



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Infectious disease studies in zebrafish : the fish pathogen *Edwardsiella tarda* as a model system

Soest, J.J. van

Citation

Soest, J. J. van. (2011, November 29). *Infectious disease studies in zebrafish : the fish pathogen Edwardsiella tarda as a model system*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18149>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18149>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

In een wereld waarin het steeds moeilijker wordt om bacteriële infecties te bestrijden vanwege de toenemende resistentie tegen antibiotica, zijn ziektemodellen die snelle screening van grote aantallen proefdieren mogelijk maken meer dan ooit nodig. Zulke modelsystemen kunnen helpen bij de ontdekking en studie van virulentiefactoren van ziekteverwekkers en bij de ontdekking van nieuwe antibiotica en stoffen die het immuunsysteem versterken. Modelorganismen die in de studie van ziekten worden gebruikt, lopen uiteen van invertebraten, zoals de nematode *Caenorhabditis elegans*, tot vertebraten, zoals de muis. De resultaten verkregen uit onderzoek met de muis zijn het beste te extrapoleren naar de mens, maar de muis is niet geschikt voor een snelle screening van grote aantallen, in tegenstelling tot *C. elegans*. *C. elegans* is bijvoorbeeld gebruikt om de virulentie van verschillende stammen van *Pseudomonas aeruginosa* te vergelijken. De extrapolatie van resultaten verkregen met deze nematode naar de mens is echter lastig. Verschillende andere modelorganismen hebben vergelijkbare tekortkomingen en dus rees de vraag naar een modelorganisme dat een goede extrapolatie naar de mens en snelle screening van grote aantallen combineerde. De zebravis als infectiemodel is hiervoor zeer geschikt.

De embryo's en larven van een zebravis zijn zeer geschikt voor snelle screening van grote aantallen. Een vrouwtje kan tot wel tweehonderd eitjes leggen die *ex utero* bevrucht worden. Zolang de larven niet zelfstandig kunnen eten, worden ze volgens de Europese wetgeving niet als proefdier beschouwd. In dit stadium zijn de hersenen en het zenuwstelsel nog niet volledig ontwikkeld en om die reden kan snelle screening van grote aantallen voor medische doeleinden als ethisch aanvaardbaar worden beschouwd. Belangrijk voor het wetenschappelijk onderzoek is dat de zich ontwikkelende embryo's transparant zijn, wat real-time analyse van de infectie en de reactie van het immuunsysteem mogelijk maakt. Hiervoor zijn verschillende transgene zebravislijnen met fluorescerende immuungerelateerde cellen beschikbaar. Zoals alle vertebraten, met uitzondering van primitieve kaakloze vissen zoals de prik en de lamprei, heeft de zebravis een aangeboren en een adaptief (verworven) immuunsysteem. Deze zijn tijdens de ontwikkeling van het embryo echter gescheiden in de tijd. Het aangeboren immuunsysteem is reeds één dag na bevruchting functioneel, terwijl het adaptieve immuunsysteem pas drie weken

na bevruchting volledig functioneel is. Dit maakt het mogelijk om het aangeboren immuunsysteem los van het adaptieve te bestuderen.

Bij aanvang van het in dit proefschrift beschreven onderzoek waren er al verscheidene bacteriële infectiesystemen met de zebravis opgezet, zowel met Gram-positieve bacteriën (bijvoorbeeld *Streptococcus pyogenes*) als met Gram-negatieve bacteriën (bijvoorbeeld *Salmonella typhimurium*). Tevens werd er uitgebreid onderzoek gedaan met *Mycobacterium marinum*, die granulomen vormt in de zebravis en nauw verwant is aan *Mycobacterium tuberculosis*, die granulomen vormt in de mens. Voor de meeste van deze infectiesystemen in zebravisembryo's was het echter noodzakelijk dat de ziekteverwekker in de bloedbaan werd geïnjecteerd: tijdrovend werk dat niet geschikt is voor snelle screening van grote aantallen. Hiervoor zou het makkelijker zijn als immersie van de zebravisembryo's in een oplossing met de ziekteverwekker binnen enkele dagen zou kunnen resulteren in een infectie. Eén bacterie met precies dit vermogen was net beschreven in de literatuur, *Edwardsiella tarda*.

E. tarda is een natuurlijke vispathogeen die behalve vissen tevens veel andere gastheren kan infecteren. Er werd ontdekt dat deze bacterie het vermogen heeft om een dodelijke infectie te veroorzaken in zebravisembryo's, wanneer deze op de leeftijd van 1 dag oud vijf uur aan een suspensie van deze bacterie worden blootgesteld. Over deze bacterie, die wij kozen voor ons onderzoek, was nog niet veel bekend.

Genoomsequentie *E. tarda*

Doordat nieuwe technieken de kosten en tijd van het bepalen van een genoomsequentie flink omlaag hadden gebracht en het genoom van *E. tarda* nog niet bekend was, wilden we als eerste het genoom van *E. tarda* bepalen, evenals de virulentiefactoren van de stam FL6-60, die we hadden gekozen voor ons onderzoek. Net na de eerste *de novo* samenstelling van het FL6-60-genoom werd het genoom van een andere *E. tarda* stam, EIB202, gepubliceerd. Daarom is in **hoofdstuk 2** het genoom van *E. tarda* EIB202 gebruikt als referentie voor het samenstellen van het *E. tarda* FL6-60 genoom. Dit maakte het voor ons mogelijk om het genoom bijna compleet samen te stellen, waarbij er slechts een klein aantal van *de novo* samengestelde contigs handmatig moesten worden toegevoegd. Door de flankerende sequenties van deze contigs te vergelijken met de gaten in het genoom, kon dit genoom

gecompleteerd worden. Een aantal contigs viel echter buiten het samengestelde genoom. Hoewel *E. tarda* EIB202 een plasmide bevat, kon geen van de reads op dit plasmide worden teruggevonden, wat laat zien dat dit plasmide ontbreekt in *E. tarda* FL6-60. De overgebleven contigs konden echter wel *de novo* worden samengesteld tot een circulair element met meerdere overlappende reads. Na correctie voor de grotere hoeveelheid reads van AT-rijke regio's bleek dat het element dezelfde dekking heeft als het genoom, wat betekent dat er slechts één kopie is per cel. Bij de annotatie van de genen van het element bleek dat deze voornamelijk gerelateerd zijn aan de genen van bacteriële virussen, de bacteriofagen of kortweg fagen. Tevens is de lengte van het element vergelijkbaar met dat van de P22-podoviridae, wat leidde tot de veronderstelling dat het een nieuw element is afkomstig van fagen.

De genomen van de twee stammen van *E. tarda* bleken zeer vergelijkbaar. De gaten in het genoom van *E. tarda* FL6-60 die handmatig gevuld moesten worden met *de novo* samengestelde contigs, waren stuk voor stuk regio's met faaggerelateerde genen. Andere regio's met grote variatie tussen de twee stammen, waren voornamelijk geconcentreerd rond voorspelde genomische eilanden die eveneens faaggerelateerde genen en ook transposons bevatten. Deze twee observaties laten zien dat de twee stammen nauwelijks veranderd zijn in de niet-faaggerelateerde genen. Vergelijking met *Edwardsiella ictaluri*, de nauwe verwant van *E. tarda*, liet eveneens een opmerkelijke structurele overeenkomst zien. Slechts twee regio's hadden een andere oriëntatie en de twee soorten waren voor 35,4 % identiek.

Om de verschillen tussen de verschillende *E. tarda* stammen en *E. ictaluri* meer in detail te bekijken, vergeleken we het type III secretiesysteem (T3SS) en het type VI secretiesysteem (T6SS) van de verschillende stammen. Deze vergelijking liet een grote mate van gelijkheid zien tussen de *E. tarda* stammen EIB202 en FL6-60. Het T3SS van de *E. tarda* stam FK1051 week het meest af van de andere *E. tarda* stammen, maar dit zou kunnen komen door fouten tijdens het sequencen. Deze dieptevergelijking tussen de verschillende stammen van *E. tarda* laat zien dat de gebruikte sequencingtechniek zeer geschikt is om snel verschillen tussen genomen te identificeren.

Terwijl *E. tarda* een groot aantal gastheren kan infecteren, is de nauw verwante *E. ictaluri* meer gespecialiseerd. Deze bacteriesoort infecteert voornamelijk meervallen. Verschillen in gastheren of in gastheerbereik kan

worden toegewezen aan verschillen in de virulentiefactoren. Om die reden hebben we *E. ictaluri* meegenomen in onze analyse van de secretiesystemen. Uit deze analyse bleek dat de volgorde van de genen van zowel het T3SS als het T6SS hetzelfde is tussen *E. tarda* en *E. ictaluri*, maar dat er significante verschillen zijn binnen de genen. Het zou erg interessant zijn om het effect van deze verschillen tussen *Edwardsiella* stammen te onderzoeken in een modelorganisme zoals de zebravis en om de bijdrage van andere virulentiegenen te onderzoeken met behulp van mutanten.

Blootstelling van zebravisembryo's aan *E. tarda*

Na bepaling van de aanwezigheid van virulentiefactoren van *E. tarda* in de gebruikte FL6-60-stam, hebben we getracht om een systeem op te zetten om zebravisembryo's door middel van immersie in *E. tarda*-suspensie te infecteren, zoals beschreven in **hoofdstuk 3**. Naast *E. tarda* zijn ook de stammen PAO1 en PA14 van de pathogeen *P. aeruginosa*, die bekend staat om zijn grote verscheidenheid aan gastheren, getest. Terwijl *E. tarda* in de immersieassay sterfte van zebravisembryo's veroorzaakte, deden beide stammen van *P. aeruginosa* dat niet. Het sterftepercentage van de zebravisembryo's na immersie in een *E. tarda*-suspensie was echter zeer wisselend tussen verschillende experimenten, variërend van 25 tot 75 % na vier dagen. Deze mate van variatie is te groot om te screenen op verzwakte mutanten of antimicrobiële stoffen, dus wilden we een andere methode voor het uitlezen van infectie vinden dan bepaling van het sterftepercentage.

Om genexpressiemarkers voor de mogelijke infectie te vinden werd een microarray-analyse uitgevoerd op zebravisembryo's na immersie in *E. tarda*-suspensie. Verder werd onderzocht of *P. aeruginosa* PAO1 en PA14 een reactie op transcriptieniveau zouden geven, aangezien ze geen sterfte veroorzaken. Als niet-pathogene controle werd ook *Escherichia coli* meegenomen in de analyse. De resultaten van de microarray-analyse waren verrassend. *E. tarda*, de enige van de vier geteste bacteriën die sterfte veroorzaakt na immersie, bracht de kleinste verandering in expressie van de genen in de zebravis teweeg, kleiner zelfs dan de niet-pathogene *E. coli*. Interessant was het dat *P. aeruginosa* PAO1 en PA14 voor een zeer grote reactie van de zebravis zorgden. Verdere analyse van de verschillende reacties op de bacteriën liet zien dat er nauwelijks immuungerelateerde genen tussen de

genen met een hogere expressie zaten. Het gen dat het meest omhoog was gegaan in expressie na blootstelling aan *E. tarda* was *cyp1a*, een gen van de cytochroom p450-familie, waarvan bekend is dat het door toxische stoffen in het vasculaire epitheel en het epitheel van de kieuwen wordt geïnduceerd. Dit gen had een hogere expressie na immersie in alle vier de bacteriën, het hoogst na blootstelling aan *P. aeruginosa*, waarvan bekend is dat het grote hoeveelheden toxines en andere virulentiefactoren uitscheidt. Andere genen waarvan een hogere expressie gevonden werd na blootstelling, waren *zgc:154020*, een gen met een grote overeenkomst met het muis-gen *immuno-responsive gene 1* (*irg1*) en die we daarom *irg1-like* (*irg1l*) hebben genoemd, en *stanniocalcin 1* (*stc1*), dat bij mensen in verband is gebracht met de ontstekingsreactie. Analyse van de ontologie van de genen bevestigde het gebrek aan een immuunrespons. Enkel bij genen met de GO-term “response to stimulus” en meer specifiek “response to stress” werd een significante verrijking gevonden.

De afwezigheid van een geïnduceerde expressie van immuungerelateerde genen 5 uur na immersie, wees erop dat er nog geen infectie van het weefsel had plaatsgevonden en dat de gevonden veranderingen in expressie mogelijk een reactie van het epitheel waren. Daarom hebben we naar latere tijdstippen na immersie in *E. tarda* gekeken. Voor deze analyse werden zes genen uitgekozen voor qPCR-analyse, *cyp1a*, *irg1l* en *stc1*, geselecteerd op basis van de microarray-analyse, en de bekende immuunmarkers *il1b*, *mmp9* en *tnfa*. De immuunmarkers *il1b* en *mmp9* vertoonden 24 uur na infectie een reactie, die 48 uur na infectie nog veel sterker was. *Irg1l* was op alle tijdstippen geïnduceerd. *Stc1* en *tnfa* gaven dermate wisselende resultaten, dat deze verder niet zijn meegenomen in de analyse. Echter, deze variatie in combinatie met de variatie van het sterftepercentage, leidde tot de hypothese dat niet alle embryo's werden geïnfecteerd. Experimenten waarin de *E. tarda* suspensie werd gefractioneerd in de was-vloeistof en gewassen bacteriën lieten zien dat de vroege reacties van *cyp1a* en *irg1l* verklaard konden worden als een reactie op losgelaten delen van de celmembraan of andere losse bacteriële stoffen. De reactie op deze bacteriële stoffen kan van het epitheel zijn. Hierbij is de reactie van *cyp1a* relatief kort, terwijl die van *irg1l* misschien doorgezet wordt als een reactie op systemische infectie van interne weefsels of als een blijvende reactie op de bacteriële stoffen. Hoewel het mogelijk is dat dit puur een reactie is van het epitheel, kan het ook zijn dat de losgekomen bacteriële stoffen het embryo

in diffunderen, waar het vervolgens een algemene reactie veroorzaakt. De reacties van *il1b* en *mmp9* volgden voornamelijk op de blootstelling aan de bacteriële fractie, wat suggereert dat dit markers zijn voor een systemische infectie.

Door gebruik te maken van een protocol voor de isolatie van RNA uit een enkel embryo, konden we de regulatie van de genen *cyp1a*, *irg1l*, *il1b* en *mmp9* in individuele embryo's 48 uur na infectie testen. De resultaten gaven een sterkere bevestiging van onze hypothese. Terwijl *cyp1a* zoals verwacht niet was geïnduceerd en *irg1l* geïnduceerd was in alle embryo's, mogelijk als een reactie op losgelaten bacteriële stoffen, waren *mmp9* en *il1b* geïnduceerd in slechts één van de vijf embryo's. Het lijkt er dan ook op dat alleen dat ene embryo daadwerkelijk geïnfecteerd was.

Om te controleren of de gevonden variatie veroorzaakt werd door individuele verschillen tussen de embryo's, werd besloten om de zebravissen met *E. tarda* te injecteren. De reactie van dezelfde vier genen werd bepaald door middel van qPCR op twee tijdstippen, namelijk 4 en 8 uur na infectie. *Cyp1a* werd niet of nauwelijks geïnduceerd, wat in overeenstemming is met onze suggestie dat het een rol zou kunnen spelen in de reactie van het huidepitheel bij externe blootstelling aan bacteriële stoffen. Van de andere drie genen waren *irg1l* en *mmp9* 4 uur na infectie niet of zwak geïnduceerd, maar 8 uur na infectie zeer sterk geïnduceerd in alle embryo's, dit terwijl *il1b* sterk geïnduceerd was op beide tijdstippen, eveneens in alle embryo's. Niet alleen de reactie op transcriptieniveau bleek reproduceerbaar in alle embryo's na injectie met *E. tarda*, maar ook het sterftepercentage, aangezien 48 uur na infectie alle embryo's dood waren.

Nadat gebleken was dat injectie van *E. tarda* in embryo's beter reproduceerbare resultaten gaf op het niveau van individuele embryo's, hebben we hier microarray-analyse op uitgevoerd. In tegenstelling tot de resultaten van de microarray van het immersie-experiment, toonde deze microarray-analyse een hogere inductie van een groot aantal immuungerelateerde genen naast *irg1l*, *mmp9* en *il1b*. Een ontologie-analyse van de genen weerspiegelde dit met een significante verrijking van de GO-term "immune system process" naast "response to stimulus", die als enige werd gevonden na immersie.

De resultaten beschreven in dit hoofdstuk, zorgen voor enkele interessante discussiepunten en punten voor toekomstig onderzoek. Een van de meest

opvallende conclusies die getrokken kan worden, is dat het zebravisembryo verbazingwekkend resistent is tegen infectie van externe ziekteverwekkers. Van de diverse bacteriën die door verschillende onderzoeksgroepen zijn getest, zijn er slechts twee gevonden die één dag oude embryo's mogelijk kunnen infecteren door middel van statische immersie, namelijk *E. tarda* en *Flavobacterium columnare*. Bovendien, zoals aangetoond in dit proefschrift, is het zelfs twijfelachtig of *E. tarda* in immersieassays echt infectie kan veroorzaken. Als er al infectie optreedt dan is dat met een lage efficiëntie, maar het is ook niet uit te sluiten dat een deel van de embryo's dood gaat als gevolg van een toxische respons. Een test met statische immersie van drie dagen oude embryo's, waarvan de mond open is, was ook geen bruikbaar alternatief, aangezien er geen sterfte optrad in de daaropvolgende 2 dagen en na deze periode worden de zebravisembryo's minder interessant voor screeningsprojecten. Deze resultaten suggereren de vroege aanwezigheid van een zeer sterk immuunsysteem. Echter, het sterftepercentage van 100 % na intraveneuze injectie laat zien dat dit niet het geval is. In plaats daarvan lijkt het erop dat de bacteriën de huid of het darmepitheel niet kunnen penetreren en daarom geen interne infectie kunnen veroorzaken. Hoewel het mogelijk is dat *E. tarda* en *F. columnare* de huid wel kunnen penetreren, is het waarschijnlijker dat kleine, onbedoelde beschadigingen van de huid, veroorzaakt tijdens het werken met de embryo's, ervoor zorgen dat bacteriën binnen kunnen komen. Aan het begin van dit onderzoek leek het erop dat *P. aeruginosa* stammen PAO1 en PA14 sterfte veroorzaakten na immersie van de zebravisembryo's in suspensies van deze bacteriën. Naarmate meer ervaring in het werken met embryo's werd opgedaan, nam deze sterfte af tot het punt dat alle embryo's overleefden. Desalniettemin zijn *E. tarda* en *F. columnare* speciaal, aangezien zij de enige geteste bacteriën lijken te zijn die slechts weinig schade aan de huid nodig hebben om een infectie te kunnen veroorzaken.

De reden van de resistentie van zebravisembryo's tegen externe blootstelling aan bacteriën is waarschijnlijk dat het binnenkomen van bacteriën wordt voorkomen. De vraag is hoe dit wordt bereikt. Misschien produceert het epitheel tot nu toe ongeïdentificeerde antimicrobiële stoffen. Een andere mogelijke verklaring is dat het epitheel van zebravissen is omgeven door een slijmlaag die bacteriën tegenhoudt. Waarschijnlijker is dat het een combinatie van deze twee verklaringen is: een slijmlaag vol met antimicrobiële stoffen. De

aanwezigheid van resistentie tegen deze stoffen zou de virulentie van *E. tarda* en *F. columnare* in de immersieassay, kunnen verklaren. Dit zou meer in detail bestudeerd moeten worden. De resultaten van de microarray-analyse na immersie laten een reactie zien van de zebravis op uitwendig aanwezige bacteriën en voornamelijk, zoals aangetoond met qPCR, op losgelaten of uitgescheiden bacteriële stoffen. Deze reactie zou van het epitheel kunnen komen. Het meest interessante resultaat was dat *P. aeruginosa* stammen PAO1 en vooral PA14, een veel sterkere reactie veroorzaakten dan *E. tarda*. Aangezien bekend is dat *P. aeruginosa* veel stoffen uitscheidt, zou deze bacterie naast *E. tarda* gebruikt kunnen worden om deze reactie te onderzoeken en te bepalen of deze inderdaad van het epitheel afkomstig is. Verschillen tussen *E. tarda* en *P. aeruginosa* in de stoffen die een rol spelen in de respons van het epitheel, kunnen dan worden geïdentificeerd. Om te testen of de secretiesystemen een rol spelen, kunnen mutanten van bacteriën en “trans-well”-proeven worden gebruikt. In “trans-well”-proeven worden de bacteriën en de embryo's gescheiden door een filter met poriën van 0,2 µm. Deze laat geen bacteriën, maar wel uitgescheiden stoffen door, die vervolgens het embryo kunnen beïnvloeden. Om te testen of de reactie veroorzaakt wordt door componenten van LPS (lipopolysacchariden), losgekomen van de buitenmembraan tijdens het wassen, kan geëxperimenteerd worden met gezuiverde LPS of met LPS-mutanten.

De conclusie van hoofdstuk 3 is, dat het *E. tarda* immersiesysteem niet geschikt is voor grote screeningsprojecten. Recentelijk is er een automatisch injectiesysteem voor snelle screening van grote aantallen embryo's beschreven. In dit systeem worden bacteriën automatisch in de dooiers van bevruchte eieren geïnjecteerd, die vervolgens langzaam prolifereren om pas in een volgroeid embryo een infectie te veroorzaken. Dit systeem is zeer bruikbaar voor onderzoek met *Mycobacterium marinum*. Voor *E. tarda* is dit systeem echter niet geschikt vanwege de pathogeniciteit en snelle vermeerdering van de bacterie. Het zou de zich ontwikkelende zygote doden voordat het zich tot een volgroeid embryo kan ontwikkelen. Dit systeem kan mogelijk wel bruikbaar zijn als er verzwakte mutanten van *E. tarda* worden gevonden.

Analyse van een zebravismutant in Myd88

Tijdens dit promotieonderzoek werd, in een TILLING-screen, de eerste mutant geïdentificeerd met een knock-out-mutatie in een essentieel immuungerelateerd gen. Daarom hebben we in **hoofdstuk 4** *E. tarda* gebruikt om deze zebravis met een knock-out-mutatie in het gen coderend voor Myd88 te karakteriseren. Myd88 is een belangrijk adapter-eiwit in de Toll-like receptor (TLR) signaaltransductie. TLR's vormen één van de families van receptoren van het aangeboren immuunsysteem dat pathogeen-gerelateerde moleculen herkent. Er waren al eerdere studies met *myd88*-morpholino's uitgevoerd, maar morpholino's hebben een aantal nadelen. Ze kunnen alleen gebruikt worden voor de uitschakeling van genen tijdens de eerste paar dagen van de embryo-ontwikkeling, omdat ze te veel verdund of afgebroken worden tijdens latere stadia. Verder kunnen ze niet-specifieke effecten veroorzaken. De puntmutatie in *myd88* creëert een voortijdig stopcodon. Dit leidt tot een incompleet Myd88-eiwit, dat slechts bestaat uit een gedeeltelijk "death domain", dat net een deel mist dat essentieel is voor communicatie met verder in de signaaltransductieroute gelegen componenten. Dit eiwit mist eveneens het volledige TIR-domein, nodig voor communicatie met de TLR. Vergelijking van de transcriptieprofielen van de wild-type en de *myd88*^{-/-} embryo's op drie verschillende tijdstippen liet slechts een klein aantal genen zien met een consistente verandering in expressie, inclusief *myd88* zelf. Deze laatste observatie suggereert een terugkoppeling van *myd88* naar zichzelf of een sterk verminderde stabiliteit van het gemuteerde *myd88*-mRNA.

Het opkweken van de *myd88*^{-/-} mutanten tot volwassen vissen is moeilijk gebleken. Bij de start van dit onderzoek stierven de volwassen vissen zodra er een stukje vin geknipt werd voor genotypering. Daarom maakten we gebruik van wild-type en mutante zebravisembryo's van heterozygote volwassenen. Aangezien van het immersiesysteem in hoofdstuk 3 was aangetoond dat het niet geschikt is voor analyse op het niveau van individuele embryo's en het bovendien geen makkelijk meetbare immuunrespons opwekt, gebruikten we de intraveneuze injectiemethode voor de karakterisering van de immuunrespons van deze mutant. Er werd qPCR-analyse gedaan op de genen *mmp9*, *irg1l*, *il1b* en *ifn*. Dit liet een duidelijke *myd88*-afhankelijkheid zien van *mmp9* en een gedeeltelijke *myd88*-afhankelijkheid van *irg1l* en *il1b*. Voor *ifn* was het niet

mogelijk om conclusies te trekken, aangezien dit gen slechts in één van de wild-type embryo's was geïnduceerd.

De embryo's die voor de qPCR-analyse waren gebruikt, werden vervolgens geanalyseerd met microarrays. Zoals verwacht, liet dit zien dat veel immuungerelateerde genen afhankelijk zijn van Myd88. Omdat een aantal van deze immuungerelateerde genen op de array vertegenwoordigd is door meerdere probes, konden deze op een betrouwbare manier worden geïdentificeerd als *myd88*-afhankelijke genen. Onze resultaten lieten zien dat *mmp9*, *il1b* en *irak3* expressie *myd88*-afhankelijk zijn, wat eerdere resultaten verkregen met *myd88*-morpholino knockdown en *Salmonella* infectie, bevestigt. Ook verschillende andere genen zoals transcriptiefactoren (bijv. *junb*), signaaltransductiegenen (bijv. *rip2k*), cytokinegenen (bijv. *tnfb*), chemokinegenen (bijv. *cxcl-ccl*) en andere immuunresponsgenen (bijv. *ncf1*) vertoonden afhankelijkheid van Myd88. Deze resultaten komen overeen met bevindingen uit onderzoek met knock-out-muizen van *MyD88*. Van een aantal genen, waarvan werd aangetoond dat ze *myd88*-afhankelijk zijn, was eerder in een morpholino-onderzoek ook aangetoond dat ze *traf6*-afhankelijk zijn. Dit waren onder andere *mmp9*, *il1b*, *tnfb*, *ncf1*, *zgc:114032* (complement factor B), *zgc:112143* (TNF α -induced protein 9) en *tlr5b*. Deze genen kunnen nu als doelwitgenen van de *myd88*-*traf6*-signaaltransductie worden beschouwd.

De meest verrassende observatie was het verschil in expressie tussen *tnfa* en *tnfb* in de *myd88*^{-/-}-mutant. In tegenstelling tot *tnfb*, dat volledig *myd88*-afhankelijk bleek te zijn, was *tnfa* totaal onafhankelijk van Myd88. *Tnfa* en *tnfb* zijn twee kopieën in het zebravisgenoom van het gen dat in de muis en in de mens codeert voor TNF α . Terwijl *tnfb* dezelfde afhankelijkheid van Myd88 laat zien als humaan TNF α , doet *tnfa* dat niet, wat mogelijk een divergentie van de functie van deze homologe genen weerspiegelt.

De inductie van verschillende genen (zoals *il1b*) bleek niet volledig maar gedeeltelijk afhankelijk zijn van Myd88, wat mogelijk verklaard kan worden door weefsel-specifieke verschillen. Aangezien in deze experimenten het RNA geïsoleerd werd van hele embryo's, gaan de verschillen tussen de diverse weefsels verloren. Zo werden er bijvoorbeeld opvallende verschillen gevonden tussen de transcriptionele respons van de milt en de lever bij septische wild-type muizen en knock-out-muizen van Myd88. De reactie van de lever toonde

een sterke afhankelijkheid van Myd88, terwijl de reactie van de milt grotendeels Myd88-onafhankelijk was.

In dit hoofdstuk hebben we aangetoond dat de *myd88*^{-/-} mutant van de zebravis een sterk verminderde aangeboren immuunrespons tegen *E. tarda* heeft. Momenteel worden experimenten met deze zebravismutant gedaan, waarin andere pathogenen worden onderzocht. De eerste resultaten wijzen erop dat *myd88* een belangrijke rol speelt bij het onder controle houden van een *M. marinum*-infectie. Aangezien de problemen met het opkweken van de *myd88*^{-/-} zebravis mutant naar volwassenheid inmiddels zijn opgelost, kan het voordeel van de zebravismutant ten opzichte van de morpholino-knockdown nu volledig worden benut. Daarbij zullen nieuwe TILLING-screens, waarvan de efficiëntie door nieuwe sequencingtechnieken in de laatste jaren enorm is toegenomen, ertoe leiden dat er snel meer immuungerelateerde mutanten geïdentificeerd zullen worden. Het Sanger Instituut heeft de ambitie om binnen een paar jaar zebravismutanten voor ieder gen beschikbaar te hebben. Naast de TILLING-screens is ook het gebruik van de zinkvinger-technologie snel in opkomst, wat gerichte knock-out en knock-in van genen in de zebravis mogelijk maakt. Deze ontwikkelingen zullen ervoor zorgen dat de zebravis als genetisch testmodel snel op gelijke hoogte zal komen met de muis.

Conclusie

Concluderend legt het in dit proefschrift beschreven onderzoek een sterke basis voor toekomstig onderzoek. Het genoom van *E. tarda* kan inzicht geven in de verschillen tussen pathogene en niet-pathogene stammen en ook in de verschillen tussen gastheer-specifieke *E. tarda*-stammen en stammen met een breder gastheerbereik. Het zebravisembryomodel zal bij uitstek geschikt zijn om de interactie van virulentiefactoren van *E. tarda* met het aangeboren immuunsysteem van de gastheer te bestuderen. Hierbij zal het ook zeer interessant zijn om de reactie op *E. tarda* te vergelijken met de reactie op *E. ictaluri*. Helaas moeten we concluderen dat *E. tarda* weinig geschikt is voor grote screeningsprojecten, aangezien het immersiesysteem niet reproduceerbaar genoeg is en de bacterie een te sterke pathogeen is voor geautomatiseerde dooierinjecties. Toch heeft ons onderzoek naar het immersiesysteem veel interessante openingen gecreëerd voor het onderzoeken van de reactie van het zebravisepitheel, niet alleen in reactie op *E. tarda* maar

ook met betrekking tot de *P. aeruginosa* stammen. Niet alleen is de respons van het epitheel interessant, maar ook de bacteriële stoffen die deze respons veroorzaken. De karakterisering van de *myd88*^{-/-}-mutant is waarschijnlijk de belangrijkste contributie van dit proefschrift aan toekomstig onderzoek. Het is de eerste zebravismutant met een knock-out mutatie in een gen, dat centraal staat in het aangeboren immuunsysteem. In de toekomst kunnen er onderzoeksprojecten worden uitgevoerd met verschillende pathogenen en kankermodellen, waarbij de volledige rol van *myd88* in de zebravis kan worden blootgelegd, mogelijk leidend tot nieuwe inzichten in de functie van het aangeboren immuunsysteem.

