

Seeprakala immunologisena tutkimusmallina

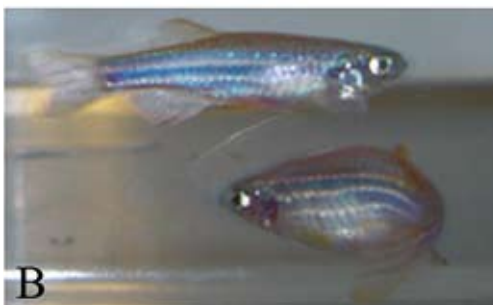
Ihmisgenomiprojekti ja uudet löydetty tautien geeniassoosiaatiot lisäävät tarvetta geneettisesti manipuloitavien mallieläinten käytölle. Seeprakala on perinteinen kehitysbiologian mallieläin, jonka suosio biolääketieteellisessä tutkimuksessa on kasvanut räjähdysmäisesti viime vuosina. Syy tutkimusmallin suosioon liittyy seeprakalan alkion läpinäkyvyyteen ja nopeaan kehitykseen sekä monipuolisiin geneettisen manipulaation mahdollisuuksiin. Seeprakalan poikasilla yksittäisiä geneejiä voidaan vaimentaa helposti morfoliinotekniikan avulla. Pienen ja nopeasti lisääntyvän seeprakalan avulla voidaan toteuttaa laajoja geneettisiä seuloja erilaisissa tautimalleissa. Immunologiseen tutkimukseen seeprakala soveltuu erinomaisesti: se on neurofysiologiselta kehitystasoltaan alin genomiltaan tunnettu selkärangaksiin kuuluva mallieläin, jolla on täysin kehittynyt immuunipuolustus – sekä synnynnäinen että hankinnainen immunitetti.

Useat synnynnäisen immunitetin mekanismit, kuten fagosytoosi ja sytokiini tuotto, kehittyivät 700 miljoonaa vuotta sitten meressä eläville selkärangattomille organismeille. Vielä nykyisin kaikki selkärangattomat – noin 95 % kaikista lajeista – puolustautuvat infektioita vastaan pelkän synnynnäisen immunitetin avulla. Monet immuunipuolustuksen perusmekanismit ovat säilyneet evoluutiossa lähes muuttumattomina selkärangaksiin ja nisäkkäisiin asti (Pancer ja Cooper 2006, Kvell

ym. 2007). Näin ollen helposti geneettisesti muunneltavia mallieläimiä, erityisesti banaanikärpistä, *Drosophila melanogaster*ita, on käytetty paljon synnynnäisen immunitetin tutkimusmallina. Banaanikärpismallin avulla on esimerkiksi löydetty ihmisen Tollin kaltaiset reseptorit (Toll-like receptors, TLRs), ensisijaisen tärkeitä, mikrobeja tunnistavat reseptorit (Hoffmann ym. 1999, Lemaitre ja Hoffmann 2007).

Immuunipuolustuksen evoluutiossa seuraava suuri harppaus, hankinnaisen immunitetin synty, tapahtui 200 miljoonaa vuotta myöhemmin, samaan aikaan, kun kaloille kehittyi ensimmäisistä kiduskaarista leukaluut. Seeprakala, *Danio rerio*, on leukakala ja kuuluu muun muassa karpin ja kultakalan tavoin *Cyprinidae*-perheeseen. Tämän perheen ja nisäkkäiden linjat erosivat 450 miljoonaa vuotta sitten toisistaan. Leukakaloilla on ylempien selkärangaitten kanssa samankaltainen täysin kehittynyt immuunipuolustus, johon kuuluvat mm. hankinnaisen immunitetin B- ja T-lymfosyytit, MHC (major histocompatibility complex) ja immunologinen muisti. Kuten synnynnäisen myös hankinnaisen immunitetin mekanismit ovat säilyneet lähes muuttumattomina synnyttäen asti – leukakaloista ihmiseen (Pancer ja Cooper 2006, Kvell ym. 2007). Vaikka seeprakala on immunologisena tutkimusmallina uusi, on jo onnistuttu luomaan useita malleja immunologisten häiriötilojen kuten leukemian, lymfooman ja immuunipuutosten tutkimiseksi seeprakalassa (Meeker ja Trede 2008).

Seeprakalalla on tehty kehitysbiologista tutkimusta 1930-luvulta lähtien, muun muassa alkioiden läpinäkyvyyden ja kohdunulkoisen kehityksen takia. Myöhemmin seeprakala on osoittautunut erittäin hyväksi malliksi useilla biolääketieteen osa-alueilla: geneettisissä, toksikologisissa ja farmakologisissa tutkimuksissa sekä viime aikoina myös infektiobiologiassa ja immunologiassa (Phelps ja Neely 2005, Meeker ja Trede 2008). Seeprakalalla on monia edullisia ominaisuuksia, joiden vuoksi siitä on nopeasti tullut suosittu biolääketieteellinen mallieläin. Tärkeimmät edut liittyvät alkionkehityksen ominaispiirteisiin ja geneettisen manipulaation monipuolisiin mahdollisuuksiin. Kehitysprosessija on helppo seurata, koska alkionkehitys tapahtuu kohdun ulkopuolella ja poikanen on ensimmäisen viikon ajan läpinäkyvä. Lisäksi kehitys etenee erittäin nopeasti: sydän lyö jo 24 tunnin kuluttua hedelmöityksestä ja kaikki elimet ovat



KUVA 1. A) Seeprakalan ruskuaispussi-poikasija 48 tuntia hedelmöityksen jälkeen. Yksi poikasista on kuoriutunut suonikalvon sisältä. B) Aikuisia seeprakaloja.

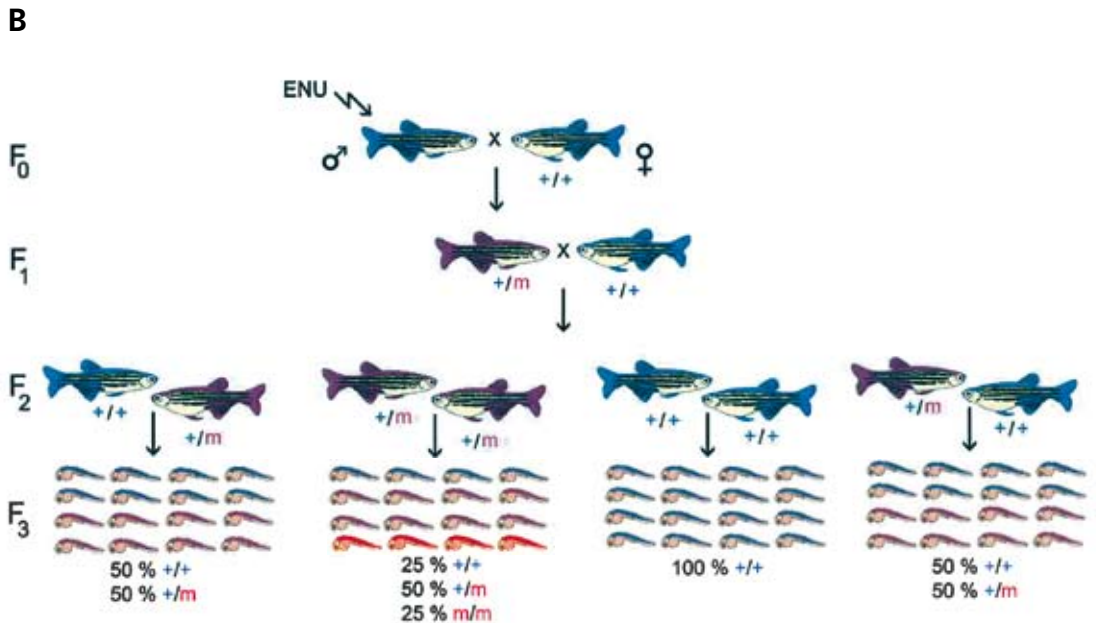
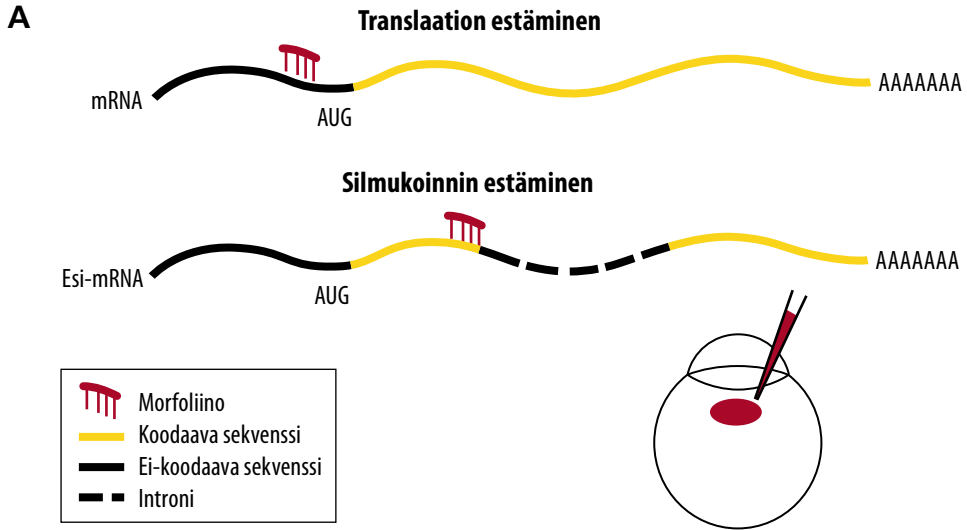
pääasiallisesti kehittyneet 48 tunnin kuluttua (**KUVA 1A**). Seeprakalan geneettinen manipulointi on suhteellisen helppoa verrattuna muihin selkärangkaisiin mallieläimiin. On olemassa tehokkaita menetelmiä tuottaa satunnaisia tai kohdennettuja mutaatioita seeprakalan perimään. Seeprakalamallin parhaita ominaisuuksia onkin mahdollisuus laajoihin geneettisiin seuloituihin uusien geenien kartoittamiseksi. Seeprakalan pieni koko (≤ 5 cm) (**KUVA 1B**) ja jälkeläisten nopea tuotto (200–300 poikasta viikossa) mahdollistavat sellaiset laajat geneettiset seulonnot, joita on aiemmin voitu toteuttaa vain selkärangattomilla mallieläimillä. Lisäksi jo tunnettuja genejä voidaan vaimentaa seeprakalan poikasilla helposti, vaikkakin lyhytaikaisesti, morfoliino-oligonukleotiditekniiikan avulla (**KUVA 2A**). Geneettisille tutkimuksille uusia mahdollisuuksia avaa seeprakalan genomien sekvensointiprojekti, joka on jo lähes valmis ja seeprakalatutkijayhteisön saatavilla (www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/) (Nüsslein-Volhard ja Dahm 2002, Lieschke ja Currie 2007) (**TAULUKKO 1**).

Seeprakalan immuunipuolustus

Synnynnäinen immunitteetti. Infektion aikana seeprakalan elimistöön päässeen patogeenin havaitsevat ensimmäisenä hahmontunnistusreseptorit, jotka tunnistavat erilaisia konservoituneita patogeenien pintarakenteita. Hahmontunnistusreseptoreista Tollin kaltaiset reseptorit (TLR) ovat tärkeitä signaloivia re-

TAULUKKO 1. Seeprakalan etuja ja heikkouksia mallieläimenä.

- + Laajat mutageneesiseulonnot mahdollisia
- + Neurofysiologiselta kehitystasoltaan alin mallieläin, jolla on hankinnainen immunitteetti
- + Tuottaa nopeasti paljon jälkeläisiä, yksilönkehitys on nopeaa
- + Poikaset ovat läpinäkyviä ensimmäisten elinpäivien ajan
- + Morfoliinotekniikat mahdollisia
- Solubiologisten työkalujen puute, ei jatkuvia solulinjoja eikä kaupallisia vasta-aineita saatavilla
- Poikkeaa anatomisesti ihmisestä enemmän kuin nisäkäsmallieläimet, esimerkiksi keuhkot ja luuydin puuttuvat



KUVA 2. A) Geenin vaimentaminen morfoliinitekniikalla. Morfoliinit voidaan suunnitella estämään translaation aloitusta tai esi-RNA:n silmukointia. Morfoliinit ruiskutetaan 1–4 solun asteella olevaan alkion ruskuaispussiin. **B)** Geneettinen seulonta. Tehtäessä mutageneesiseulontaa seeprakaloille perustajapolven (F_0) uros käsitellään kemiallisella mutageenilla (ENU), jolloin toiseen sen perimän DNA-juosteista tulee satunnaisia pistemutaatioita. Uros risteytetään villin tyyppin ($+/+$, sininen) naaraan kanssa, jolloin saadaan mutaation suhteen heterotsygoottinen ($+/m$, violetti) F_1 -polvi. Myös F_1 -polven

kalat risteytetään villin tyyppin kalojen kanssa, ja näin saadaan F_2 -polvi, jossa on mutaation suhteen sekä heterotsygootteja että villityypin yksilöitä. F_2 -polvessa sisaruksia risteytetään keskenään F_3 -polveksi, jossa 25 %:ssa poikueista 25 % poikasista on mutaation suhteen homotsygootteja (m/m , punainen). Mutaatioon suhteen homotsygoottiset yksilöt pyritään löytämään sopivalla seulontamenetelmällä, esimerkiksi poikasten ilmiäsuun perusteella. Mutatoinut kohdegeeni voidaan tunnistaa positionaalisen kloonauksen avulla.

septoreita. Seeprakalalta on löydetty vähintään yksi vastine ihmisen jokaiselle kymmenelle TLR-geenille ja lisäksi kaksi kalaspesifistä TLR-geeniä. Hahmontunnistusreseptorit ovat enimmäkseen säilyneet hyvin evoluutiossa kaloista ihmiseen (Meijer ym. 2004, Phelps ja Neely 2005).

Hahmontunnistusreseptorien sitoutuminen patogeeneihin laukaisee tulehdusvälittäjäaineiden tuotannon. Seeprakalalta on löydetty

T-solujen toiminta on seeprakalalla samankaltaista kuin ihmisellä

mm. interleukiini 1 β :n ja tuumorinekroositekijä alfan geenit, jotka osallistuvat akuutin vaiheen immuunivasteen käynnistymiseen

samankaltaisesti kuin nisäkkäiden vastaavat tulehduksenvälittäjäaineet (Phelps ja Neely 2005).

Tulehduksenvälittäjäaineet saavat aikaan hetkellisesti akuutin vaiheen proteiinien tuoton huomattavan lisääntymisen. Seeprakalalta on löydetty useiden ihmisen akuutin vaiheen proteiinien vastineiden kuten CRP:n ja seerumin amyloidi A:n lisäksi uusia kalaspesifisiä akuutin vaiheen proteiineja. (Meeker ja Trede 2008). Tulehduksen akuutin vaiheen aikana tapahtuu myös komplementin aktivaatio, joka voi seeprakalalla tapahtua kolmea eri reittiä kuten ihmiselläkin: klassista reittiä, vaihtoehtoista reittiä tai lektiinireittiä. Komplementtisyysteemi on seeprakalalla täysin kehittynyt ja hyvin samankaltainen kuin ihmisellä. Se pyrkii tuhoamaan patogeenit rikkomalla niiden solukalvon tai opsonoimaan ne fagosytoosia varten (Phelps ja Neely 2005).

Seeprakalalla on bakteereja fagosytoivia kudosemakrofageja, jotka vastaavat ulkomuodoltaan ja toiminnaltaan ihmisen makrofageja (Trede ym. 2004, Phelps ja Neely 2005). Toisin kuin ihmisillä seeprakaloilla makrofagit kypsyvät munuaisissa luuytimen sijaan (Phelps ja Neely 2005). Toista tärkeää akuutin vaiheen fagosytoivaa solutyyppejä granulosityttejä seeprakalalla on kahdenlaisia: neutrofiileja ja nisäkkäistä poiketen tuntemattomalla tavalla toimivia soluja, joilla on sekä eosinofiilisen että basofiilisen granulositytin piirteitä

(Lieschke ym. 2001, Phelps ja Neely 2005).

Virusinfektioita ja solunsisäisiä patogeeneja vastaan seeprakala taistelee sytotoksisilla soluilla, joita on kahta eri tyyppiä: luonnollisia tappajasoluja (NK-soluja) ja epäspesifisiä sytotoksia soluja (nonspecific cytotoxic cells, NC). NK-solut tunnistavat mikrobeja reseptorivälitteisesti, mutta seeprakalalta ei ole löytynyt NK-reseptoreja. Luukaloille ominaisten NITR-reseptorien (novel immune-type receptors) on ajateltu hoitavan NK-reseptorien tehtävää mikrobien tunnistamisessa (Trede ym. 2004). NC-soluilla puolestaan on ilmeisesti tärkeä tehtävä kalan parasiittien tunnistamisessa, ja ne muistuttavat morfologialtaan monosyyttejä enemmän kuin NK-soluja (Phelps ja Neely 2005) (TAULUKKO 2).

Hankinnainen immunitetti. Antigeneita esittelevät solut ovat ensimmäisiä hankinnaisen immunitetin soluja, jotka ovat kontaktissa elimistöön tunkeutuneen patogeenin kanssa. Seeprakaloilta ei ole löydetty dendriittisoluja, »ammattimaisia» antigeeniä esitteleviä soluja, mutta niillä on sekä monosyyttejä että kudosemakrofageja, jotka pystyvät tähän tehtävään. Antigeneita esittelevät solut fagosytoivat mikrobin ja prosessoivat sen peptideiksi. Antigeenien esittely tapahtuu pernassa, munuaisissa ja suolessa, jotka toimivat seeprakalan sekundaarisina imukudoksina (Phelps ja Neely 2005).

Seeprakalalla ei ole luuydintä eikä ilmeisesti imusolmukkeita, joskin imusuonijärjestelmä on seeprakalalta löydetty vasta hiljattain (Yaniv ym. 2006). Luuytimen sijaan B-solut kypsyvät munuaisissa.

T-solujen toiminta on seeprakalalla samankaltaista kuin ihmisellä, ja seeprakalalla onkin toimiva immunologinen muisti. Toisin kuin ihmisellä, seeprakalan B-solut erittävät lähinnä IgM-luokan vasta-aineita, ja IgG-, IgD-, IgE ja IgA-luokan vasta-aineet puuttuvat lähes kokonaan. Hedelmöityksestä noin neljän viikon ajan seeprakalan poikasten B-solut eivät vielä eritä immunoglobuliineja ja T-solut ovat kypsymättömiä. Sitä ennen immuunipuolustus perustuu pelkkään synnynnäiseen immunitettiin (van der Sar ym. 2004, Trede ym. 2004, Phelps ja Neely 2005, Meeker ja Trede 2008) (TAULUKKO 2).

TAULUKKO 2. Ihmisen, seeprakalan ja banaanikarpäsen immuunipuolustus.

	Ihminen	Seeprakala	Banaanikarpänen
Synnynnäinen immunitetti			
Tollin kaltaiset reseptorit (TLR)	10 erilaista, kaikilla immunologinen tehtävä	Löydetty vastine jokaiselle ihmisen TLR:lle, ligandeissa eroja ihmiseen verrattuna	Noin 10 Toll-reseptoria, joista vain yhdellä osoitettu immunologinen tehtävä
Granulosyytit	Neutrofiilit, eosinofiilit ja basofiilit	Neutrofiilit ja eosinobasofiilit	–
Makrofagit	+	+	Makrofaginkaltaiset plasmatosyytit
Sytotoksiset solut	NK-solut	NC-solut ja NK-solut, eroja reseptoreissa verrattuna ihmiseen	–
Komplementti	+	+	Joidenkin komponenttien vastineita, ei koko systeemiä
Hankinnainen immunitetti			
Primaariset imukudokset	Luuyn ja kateenkorva	Munuaiset ja kateenkorva	–
Sekundaariset imukudokset	Imusolmukkeet, suoli, perna, ym.	Perna, munuaiset, suoli	–
MHC-proteiinit	+	+	–
Antigeenia esittelevät solut	Dendriittisolut, monosyytit, makrofagit ja B-solut	Monosyytit ja makrofagit	–
Lymfosyytit	T- ja B-solut	T- ja B-solut, eroja vastainetuotannossa verrattuna ihmiseen	–

MHC = major histocompatibility complex, NK-solut = luonnolliset tappajasolut, NC-solut = epäspesifiset sytotoksiset solut

Seeprakalan infektibiologia ja immunologia

***In vivo* -kuvantaminen.** Seeprakalan poikasten läpinäkyvyys ja kohdunulkoinen kehitys tekevät mahdolliseksi elävän selkärankaisen organismin toimintojen ja kehityksen seuraamisen ja kuvantamisen helposti ja epäinvasiivisesti. Kuvantaminen on toistaiseksi rajoittunut pigmentaation muodostumisen vuoksi alle viikon ikäisiin poikasiin. Tulevaisuudessa myös aikuisen kalan toimintojen kuvantaminen lienee mahdollista läpinäkyvinä säilyvillä kalalinjoilla (White ym. 2008).

Seeprakalamallin avulla voidaan kuvantaa elinten dynaamista kehitystä ja selvittää jopa yksittäisten solujen alkuperä kuvaamalla kehitysprosessia ja jäljittämällä sitten soluja ajassa taaksepäin videolta (Yaniv ym. 2006). On

mahdollista seurata tulehdussolujen vaeltamista selkärankaisen elimistössä esimerkiksi haavan paranemisen tai infektion aikana (Redd ym. 2006). Tulehdussolujen kuvantamisessa voidaan hyödyntää lukuisia saatavilla olevia siirtogeenisiä kalalinjoja, jotka ilmentävät fluoresoivaa merkkiainetta (green fluorescent protein, GFP) kiinnostuksen kohteena olevissa soluissa. On kehitetty esimerkiksi seeprakalalinjoja, jotka ilmentävät GFP:tä epäkypsissä T- ja B-soluissa, T-soluissa, neutrofiileissa tai myeloidilinjan soluissa (Jessen ym. 1999, Traver ym. 2003, Hsu ym. 2004, Langenau ym. 2004, Renshaw ym. 2006). Fluoresoivien

» Henna Syrjäkarin ja Marikki Laihon palkitut nro 22/2008: Välkettä syvyyksistä – kemian Nobelin palkinto vihreän fluoresoivan proteiinin keksijöille, s. 2599.

YDINASIAI

- ▶ Alkioiden läpinäkyvyyden ja nopean kohdunulkoisen kehityksen takia seeprakala on suosittu kehitysbiologian mallieläin.
- ▶ Seeprakalan geneettiseen manipulointiin on monipuolisia mahdollisuuksia.
- ▶ Seeprakalamallissa voidaan sekä toteuttaa laajoja geneettisiä seulontoja että mallintaa useita ihmisen sairauksia.
- ▶ Seeprakala on neurofysiologiselta kehitystasoltaan alin genomiltaan tunnettu mallieläin, jolla on täysin kehittynyt immuunipuolustus.
- ▶ Immunitetin mekanismit ovat hyvin säilyneet evoluutiossa kaloista ihmiseen.

isäntäsolujen toiminnan lisäksi voidaan seurata fluoresoivien patogeenien toimintaa elimistössä. Saatavilla on valikoima eri aallonpituuksilla fluoresoivia bakteereja, jotka yhdistettynä siirtogeenisiin GFP-kalalinjoihin tarjoavat monenlaisia mahdollisuuksia immuunivasteen ja infektioprosessin tutkimiseen läpinäkyvissä kalanpoikasissa.

Käänteisen genetiikan (reverse genetics) tavoitteena on erilaisia menetelmiä käyttäen muuttaa yksittäistä tunnettua geeniä ja näin mallintaa vastaavan geenimutaation aiheuttamaa tautia ihmisessä. Hiirimallissa paljon käytetty »knockout»-geenivaimennusmenetelmä ei ole toistaiseksi onnistunut seeprakaloilla, koska seeprakalojen alkioiden kantasoluja ei ole onnistuttu kasvattamaan (Sood ym. 2006). Sen sijaan seeprakalan poikasilla on mahdollista vaimentaa nopeasti ja spesifisesti yksittäisiä tunnettuja geenejä morfoliino-oligonukleotiditekniiikan avulla (Nasevicius ja Ekker 2000). Morfoliinot viedään mikroinjektioilla alkioiden ruskuaispussiin, mistä ne pääsevät alkion kaikkiin soluihin. Morfoliinot ovat 21–25 emäsparin mittaisia muunneltuja antisense-oligonukleotideja, jotka sitoutuvat spesifisesti vastaavaan sekvenssiin kohdegeenin lähetti-RNA:ssa. Ne voidaan suunnitella

estämään joko translaation aloitusta tai lähetti-RNA:n silmukoimista (KUVA 2A).

Morfoliinotekniikan suurin puute on se, että vaikutus kestää vain 4–5 vuorokauden ajan, minkä jälkeen morfoliinin määrä kalanpoikaisen soluissa ei ole enää riittävä ja kohdeproteiinia alkaa jälleen ilmentyä. Tämän vuoksi morfoliiniin perustuvat tutkimukset rajoittuvat alle viiden vuorokauden ikäisiin seeprakalanpoikasiin, ja niinpä esimerkiksi hankinnaista immunitteettia ei morfoliinotekniikalla voida tutkia (Nasevicius ja Ekker 2000). Lisäksi tulosten tulkintaa vaikeuttavat usein morfoliinon epäsosifiset vaikutukset ilmiasuun. Tulosten spesifisyys voidaan varmistaa esimerkiksi suunnittelemalla samalle geenille kaksi toisistaan riippumatonta morfoliinoa. Toisaalta geenien vaimennus morfoliinon avulla on esimerkiksi »knockout»-hiirten tuottamiseen verrattuna erittäin halpaa, nopeaa ja helppoa. Tämä mahdollistaa toiminnallisten seulontojen toteuttamisen, kuten tutkimuksessa, jossa seulottiin 61 ehdokasgeenin joukosta 14 hematopoeettisten kantasolujen säätelijää (Eckfeldt ym. 2005).

Suora genetiikka (forward genetics). Toisin kuin ihmisgenetiikassa, jossa mutaatioita etsitään potilaista, malliorganismeissa voidaan tuottaa suuri määrä mutanttityksilöitä, joista tunnistetaan kiinnostuksen kohteena oleva muuttunut ilmiasu. Näin on mahdollista etsiä systemaattisesti ennen tuntemattomia geenejä, jotka ovat välttämättömiä tutkittavalle toiminnolle.

Genominlaajuisia immunologisia mutaatioseulontoja on tehty hyvin tuloksin mm. sukulamadossa, banaanikärpäsessä ja kasveissa. Laajan mittakaavan mutaatioseulonnan toteuttaminen selkärankaisessa mallieläimessä on eräs houkuttelevimmista seeprakalamallin tarjoamista mahdollisuuksista. Ensimmäiset seeprakalan geneettiset seulonnat tehtiin 1990-luvulla Bostonissa ja Tübingenissä. Niissä kartoitettiin varhaista alkionkehitystä ohjaavia geeniverkostoja (Driever ym. 1996, Haffter ym. 1996). Seeprakalojen nopean kehityksen, jälkeläisten nopean tuoton ja pienten tilavaatimusten vuoksi niillä on mahdollista toteuttaa laajoja geneettisiä seulontoja, jopa saturaa-

tioon asti (tilastollisesti tuotettu mutaatio jokaiseen geeniin genomissa), mikä on ollut aikaisemmin mahdollista vain selkärangattomilla mallieläimillä. Nisäkkäillä, esimerkiksi hiirillä, laajojen geneettisten seulontojen toteuttaminen on ongelmallista, koska vaatii erittäin suuria resursseja kasvattaa ja analysoida riittävän suuri määrä mutagenisoituja eläinlinjoja. Nisäkäsmalleissa varhaisten kehitysvaiheiden prosesseja, kuten synnynnäisen immunitietin toimintaa ennen hankinnaisen immunitietin käynnistymistä, ei myöskään päästä seuraamaan alkioiden kohdunsisäisen kehittymisen vuoksi (van der Sar ym. 2004, Trede ym. 2004, Phelps ja Neely 2005, Meeker ja Trede 2008).

Seeprakalojen sukusoluihin voidaan tuottaa mutaatioita kolmella tavalla: kemiallisilla yhdisteillä, esimerkiksi N-etyyli-N-nitroso-urealla (ENU), insertionaalisen mutageneesin avulla, esimerkiksi virusvektoreilla, tai gamma-säteilyllä. Kemiallinen mutageneesi ENU:lla on yleisimmin käytetty tapa (Pelegri 2005). ENU-käsittelyllä aiheutetaan ensimmäisen sukupolven uroskalojen sukusoluihin satunnaisia mutaatioita. Seulontaa varten tuotetaan mutaatioiden suhteen homotsygoottisia yksilöitä risteyttämällä ENU:lla käsiteltyjen kalojen jälkeläisiä keskenään kolmanteen sukupolveen asti (KUVA 2B). Kun seulonnassa on löydetty poikue, jossa esiintyy haluttua ilmiä, selvitetään, missä geenissä mutaatio sijaitsee. Tällä tavalla on löydetty esimerkiksi useita B- ja T-lymfosyyttien erilaistumiselle välttämättömiä geenejä (Schorpp ym. 2006, Trede ym. 2007).

Infektiomallit seeprakalassa. Seeprakalaa on käytetty onnistuneesti tutkimusmallina erilaisille ihmisen infektiotaudeille. Aikuisen seeprakalan kokeellinen infektio aikaansaadetaan ruiskuttamalla bakteerisuspensiota joko verenkiertoon tai vatsakalvon sisään. Poikasten infektoimiseen riittää bakteerisuspension lisääminen veteen. Patogeenin mukaan ongelmia voi syntyä epäedullisten lämpötilaolosuhteiden vuoksi: vaihtolämpöisiä seeprakaloja kasvatetaan +28 °C:ssa, mutta nisäkäspatogeenien kasvulle ja toiminnoille optimaalinen lämpötila on +37 °C. Tästä syystä infektiomalleissa pyritään usein hyödyntämään seepraka-

lan luonnollisia patogeeneja (van der Sar ym. 2004).

Kalapatogeeni *Mycobacterium marinum* on läheinen sukulainen ihmiselle tuberkuloosia aiheuttavalle *M. tuberculosis* -bakteerille. Ihmisen ja seeprakalan tuberkuloosin taudinkuvat muistuttavat toisiaan: kuten *M. tuberculosis* ihmistuberkuloosissa, *M. marinum* aiheuttaa sekä aikuisessa kalassa että poikassa etenevän kroonisen systeemisauroden, jossa kudoksiin kehittyy kaseonekroottisia granulomatoottisia muutoksia (Tobin ja Ramakrishnan 2008).

Streptococcus iniae on suuri taudinaiheuttaja kalankasvattamoissa ja voi aiheuttaa infektion sekä kaloissa että ihmisissä. *S. iniae* aiheuttaa seeprakalalla systeemisen invasiivisen tulehduksen, jonka oireita on esimerkiksi aivokalvontulehdus (Neely ym. 2007). Suboptimaalisesta lämpötilasta huolimatta seeprakalaa on käytetty infektiomallina ihmispatogeeneille *Salmonella arizonae*, *Streptococcus pyogenes* ja *Salmonella typhimurium* (van der Sar ym. 2003).

Lopuksi

Seeprakalamallissa yhdistyvät ainutlaatuisella tavalla sekä yksinkertaisempien että kehittyneempien malliorganismien parhaat puolet: mahdollisuus tehokkaaseen geneettiseen seulontaan ja ihmisen sairauksien mallintamiseen. Yhdistämällä laaja geneettinen seulonta tutkittavaan tautimalliin voidaan löytää täysin uusia patogeneesiin vaikuttavia geenejä.

Seulontaa varten seeprakalojen perimään aiheutetaan satunnaisia mutaatioita ja etsitään taudinkuvaan vaikuttavia geenimuutoksia. Seulottaessa infektiolaitteen vaikuttavia geenejä voidaan hyödyntää kalalinjoja, jotka ilmentävät fluoresoivia merkkiaineita erilaisissa tulehdussoluissa tai fluoresoivaa merkkiainetta ilmentävää patogeenia. Näin voidaan selvittää infektion etenemisessä tapahtuvia,

Seeprakalamallissa yhdistyvät sekä yksinkertaisempien että kehittyneempien malliorganismien parhaat puolet

isännän ja patogeenin vuorovaikutukseen perustuvia prosesseja ainutlaatuisella tavalla. Samassa infektiomallissa seulonta voidaan toteuttaa vaihtoehtoisesti myös tuottamalla mutaatioita bakteerin perimään, jotta saadaan tietoa patogeenin virulenssitekijöistä. Saatua

tietoa voidaan hyödyntää esimerkiksi etsittäessä uusia rokotuskohteita. Lääketieteellinen tutkimus tarvitsee seeprakalan kaltaisia malli-organismeja, jotta ihmisen sairauksien syntyä solu- ja molekyyllitasolla voidaan ymmärtää paremmin. ■

MATALEENA PARIKKA, HLT, tutkijatohtori

LEENA-MAIJA VANHA-AHO, LuK

SAARA KUKKOLA, LuK

MIKA RÄMET, professori, erikoislääkäri

Lääketieteellisen teknologian instituutti
33014 Tampereen yliopisto

KIRJALLISUUTTA

- Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, ym. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 1996;123:37–46.
- Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Flynn CM, ym. Functional analysis of human hematopoietic stem cell gene expression using zebrafish. *PLoS Biol* 2005;3:e254.
- Haffter P, Granato M, Brand M, ym. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 1996;123:1–36.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313–8.
- Hsu K, Traver D, Kutok JL, ym. The pu.1 promoter drives myeloid gene expression in zebrafish. *Blood* 2004;10:1291–7.
- Jessen JR, Willett CE, Lin S. Artificial chromosome transgenesis reveals long-distance negative regulation of rag1 in zebrafish. *Nat Genet* 1999;23:15–6.
- Kvell K, Cooper EL, Engelmann P, Bovari J, Nemeth P. Blurring borders: innate immunity with adaptive features. *Clin Dev Immunol* 2007;2007:83671.
- Langenau DM, Ferrando AA, Traver D, ym. In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7369–74.
- Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 2007;25:697–743.
- Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007;8:353–67.
- Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 2001;98:3087–96.

- Meeker ND, Trede NS. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev Comp Immunol* 2008;32:745–57.
- Meijer AH, Krens SFG, Rodriguez IAM, ym. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Mol Immunol* 2004;40:773–83.
- Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 2000;26:216–20.
- Neely MN, Pfeifer JD, Caparon M. *Streptococcus-zebrafish* model of bacterial pathogenesis. *Infect Immun* 2002;70:3904–14.
- Nüsslein-Volhard C, Gilmour DT, Dahm R. Introduction: zebrafish as a system to study development and organogenesis. Kirjassa: Nüsslein-Volhard C ja Dahm R, toim. *Zebrafish*. Oxford University Press 2002, s. 1–5.
- Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2006;24:497–518.
- Pelegri F. Mutagenesis. Kirjassa: Nüsslein-Volhard C, Dahm R, toim. *Zebrafish*. Oxford University Press 2002, s. 145–74.
- Phelps HA, Neely MN. Evolution of the zebrafish model: from development to immunity and infectious disease. *Zebrafish* 2005;2:87–103.
- Redd MJ, Kelly G, Dunn G, Way M, Martin P. Imaging macrophage chemotaxis in vivo: studies of microtubule function in zebrafish wound inflammation. *Cell Motil Cytoskeleton* 2006;63:415–22.
- Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DM, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MK. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 2006;108:3976–8.
- van der Sar AM, Appelmeik BJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Bitter W. A star with stripes: zebrafish as an infection model. *Trends Microbiol* 2004;12:451–7.

- van der Sar AM, Musters RJ, van Eeden FJ, Appelmeik BJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Bitter W. Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections. *Cell Microbiol* 2003;5:601–11.
- Schorpp M, Bialecki M, Diekhoff D, ym. Conserved functions of Ikaros in vertebrate lymphocyte development: genetic evidence for distinct larval and adult phases of T cell development and two lineages of B cells in zebrafish. *J Immunol* 2006;177:2463–76.
- Sood R, English MA, Jones M, ym. Methods for reverse genetic screening in zebrafish by resequencing and TILLING. *Methods* 2006;39:220–7.
- Tobin DM, Ramakrishnan L. Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol* 2008;10:1027–39.
- Traver D, Paw BH, Poss KD, Penberthy WT, Lin S, Zon LI. Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat Immunol* 2003;4:1238–46.
- Trede N, Meijer AH, Snaar-Jagalska BE, Spaik HP. Model systems for infectious disease and cancer in zebrafish: a report on an EMBO workshop held at the Lorentz Center, Leiden, The Netherlands, July 16–18, 2007. *Zebrafish* 2007;4:287–92.
- Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* 2004;20:367–79.
- White RM, Sessa A, Burke C, ym. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell* 2008;2:183–9.
- Yaniv K, Isogai S, Castranova D, Dye L, Hitomi J, Weinstein BM. Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med* 2006;12:711–6.

SIDONNAISUDET:

Ei ilmoitusta sidonnaisuuksista