gangbare vergunningregels zoals bij proefdieronderzoek niet van toepassing zijn.

Chip met eitjes

Het tweede voordeel is de schaal waarop experimenten kunnen worden gedaan. Want een zebrafislarve heeft maar weinig water nodig. Zo worden de visjes vaak al onderzocht in zogenaamde 96-wells platen, plastic bakjes met 96 putjes waarin een halve milliliter water past. Maar het kan nog kleiner. Dat is waar Richardson zich nu voornamelijk op richt: het opzetten van geautomatiseerde miniaturassays waarbij duizenden potentiële geneesmiddelen worden getest op zebrafislarven. Een videoanalyse door computers bekijkt wat het effect van de stoffen is op ieder individueel embryo op bijvoorbeeld zwemgedrag. "Je hoeft niet iemand te betalen om de hele dag door een microscoop te turen." Richardson toont het eerste model van een glazen chip met het formaat van creditcard, speciaal gemaakt door

het Nederlandse bedrijf Micronit. In het plaatje zitten putjes met een doorsnede van een paar millimeter doorsnede, waarin een zebrafiseitje past. In ieder putje past negenduizendste liter - negen microliter - en wordt apart verwarmd en via microscopische kanaaltjes voorzien van vers water. "Het water wordt ververst met een snelheid van twee microliter per minuut. Het grote voordeel is dat je weinig water verbruikt en dus ook weinig van de stoffen die je wilt onderzoeken."

Fysiologie

De technologie is er, de eerste interessante resultaten zijn er ook, maar veel farmaceutische bedrijven willen meer onderbouwing zien. Validatie van het testsysteem is nu een belangrijk doel. De vraag daarbij is of de zebrafis test vergelijkbaar en zo niet beter is dan standaardtesten met bijvoorbeeld muizen in het zoeken naar nieuwe geneesmiddelen. "We hebben al veel verschillende stoffen uitgeprobeerd - toxines, atropine, noem maar op - en we zien dat in het algemeen de zebrafis een goed model is om effecten te voorspellen."

In het fysiologisch onderzoek naar immunologie en stress heeft de zebrafis ook een plaats verworven, aldus de Nijmeegse hoogleraar organismale dierfysiologie prof. dr. Gert Flik.

We staan tussen de aquaria en plastic bassins met jonge spiegelkarpers, tilapia, krioelende Afrikaanse meervallen, dikke schubkarpers en natuurlijk kleine bakjes met zebrafissen.

Flik is vooral actief op het gebied van onderzoek naar adaptatie en stressregulatie van vissen, bijvoorbeeld in de aquacultuur.

Werd voorheen veel onderzoek gedaan met karper en goudvis, sinds de eeuwwisseling is ook de zebrafis een gewaardeerd modeldier geworden.

Overeenkomsten

Fysiologisch onderzoek floreert bij de wetenschap dat er grote overeenkomsten zijn tussen vissen en andere gewervelde dieren, stelt Flik. "De mens produceert bijvoorbeeld prolactine om de vorming van moedermelk te stimuleren. Discusvissen maken onder invloed van datzelfde hormoon een met specifieke eitwitten verrijkte slijmblaas, waarvan de jongen kunnen eten".

In de vroege embryonale fase van de mens is de huid van de foetus vergelijkbaar met die van een vis. De huid is dan doorlaatbaar voor water en ionen, en prolactine van de moeder reguleert die doorlaatbaarheid. "Bekijk je een stekelbaarsje

dat van zout naar zoet water trekt, dan zie je dat die prolactine gaat aanmaken om de doorlaatbaarheid van de huid aan te passen. Anders verliest hij in zoet water via de huid ionen en loopt water naar binnen." Het zijn kortom allemaal variaties op een biologisch thema, zegt Flik.

Gereedschapskist

Fliks groep is de eerste die het hormoon leptine heeft aangetoond in karpers en ook de zebravis. Leptine wordt in de mens door vetcellen geproduceerd en remt het hongergevoel; hoe meer vet je hebt, hoe meer leptine in je bloed. "Als je menselijk leptine in goudvissen of karpers injecteert in de ventrikels van de hersenen, dan remt het de eetlust en functie die dus in alle gewervelden bewaard lijkt. Verder blijken leptinereceptoren in zebravissen vooral in botachtige weefsels voor te komen, ook de schubben. We willen natuurlijk graag uitvinden waarvoor dat is."

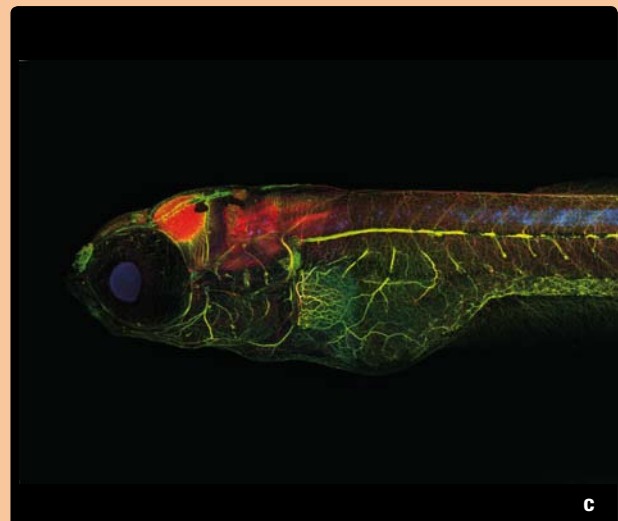
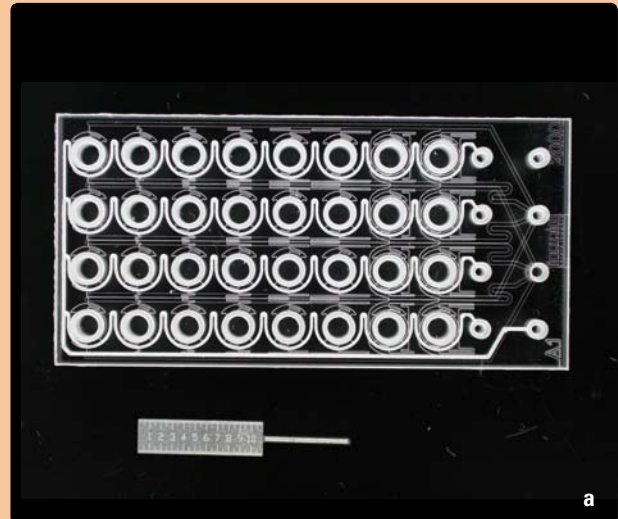
Zebravis en karpers worden naast elkaar onderzocht. "Met een zebravis kun je veel meer, de soort is goedkoper, je kunt ze makkelijk aan de leg krijgen. Wat groen in de bak en je doet het licht aan en hij gaat paaien. Een karpers moet je (in het lab) met hormonen behandelen.

De zebravisembryologie is goed te bestuderen en er is een gereedschapskist met onderzoekstools ontwikkeld, die voor de karpers niet beschikbaar is. Vooral met genetische technieken en transgene lijnen kun je ongekende dingen doen. Wij hebben een aantal transgene zebravislijnen in gebruik, waarin botcellen groen oplichten door GFP gekoppeld aan een receptorgen dat alleen in botcellen tot expressie komt. Als zo'n zebravis een schub verliest, maakt hij binnen een week een nieuwe en kun je de cellen die daarvoor zorgen ook heel mooi volgen". We doen dat momenteel om zowel botvormende als botafbrekende cellen te bestuderen in het kader van vragen rond osteoporose in de mens, weer een voorbeeld van inzet van vissen voor biomedisch onderzoek.

Natuurlijk heeft de zebravis ook een paar nadelen, zegt Flik. "Als je echt fysiologisch onderzoek wilt doen, is de zebravis vaak rampzalig - probeer maar eens bloed af te nemen. Dan moet je toch naar de karpers. Het is wel prettig dat karpers en zebravis genetisch zo nauw verwant zijn. Als je een gen hebt gevonden in de zebravis, kun je het overeenkomstige karpergen zo opsporen. De zebravis kan niet alles, maar in de combinatie met andere vissoorten is ie ijzersterk". **V**

Geraadpleegde literatuur

- Brittain, S.A. et al. (2009) Zebrafish development and regeneration: new tools for biomedical research. *Int. J. Dev. Biol* 53: 835-850.
- Kabashi, E. et al (2011) Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812: 335-345.
- Wielhouwer, E.M. et. al. (2011). Zebrafish embryo development in a microfluidic flow-through system. *Lab Chip*. 11:1815-24.
- De Vrieze E, Sharif F, Metz JR, Flik G, & Richardson MK (2011) Matrix metalloproteinases in osteoclasts of ontogenetic and regenerating zebrafish scales. *Bone* 48 704-712.



Van boven naar beneden:

- Zebravissen worden gekweekt in speciale glazen chips.
- Embryo van zebravis in kweekchip.
- Transgene zebravissen kunnen goed worden gebruikt om de embryologie te bestuderen.