

ZEBRAFISCH-EMBRYONEN ERLEICHTERN DIE DETEKTION VON NEUROTOXINEN IN DER ÖKOTOXIKOLOGIE

ZEBRAFISH EMBRYOS FACILITATE THE DETECTION OF NEUROTOXINS IN ECOTOXICOLOGY

Hintergrund und Ziele

Für eine Vielzahl an Chemikalien, die in die Umwelt gelangen, wird eine neuroaktive Wirkung vermutet. Viele Insektizide sind beispielsweise speziell zur Störung der neuronalen Erregungsleitung in Insekten entwickelt worden. Auch spezifisch oder unspezifisch das Nervensystem beeinflussende Arzneimittel sind in der Umwelt zu finden. Obwohl neuroaktive Substanzen eine beträchtliche Gefahr, insbesondere für aquatische Organismen, darstellen, liegen meist keine oder nur unzureichende Informationen über ein neurotoxisches Potenzial vor. Neurotoxikologische Untersuchungen fokussieren gewöhnlich auf akute und chronische Gesundheitsrisiken für den Menschen, die Umweltrelevanz neurotoxischer Wirkungen von Chemikalien bleibt unberücksichtigt. Traditionell werden Neurotoxizität und Entwicklungsneurotoxizität mit zeitaufwändigen, teuren und ethisch bedenklichen Testmethoden an Nagern untersucht. Der Nachweis einer neurotoxischen Wirkung mit dem Fischembryotest (FET) hingegen vermeidet den Einsatz von Säugern und Tierversuchen allgemein. Das toxische Potential von Chemikalien auf die Neurogenese im Wirbeltier kann im Fischembryomodell leichter und schneller untersucht werden, und die Entwicklung und Struktur des Nervensystems bei Wirbeltieren sind genügend konserviert, um eine Übertragbarkeit zwischen Fisch und Säuger / Mensch zu gewährleisten.

Die Eier und Embryonen des Zebrafisch (*Danio rerio*), die hierfür verwendet werden, sind in großer Zahl im Labor verfügbar und aufgrund der geringen Größe, guter Transparenz und schneller Embryonalentwicklung (ca. 48 h) ideal für Screening-Anwendungen im Mittel- und Hochdurchsatz.

Projektbeschreibung

Es wurden Insektizide und pharmazeutische Wirkstoffe mit neurologischem Phänotyp und/oder Wirkmechanismus (z. B. Blockade der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren) ausgewählt und im FET in Kombination mit Motoneuronen-

spezifischen whole-mount Immunfärbungen getestet. Neuronale Schädigungen sollten so in Fischembryonen mit Hilfe monoklonaler Antikörper lokalisier- und charakterisierbar gemacht werden. Diese Methode erlaubt die Differenzierung zwischen primären (PMN) und sekundären Motoneuronen (SMN) des embryonalen Rückenmarks. Schädigungen können mikroskopisch anhand der in Tab.1 genannten Merkmale klassifiziert und ausgewertet werden.

Ergebnisse

Die getesteten Substanzen führten zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Spontanbewegung und der Pigmentierung und einem verkrümmten Notochord und Neuralrohr. Solche Defekte können mit einer beeinträchtigten neuronalen Entwicklung assoziiert werden. Die Färbung der PMNs und SMNs bestätigte eine neurotoxische Wirkung. Mit steigender Konzentration war eine übermäßige Desorganisation und Verzweigung der Axone zu beobachten (Fig. 1A). Die entsprechende Konzentrations-Wirkungsbeziehung erwies sich zudem im Vergleich zum Standard-FET als etwas sensitiver (Fig. 1B).

Fazit

Es gelang uns, mittels einer einfachen und schnellen immunchemischen Methode den FET so zu ergänzen, dass entwicklungsbezogene neuronale Schäden erkannt und charakterisiert werden können. Dadurch wird die Darstellung von Zusammenhängen zwischen Schadstoffexposition und neurotoxischer Wirkung im FET möglich und kann im Rahmen des Standardtestverfahrens zur Bestimmung des neurotoxischen Potenzials einer Substanz herangezogen werden.

Auftraggeber / Sponsor

Das Projekt wird durch das *Attract*-Programm der Fraunhofer-Gesellschaft gefördert.

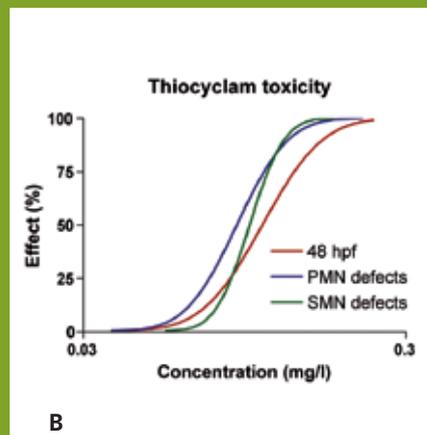
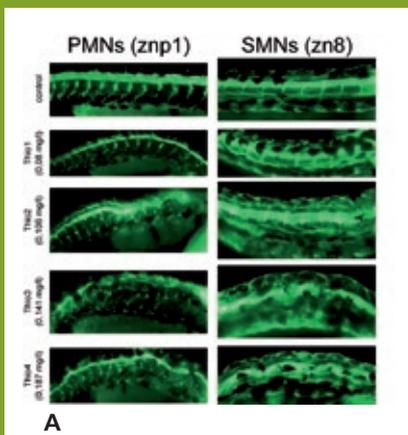


Figure 1: Effects of thiocyclam on primary and secondary motor axon development. (A) Notochord of embryos stained with *znp1* for PMNs or *zn8* for SMNs. (B) Comparison of concentration-effect curves of standard zFET and neurotoxicity tests. Antibodies were supplied by the Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa.

Background and aims

Many chemicals entering the environment are likely to be neuroactive. For example, many insecticides are developed specifically to disrupt neuronal transmission in insects. Pharmaceuticals that specifically or non-specifically target the nervous system are also detected in the environment. Despite the considerable hazard these neuroactive substances may cause to aquatic organisms, there is generally little or no information about their neurotoxic potency. Neurotoxicological studies commonly focus on acute and chronic human health risks only, whereas the environmental relevance of neurotoxic effects is generally ignored. Traditionally, developmental neurotoxicity is assessed in rodents, using expensive, time-consuming and ethically disputable test methods. The use of animals for the detection of neurotoxic effects can be avoided by applying the fish embryo test (FET) instead. The fish embryo model allows the neurotoxicity of chemicals to be tested rapidly, and there is sufficient conservation in the vertebrate nervous system to provide transferability between fish, non-primate mammals and humans. Zebrafish (*Danio rerio*) eggs and embryos are readily available in large numbers for laboratory tests, and due to their small size, transparency and rapid development (~48 h), they are ideal for medium/high throughput screening applications.

Approach

Several pesticides and pharmaceuticals with neurological effects and/or mode of action (e.g. inhibition of nicotinic acetylcholine receptors) were selected and tested in the FET combined with motor neuron-specific whole mount immunostaining. Monoclonal antibodies were used to localize and characterize neuronal damage in fish embryos. This method allowed primary motor neurons (PMN) and secondary motor neurons (SMN) in the embryonic spinal cord to be distinguished. Defects were classified microscopically as shown in Table 1.

Results

The substances we tested induced a concentration-dependent reduction in spontaneous movement and pigmentation, as well as malformation of the notochord and neural tube. Such defects are often associated with neurodevelopmental aberrations. Specific staining of the PMNs and SMNs confirmed the neurotoxic effects. With increasing concentrations, excessive branching and disorganisation of the axons became apparent (Fig. 1A). Furthermore, the corresponding concentration-effect relationship turned out to be more sensitive than the standard FET (Fig. 1B).

Table 1: Classification of motor axon defects observed in 48 hours post fertilization zebrafish embryos

Motor axon defect	Classification
Truncated at the horizontal myoseptum	Severe
Truncated at the horizontal myoseptum + excessively branched	Severe
Excessively branched but not truncated	Moderate
Innervates neighboring myotome	Moderate
Ectopic branches or ventral roots but overall normal axon morphology	Mild
Defasciculated axons	Mild

Conclusion

We were able to refine the FET by adding a rapid and convenient immunochemical method that facilitated the detection and characterization of neurodevelopmental defects. This allowed us to correlate contaminant exposure with neurotoxic effects in the FET, and can be used simply in the context of the standard test procedure to determine the neurotoxic potential of any substance.

Contact / Ansprechpartner

Dr. Martina Fenske
Tel: +49 241 6085-12230
martina.fenske@ime.fraunhofer.de

Dr. Elke Muth-Köhne
Tel: +49 241 6085-11411
elke.muth-koehne@molbiotech.rwth-aachen.de