

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/32962> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Veneman, Wouter Jurjen

Title: Developing systems for high-throughput screening of infectious diseases using zebrafish

Issue Date: 2015-05-12

Chapter 8

Nederlandse samenvatting

Met alle ontwikkelingen in de laatste paar decennia is de levensverwachting van de mens ook erg vooruit gegaan. De verwachting is dat in het jaar 2050 tweeëntwintig procent van de wereldbevolking ouder is dan 60 jaar. Dit heeft natuurlijk een groot effect op de gezondheidszorg, gezien deze bevolkingsgroep op een moment in het leven medische zorg nodig zal hebben als gevolg van kanker, diabetes, osteoporose, hartziekten en veel andere vormen van ouderdom gerelateerde ziekten. Om de medische zorg die men nodig heeft te waarborgen, moeten we zorgen voor een goede ontwikkeling van medische instrumenten, zowel wat betreft functionaliteit als als biocompatibiliteit. Op dit gebied kunnen nog altijd grote verbeteringen plaatsvinden. Het gebruik van het juiste onderzoeksmodel is hierbij erg belangrijk. Geeft de data van cel- of weefselkweek genoeg informatie of schiet het tekort aan diepte in biologische context, welke je wel kan vinden in diermodellen? En welk model geeft de humane situatie het beste weer? De laboratoria en faciliteiten spelen hierbij ook een belangrijke rol, aangezien sommige pathogene organismen onderzocht kunnen worden in een biologisch veiligheidslaboratorium van niveau 1, daar waar andere alleen in biologisch veiligheidslaboratoria van niveau 3 of 4 onderzocht kunnen worden.

Ontwikkelingen optimalisatie van high-throughput technieken voor zebra vis onderzoek

Het werk in dit proefschrift is in het bijzonder gericht op het gebruik van embryo's en larven van de zebra vis als model voor verschillende infectieziekten. Een belangrijk voordeel en het onderwerp van dit proefschrift is het feit dat de embryo's en larven ideaal zijn voor high-throughput screening. Zo hebben we bepaald welk ontwikkelingsstadium het beste is voor injecties in de dooier van het embryo met twee verschillende soorten bacteriën, namelijk *Staphylococcus epidermidis* en *Mycobacterium marinum*. We hebben de resultaten vergeleken met andere injectiemethoden zoals injectie via de ader in de staart van een embryo van 1 dag oud. We hebben aangetoond dat injectie van *S. epidermidis* en *M. marinum* in de dooier van embryo's tussen het ontwikkelingsstadia van 16 tot 128 cellen optimaal is. Er vindt dan in latere ontwikkelingsstadia verspreiding van de bacteriën naar andere weefsels plaats. Injectie in een vroeger stadium leidt tot hoge mortaliteit en in een later stadium leidt ook niet tot een representatieve infectie. De meer virulente *M. marinum* M stam kon het beste voor het stadium van 64 cellen worden geïnjecteerd (**hoofdstuk 3**)

Aangezien de vroege ontwikkelingsstadia van zebra vis eitjes ideaal zijn om automatisch te injecteren in de dooier, hebben we dit uitgevoerd met RNA, DNA, bacteriën of kankercellen (**hoofdstuk 2**). De automatische micro-injector is namelijk in staat om consistent 2000 eitjes per uur te injecteren. Deze aantallen injecties zijn niet meer te evenaren door middel van handmatige injecties. Door het gebruik van dit soort automatisering zijn we in staat om meer monsters te produceren voor bijvoorbeeld antibioticatesten of andere biologische vraagstellingen in minder tijd. Dit houdt in dat waardevolle onderzoekstijd bespaard kan worden. Echter, het onderzoeken van grote aantallen monsters vraagt ook om geavanceerde analysemethoden zoals flow-cytometrie. Wij hebben gebruik gemaakt van een extra groot model flow-cytometer

(COPAS XL) dat in staat is om zebrawislarven te analyseren en sorteren (2000/30min), zonder ze daarbij te beschadigen. Daarom kan deze analyse dagelijks herhaald worden om het fluorescente signaal van de aanwezige bacteriën in deze larven te meten (**hoofdstuk 4**). Er is echter wel één probleem bij flow-cytometrie, en dat is de lage resolutie. Dit probleem hebben we opgelost door gebruik te maken van een geautomatiseerde screeningstechniek (VAST Biolmager). Daardoor zijn we in staat om larven automatisch te laden in een glazen capillair en te oriënteren in de gewenste hoek, om deze vervolgens te analyseren met een confocale laser scanning microscoop met extra kleurencamera (**hoofdstuk 3**).

Door het gebruik van deze high-throughput methode hebben we een beter begrip gekregen van de pathogenese van *S. epidermidis* in zebrawislarven. We hebben hiervoor microscopie, flow-cytometrie en transcriptoomanalyse uitgevoerd. Door het gebruik van de COPAS XL hebben een snelle analyse weten uit te voeren om de hoeveelheid bacteriën in de larven te bepalen, zonder de larven hiervoor te moeten opofferen.

Transcriptoomanalyse

We hebben door gebruik te maken van micro-arrays een basis gelegd voor analyse van transcriptoomveranderingen na een infectie in het zebrawisembryo. Deze methode werd al snel vervangen door RNA deep sequencing. Micro-array maakt gebruik van gelabelde probes voor de detectie, wat betekent dat als een bepaalde probe niet aanwezig is ook de expressie van dit bepaalde gen niet gevonden zal kunnen worden. RNAseq daarentegen telt het aantal sequenties van verschillende genen gebaseerd op een referentiegenoom. Om die reden kunnen er ook onbekende genen gevonden worden, en de analyse kan altijd herhaald worden met betere en nieuwere versies van een referentiegenoom.

Wij hebben de keuze gemaakt voor Illumina sequencing, dat gebaseerd is op analyse van expressie van cDNA dat de novo gerepliceerd wordt op de flow cell. Echter, er zijn ook nog andere opties beschikbaar voor de expressieanalyse van RNA, zoals Ion Torrent sequencing, dat ook gebruik maakt van cDNA in plaats van RNA, maar dan wel op een semiconductorchip. Met deze methode worden kleine fragmenten gebonden op specifieke beads waarvan waterstofmoleculen worden los gelaten wanneer een nucleotide bindt. Dit leidt tot een verandering van de pH, wat door een voltagemeter gemeten kan worden. Deze veranderingen in voltage kunnen dus omgezet worden in een sequentie. Een andere optie in de toekomst zou de directe methode van RNA-sequencing met behulp van de MinION kunnen zijn. Deze methode is ook gebaseerd op flow cells met nanopores die individuele moleculen kunnen meten. Dit apparaat heeft slechts de grootte van een USB-stick en wordt al gebruikt voor de sequencing van DNA maar kan theoretisch ook gebruikt worden voor RNA of eiwitten. De nanoporetechnologie is nog altijd in ontwikkeling, maar biedt voornamelijk goede vooruitzichten voor goedkopere sequencingmethoden.

Een nadeel van RNAseq is de complexiteit van de analyse van de data. Het vereist namelijk nogal wat programmeerkunde, wat niet altijd beschikbaar is in biologiejnstituten. Een oplossing zou kunnen zijn om het door bedrijven te laten uitvoeren, maar hier hangt dan wel een prijs aan. Om die reden hebben wij samen met bio-informatici en statistici een platform ontwikkeld voor het snel en gemakkelijk analyseren van RNAseq-data. Het resultaat is een softwarepakket genaamd GeneTiles (**hoofdstuk 5**), dat alle programma's zoals Bowtie2, Samtools, 'R' statistiek programma, DESeq, DEXSeq, HTSeq en pysam combineert in één programma. Aangezien GeneTiles op een server draait, kan het bereikt worden van alle computers met verschillende besturingssoftware zoals Windows of Linux met een internetconnectie. Eén van de grote voordelen van het feit dat GeneTiles op een server draait is dat daardoor geen snelle en dure computers in het laboratorium meer nodig zijn. Om een zo compleet mogelijk pakket te hebben voor de analyse zijn er extra opties toegevoegd voor directe visualisatie van differentiële expressie gebaseerd op ratio, *P*-waarde, gecorrigeerde *P*-waarde, differentiële splitsing of gewone chromosomen. Tevens hebben we alle beschikbare biologische pathways van Wikipathways toegevoegd. Daardoor kan expressedata direct gevisualiseerd worden in complexe netwerken en data sneller en beter geïnterpreteerd worden. Het resultaat van deze nieuwe methode is de vondst van een gen dat onder infectieuze condities differentieel gesplitst kan worden, namelijk glucagon a (*gcga*).

Metabole veranderingen als gevolg van infectie

Een andere opmerkelijke vondst is de hoge expressie van het gen voor leptine b (*lepb*) in larven geïnfecteerd met *S. epidermidis* en *M. marinum*. Dit was niet eerder ontdekt omdat er geen probe van *lepb* aanwezig was op de micro-array. Het leptine gen wordt onder normale condities geproduceerd door vetcellen, die de vethuishouding reguleren in het lichaam. Wanneer een persoon eet, wordt een signaal afgegeven naar de hersenen om aan te geven wanneer je vol zit. Echter, wanneer een persoon continu te veel eet, kan dit tot leptineresistentie leiden. Dit heeft tot gevolg dat er geen signaal meer is dat je waarschuwt om te stoppen met eten. Hierdoor eten men meer dan nodig en zal daarbij in gewicht aankomen met obesitas als resultaat. Dit kan dan leiden tot een continue productie van te hoge waarden van insuline, met insulineresistentie als gevolg. Insulineresistentie is 1 van de kenmerken van diabetes type 2 dat kan leiden tot chronische problemen van het verlagen van het bloedsuikerspiegel, en een tekort aan glucose omzetting tot glycogeen. Als gevolg van deze continue hoge bloedsuikerspiegel is men meer vatbaar voor hartziekten, beroertes, blindheid en nieruitval.

Aangezien leptine al erg interessant was vanwege verschillende functies in het metabolisme en het immuunsysteem en omdat *lepb* het meest geïnduceerde gen was na infectie met *M. marinum* en *S. epidermidis*, hebben we een morpholino ontworpen om de functie van *lepb* te onderdrukken (knockdown) gedurende de vroege ontwikkeling van een zebrafisembryo. De resultaten wezen op een verhoogde hoeveelheid *M. marinum*-bacteriën in de knockdown-embryo's. Dit zou kunnen betekenen dat *lepb* een belangrijke rol heeft in het infectieproces van *M. marinum* in zebrafislarven.

Daarom hebben we massaspectrometrie uitgevoerd op knockdown-embryo's en wild type embryo's, beide met en zonder infectie. We vonden metaboliëten geassocieerd met het wasting syndroom (R. Marín-Juez, ongepubliceerde data) niet langer meer beïnvloed na infectie in de leptine knockdown-embryo's. De resultaten geven aan dat leptine een belangrijke factor is gedurende het wasting syndroom als gevolg van een infectie. Dit kan een indicatie zijn dat een verband is tussen de voedingsbalans en de immuunrespons tegen *M. marinum*. Tevens zou dit een mogelijke verklaring zijn voor gewichtsverlies als gevolg van tuberculose, omdat de eetlust is onderdrukt door hoge concentraties leptine als gevolg van de infectie. In latere stadia van een tuberculose infectie, zou men kunnen speculeren dat leptineresistentie in de hypothalamus kan optreden, met als gevolg een complexe situatie waarbij de terugkeer van de eetlust in combinatie met het wasting syndroom, een nieuw stadium van de tuberculose infectie kan vormen.

Biomateriaal-geassocieerde infecties

Zoals eerder beschreven hebben we veel verschillende injectie- en implantatietechnieken ontwikkeld voor biomateriaal-geassocieerde infecties. Echter het reproduceerbaar implanteren van biomaterialen in zebrawislarven bleek moeilijker dan gedacht (**hoofdstuk 6**). Injectie van polystyreenpartikels in de staartspier bleek erg arbeidsintensief en injectie in de dooier resulteerde slechts in een geringe verspreiding door het lichaam. Desondanks hebben we aangetoond dat de diameter van de biomaterialen een effect heeft op de verspreiding. De kleinere partikels verspreiden namelijk meer dan de grotere partikels. Het mechanisme dat de verspreiding kan verklaren hebben we nog niet ontdekt, maar hopen we op korte termijn te kunnen ontrafelen. De implantatie van biomaterialen in combinatie met de gedetailleerde pathogenese van *S. epidermidis* zoals beschreven in hoofdstuk 3, 4 en 5, zou een perfecte toevoeging kunnen zijn voor reeds bekende zoogdiermodellen voor biomateriaal-geassocieerde infecties.

Conclusie

Infectieziekten zijn overal om ons heen en daarom moeten we onze kennis over virulentiefactoren en afweermechanismen blijven ontwikkelen. Het werk beschreven in dit proefschrift gaat over verschillende technieken die bij kunnen dragen aan snelle screeningsmethoden met het doel om nieuwe strategieën te ontwikkelen tegen infectieziekten. Geautomatiseerde micro-injectoren in combinatie met grote flow-cytometers hebben hun toegevoegde waarde laten zien (**hoofdstuk 2, 3 & 4**) voor onderzoeksvragen met betrekking tot (opportunistische) pathogenen. Samenwerkingsverbanden tussen verschillende onderzoeksgroepen bleken erg succesvol met als resultaat de ontwikkeling van een gemakkelijk te gebruiken analyseplatform voor RNAseq-data (**hoofdstuk 5**). Dit had veel gedetailleerde expressieprofielen van deze pathogenen in de gastheer tot resultaat. Deze aanpak kan ook meer inzicht geven in hoe biomaterialen zich gedragen in een gastheeromgeving

in aanwezigheid of afwezigheid van een infectie (**hoofdstuk 6**). Alles bij elkaar heeft dit onderzoek geresulteerd in verschillende onderzoekmodellen voor de studie van infecties veroorzaakt door bacteriën zoals *S. epidermidis* en *M. marinum* beschreven in dit proefschrift, maar ook voor andere microben zoals schimmels of gisten.

