Het Hubrecht Instituut te Utrecht: een grote kleine visteler

Auteur: Jan-Willem Henfling

Kortgeleden bezocht ik in de kelders van een modern bouwwerk het visteeltbedrijf in de Utrechtse Uithof, gelokaliseerd. Vier dierverzorgers en de manager van het Hubrecht Instituut kweken daar zebravissen. Honderden bakken met vis: van een solitaire tot enkele tientallen; alles tussen larve en volwassen dier. De bakken zijn verdeeld in vier RAS-systeem. Op iedere dag van het jaar zwemmen in die kelder zo'n 100 duizend vissen, samen goed voor ongeveer 41 kilogram vis. Ja, je leest het goed: kilo's en geen tonnen.

Het Hubrecht Instituut

Zaterdag 14 april: Alumnidag van de Utrechtse Universiteit. Dit jaar was het Hubrecht Instituut aan de beurt om de deuren te openen. Als instituut van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (KNAW) is het nauw verbonden aan de Universiteit Utrecht en aan het Universitair Medisch Centrum Utrecht. Begonnen als de persoonlijke verzameling van Ambrosius Hubrecht (1853-1915) heeft het laboratorium zich sinds de oprichting in 1916 gericht op onderzoek naar de vroege ontwikkeling van gewervelde dieren (embryologie). Toen waren het eicellen en embryo's onder de microscoop en in potten met formaline, en nu betekent dat kijken naar de ontwikkeling van organen en organismen op moleculair, genetisch, cellulair en weefselniveau om fundamentele vragen te onderzoeken. Hoe en wanneer worden bepaalde genen aan- of uitgezet? Wat gebeurt in de ontwikkeling van een orgaan, als het DNA van een betrokken gen wordt gewijzigd? Half april was onze rondleider was Professor Jeroen den Hertog. Zebravisjes (*Danio rerio)* zijn voor de onderzoekers in zijn lab een belangrijk modelorganisme (Foto 1).

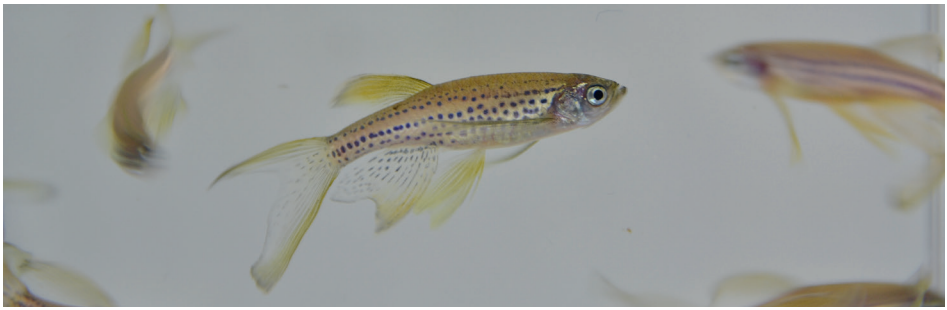


Foto 1: Zebravis (foto van Mark Reijnen)



Foto 2: Mark Reijnen in zijn domein. Foto: Jan-Willem Henfling, bewerkt door Christine Henfling.

Naast de 100 duizend zebravissen die permanent beschikbaar zijn als wildtype of een van de honderden unieke kweeklijnen, worden ook 200 vrouwelijke klauwpadden (*Xenopus laevis*) gehouden voor de eiproductie en 7.500 muizen voor embryologisch onderzoek. Hij toonde onder meer de indrukwekkende visteeltfaciliteit: "Het is voor ons, de onderzoekers, van cruciaal belang dat de vissenfaciliteit optimaal draait. Door goede faciliteiten en de inzet van betrokken medewerkers is het risico op een calamiteit in de vissenfaciliteit minimaal. Veel van de vissenlijnen waar wij mee werken zijn uniek in de wereld. Verlies van een of meerdere lijnen door een calamiteit zou maanden tot jaren vertraging in het onderzoek kunnen betekenen." Twee weken later was ik te gast bij het hoofd van de visteelt unit, Mark Reijnen (Foto 2).

De zebra is een modeldier

Mark Reijnen (1963) studeerde zoölogie aan de Hogeschool Utrecht en werkt sinds 1992 bij het Hubrecht Laboratorium, zoals dat toen nog heette. Hij werkte eerst met Zuid-Afrikaanse klauwpadden en transgene muizen, en vanaf 2003 ook met zebravissen. Die vissen werden reeds sinds 1991 op kleine schaal gebruikt voor onderzoek. In 2003 werd hij benoemd tot hoofd van de proefdierfaciliteit en in 2001 werd de productie van vissen opgevoerd van 1 naar 3 units, omdat steeds meer onderzoekgroepen met de zebravis als model bleken te gaan werken. In 2008 is de huidige zebravisfaciliteit in gebruik genomen. Onder leiding van Mark Reijnen werken 7 fte dierverzorgers

voor het instituut.
Reijnen maakt duidelijk dat de zebravis een prachtig modelorganisme is en niet alleen voor genetisch en embryologisch onderzoek. In Groningen is het een model voor Alzheimeronderzoek, in Amsterdam voor onderzoek naar kanker, in Nijmegen wordt gedragsonderzoek gedaan en in Wageningen dient het als model voor onder andere onderzoek naar dierenwelzijn (zie vorige nummer van dit blad). Kortom, de zebravis is uitermate goed beschreven in al zijn levensfasen en lijkt genetisch, anatomisch, cognitief en sociaal meer op ons mensen dan de meesten van ons willen toegeven. Indien goed gemanaged, produceren de diertjes zeer veel eieren, die vijf dagen na bevruchting al een zelfstandig levende vis opleveren. Desondanks kunnen ze toch vrij oud (vijf jaar) worden, terwijl ze klein blijven en eenvoudig te huisvesten zijn. Als proefdier voor embryologen is de zebra ook aantrekkelijk, omdat je het moederdier niet open hoeft te maken om embryo's te oogsten, zoals bij muizen, en de eieren en embryo's zijn ook nog eens vrijwel doorzichtig onder de confocale microscoop (Foto 3).

De uitdaging

Wat is de grote uitdaging voor jou als je werkt bij het Hubrecht Instituut? Reijnen: "Dat is meteen ook het doel van het Hubrecht: een gezonde populatie opbouwen en onderhouden met allereerst de wildtype-populatie en daarnaast vele tientallen unieke transgene populaties. We onderscheiden daarbij genetisch gemodificeerde vis (GMO) en non-GMO's (Toevoeging van de auteur: In dit geval is het genoom gewijzigd zonder DNA van andere organismen te introduceren). De bron van ons wildtype is niet de Ganges-rivier, waar de vis vandaan komt, maar het ZIRC. Dat staat voor Zebra Fish International Research Centre te Oregon in de VS. Wij bestellen daar regelmatig drie dagen oude *bleached* embryo's. Dat zijn embryo's die met hypochloriet zijn gedesinfecteerd. Door die eens in de drie

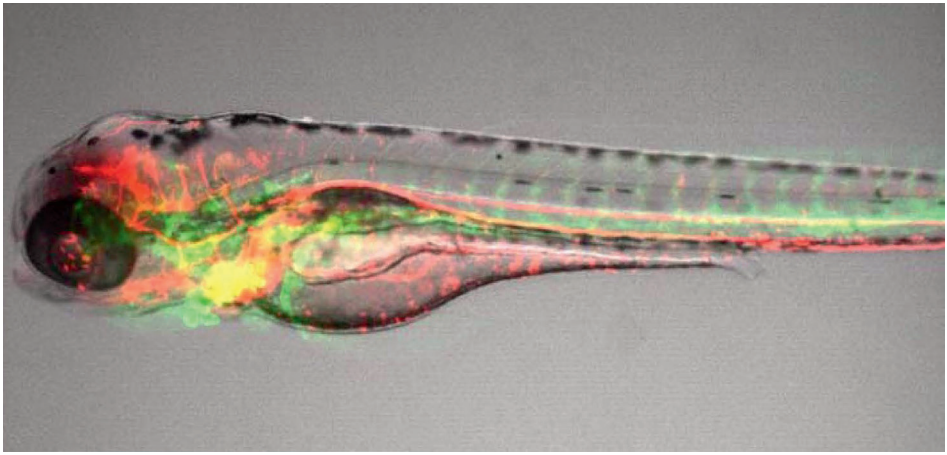


Foto 3: Vijf dagen oud embryo van een zebravis kort na eclosie, want de dooierzak is zo te zien opgebruikt. Dit is een levende transgene vis met groen-fluorescerende bloedvaten en rood-fluorescerende bloedcellen. De fluorescerende markers karakteriseren specifieke DNA stukjes die actief zijn. Zo kun je zien dat deze vis het (voor een bepaald onderzoek) gewenste DNA heeft en waar dat DNA tot expressie komt.

generaties te kruisen met onze populatie kunnen we inteelt voorkomen en blijft het uitgangsmateriaal stabiel. Dat is natuurlijk van groot belang voor de reproduceerbaarheid van het onderzoek. Omdat de zebra's vrij lang leven duurt een generatie gemiddeld twee jaar en moet eens in de zes jaar worden teruggekruist met wild materiaal van ZIRC."

"Ook bij ons bleken we de embryo's, afkomstig van geïmporteerde vislijnen, want de kans dat we een ziekte introduceren willen we zo veel mogelijk uitsluiten. Onze onderzoekers werken vooral met bevruchte eieren, die in vijf dagen ontwikkelen tot een zelfstandig levende vis. Daarom is het optimaliseren van de eiproductie door de vissen ook een uitdaging. Temperatuur en waterkwaliteit zijn daarbij erg belangrijk. Waar ze van nature leven, in de estuaria van de Ganges bijvoorbeeld, is het water vuil en heeft het een hoog zoutgehalte. Ze gaan eieren produceren in de regentijd, dus als het water minder zout is. Dat bootsten we na door ze te houden in mineraalarm water, zodat de vissen zeer productief zijn. Tot wel veertig procent van het water is RO-leidingwater (RO betekent *reverse osmosis*). Zo produceren ze honderd tot tweehonderd eieren per week."

De kweek ruimtes

We zien in de kweekruimten honderden kleine aquaria met soms één, soms een



Figuur 4: Verschillende maten overflowtanks worden gebruikt voor solitaire vissen, of grotere groepjes. Daarnaast worden ook geschakelde doorstroomtanks gebruikt. De nummers geven de familie aan en daarmee de pedigree. Dit is het "kapitaal" van het Hubrecht Instituut. Veel lijnen zijn uniek in de wereld en wezenlijk voor genetisch en embryologisch onderzoek.

Blok 1. Voortplanting

Eiproductie bij vrouwen wordt getriggerd door licht/donker regime. Bij toenemen lichtintensiteit in tank en verlagen van de geleidbaarheid (zoutconcentratie) wordt de eiproductie op gang gebracht. De paren worden gevormd en eicellen (uitwendig) bevrucht door aanwezige mannetjes. Vissen worden gehouden boven een inzetbakje met een visnet waar de eieren doorheen kunnen vallen (Foto 5). De eieren worden verzameld voor opkweek of voor injecties met constructen (dat zijn geconstrueerde stukken DNA). Ieder vrouwtje produceert tot zo'n 200 eieren per week. De fokvrouwen worden maximaal een maal per week gebruikt om ze voldoende rust te geven en bij te voeren voor nieuwe eiproductie.



Figuur 5: Sex on the beach: Dit inzetbakje (bij de gebruikers al snel de "sex on the beach" tank genoemd) is voorzien van nylongaas dat schuin oploopt in de vistank, waarboven de vissen (m/v) zwemmen. De vrouwtjes zullen een locatie opzoeken (substraatbodem) waar ze de eieren makkelijker kunnen afstrijken door hun buik erover te masseren. Ook de mannen duwen met hun kop tegen de buik om de 'spawning' te versnellen

De Wet op de Dierproeven (WOD)

"Bij alles wat je hier ziet hebben we te maken met de wet op de dierproeven (WOD). Embryo's vallen niet onder die wet, want ze leven nog niet zelfstandig. Op dag vijf is de dooierzak geresorbeerd, de zwemblaas geïnflateerd en moeten ze worden gevoerd, want anders ervaren ze ongerief. Dan geldt de wet. Gelukkig kunnen de meeste onderzoekers goed uit de voeten met alleen die embryo's. Na een dag zie je onder de microscoop bijvoorbeeld al een buisje dat pompt. Dat wordt het hart. Met de andere organen die ze hier bestuderen gaat het net zo snel. Totdat de embryo's vijf dagen oud zijn hebben de onderzoekers niet te maken met de ethische commissie. Onder de huidige wetten kun je niet zomaar een proefje bedenken en doen met vissen. Alles met dieren ouder dan vijf dagen moet gedetailleerd beschreven en gemotiveerd worden. Veel van de vissen die je hier ziet zijn van een unieke lijn met een nauwkeurig bepaalde genetische afwijking, die wordt gebruikt in ons onderzoek. Die vissen kunnen dus ook een genetisch geïnduceerde tumor ontwikkelen; je weet nooit wanneer die komt. Je moet iedere kweek daarom aanmelden bij de IVD (Instantie voor Dierenwelzijn) en samen stel je vast dat het ongerief van de proefdieren in redelijke relatie staat met de wetenschappelijke vraag. Als dieren niet voldoen aan redelijke eisen, dan worden ze afgemaakt, meestal door een *cold shock*. Het zijn tropische vissen en die zijn vrijwel onmiddellijk verdoofd als je ze op ijs legt."

Naast zorg voor dierenwelzijn is natuurlijk de diergezondheid een punt van grote zorg. Iedere medewerker en bezoeker wordt voorzien van weggooi-overschoenen voordat hij de aquariumruimten in kan en op hygiëne bij de behandeling van vis wordt strikt toegezien. Iedere viskweek-unit heeft een sector speciaal bestemd voor bakken met "sentinel"-vissen en -slakjes (zie Blok 2 en Foto 6). Dat zijn zebravissen en slakken die dagelijks nauwkeurig worden geobserveerd op afwijkingen in uiterlijk en gedrag. Afwijkingen en zeer zeker mortaliteit zijn de indicatoren die je niet wilt zien.



Foto 6: Een van de aquaria met appelslakjes, de schoonmakers.

kleine groep visjes (Foto 4). Reijnen merkt op dat het zorgvuldig doorkweken van al die unieke lijnen van groot belang is, want constant liggen puntmutaties op de loer en dat bedreigt de reproduceerbaarheid van het onderzoek. Hij illustreert dit door me erop te wijzen dat: "ieder mens dat ter wereld komt heeft al minstens 47 mutaties." Ik ook? "Ja, zelfs wij" is het geruststellende commentaar. Bij de zebravissen is het niet veel beter, ondanks hun kortere levenscyclus. Gelukkig zitten niet al die mutaties in de kiembaan en worden ze dan niet doorgegeven aan het nageslacht, maar het is evident dat je zeker bij doorkweken van unieke lijnen heel erg moet letten op mutaties en inteelt. "We meten de lengte en wegen de vissen regelmatig en kijken nauwkeurig naar de eiproductie. Als we een afwijking noteren is het mis. Van iedere lijn die je hier ziet is de *pedigree* exact beschreven in verband met de reproduceerbaarheid van het onderzoek."

Ik realiseer mij al schrijvend dat de meeste van die lijnen natuurlijk heterozygoot zijn, omdat homozygoten met een geïnduceerd genetisch defect weinig levenskansen zullen hebben voorbij het embryostadium. De meeste afwijkingen, vertelde Reijnen, zijn zichtbaar vanwege een fluorescerende marker in het gen, dus je weet na kruisen van de lijn met het wildtype, of na inkruisen, welke embryo's het gen hebben. Die worden opgekweekt en de rest kan dan weg (Blok 1 en Foto).

Ergens in de productieruimtes zag ik een handgeschreven bordje dat waarschuwt om daar niet te eten en dat je ook de vissen niet mag eten. Grapje? Het zou zomaar serieus kunnen zijn en is in ieder geval een extra uiting van de zorg die iedere vis iedere dag ontvangt bij deze grote kwekerij van kleine, bijzondere vissen.

Blok 2: Kweek van zebravissen bij het Hubrecht Instituut te Utrecht

Het water (een mineraalarm mengsel van gedechloreerd en norit-gefilterd leidingwater met water bereid via "reverse osmosis", pH 7,5 en 350 µs) wordt constant gehouden op een temperatuur van 26,5 graden en stroomt anderhalf tot twee maal per uur door het systeem. De waterverversingsgraad is 10 tot 33 procent per dag afhankelijk van het gemeten nitraatgehalte.

De visteeltfaciliteit bestaat uit drie zelfstandige units, ieder met een eigen filtratiesysteem van Fleuren & Nooijen (Foto 7). Systeem 1 is in 2008 afgebroken nadat systemen 2, 4 en 5 in gebruik werden genomen. Systeem 3 is de voorraad van 2 maal 1000 liter vers systeemwater. Ieder systeem bevat, afhankelijk van de omvang, 3.000 tot 10.000 liter water.

Slakken: In iedere bak leven naast de vissen ook slakken (soort: appelslakken), die de wand schoon en het water vrij houden van niet-geconsumeerd voer en feces.

Voeding: De vissen eten 1 tot 5% van hun gewicht aan voer per dag. De juvenielen 5% op dag 5 tot 3% op dag 96. Volwassen dieren ontvangen 1 tot 2 % van hun gewicht aan voer. Het voer is een mengsel van 300 gram Tetramin en 100 gram net geëcloseerde Arthemia-cysten. Daarnaast ontvangen de larven tot dag 14 dagelijks een kleine hoeveelheid *Tetrahymena pyriformis*, een protozo.

Omdat de vissen niet geoogst worden kun je natuurlijk geen VCR bepalen, of veel zeggen over efficiency. Het Hubrecht Instituut hanteert een integrale kostprijs per week voor alle gebruikte proefdieren. Voor de vissen bedraagt deze € 4,22 voor een bakje met 30 visjes. Op grond van bedrijfseconomische overwegingen (geschatte loonsom, afschrijvingen, organisatie) kom ik echter al snel in de buurt van € 4 tot € 8 per vis. Dan zit je op een kostprijs van zo'n € 20 duizend per kilo. Deze zebra's worden duur betaald of stevig gesubsidieerd en vast heel zelden geconsumeerd!



Foto 7: RAS unit van Fleuren & Nooijen met trickling-toren (100L en 45 m²) en upflow-denitrificatietoren (50L en 42 m²) en UV-lamp voor desinfectie.