



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Functioning of the endocannabinoid system in stress and anxiety in zebrafish larvae

Luchtenburg, F.J.

Citation

Luchtenburg, F. J. (2020, October 7). *Functioning of the endocannabinoid system in stress and anxiety in zebrafish larvae*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137310>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/137310>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137310> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Luchtenburg, F.J.

Title: Functioning of the endocannabinoid system in stress and anxiety in zebrafish larvae

Issue date: 2020-10-07

Addendum

**Nederlandse samenvatting
Curriculum vitae**

Nederlandse samenvatting

Introductie

Het endocannabinoïd systeem (ECS) beïnvloedt een breed scala aan processen in ons lichaam. Componenten van het ECS worden daarom beschouwd als veelbelovende mogelijke aangrijpingspunten voor geneesmiddelen tegen verschillende ziekten (Di Marzo 2018), waaronder cardiovasculaire, stofwisselings- en ademhalingsstoornissen en ziekten van het centrale zenuwstelsel (Pacher et al. 2006). Helaas kan het moduleren van het ECS leiden tot ernstige bijwerkingen, zoals psychiatrische klachten (Moreira en Lutz 2008) of hersenbeschadiging (van Esbroeck et al. 2017). Om de mogelijkheden van het ECS volledig te benutten, is meer onderzoek nodig. In de huidige studie hebben we zebravislarven gebruikt om het ECS te bestuderen, om het potentieel te inventariseren van de zebravis als complementair diermodel in het ECS-onderzoek, naast de bestaande knaagdiermodellen.

De interesse voor de zebravis als diermodel neemt toe. Het zebravismodel heeft, met name wanneer embryo's en larven worden gebruikt, een aantal interessante voordelen, zoals lage kosten, eenvoudig onderhoud en kleine benodigde ruimte voor huisvesting. Het model wordt steeds populairder in het onderzoek naar het centraal zenuwstelsel, vanwege de beschikbaarheid van mutanten en transgene lijnen, en *in vivo* microscopische analyse van hersenactiviteit in combinatie met screening van gedrag. Onze kennis over het ECS bij zebravissen is echter nog beperkt. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was daarom om een beter begrip te krijgen van het ECS bij zebravislarven. De belangrijkste bevindingen van dit onderzoek worden hieronder besproken.

Zebravislarven kunnen als model complementair aan knaagdiermodellen worden gebruikt, maar om gegevens tussen de modellen te kunnen vergelijken is een goede basiskennis van het zebravismodel vereist. Uit genetische en bio-informatica-onderzoeken weten we dat er een compleet ECS aanwezig is in de zebravis, inclusief cannabinoïd receptor (Cnr) 1 en 2, hun liganden anandamide (AEA) en 2-arachidonoylglycerol (2-AG), en metabole enzymen zoals fatty acid amide hydrolase (Faah) (Lam et al. 2006; McPartland et al. 2007; Rodriguez-Martin et al. 2007). Bovendien is het ECS van de zebravis zeer homoloog aan zowel het ECS van knaagdieren als mensen (Demin et al. 2018; Klee et al. 2012; McPartland et al. 2007). Er zijn een paar studies van het ECS gedaan met zebravissen (Hoofdstuk 1 geeft hiervan een overzicht), maar de meeste zijn gedaan met volwassen vissen en niet met larven. Over het algemeen zijn gegevens van dit beperkte aantal functionele onderzoeken naar het ECS bij zebravissen consistent met de resultaten van onderzoek bij knaagdieren (Krug en Clark 2015). Op basis van de resultaten beschreven in dit proefschrift, denken

we dat zebravislarven kunnen worden beschouwd als een goed model voor het bestuderen van het ECS, complementair aan de knaagdiermodellen.

Samenvatting van de experimentele hoofdstukken (2 – 4)

In **Hoofdstuk 2** hebben we het effect van de activiteit van het ECS op het gedrag van vijf dagen oude zebravislarven onderzocht met behulp van een visuele motorische respons test. In deze test kregen larven eerst de tijd om te acclimatiseren in de opstelling en vervolgens werd angst-gerelateerd gedrag veroorzaakt door het licht uit te doen (Ellis et al. 2012; Peng et al. 2016). We ontdekten dat behandeling met de niet-specifieke Cnr-agonisten WIN55,212-2 en CP55,940 resulteerde in een afname van hoe veel de larven bewogen in zowel de lichte als de donkere fases van de test. Om vast te stellen of dit effect werd gemedieerd door Cnr1 of Cnr2, hebben we voorafgaand aan de test een specifieke Cnr1-antagonist toegediend. Deze behandeling deed het effect van de agonist WIN55,212-2 teniet, wat aangeeft dat het de activering van Cnr1 is die de mobiliteit van de larven vermindert. Dit werd bevestigd door de waarneming dat WIN55,212-2 geen effect had op de beweging van larven van een *cnr1* knock-out lijn. De immobiliteit van de met WIN55,212-2 behandelde larven was niet het gevolg van (gedeeltelijke) verlamming, want de mobiliteit van de larven kon worden hersteld door behandeling met stimulerende verbindingen zoals ethanol en nicotine. Blijkbaar resulteert exogene activering van Cnr1 in een minder mobiel fenotype, maar door de verminderde mobiliteit in zowel de lichte als donkere fase konden we niet concluderen of de verminderde voortbeweging in de donkere fase een anxiolytisch effect was van de Cnr1-agonisten. Interessant is dat toediening van alleen de antagonist AM251 geen effect had op de mobiliteit en dat de *cnr1* knock-out lijn zich vergelijkbaar gedroeg in vergelijking met wild type dieren, wat aangeeft dat de werking van endogene cannabinoïden de motorische respons bij zebravislarven niet beïnvloedt.

In **Hoofdstuk 3** hebben we het effect bestudeerd van de activiteit van het ECS in van vijf dagen oude zebravislarven op angst-gerelateerd gedrag in een zogenaamde licht-donker opstelling. Deze opstelling bestaat uit een bakje met een licht en een donker compartiment, en de afgelegde afstand en de tijd doorgebracht in het donkere compartiment (als een percentage van de totale afstand en tijd), en de tijd tot de eerste binnenkomst van het donkere compartiment worden beschouwd als parameters voor angst-gerelateerd gedrag. In ons onderzoek werden zebravislarven blootgesteld aan WIN55,212-2. De resultaten lieten zien dat de met WIN55,212-2 behandelde larven meer tijd in het donker doorbrachten, vergeleken met larven die een controle-behandeling hadden gekregen. Ook werd de tijd totdat ze voor het eerst naar het donkere compartiment gingen, verlaagd. Deze effecten van WIN55,212-2 werden gemedieerd door Cnr1, aangezien ze afwezig waren in *cnr1* knock-out larven en bij

gelijktijdige behandeling met de Cnr1 antagonist AM251. Deze gegevens tonen duidelijk aan dat exogene activering van Cnr1 door toediening van WIN55,212-2 resulteert in een minder angstig fenotype in zebravislarven. Opnieuw hadden zowel AM251-behandeling als knock-out van *cnr1* geen effect op het gedrag van de larven, wat aangeeft dat endogene cannabinoïden het gedrag van larven in deze licht-donker opstelling niet beïnvloeden, vergelijkbaar met de resultaten die zijn waargenomen in de visuele motorische respons test in Hoofdstuk 2. Dit werd nog eens bevestigd in een experiment waarin we de afbraak van AEA, een van de endogene cannabinoïden, verminderden door toediening van PF-04457845, een stof die het enzym FAAH remt. Deze behandeling resulteerde in een vijfvoudige toename van AEA-niveaus, maar had geen invloed op het angst-gerelateerde gedrag van de larven.

In **Hoofdstuk 4** is het effect van ECS-modulatie op de productie van het hormoon cortisol onderzocht bij vijf dagen oude zebravislarven. Blootstelling aan de Cnr-agonist WIN55,212-2 resulteerde al na twintig minuten in verhoogde basale cortisolspiegels, die afhankelijk van de WIN55,212-2-dosis toenamen. Dit effect was afwezig bij *cnr1* knock-out larven, wat suggereert dat deze basale cortisolverhoging Cnr1-afhankelijk is. Stress verhoogt ook het cortisolniveau, en dit hebben wij laten zien door larven te onderwerpen aan zogenaamde ‘netting stress’, waarbij ze een aantal maal uit het water worden getild in een netje. Toediening van WIN55,212-2 bleek ook de door stress verhoogde cortisolniveaus te laten stijgen. Interessant is dat de door WIN55,212-2 geïnduceerde toename van basale cortisolspiegels kan worden geblokkeerd door vooraf antalarmin toe te dienen, dat een antagonist is van de Corticotropin-Releasing Hormone-Receptor1 (CRH-R1). Dit suggereert dat WIN55,212-2 de Hypothalamus-Pituitary-Intrerenal (HPI)-as activiteit verhoogt door de Corticotropin-Releasing Hormone (CRH)-spiegels in de hypothalamus te verhogen. De Cnr1-antagonist AM251 had geen effect op de basale cortisolspiegels en in *cnr1* knock-out larven waren de basale cortisolspiegels vergelijkbaar met die van wild type larven. Dit toont aan dat endogene cannabinoïden in dit stadium van ontwikkeling niet actief betrokken zijn bij de regulatie van basale cortisolniveaus bij zebravissen. Bovendien vertonen *cnr1* knock-outlarven een vergelijkbare cortisolrespons op netting stress in vergelijking met wild type larven, en verandert het verhogen van de AEA-niveaus door toediening van de FAAH-remmer PF-04457845 ook de door stress geïnduceerde cortisolrespons niet, wat aantoont dat endogene cannabinoïden ook geen effect hebben op de door stress verhoogde cortisolspiegels.

Belangrijkste bevindingen

Een van de belangrijkste bevindingen van dit onderzoek is dat exogene activering van Cnr1 in zebravislarven resulteerde in verschillende sterke effecten:

remming van de mobiliteit (Hoofdstuk 2), een minder angstig fenotype (Hoofdstuk 3) en activering van de HPI-as (Hoofdstuk 4). Deze effecten waren allemaal *Cnr1*-gemedieerd, en dit maakt de zebravislarve een interessant model om medicijnen te bestuderen die *Cnr1* activeren. Een ander interessant resultaat is het schijnbare gebrek aan endogene ECS-activiteit in vijf dagen oude zebravislarven. In geen van onze studies hebben we een effect waargenomen van *cnr1* knock-out of van het blokkeren van *Cnr1* met de antagonist AM251, terwijl exogene activering van *Cnr1* wel een effect had dat werd opgeheven door *cnr1* knock-out of AM251. Bovendien resulteerde verhoogde endogene ECS-activiteit door *Faah*-remming (*Faah* is het AEA-katabole enzym) ook niet in een verandering van angst-gerelateerd gedrag of de activiteit van de HPI-as. Samengevat concluderen we dat zebravislarven een functionele *Cnr1* bevatten, die een vergelijkbare werking heeft als deze receptor heeft in andere diersmodellen, maar dat deze receptor in dit stadium van ontwikkeling niet wordt geactiveerd door endogene cannabinoïden.

We vonden in de literatuur slechts enkele studies waarin het gebruik van *Cnr1* antagonistene of *cnr1* knock-out enig effect bleek te hebben bij zebravislarven. In één studie (Akhtar et al. 2013) had AM251 een acuut effect op de mobiliteit (bij 7,2 μ M), maar deze concentraties van AM251 bleken in onze studies toxisch te zijn. In een andere studie, uitgevoerd op zes dagen oude zebravislarven, resulteerde lever-specifieke overexpressie van het *cnr1*-gen in hepatische steatose, die werd geblokkeerd door 72 uur AM251-blootstelling (Pai et al. 2013). Er is ook gerapporteerd dat toediening van AM251 de *cnr1*-transcriptie in de levers van larven en volwassen zebravissen omlaag reguleert (Migliarini en Carnevali 2008). Bovendien had in een andere studie blootstelling aan AM251 invloed op het percentage zebraviseieren dat uitkwam en het aantal zwemmende larven (vier dagen oud) (Migliarini en Carnevali 2009). Een studie waarin een *cnr1* knock-out zebravislijn werd gebruikt, toonde kleinere levers, minder hepatocyten en verminderde lever-specifieke genexpressie, in 72 uur oude embryo's van deze lijn, vergeleken met wild type embryo's (Liu et al. 2016). Ook is aangetoond dat het uitschakelen van het *cnr1* of *faah2a* gen bij zebravislarven (vijf dagen oud) geen effect heeft op hun basale mobiliteit, maar wel op hun beweging na osmotische stress (Krug et al. 2018). Op basis van het feit dat een volledig ECS aanwezig is in zebravislarven (Martella et al. 2016; Oltrabella et al. 2017) en bevindingen van ons en andere groepen die hierboven zijn beschreven, suggereren we dat eCB's een rol kunnen spelen tijdens de ontwikkeling van zebravislarven, maar dat de concentraties van eCB's in zebravislarven over het algemeen niet voldoende zijn om betrokken te kunnen zijn bij de modulatie van systemen zoals het gedrag of de HPI-as. Bij volwassen zebravissen spelen eCB's een duidelijke rol bij gedragsregulatie. Zo is aangetoond dat acute behandeling met AM251 angst-gerelateerd gedrag verhoogde, waaronder verstijving (dood houden), meer bodembe-

woning, verminderde mobiliteit en meer grillige bewegingen (Tran et al. 2016). Dit geeft aan dat later tijdens de ontwikkeling van zebravissen de rol van eCB's groter wordt. In knaagdieren zien we vergelijkbare effecten als in volwassen vissen, en beïnvloedt zowel het blokkeren van CNR1 met AM251 als knock-out van *cnr1* het gedrag (Chhatwal en Ressler 2007), en dit is ook aangetoond voor FAAH-remmers (Chhatwal en Ressler 2007; Lau en Vaughan 2014; Scherma et al. 2008).

In ons onderzoek werd, met behulp van de visuele motorische respons test, na behandeling met WIN55,212-2 een vermindering van de mobiliteit in de donkere fase waargenomen, en deze vermindering wordt beschouwd als een anxiolytisch effect (Hoofdstuk 2). Omdat vissen echter ook minder bewegen in de lichte fase, konden we geen onderscheid maken tussen een motorisch effect en een angst-gerelateerd effect. Dit punt hebben we uitgewerkt in de licht-donker test (Hoofdstuk 3), waarin een anxiolytisch effect van *Cnr1*-activering was te zien. Dit werd duidelijk doordat de larven relatief meer tijd in de donkere zone doorbrachten, meer in de donkere zone bewogen en eerder de donkere zone in gingen, na WIN55,212-2 toediening. Gegevens over het effect van *Cnr1*-activering op angst bij volwassen zebravissen zijn tegenstrijdig en laten een anxiogeen effect zien (Stewart en Kalueff 2014), of geen effect (Ruhl et al. 2014), voor delta(9)-tetrahydrocannabinol en, afhankelijk van de toediening, geen effect of een anxiolytisch effect voor WIN55,212-2 (Barba-Escobedo en Gould 2012; Connors et al. 2013). Ook bij knaagdieren is het effect van CNR1-activering op angst-gerelateerd gedrag gecompliceerd. Over het algemeen verminderen lage doses cannabinoïden angst-gerelateerde reacties, terwijl hogere doses leiden tot meer angstige reacties (Rubino et al. 2007). Er is ook gesuggereerd dat de angstrespons soortafhankelijk kan zijn. WIN55,212-2 heeft namelijk bij muizen een anxiolytisch effect, terwijl het bij ratten de angst verhoogt (Haller et al. 2007). Deze variaties tussen verschillende soorten of verschillende concentraties kunnen worden verklaard door verschillen in de balans van GABA en glutamaat (Haller et al. 2007). Cannabinoïden kunnen werken via CNR1's die zich op GABAerge of glutamaterge neuronen bevinden. De angst-gerelateerde effecten van cannabinoïden hangen daarom af van de relatieve cannabinoïd-responsiviteit van GABAerge en glutamaterge neurotransmissie (Haller et al. 2007), die kunnen variëren tussen individuen, soorten en bij verschillende cannabinoïd concentraties.

Tenslotte vonden we dat exogene *Cnr1*-activering door WIN55,212-2 de basale cortisolspiegels in zebravislarven verhoogde (Hoofdstuk 4). Wanneer de WIN55,212-2 toediening wordt voorafgegaan door blootstelling aan antalarmin, een *Crh-R1*-antagonist, verminderde deze verhoging van de cortisolconcentratie. Dit toont aan dat de verhoogde basale cortisolspiegel bij *Cnr1*-activering wordt gemedieerd door verhoogde *Crh*-activiteit, en suggereert dat WIN55,212-2 of-

wel direct inwerkt op de hypothalamische Crh-neuronen of andere hersengebieden die signalen naar de hypothalamus sturen. Dit is in overeenstemming met studies uitgevoerd bij ratten en muizen, waarin werd aangetoond dat Cnr1-activering resulteerde in verhoogde niveaus van het hypofyse-hormoon Adrenocorticotrop hormone (ACTH) (Barna et al. 2004; Manzanares et al. 1999; Steiner en Wotjak 2008), wat aangeeft dat er geen direct effect is van Cnr1 op de biosynthese van cortisol in de bijnieren.

Verwachting voor de toekomst

In dit proefschrift wordt aangetoond dat zebravislarven zeer geschikt zijn als model voor screening van geneesmiddelen die werken op het ECS. Ten eerste is er een compleet ECS aanwezig in de larven. Ten tweede ontbreekt het in deze fase van de ontwikkeling aan endogene activiteit van het ECS. Ten derde is er de algemene gelijkenis van de waargenomen effecten met andere (zoog)diermodellen. En ten vierde hebben zebravislarven een aantal interessante kenmerken, zoals optische transparantie en mogelijkheden voor high-throughput screening, wat ze complementair maakt aan knaagdiermodellen. Nieuw gesynthetiseerde Cnr1-agonisten kunnen worden gescreend met behulp van de tests die in dit proefschrift worden beschreven, onder basale of gestreste omstandigheden, op mogelijke gunstige effecten, maar ook op toxiciteit. Nieuwe stoffen kunnen bijvoorbeeld worden gescreend op hun effecten op door stress geïnduceerde cortisolresponsen of gedragsveranderingen. Ook kunnen zowel chemische als genetische manipulaties worden toegepast om het effect van bepaalde systemen of processen op de Cnr1-activiteit te onderzoeken. Het is ook interessant om te bestuderen of er methoden zijn om de Cnr2-activiteit op een vergelijkbare manier te onderzoeken, bijvoorbeeld door het effect ervan op het immuunsysteem of op het metabolisme te bestuderen. Als er ook geen endogene interferentie is van eCB's met de Cnr2-functie, kan het interessant zijn om vergelijkbare screeningsmodellen te ontwikkelen voor exogene Cnr2-activering.

In onze experimenten hebben wij geen bewijs gevonden voor endogene activiteit van het ECS. Aangezien dit waarschijnlijk verband houdt met het ontwikkelingsstadium van de larven, zal het interessant zijn om de functionele ontwikkeling van het ECS bij zebravissen te bestuderen. Vanaf welk stadium wordt de endogene signalering actief en correleert dit met eCB-niveaus en metabole enzymactiviteit? Het zal interessant zijn om de experimenten, zoals beschreven in dit proefschrift, uit te voeren tijdens verschillende stadia van ontwikkeling van de zebravis. Daarbij kan dan gebruik worden gemaakt van dezelfde Cnr1 antagonist en mutante lijnen die een functionele *cnr1* missen, die wij in de hier beschreven studies hebben gebruikt. Ten slotte kunnen verschillende hersengebieden een verschillende ECS-werking hebben, zoals weerspiegeld door verschillende AEA / 2-AG-verhoudingen of plaatselijke verschillen in Cnr1-expressie. Lokale analyse van verschillende hersengebieden is dus van groot belang

voor het begrijpen van het ECS. De optische transparantie van zebravislarven, gecombineerd met de beschikbaarheid van fluorescerende reporters, maakt deze lokale analyse mogelijk van metabole activiteit van het ECS, Cnr1 activiteit en het effect van het ECS op neuronale activiteit.

Concluderende opmerkingen

Deze studie heeft ons een interessant diermodel opgeleverd, het zebravislarve model, dat farmacologische screening van Cnr1-agonisten en hun rol binnen het centrale zenuwstelsel mogelijk maakt. Dit is vastgesteld aan de hand van Cnr1-gemedieerde verandering in mobiliteit, angst-gerelateerd gedrag en HPI-as activiteit. Het zebravislarve model kan gebruikt worden als complementair model aan de bestaande knaagdiermodellen, om het ECS te bestuderen. Het biedt verschillende interessante kenmerken, zoals optische transparantie en mogelijkheden voor screening met grote aantallen. Bovendien is er een compleet ECS aanwezig en is endogene activiteit min of meer afwezig, waardoor exogene stoffen eenvoudig kunnen worden gescreend. De data van zebravisonderzoek zijn over het algemeen in overeenstemming met de resultaten in de knaagdierliteratuur. Aangezien het ECS bij veel ziekten betrokken is, kan meer onderzoek van dit systeem resulteren in de ontdekking van nieuwe (aangrijpingspunten voor) geneesmiddelen tegen deze aandoeningen.

Referenties

- Akhtar MT, Ali S, Rashidi H, van der Kooy F, Verpoorte R, Richardson MK (2013) Developmental effects of cannabinoids on zebrafish larvae. *Zebrafish* 10: 283-93.
- Arranz A, Venihaki M, Mol B, Androulidaki A, Dermitzaki E, Rassouli O, Ripoll J, Stathopoulos EN, Gomariz RP, Margioris AN, Tsatsanis C (2010) The impact of stress on tumor growth: peripheral CRF mediates tumor-promoting effects of stress. *Mol Cancer* 9: 261.
- Barba-Escobedo PA, Gould GG (2012) Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: strain and anxiolytic effects. *Genes, brain, and behavior* 11: 366-73.
- Barna I, Zelena D, Arszovszki aC, Ledent C (2004) The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. *Life sciences* 75: 2959-70.
- Broadbear JH, Winger G, Rivier JE, Rice KC, Woods JH (2004) Corticotropin-releasing hormone antagonists, astressin B and antalarmin: differing profiles of activity in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 29: 1112-21.
- Chhatwal JP, Ressler KJ (2007) Modulation of fear and anxiety by the endogenous cannabinoid system. *CNS Spectr* 12: 211-20.
- Connors Ka, Valenti TW, Lawless K, Sackerman J, Onaivi ES, Brooks BW, Gould GG (2013) Similar anxiolytic effects of agonists targeting serotonin 5-HT1A or cannabinoid CB receptors on zebrafish behavior in novel environments. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*: 1-9.
- Demin KA, Meshalkina DA, Kysil EV, Antonova KA, Volgin AD, Yakovlev OA, Alekseeva PA, Firuleva MM, Lakstygala AM, de Abreu MS, Barcellos LJG, Bao W, Friend AJ, Amstislavskaya TG, Rosemberg DB, Musienko PE, Song C, Kalueff AV (2018) Zebrafish models relevant to studying central opioid and endocannabinoid systems. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 86: 301-312.
- Di Marzo V (2018) New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nat Rev Drug Discov* 17: 623-639.
- Dong H, Keegan JM, Hong E, Gallardo C, Montalvo-Ortiz J, Wang B, Rice KC, Csernansky J (2018) Corticotrophin releasing factor receptor 1 antagonists prevent chronic stress-induced behavioral changes and synapse loss in aged rats. *Psychoneuroendocrinology* 90: 92-101.
- Ellis LD, Seibert J, Soanes KH (2012) Distinct models of induced hyperactivity in zebrafish larvae. *Brain Res* 1449: 46-59.
- Haller J, Mátyás F, Soproni K, Varga B, Barsy B, Németh B, Mikics E, Freund TF, Hájos N (2007) Correlated species differences in the effects of cannabinoid ligands on anxiety and on GABAergic and glutamatergic synaptic transmission. *The European journal of neuroscience* 25: 2445-56.

- Klee EW, Schneider H, Clark KJ, Cousin MA, Ebbert JO, Hooten WM, Karpyak VM, Warner DO, Ekker SC (2012) Zebrafish: a model for the study of addiction genetics. *Human genetics* 131: 977-1008.
- Krug RG, 2nd, Lee HB, El Khoury LY, Sigafos AN, Petersen MO, Clark KJ (2018) The endocannabinoid gene *faah2a* modulates stress-associated behavior in zebrafish. *PLoS One* 13: e0190897.
- Krug RG, Clark KJ (2015) Elucidating Cannabinoid Biology in Zebrafish (*Danio rerio*). *Gene*.
- Lam CS, Rastegar S, Strähle U (2006) Distribution of cannabinoid receptor 1 in the CNS of zebrafish. *Neuroscience* 138: 83-95.
- Lau BK, Vaughan CW (2014) Targeting the endogenous cannabinoid system to treat neuropathic pain. *Front Pharmacol* 5: 28.
- Liu LY, Alexa K, Cortes M, Schatzman-Bone S, Kim AJ, Mukhopadhyay B, Cinar R, Kunos G, North TE, Goessling W (2016) Cannabinoid receptor signaling regulates liver development and metabolism. *Development* 143: 609-22.
- Manzanares J, Corchero J, Fuentes Ja (1999) Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain research* 839: 173-9.
- Martella A, Sepe RM, Silvestri C, Zang J, Fasano G, Carnevali O, De Girolamo P, Neuhaus SC, Sordino P, Di Marzo V (2016) Important role of endocannabinoid signaling in the development of functional vision and locomotion in zebrafish. *FASEB J* 30: 4275-4288.
- McPartland JM, Glass M, Matias I, Norris RW, Kilpatrick CW (2007) A shifted repertoire of endocannabinoid genes in the zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular genetics and genomics* : MGG 277: 555-70.
- Migliarini B, Carnevali O (2008) Anandamide modulates growth and lipid metabolism in the zebrafish *Danio rerio*. *Molecular and cellular endocrinology* 286: S12-6.
- Migliarini B, Carnevali O (2009) A novel role for the endocannabinoid system during zebrafish development. *Mol Cell Endocrinol* 299: 172-7.
- Moreira Fa, Lutz B (2008) The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addiction biology* 13: 196-212.
- Oltrabella F, Melgoza A, Nguyen B, Guo S (2017) Role of the endocannabinoid system in vertebrates: Emphasis on the zebrafish model. *Dev Growth Differ*.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58: 389-462.
- Pai W-Y, Hsu C-C, Lai C-Y, Chang T-Z, Tsai Y-L, Her GM (2013) Cannabinoid receptor 1 promotes hepatic lipid accumulation and lipotoxicity through the induction of SREBP-1c expression in zebrafish. *Transgenic research* 22: 823-38.

- Peng X, Lin J, Zhu Y, Liu X, Zhang Y, Ji Y, Yang X, Zhang Y, Guo N, Li Q (2016) Anxiety-related behavioral responses of pentylentetrazole-treated zebrafish larvae to light-dark transitions. *Pharmacol Biochem Behav* 145: 55-65.
- Rodriguez-Martin I, Herrero-Turrion MJ, Marron Fdez de Velasco E, Gonzalez-Sarmiento R, Rodriguez RE (2007) Characterization of two duplicate zebrafish Cb2-like cannabinoid receptors. *Gene* 389: 36-44.
- Rubino T, Sala M, Vigano D, Braida D, Castiglioni C, Limonta V, Guidali C, Realini N, Parolaro D (2007) Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats. *Neuropsychopharmacology* 32: 2036-45.
- Ruhl T, Prinz N, Oellers N, Seidel NI, Jonas A, Albayram O, Bilkei-Gorzo A, von der Emde G (2014) Acute administration of THC impairs spatial but not associative memory function in zebrafish. *Psychopharmacology*.
- Scherma M, Medalie J, Fratta W, Vadivel SK, Makriyannis A, Piomelli D, Mikics E, Haller J, Yasar S, Tanda G, Goldberg SR (2008) The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropharmacology* 54: 129-40.
- Steiner Ma, Wotjak CT (2008) Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in brain research* 170: 397-432.
- Stewart AM, Kalueff AV (2014) The behavioral effects of acute Δ^9 -tetrahydrocannabinol and heroin (diacetylmorphine) exposure in adult zebrafish. *Brain research* 1543: 109-19.
- Tran S, Chatterjee D, Facciolo A, Gerlai R (2016) Concentration, population, and context-dependent effects of AM251 in zebrafish. *Psychopharmacology (Berl)* 233: 1445-54.
- Traslavina GA, Franci CR (2011) The CRH-R(1) receptor mediates luteinizing hormone, prolactin, corticosterone and progesterone secretion induced by restraint stress in estrogen-primed rats. *Brain Res* 1421: 11-9.
- van Esbroeck ACM, Janssen APA, Cognetta AB, 3rd, Ogasawara D, Shpak G, van der Kroeg M, Kantae V, Baggelaar MP, de Vrij FMS, Deng H, Allara M, Fezza F, Lin Z, van der Wel T, Soethoudt M, Mock ED, den Dulk H, Baak IL, Florea BI, Hendriks G, De Petrocellis L, Overkleeft HS, Hankemeier T, De Zeeuw CI, Di Marzo V, Maccarrone M, Cravatt BF, Kushner SA, van der Stelt M (2017) Activity-based protein profiling reveals off-target proteins of the FAAH inhibitor BIA 10-2474. *Science* 356: 1084-1087.