


Eingehende Darstellung zum Verwendungsnachweis

Zuwendungsempfänger	Förderkennzeichen
BASF SE	161L0232B (alt: 031L0232B)
Vorhabenbezeichnung	
<i>Prädiktion vorgeburtlicher Entwicklungstoxizität mit dem Zebrafärlingsembryo-Modell - Nachweis von Key Events aus Adverse Outcome Pathways</i>	
Laufzeit des Vorhabens	Berichtszeitraum
01.04.2020 – 31.12.2023	1.4.2020 - 31.12.2023
	Projektleitung: Dr. Franziska Zickgraf
	Berichtung durch Dr. Franziska Zickgraf (Nachfolgerin Projektleitung Dr. Burkhard Flick/Dr. Barbara Birk)
	

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031L0232B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin / beim Autor.

Gefördert vom



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

1. Einleitung

Mit dem Zebrafärlingsembryo als zentralem experimentellem Modell sollten die Grundlagen für die Prädiktion der pränatalen Entwicklungstoxizität auf Basis des Adverse Outcome Pathway (AOP) Konzeptes gelegt werden. Der Fischembryo wurde ausgewählt, da es das einzige Alternativmodell ist, das die komplexen Differenzierungsvorgänge eines Organismus repräsentiert, aber sich dennoch für kleinskalige Hochdurchsatz-Analysen eignet. Durch AOP-verknüpfte Analysen sollen Tierversuche (z.B. OECD 414, pränatale Entwicklungstoxizität) reduziert werden. Die Analysen beinhalten eine innovative bildgestützte Phänotypen-Analyse, sowie konzentrations- und zeitabhängige Transkriptom- und Metabolomanalysen. Das angestrebte Verfahren soll kurz- und mittelfristig für das Screening von Chemikalien und Wirkstoffen eingesetzt werden, wodurch frühzeitig in der Entwicklung neuer Substanzen potenzielle Schadwirkungen erkannt und damit Tierversuche in der späteren Zulassung

vermieden werden. Langfristig, in Kombination mit ggf. weiteren experimentellen und in silico Modellen, ergibt sich auch eine Anwendung im regulatorischen Bereich. Um die Machbarkeit des Verfahrens zu demonstrieren, wurden zwei für Menschen relevante Substanzgruppen auf der Basis von Säugerphänotypen (Induktoren einer Gaumenspalte, Angiogenese-Hemmer) untersucht. Durch Verknüpfung mit dem Adverse Outcome Pathway (AOP) Konzept wurden Parameter identifiziert, die für eine alternative Prüfstrategie zur pränatalen Entwicklungstoxizität, z.B. im Rahmen einer integrierten Teststrategie oder eines Read Across, genutzt werden können.

2. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse.

Es handelte sich um ein gemeinsames Verbundprojekt mit den Projektpartnern UFZ und BASF.

Auswahl der Modellsubstanzen:

Für die Auswahl der Modellsubstanzen wurde eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Wirkungsmodi in den Fokus genommen: 1) Anti-Angiogenese und 2) Entwicklung von Gaumenspalten. Bei der Literaturrecherche mussten (möglichst) verschiedene Kriterien erfüllt sein:

1. Verfügbare Reprotoxikologische Daten in Ratte/Maus oder Kaninchen
2. Morphologische Informationen im Zebrafisch sollten möglichst verfügbar sein
3. Geeignete Physiko-chemische Eigenschaften
4. Keine IP-relevanten Beschränkungen
5. Publizierbare Substanzen
6. Knowhow zum Mode of Action
7. Kosten der Substanz bei Bestellung

Analyse/Auswertung der Metabolomdaten von PTU

Zur Vorbereitung der Metabolomanalyse in diesem BMBF-Projekt erfolgte eine kritische Reanalyse vorhandener Metabolomdaten. Ziel war es, die Auswahl des Konzentrationsbereichs, die Probenahme und -aufbereitung, Details der Messmethodik und die Datenauswertung zu evaluieren, um Anpassungen für die Fragestellung des Projekts vornehmen zu können.

Der vorhandene Datensatz umfasste zwei entwicklungstoxische Substanzen mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen, 6-Propyl-2-thiouracil (PTU), eine schilddrüsenwirksame Substanz (Hemmung von Thyroperoxidase und Deiodinase1), und BAS-2 (proprietäre Substanz der BASF), bekannt als Leberenzyminduktor in vivo. Als höchste

Testkonzentration diente im PTU-Experiment der LC25-Wert (d.h. die Konzentration, bei der 25% Mortalität eintritt). Es wurden fünf Konzentrationen getestet und das gesamte Experiment wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu testen. Im BAS-2-Experiment wurden acht Konzentrationen getestet und der LC50-Wert als höchste Testkonzentration gewählt, aufgrund der steilen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung in der Morphologie. Pro Probe wurden 30 Zebrafischembryonen gepoolt und mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden (GC-MS und LC-MS/MS) wurden 249 identifizierte Metabolite gemessen, die ein breites Spektrum biochemischer Stoffwechselwege abdeckten. Metabolitveränderungen wurden relativ semiquantitative zur Kontrolle.

Es zeigte sich, dass die Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Effekten im Metabolom für das ZF-AOP Projekt herausfordernd werden kann. Nur erstere können plausibel mit den AOPs verknüpft werden. Um die spezifischen behandlungsbedingten Effekte herausfiltern zu können, haben wir folgende Strategie erarbeitet, die im Folgenden erläutert wird:

Unter der Prämisse, dass bei einer Mortalitätsrate von 25% vorrangig allgemein zytotoxische Effekte auftreten, wurden die LC25-Gruppen beider Substanzen verglichen und übereinstimmende signifikante Effekte notiert. Diese Effektliste wurde dann von den signifikanten Effekten bei den jeweiligen LOECs (niedrigste Konzentration mit beobachteten Effekten) subtrahiert. Dieser Ansatz ermöglichte es, drei unterschiedliche Effektmuster zu beschreiben. Das erste Muster repräsentiert allgemeine Zytotoxizität, umfasst 77 Metaboliten, und ist hauptsächlich gekennzeichnet durch verringerte Aminosäurespiegel und erhöhte Konzentrationen von Nukleinbasen. Das zweite durch PTU hervorgerufene Muster umfasst 31 signifikant veränderte Metaboliten, wobei die Erhöhung der Tyrosinkonzentration am auffälligsten war. Das dritte BAS-2-bezogene Muster umfasst 82 Metaboliten und war hauptsächlich durch erhöhte Konzentrationen von Fettsäuren und Carnitinen gekennzeichnet.

Insbesondere bei PTU ließ sich ein mechanistischer Zusammenhang durch den erhöhten Tyrosinspiegel (ein direkter Vorläufer von Schilddrüsenhormonen) herstellen. Dieser lässt sich direkt mit einem molekularen Schlüsselereignis der Entwicklungstoxizität verknüpfen, da das Gleichgewicht der Schilddrüsenhormone für die Embryonalentwicklung von wesentlicher Bedeutung ist. Bei BAS-2 weisen die erhöhten Konzentrationen von Metaboliten, die an der Fettsäureoxidation beteiligt sind, auf einen möglichen Zusammenhang mit Lebertoxizität hin, ein direkter Link zu Entwicklungstoxizität konnte allerdings vorerst nicht gezeigt werden. Da bislang allerdings nur zwei Substanzen getestet wurden, ist anzunehmen, dass gegebenenfalls auch spezifische Effekte subtrahiert wurden.

Zusätzlich zu den berichteten Ergebnissen der Entwicklungstoxizität von Propylthiouracil (PTU) wurden weiterführende Auswertungen durchgeführt, die zum Ziel hatten, die Reproduzierbarkeit der Metabolomexperimente aufzuklären, mittels einer Pathway-Analyse relevante Pathways den spezifischen Effekten zuzuordnen, sowie die Dosis-Response-Modellierung der Metabolite zu analysieren. Diese hatte zum Ziel ein Verfahren für die

Metabolomauswertung von Zebrafischembryonen im Kontext der Entwicklungstoxizität zu erarbeiten.

Eine Hauptkomponentenanalyse konnte dabei aufzeigen, dass die Metabolomantwort der mit verschiedenen Konzentrationen von PTU behandelten Zebrafische konzentrationsabhängig, sowie reproduzierbar ist (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Effekt der Konzentrationsabhängigkeit auf einer Verminderung der „Aminosäuren und unmittelbar von ihnen abgeleiteten Metaboliten“, sowie einer Erhöhung der „Lysoglycerophospholipide“ beruht.

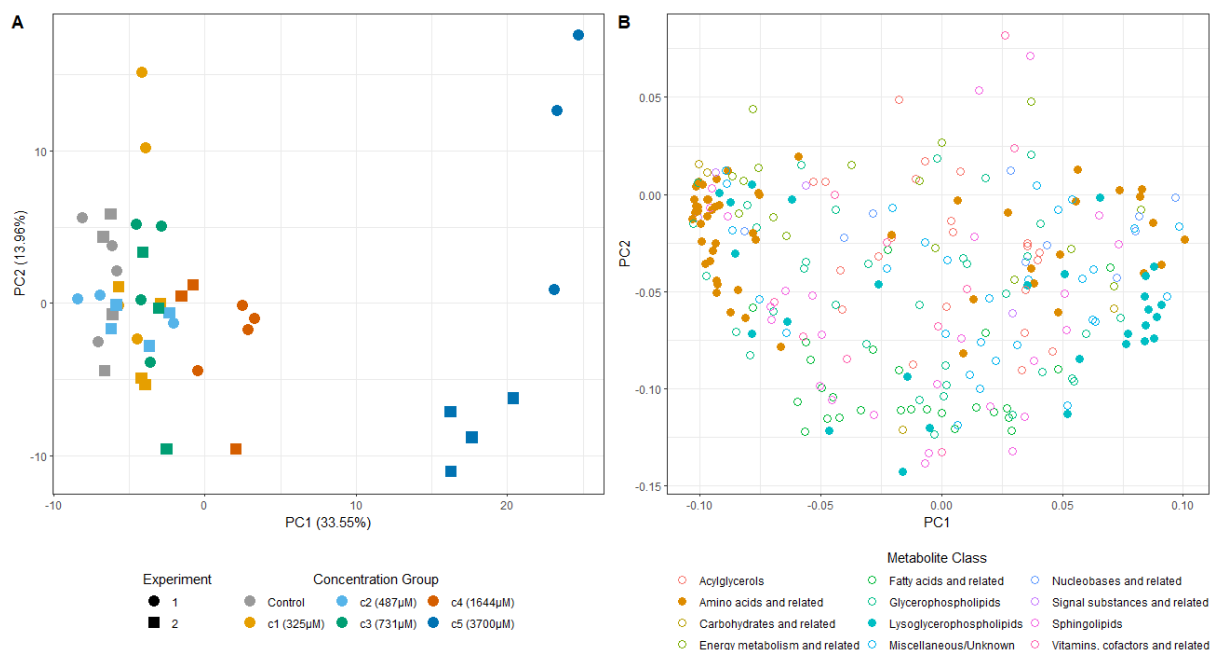


Abbildung 1: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Metabolomantwort von Zebrafischembryonen, die mit PTU in 2 unabhängigen Experimenten behandelt worden sind. Die PCA zeigt eine konzentrationsabhängige Metabolomantwort über die beiden Experimente hinweg. Zudem ist die Metabolomantwort reproduzierbar. A) In der PCA separieren sich die Konzentrationen in der PC1, die für 34% der Variabilität verantwortlich ist. Die Konzentrationsabhängige Metabolomantwort (unterschiedliche Farben) ist von Experiment 1 (Kreise) zu Experiment 2 (Quadrate) reproduzierbar. B) Der Loading-Plot zeigt die stärksten Treiber für die Auftrennung in PC1 unter denen viele Aminosäuren und unmittelbar von ihnen abgeleiteten Metaboliten vermindert, sowie Lysoglycerophospholipide erhöht waren.

Die Analyse der Pathways um spezifische Effekt aufzuzeigen, wurde basierend auf den signifikant (FDR < 0.25) in der Konzentration c3 veränderten Signalwegen durchgeführt unter Benutzung des webbasierten Tools Metaboanalyst 5.0 (Pang et al. 2021). Nur Signalwege in anderen Konzentrationen, die auch bei der Konzentration c3 betroffen waren, wurden auch verwendet. Bei der Konzentration c1 war kein Signalweg signifikant verändert. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** gibt die signifikant veränderten Signalwege über die 5 Konzentration hinweg an und zeigt auf, wie sich diese über die Konzentration hinweg verändern (Größe der Kreise = Signifikanz basierend auf

den $-\log_{10}(p)$ - Werten, Farbkodierung = Impact der Metaboliten für den jeweiligen Signalweg).

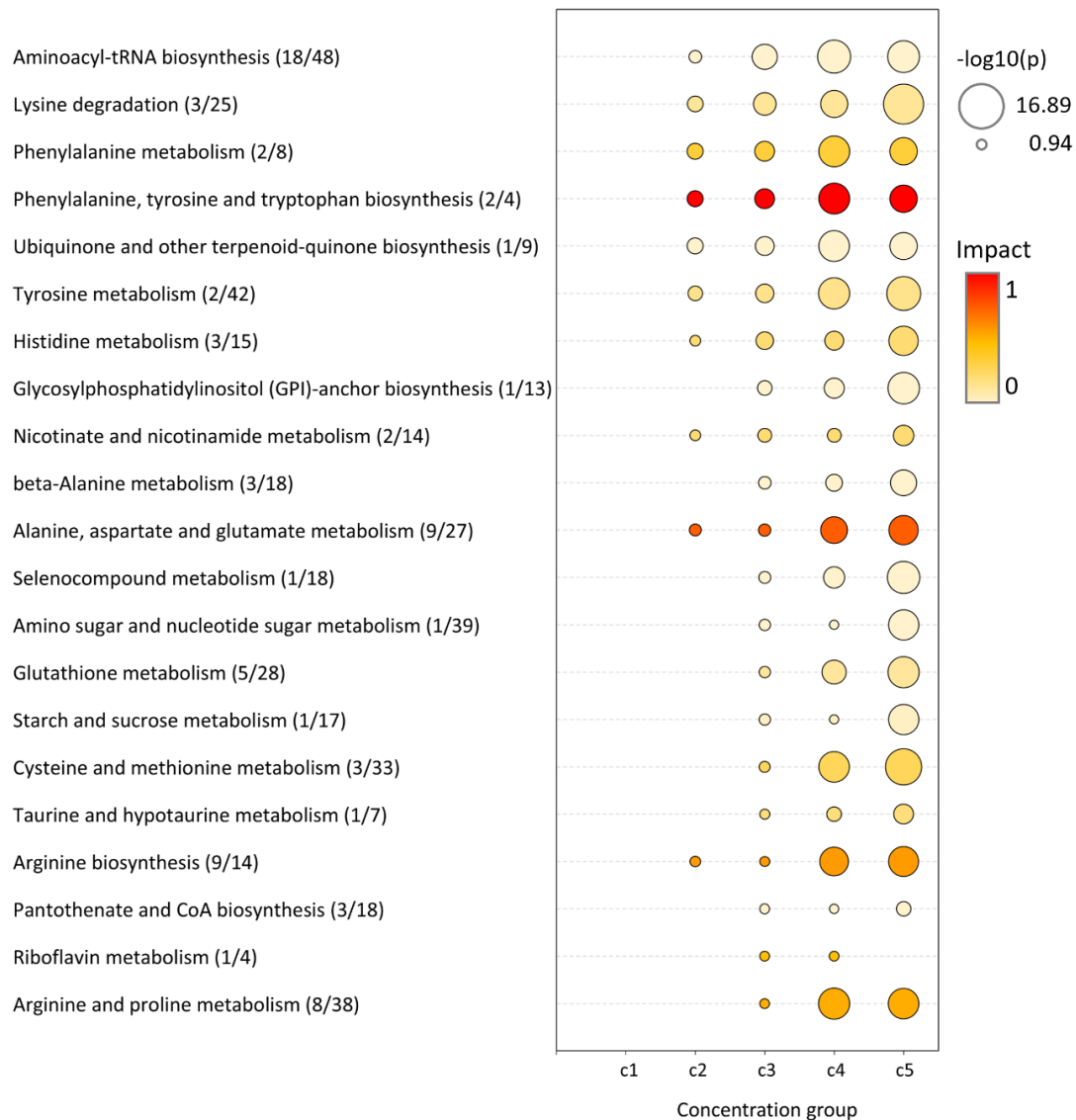


Abbildung 2: Signifikant veränderte Signalwege basierend auf der Metabolomanwort nach PTU-Behandlung in 5 Konzentrationen. Basierend auf der Analyse mit dem webbasierten Tool Metaboanalyst 5.0 (Pang et al. 2021) wurde der konzentrationsabhängige Effekt der PTU-Behandlung auf die endogenen metabolischen Signalwege im Zebrafisch untersucht. Ein Schwellenwert der FDR von 0.25 wurde verwendet, um signifikant veränderte Signalwege herauszufiltern. Nur Signalwege in anderen Konzentrationen, die auch bei der Konzentration c3 betroffen waren, wurden auch verwendet. Bei der Konzentration c1 war kein Signalweg signifikant verändert. Die Abbildung ist sortiert nach den $-\log_{10}(p)$ - Werten (dargestellt als Größe der Kreise) der Konzentration c3. Der „Impact“ ist durch die Farbgebung von hellgelb nach rot dargestellt und gibt die Wichtigkeit des Metaboliten für den jeweiligen Signalweg an. Die Zahlen in den Klammern geben an, wie viele Metabolite im jeweiligen Signalweg von allen sich im Signalweg befindlichen Metaboliten verändert waren.

Vorversuche zur benötigten Anzahl von Zebrafischembryonen für Metabolomanalysen

Die Metabolomanalyse der PTU-behandelten Zebrafische zeigte, dass AOP-relevante Metabolit- und Pathwayveränderungen aufgedeckt werden konnten. Bei dieser Proof-of-concept Studie war der Wirkmechanismus von PTU bekannt, was eine targeted Messung basierend auf einer Auswahl von etwa 200 Metaboliten ermöglichte. Da das System in Zukunft aber auch für das Screening von Substanzen eingesetzt werden soll, für die der Wirkmechanismus unbekannt ist, liefert eine untargeted Metabolomanalyse eine breitere Abdeckung potenziell relevanter Metaboliten. Desweiteren wurde geprüft, ob die Anzahl der Zebrafischembryonen reduziert werden kann, was besonders für die Entwicklungstoxikologie und Teratologie interessant ist, da spezifische phänotypische Veränderungen oftmals nur in einem Teil der Nachkommen auftreten. Diese spezifischen Veränderungen könnten durch eine Zusammenführung, um die benötigte Matrixmenge zu erreichen, „verdünnt“ werden.

In einem Vorversuch wurden die targeted und untargeted Metabolommessungen mit unterschiedlicher Anzahl an Zebrafischembryos pro Probe (1-3) gegenübergestellt und die Anzahl an high-quality Analyten verglichen. Der targeted Ansatz lieferte für 1, 2 oder 10 Embryonen 210, 230 bzw. 260 high-quality Analyten. Der untargeted Ansatz lieferte für 1 Embryo 3900 high-quality Analyten und für 2 und 10 Embryonen je etwa 4600.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde entschieden, den untargeted Ansatz zur Bestimmung der metabolischen Schlüsselereignisse der ausgewählten AOPs zu verwenden. Der Verlust an Analyten von 10 auf 1 Embryo wurde als vernachlässigbar angesehen im Verhältnis zum Informationsgewinn, wenn die Metabolomanalyse in einzelnen Fischen durchgeführt wird.

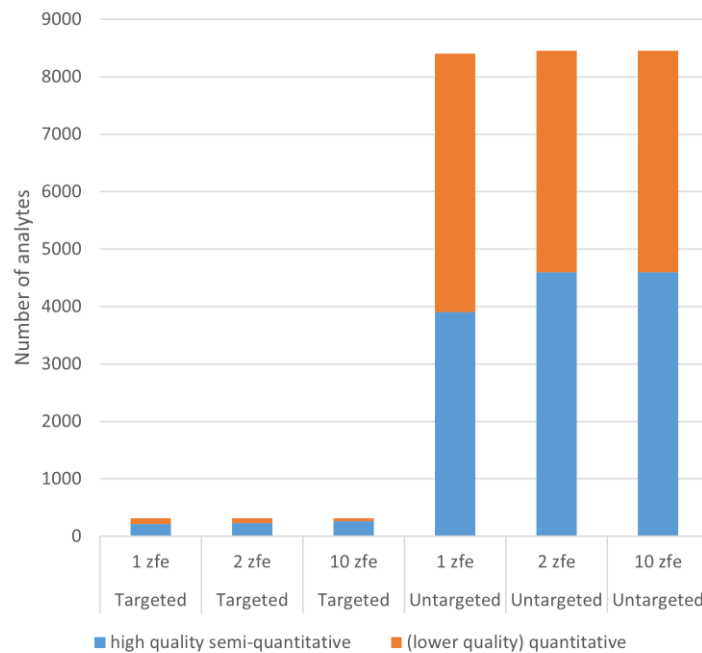


Abbildung 3: Gegenüberstellung der Anzahl der gemessenen „high quality semi-quantitative“ (blau) und „(lower quality) quantitative“ (orange) Analyten, wenn 1, 2 oder 10 Zebrafischembryonen in einer targeted oder untargeted LC-MS/MS Messung gemessen wurden.

Substanzauswahl, Planung und Durchführung von Rangefinder-Experimenten und Hauptversuch zu den Anti-Angiogenese Substanzen

Für den AOP “Hemmung der Angiogenese“ wurden folgende Substanzen ausgewählt: SU4312, Sorafenib, Rotenone und Methotrexate. Für diese Substanzen wurden Effekte auf die Morphologie und das Verhalten im Fischembryo am UFZ untersucht, um die Dosiswahl für das Hauptexperiment zu bestimmen.

Im Hauptexperiment wurden dann die 4 Substanzen mit folgenden Dosierungen verwendet, um die Zebrafischembryonen für die nachfolgende Metabolomanalyse zu behandeln: SU4312 (0,5; 1,0; 1,5 µM), Sorafenib (1,5; 2,0; 2,4 µM), Rotenone (6,25; 12,5; 25 nM), Methotrexate (100, 200, 250 µM).

Als höchste Testkonzentration diente im Experiment der LC20-Wert (d.h. die Konzentration, bei der 20% Mortalität eintritt). Der LC10 und LC5-Wert dienten als Orientierung für die mittlere und niedrige Testkonzentration. Es wurden jeweils drei Konzentrationen getestet. In **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** ist der prozentuale Anteil der letalen oder beeinträchtigten Zebrafischembryonen dargestellt.

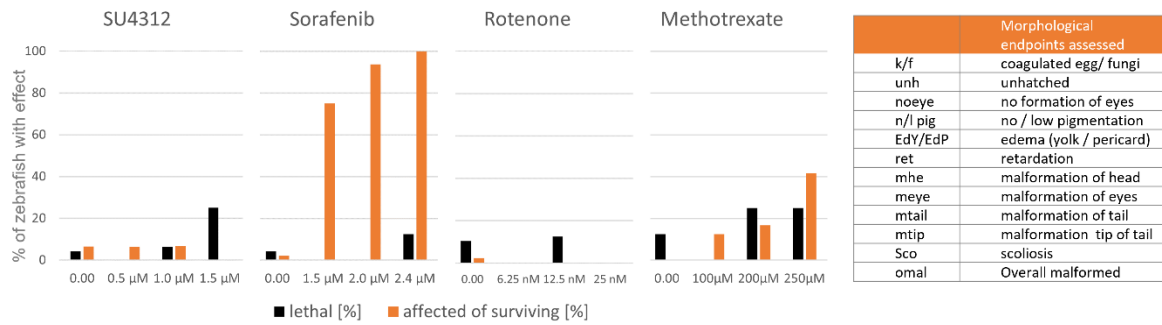


Abbildung 4: Prozentualer Anteil der Zebrafischembryonen, mit Entwicklungsanomalien (orange) oder Mortalität (schwarz) waren nach Behandlung mit 3 unterschiedlichen Dosierungen der Angiogenesehemmer SU4312, Sorafenib, Rotenone oder Methotrexate. Untersucht wurden jeweils 3 Konzentrationen der Substanzen SU4312 (0,5; 1,0; 1,5 μM), Sorafenib (1,5; 2,0; 2,4 μM), Rotenone (6,25; 12,5; 25 nM) und Methotrexate (100, 200, 250 μM). Zudem sind die Effekte in der Vehikelkontrolle gegeben (0.00).

Für das Hauptexperiment wurden dann pro Kondition 16 Zebrafischembryonen über einen Zeitraum von 4 Tagen mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz behandelt. Zusätzlich wurden insgesamt 192 Lösungsmittelkontrollen mitgeführt. Zum Zeitpunkt 96 h nach Fertilisation wurden grobe morphologische Veränderungen notiert und überlebende Embryonen einzeln beprobt. Von den Lösungsmittelkontrollen wurden 20 Embryonen beprobt, verbliebene wurden vereinigt für eine Poolprobe genutzt, die als Referenz für inter- und intrainstrumentelle Schwankungen bei der Metabolomanalyse dient. In Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. ist eine Zusammenfassung der jeweiligen Effekte pro Well für die 4 Substanzen SU4312, Sorafenib, Rotenone und Methotrexat dargestellt. Das Metabolom der ausgewählten Zebrafischembryonen wurde dann mittels untargeted LC-MS/MS gemessen und mit Hilfe bioinformatischer Methoden hinsichtlich einer Vorhersage der Entwicklungstoxizität ausgewertet.

SU4312	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	k/f	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	k/f	Ti.C3
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	k/f	DMSO	Ti.C1	mtip	Ti.C2	Ti.C2	k/f	Ti.C3
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	k/f
D	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	mtip	k/f	Ti.C3	Ti.C3
E	DMSO	DMSO	DMSO	unh	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
F	unh	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	k/f	Ti.C3
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	unh	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3

Sorafenib	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	EdP	EdP, ret	EdP, ret	unh	k/f
B	DMSO	DMSO	k/f	DMSO	DMSO	DMSO	EdP	EdP	EdP, ret	EdP, ret	unh	unh
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	EdP	EdP	EdP, ret	Ti.C2	Sco, ret	unh
D	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	EdP, Sco	EdP, mhe	EdP, ret	EdP, Sco, ret	unh	unh
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	unh	EdP, mhe, ret	unh	unh
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	EdP, Sco	EdP, ret	EdP, ret	unh	unh
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	EdP	EdP	EdP, ret	EdP, ret	k/f	EdP, EdY, ret
H	unh	k/f	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	EdP	EdP	EdP, ret	EdP, ret	unh	unh

Rotenone	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	unh	DMSO	DMSO	DMSO	k/f	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
B	k/f	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	k/f	k/f	Ti.C3	Ti.C3
C	DMSO	DMSO	DMSO	k/f	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
D	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	k/f	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
G	DMSO	DMSO	k/f	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3

Methotrexate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	k/f	k/f	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	omal	Ti.C3	k/f
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	ret	Ti.C2	k/f	unh, omal	omal, ret, EdP
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	ret, EdP	Ti.C2	k/f	k/f	k/f
D	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	k/f	Ti.C2	unh, omal	Ti.C3
E	DMSO	DMSO	DMSO	k/f	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	ret, omal	Ti.C2	Ti.C3	unh, omal
F	DMSO	k/f	DMSO	k/f	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	k/f	Ti.C3
G	DMSO	DMSO	k/f	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	mtail	Ti.C3
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	k/f	Ti.C2	Ti.C3	k/f

Ti - test item; C - concentration

Abbildung 5: Zusammenfassung der Zebrafischembryonen, die nicht beeinträchtigt (grün), beeinträchtigt (orange) oder tot (rot) waren, nach der Behandlung mit SU4312, Sorafenib, Rotenone und Methotrexate. In den Wells mit der orangenen/roten Farbmarkierung sind die Arten der Beeinträchtigung wie folgt: nor = normal, k/f = coagulated egg/ fungi, unh = unhatched, noeye = no formation of eyes, n/l pig = No / low pigmentation, EdY / EdP = Edema (Yolk / Pericard), ret = retardation, mhe = Malformation of head, meye = malformation of eyes, mtail = Malformation tail, mtip = Malformation tip of tail, Sco = Scoliosis, omal = overall malformed. Ti = test item, C = concentration.

Anzahl und Intensität der Metabolomveränderungen

Die Auswertung der Anzahl und Intensität signifikant veränderter LC-MS-Merkmale, gemessen an Zebrafischembryonen, die jeweils den drei Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch) von SU4312, Sorafenib, Rotenon oder Methotrexat ausgesetzt waren, ergab signifikante ($p < 0.1$) Veränderungen (**Abbildung 6**). Insgesamt gab es mehr Veränderungen bei Sorafenib und Methotrexate, denn bei Rotenone und SU4312.

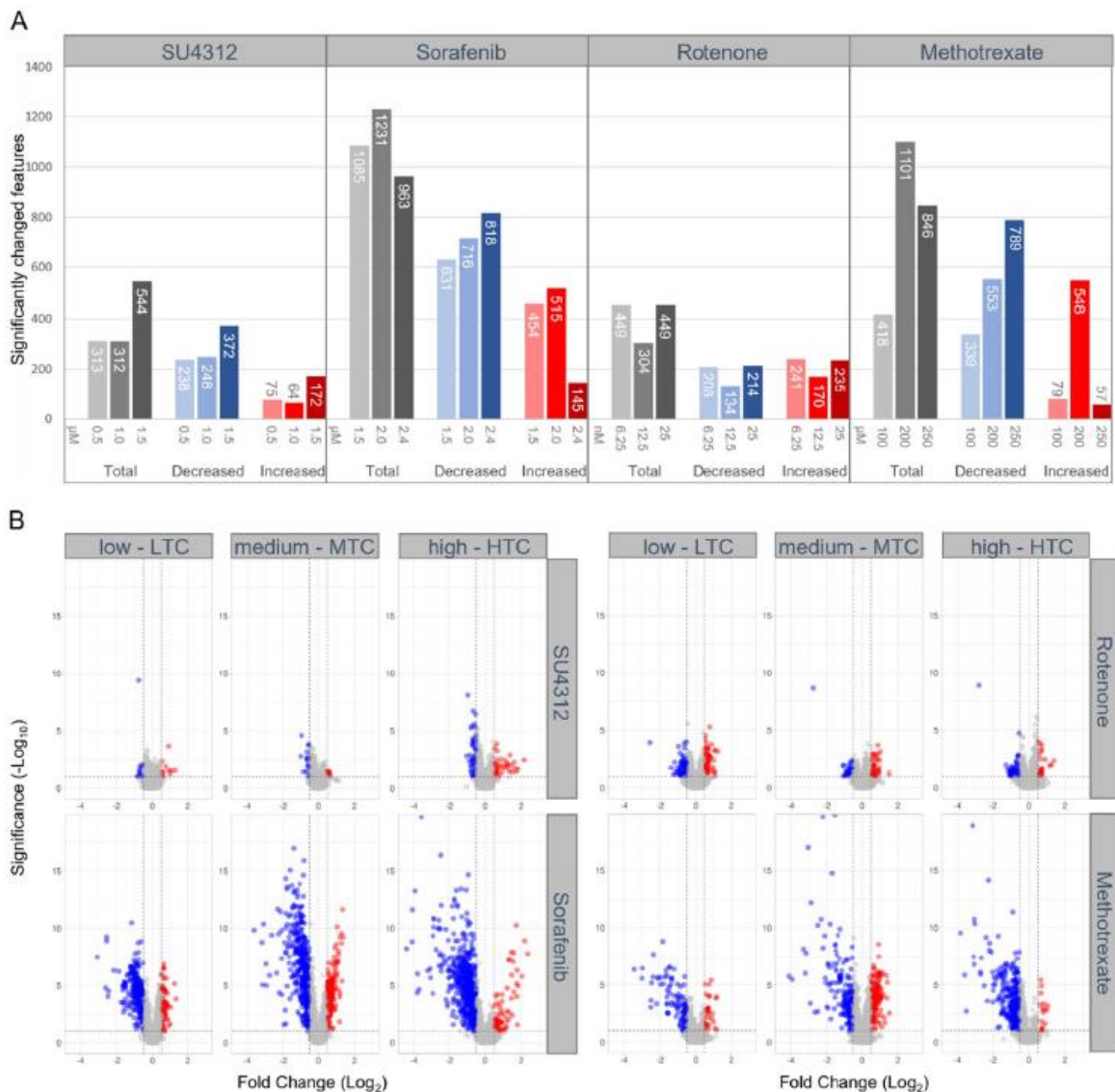


Abbildung 6: Anzahl und Intensität signifikant veränderter LC-MS-Merkmale, gemessen an Zebrafischembryonen, die jeweils drei Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch) von SU4312, Sorafenib, Rotenon oder Methotrexat ausgesetzt waren. Die Gesamtzahl der Merkmale, die in der Analyse enthalten waren, betrug 1835. A) Anzahl von signifikant ($p \leq 0,1$) veränderten Merkmalen pro experimenteller Bedingung. Eine zunehmende Farbintensität zeigt eine zunehmende angewendete Konzentration an. Graue Balken zeigen die Gesamtzahl der signifikanten Veränderungen an, während blaue und rote Balken signifikante Ab- und Zunahmen darstellen. B) Volcano plots zeigen relative Änderungen und ihre Signifikanz. Rote Punkte zeigen signifikant erhöhte Merkmale an, während blaue Punkte signifikant verringerte Merkmale anzeigen. LTC niedrigste Testkonzentration, MTC mittlere Testkonzentration, HTC höchste Testkonzentration.

Die Überschneidung der hoch- bzw. herunterregulierten Metabolite ist in **Abbildung 7** dargestellt. Es zeigte sich, dass der Overlap zwischen der LTC und der MTC von Sorafenib am größten war (**Abbildung 7A und B**). Die Beobachtungen aus der univariaten Analyse (**Abbildung 6**) spiegelten die morphologischen Effekte (**Abbildung 4**) hinsichtlich Größenordnung und Trend, wider. Die Sorafenib und Methotrexat Behandlungen zeigten mehr veränderte Phänotypen und gleichzeitig mehr veränderte Metabolite als SU4312 und Rotenone (**Abbildung 4 und Abbildung 6**).

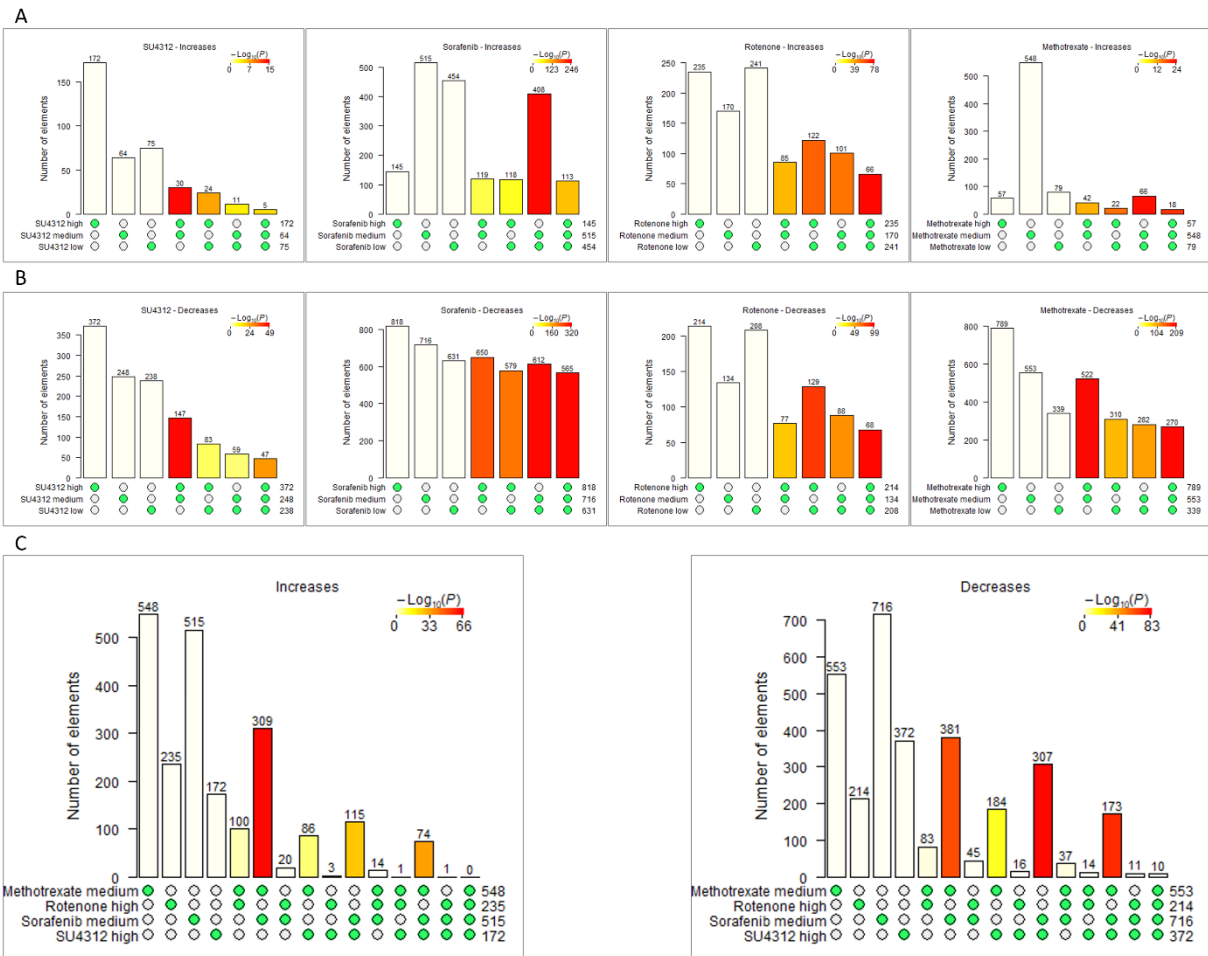


Abbildung 7: Überschneidung veränderter Merkmale zwischen Testgruppen. Die Anzahl der Elemente bezieht sich auf die Anzahl der gemeinsam veränderten Merkmale zwischen den Testgruppen. Für die Mehrfach-Schnittmengenanalyse wurde das R-Paket 'SuperExact Test' verwendet (Wang et al. 2015). A) Überschneidung signifikanter ($p \leq 0,1$) Zunahmen zwischen drei Testkonzentrationen einer Testsubstanz. B) Überschneidung signifikanter Abnahmen zwischen drei Testkonzentrationen einer Testsubstanz. C) Überschneidung signifikanter Zunahmen/Abnahmen zwischen allen Testsubstanzen für ausgewählte Konzentrationen.

Hauptkomponentenanalyse (PCA – „Principal Component Analysis“)

Mithilfe der Hauptkomponentenanalyse (PCA – „Principal Component Analysis“), welche ein unsupervised, multivariater statistischer Ansatz ist, um die Struktur von hochdimensionalen Datensätzen durch Dimensionsreduzierung zu analysieren, wurden die Daten weiter analysiert. Es zeigte sich, dass 50% der Varianz in den ersten drei Hauptkomponenten liegt und dass die Separierung in PC1/PC2 durch das Auftreten von abnormalen Phänotypen gesteuert wird (**Abbildung 8**).

Unter den mit Sorafenib behandelten ZFE schienen drei ZFE ohne sichtbare morphologische Veränderungen mit den Kontrollen zu clustern. Zudem clusterten von den mit Methothrexate behandelten ZFE mit abnormalem Phänotyp zwei deutlich mit den Sorafenib abnormalen Phänotypen, während zwei andere ZFE eine leichte Separierung von dieser Gruppe zeigte. Die beiden ersten war deutlich missgebildet und zeigten eine Retardierung während letztere beide lediglich missgebildet waren ohne erkennbare Anzeichen einer Retardierung.

Um weitere Effekte analysieren zu können, wurde die PC3 vs. PC1 angeschaut. Hier zeigten sich zwei Trends: Die Proben trennten sich anhand einer Diagonalen auf, was hauptsächlich an den beiden Angiogeneseinhibitoren Sorafenib und Su4312, aber auch an Methotrexate sichtbar wurde. Zudem wurde eine Separierung in die orthogonale Richtung deutlich, denen hauptsächlich die Proben von Rotenone folgten, jedoch auch die Proben von Methotrexat (**Abbildung 8B** und **Abbildung 9D**). Zusammengefasst zeigten die PCA, dass sich ZFE mit schweren Malformationen von denen mit leichten oder keinen Malformationen metabolisch unterscheiden (PC1/PC2) und dass sich bekannte Angiogeneseinhibitoren (Sorafenib, SU4312) sowie Methotrexate ähnliche metabolische Effekte teilen (PC1/PC3). Zudem konnte eine Dose-Response für Sorafenib und Methotrexate festgestellt werden.

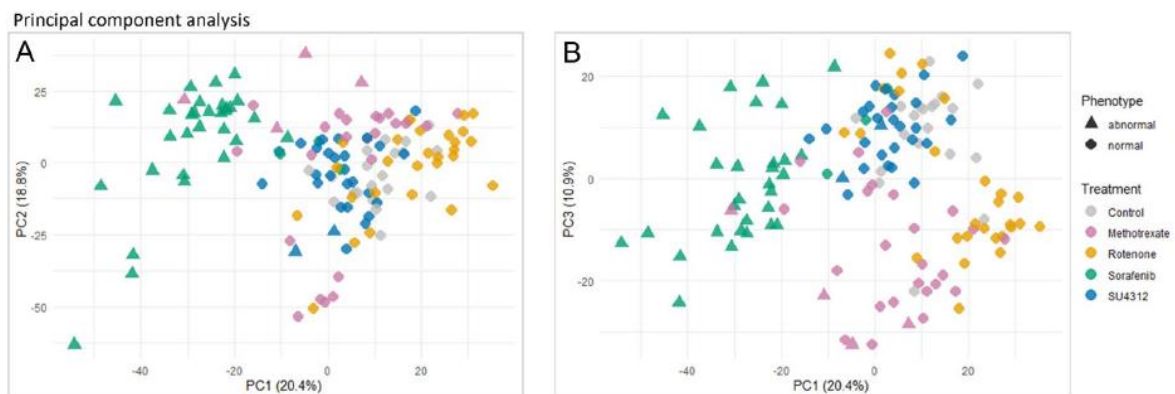


Abbildung 8: Hauptkomponentenanalyse (PCA), die die Stoffwechselprofile einzelner Zebrafischembryonen darstellt, die jeweils mit SU4312, Sorafenib, Rotenon oder Methotrexat in drei Konzentrationen behandelt wurden und nach Phänotypen eingefärbt sind. Phänotypbewertung und untargeted Metabolomics wurden an demselben Zebrafischembryo durchgeführt. Eine kumulative metabolische Varianz von 50% wird durch die ersten drei Hauptkomponenten (PCs) beschrieben, wobei 20,4% durch PC1, 18,8% durch PC2 (A) und 10,9% durch PC3 (B) erklärt werden.

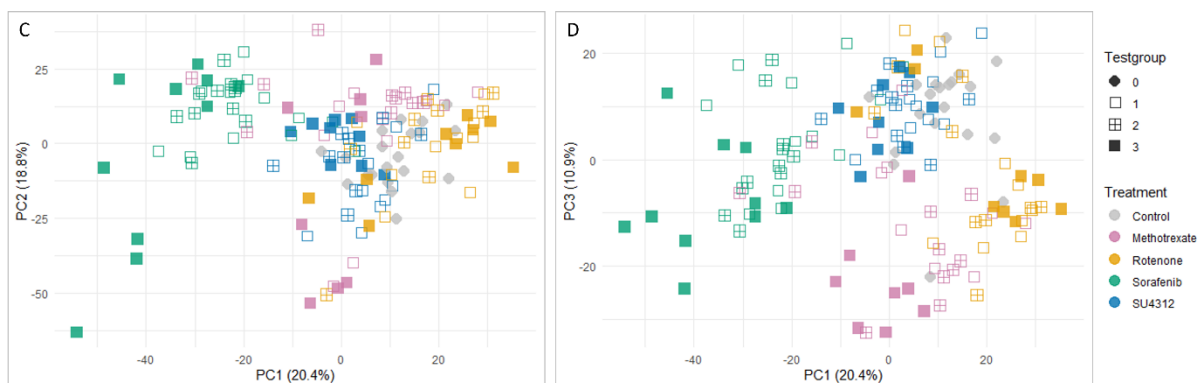


Abbildung 9: Hauptkomponentenanalyse (PCA), die die Stoffwechselprofile einzelner Zebrafischembryonen darstellt, die jeweils mit SU4312, Sorafenib, Rotenon oder Methotrexat in drei Konzentrationen behandelt wurden und nach Testkonzentration eingefärbt sind. C) PC1 vs. PC2 and D) PC1 vs. PC3 illustrating different concentrations with 1 - lowest test concentration, 2 - medium test concentration, and 3 - highest test concentration

Überschneidung und Natur der metabolischen Effekte der Angiogeneseinhibitoren Sorafenib und SU4312 mit Methotrexat

Für Sorafenib, SU4312 und Methotrexate wurden 74 gemeinsam veränderte, erhöhte Metabolite und 173 gemeinsam, erniedrigte Metabolite gefunden, was zusammen 247 gemeinsam veränderte

Metabolite für die Angiogeneseinhibitoren ergibt (**Abbildung 10**). Für Rotenone hingegen wurden lediglich 10 gemeinsam veränderte, erhöhte und keine gemeinsam veränderten, erniedrigten Metaboliten mit allen Substanzen identifiziert, was einem gemeinsamen antiangiogenen Wirkmechanismus entspricht.

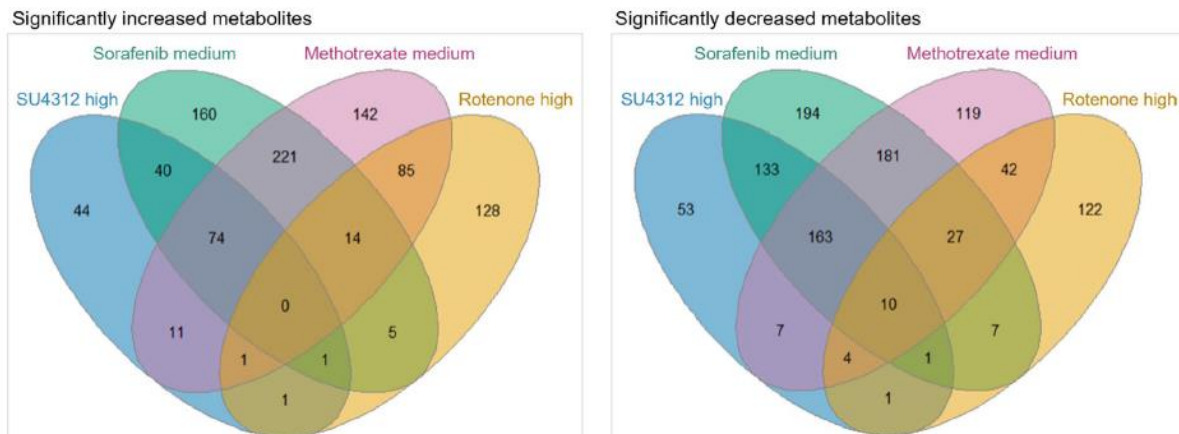


Abbildung 10: Überschneidung von erhöhten/verminderten LC-MS-Merkmalen bei mit SU4312, Sorafenib, Methotrexat und Rotenon behandelten Zebrafischembryonen. Die hohen Konzentrationen von SU4312 und Rotenon sowie die mittleren Konzentrationen von Sorafenib und Methotrexat wurden hinsichtlich gemeinsamer Metabolomveränderungen analysiert. Die Testgruppen wurden aufgrund morphologischer Befunde und metabolischer Effektlevel ausgewählt. Es wurden keine gemeinsamen Merkmale gefunden, die in allen Testgruppen signifikant ($p \leq 0,1$) erhöht waren. 74 Merkmale waren gemeinsam bei den Behandlungen mit SU4312, Sorafenib und Methotrexat erhöht. 10 Merkmale waren in allen Testgruppen signifikant verringert, und 173, wenn Rotenon ausgeschlossen wurde.

In **Abbildung 10** ist die Identität der veränderten Metabolite zusammengefasst, die basierend auf der untargeted Metabolomicsmethode annotiert werden konnten. Die 247 veränderten Metabolite bestanden zu 75% aus Lipiden verschiedener Klassen. Desweiteren wurden Coenzyme und repräsentative Metabolite aus biochemischen Signalwegen wie dem TCA Zyklus, Aminosäuren- oder Purinstoffwechsel im gemeinsam veränderten metabolischen Pattern von Sorafenib, SU4312 und Methotrexate gefunden. Unter den gemeinsam veränderten Metaboliten zwischen Sorafenib, SU4312 und Methotrexat wurden Phosphatidylinositole (PI), Diglyceride (DG), Triglyceride (TG), Phosphatidylserine (PS), Cholesterylester (CE), 3-Decaprenyl-4-hydroxybenzoesäure (DHB), 2-Demethylubiquinon-9 (DeMQ), metabolische Verbindungen im Zusammenhang mit der Folsäure-Biosynthese und Retinoide identifiziert. Es wurde berichtet, dass die Angiogenese bei schwangeren Mäusen mit Folsäuremangel verringert war und proangiogene Faktoren wie VEGFR2 betroffen waren (Li et al., 2015). In unseren Messungen waren alle gemessenen Metaboliten der Folsäure-Biosynthese reduziert, was darauf hindeutet, dass ein Mangel an Folsäure die Angiogenese beeinträchtigen kann. Darüber hinaus waren die Retinolspiegel in den Behandlungsgruppen von Sorafenib, SU4312 und Methotrexat reduziert. Da Retinoide schon lange als wichtige Regulatoren der Embryogenese anerkannt sind (Hill et al., 1995) und hemmende

Wirkungen auf die Angio- und Vasculogenese haben (Hoffmann, et al., 2007), könnte der beobachtete Rückgang von Retinol ein Hinweis auf Entwicklungsstörungen bei Zebrafischen sein.

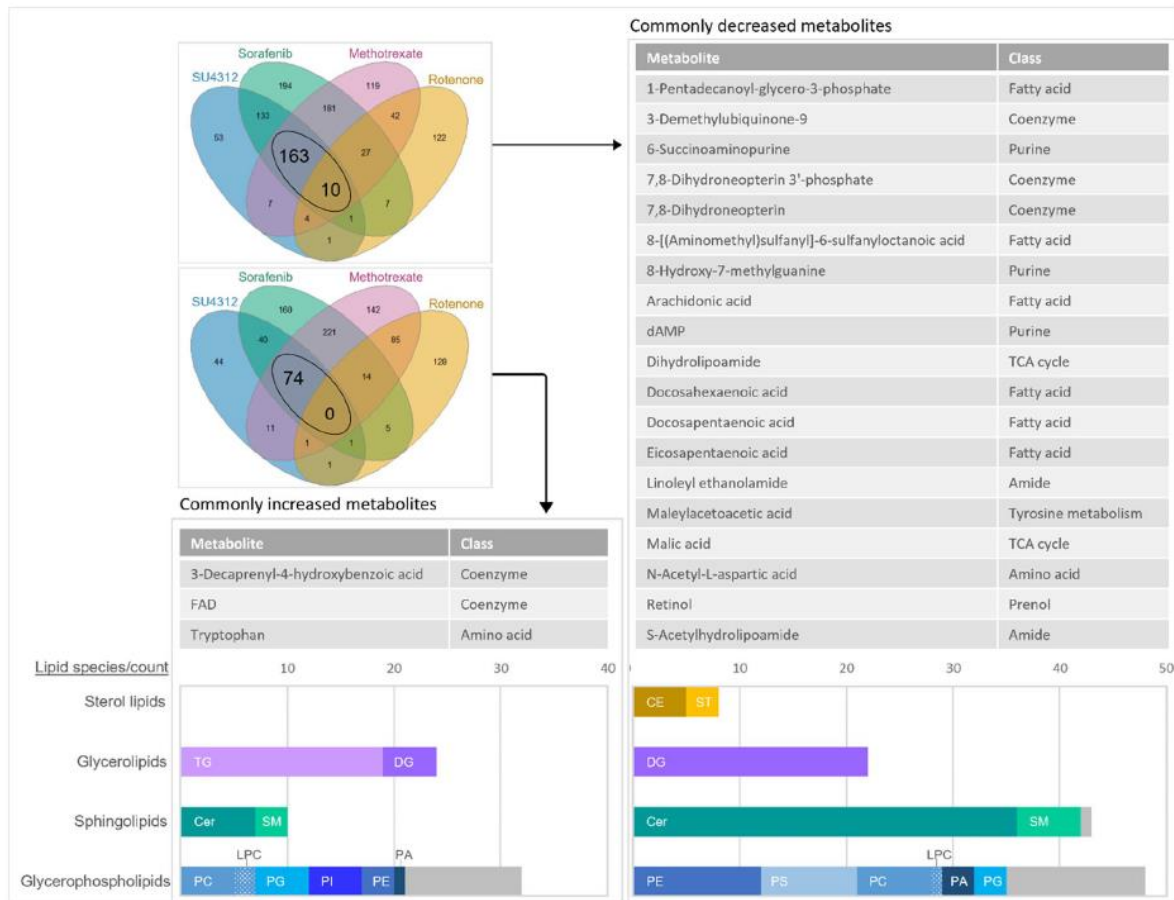


Abbildung 11: Identität der häufig veränderten LC-MS-Merkmale bei den Behandlungen mit SU4312, Sorafenib und Methotrexat. Spektrale Informationen, exakte Masse und Retentionszeit wurden verwendet, um 247 gemeinsam veränderte Merkmale zu identifizieren. 83% der Merkmale wurden annotiert und werden hier gezeigt. Lipide wurden zusammengefasst und basierend auf ihrer (Unter-)Klasse gruppiert. Neben Lipiden wurden auch mehrere Fettsäuren, Cofaktoren und andere essentielle Metaboliten identifiziert. CE Cholesterylester, Ceramid, DG Diglycerid, LPC Lysophosphatidylcholin, PA Phosphatidsäure, PC Phosphatidylcholin, PE Phosphatidylethanolamin, PG Phosphatidylglycerol, PI Phosphatidylinositol, PS Phosphatidylserin, SM Sphingomyelin, ST Sterol, TG Triglycerid.

Bioakkumulationsmessungen

Desweiteren wurden Bioakkumulationsmessungen der Substanzen SU4312 (t3, t6, t12, t24, t27, t30, t36, t48, t72, t96; 1, 2, 5 µM), Sorafenib (t36, t48, t96; 2,4 und 1,3 µM) und Rotenone (t36, t48, t96; 50, 25 nM) zu verschiedenen Zeitpunkten und Konzentrationen mittels LC-MS/MS bei BASF durchgeführt, die vom UFZ Leipzig weiter ausgewertet wurden.

Planung und Durchführung von Experimenten zu den Substanzen in Bezug auf den AOP „Induktion der Gaumenspalte“

Die Arbeiten die Vorbereitungen zu Planung und Durchführung von Experimenten zu den Substanzen den AOP „Induktion der Gaumenspalte“ betreffend, konzentrierten sich auf die Auswahl der Substanzen für diesen zweiten AOP (Valproinsäure (VPA), 2-propyl-4-Penten Säure, (4ene VPA), 2-propyl-2-Penten Säure (2ene VPA) und Ethylhexanolsäure), sowie die Organisation der Durchführung der Rangefinder und Hauptexperimente. Das Rangefinderexperiment musste mit einer höheren Konzentration an DMSO (0.1%) wiederholt werden, da bei einer Konzentration von 0.01% DMSO keine Effekte aufgetreten sind. Basierend auf der Wiederholung des Rangefinderexperimentes konnten dann die Dosierungen für den Hauptversuch erfolgreich festgelegt und dieser durchgeführt werden.

Rangefinderexperiment zum AOP „Induktion der Gaumenspalte“

In Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. sind die Anzahl der Effekte auf die Zebrafischembryonen bei den verschiedenen Konzentrationen von Valproinsäure, 2-ene VPA, 4-ene VPA und 2-Ethylhexanolsäure, wie aus dem Rangefinderexperiment ersichtlich, gegeben.

Day of analysis		2 dpf						4 dpf					
Concentration (µM)		DMSO	50	100	200	400	800	DMSO	50	100	200	400	800
Test substance ID													
Valproic acid	PE-3821	10/0/0	10/0/0	10/0/0	10/0/0	6/4/0	6/4/0	10/0/0	9/1/0	10/0/0	10/0/0	6/4/0	4/6/0
Day of analysis		2 dpf						4 dpf					
Concentration (µM)		DMSO	100	200	400	800	1600	DMSO	100	200	400	800	1600
Test substance ID													
4-ene-VPA	PE-3991	10/0/0	10/0/0	9/1/0	10/0/0	8/1/1	8/2/0	10/0/0	10/0/0	10/0/0	10/0/0	8/1/1	0/10/0
2-ene-VPA	PE-3992	10/0/0	10/0/0	10/0/0	10/0/0	8/2/0	6/4/0	9/1/0	10/0/0	10/0/0	8/2/0	8/2/0	6/4/0
2-Ethylhexanoic acid	PE-3993	10/0/0	10/0/0	10/0/0	10/0/0	8/2/0	3/7/0	10/0/0	9/1/0	10/0/0	9/1/0	8/2/0	1/7/2

Abbildung 12: Rangefinder Experiment für den AOP „Induktion der Gaumenspalte“ mit den Substanzen Valproinsäure (VPA), 2-ene VPA, 4-ene VPA und 2-Ethylhexanolsäure. Keine Beeinträchtigung / nicht-letale Beeinträchtigung irgendeiner Art / letaler Effekt.

Basierend auf den Ergebnissen des Rangefinderexperimentes wurden dann die gesamten Effekte gegen die Konzentration aufgetragen und eine Kurvenanpassung berechnet, um die Dosierungen für das Hauptexperiment für die Metabolomanalyse festzulegen. Die basierend auf Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. festgelegten Konzentrationen betragen wie folgt: Valproinsäure (VPA) 100, 300 und 900 µM, 4-ene VPA

533, 800 und 1200 μM , 2-ene VPA 233, 700 und 2100 μM und 2-Ethylhexansäure 533, 800 und 1200 μM .

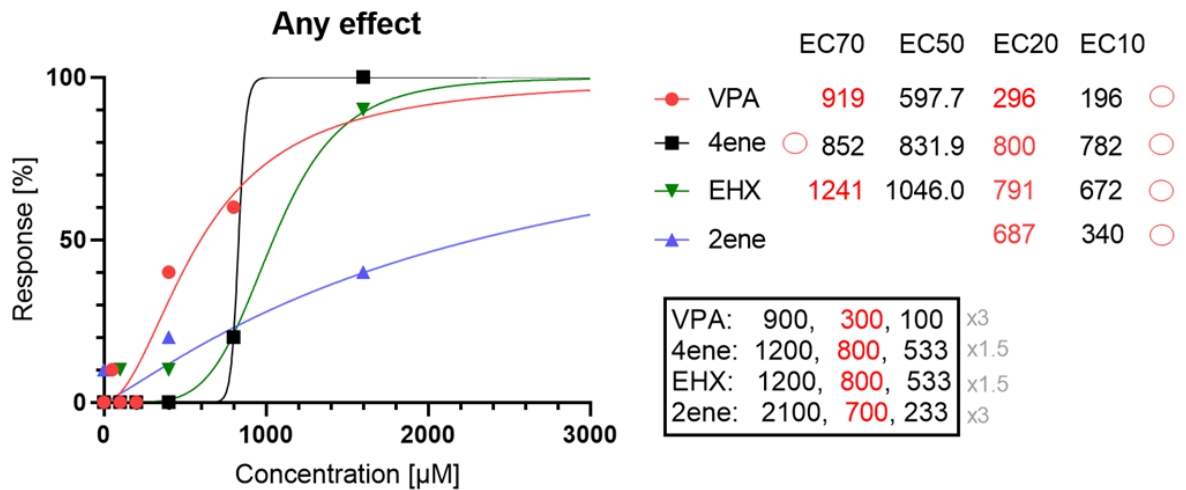


Abbildung 13: Visualisierung der aufgetretenen Effekte an Zebrafischembryonen unter Behandlung von Valproinsäure (VPA), 2-ene VPA, 4-ene VPA und 2-Ethylhexanolsäure und Wahl der Konzentrationen für das Hauptexperiment (Kasten).

Hauptexperiment mit Exposition der Zebrafische und anschließender Metabolomanalyse zum AOP „Induktion der Gaumenspalte“

Für das Hauptexperiment wurden die Zebrafischembryonen dann mit den ermittelten Konzentrationen aus dem Rangfinderexperiment der 4 Substanzen (Valproinsäure (VPA), 2-propyl-4-Penten Säure, (4ene VPA), 2-propyl-2-Penten Säure (2ene VPA) und Ethylhexanolsäure) behandelt und phänotypisch die aufgetretenen Effekte ermittelt.

VPA (Valproinsäure):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	b-c-e-i	Ti.C1	Ti.C2	b-c-d-e-l-m	b	Ti.C3
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	b
D	DMSO	DMSO	DMSO	m	DMSO	DMSO	Ti.C1	b-c-d-e-l-m	Ti.C2	b	b	Ti.C3
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	b	Ti.C3
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	m	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3

4ene VPA (2-propyl-4-Penten Säure):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	b	Ti.C3	Ti.C3
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	b-i	Ti.C3
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	b-i	Ti.C3
D	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	b-g-i-l-m	Ti.C2	Ti.C2	b-i	b-i
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	b
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	b	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	c	Ti.C2	b-i	Ti.C3
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	b	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3

Zene VPA (2-propyl-2-Penten Säure):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	b	Ti.C1	b	b	b-c	b
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	b	Ti.C2	b	Ti.C3
C	c	m	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	b
D	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	b-c	b
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	b	Ti.C3	b
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	b-c-e	b	Ti.C2	Ti.C3	b-c
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	b	b	b	b
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	b	Ti.C2	Ti.C2	b	b-c

Ethylhexanolsäure:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	b-c
B	DMSO	DMSO	DMSO	b	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	b	b-l
C	DMSO	c-e-g-i	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	Ti.C3	Ti.C3
D	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	b	b	b-i	b
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	b	Ti.C2	b-i	b-i
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	b	Ti.C3	Ti.C3
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Ti.C1	Ti.C1	Ti.C2	Ti.C2	b	Ti.C3
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	b-c-e-g-h-k-m	Ti.C1	b-i	b	Ti.C3	b-g-i

Abbildung 14: Zusammenfassung der Zebrafischembryonen für das Hauptexperiment der Metabolomanalyse nach der Behandlung mit 3 Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz, die entweder nicht beeinträchtigt (grün), beeinträchtigt (orange) oder tot (rot) waren. DMSO = Vehikelkontrolle; Ti= Test item; C= Konzentration. Die Art der Beeinträchtigung ist dargestellt in den orangenen Wells mit folgenden Abkürzungen: microcephaly (b), pericardial edema (c), necrosis (d), micropthalmia (e), yolk edema (g), altered trunk (h), yolk opacity (i), abnormal length (l), und curved (m).

Anschließend an die Exposition wurden die Metabolomanalysen durchgeführt. Basierend auf den Metabolommessungen konnte gezeigt werden, dass es einen Sequenzbias gab (Abbildung 15).

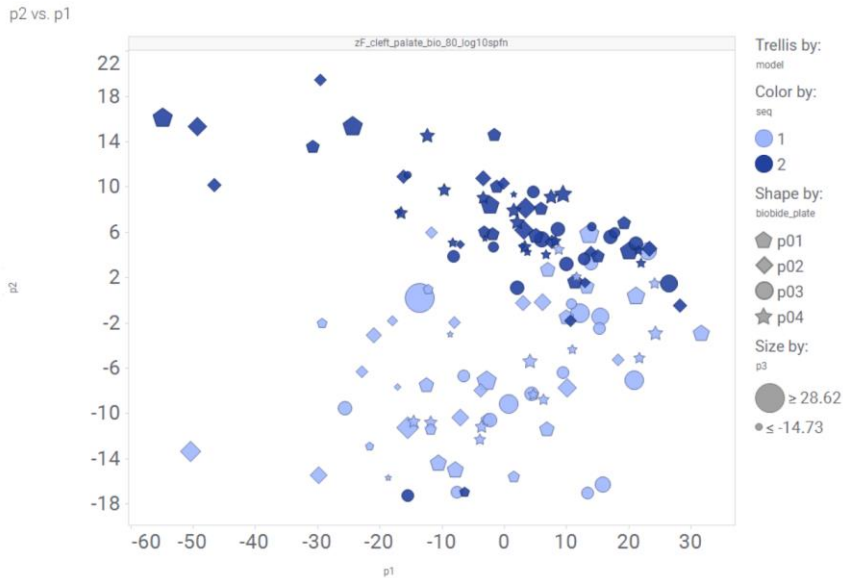


Abbildung 15: PCA (Hauptkomponentenanalyse) des mit VPA, 2ene, 4ene und Ethylhexanolsäure behandelten Zebrafischembryometaboloms. Eingefärbt sind die Proben nach der Sequenz (hellblau = Sequenz 1, dunkelblau = Sequenz 2), Symbole repräsentieren die unterschiedlichen Platten. Klar ist ein Sequenzbias ersichtlich. Seq=Sequenz

Dieser konnte durch eine Kontrollnormalisierung aufgehoben werden (**Abbildung 16**).

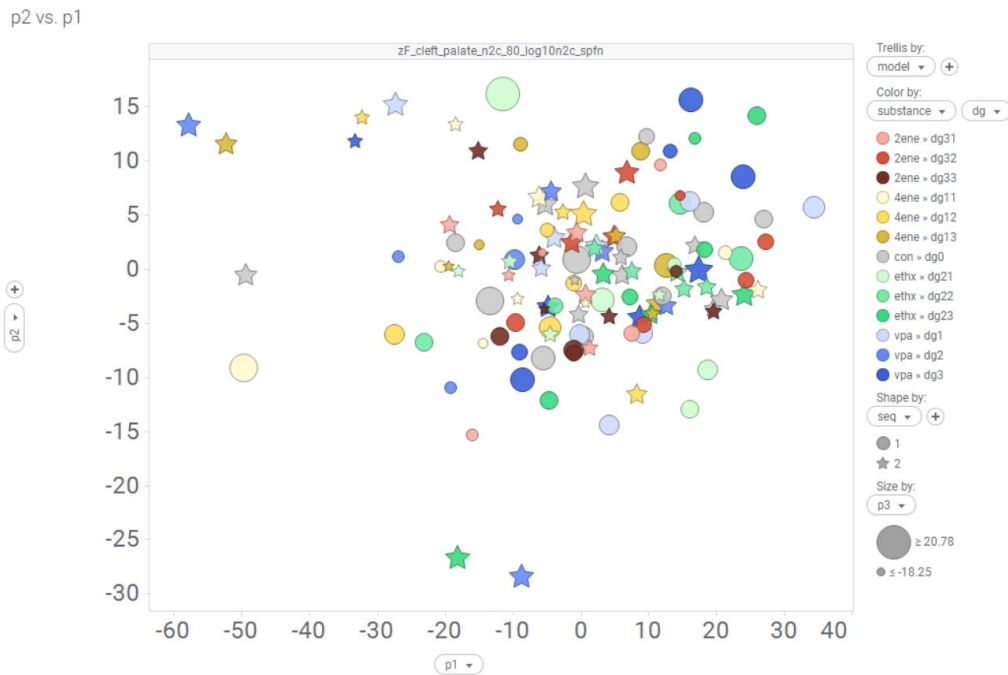


Abbildung 16: Kontrollnormierte PCA (Hauptkomponentenanalyse) des mit VPA, 2ene, 4ene und Ethylhexanolsäure behandelten Zebrafischembryometaboloms. dg=dose group, seq=Sequenz

Insgesamt ergab die Metabolomanalyse für die Substanzen für den AOP Gaumenspalte kein Clustering der Substanzen von den Kontrollen separiert und zeigte auch keine Konzentrationsabhängigkeit (**Abbildung 16**).

Weitere Experimente sind notwendig, um zu untersuchen, wie sich die Substanzen für den AOP der Gaumenspalte auf das Zebrafischmetabolom auswirken. Das bisherige Experiment

ist inconclusiv und es ist unklar, warum die Metabolomanalyse für den 2. AOP Gaumenspalteninduktion kein klares Clustering zeigte. Potentiell könnte es an den single Zebrafischembryos gelegen haben, die eine Diversität an Phänotypen aufwiesen oder daran, dass ein anderer Zebrafischembryostamm benutzt wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir im ersten Teil der Analysen zeigen konnten, dass die Metabolomantwort der mit PTU behandelten Zebrafischembryonen reproduzierbar ist und eine Konzentrationsabhängigkeit zeigt. Im zweiten Teil konnten wir bei der Behandlung der Zebrafischembryonen mit den Angiogeneseinhibitoren zeigen, dass wir beeinträchtigte Phänotypen im Metabolom von nicht beeinträchtigten Phänotypen unterscheiden konnten und haben gemeinsame Metabolite der Angiogeneseinhibitoren identifiziert. Im dritten Teil, dem AOP der Gaumenspalteninduktion waren die Ergebnisse inconclusiv. Wir wurden mit technischen Herausforderungen konfrontiert, die wir nicht komplett evaluieren konnten während der Dauer des Projektes.

3. Vergleich des Vorhabenstands mit der ursprünglichen (bzw. mit Zustimmung des ZG geänderten) Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung.

Arbeitsplanung: AP1 (Bestimmung von Gewebekonzentrationen) wurde durchgeführt, AP2/AP3 (Metabolomanalyse) durchgeführt und ausgewertet AP4 (Metabolomanalyse von weiteren Substanzen, Gaumenspalteninduktoren) durchgeführt; AP6 (Publikation und Präsentation auf Fachkongressen) 2 Publikationen publiziert

Zeitplanung: Wie im ersten Projektbericht dargelegt, wurde das Projekt mit einer Verzögerung von 5-6 Monaten begonnen. Außerdem gab es Verzögerungen bei der Auswahl der Modellschubstanzen, insbesondere durch die fehlende Eignung von Thalidomid verzögerte sich die Durchführung von Transkriptom- und Metabolomanalysen (AP2). Aufgrund dieser Verzögerung wurde eine kostenneutrale Verlängerung beantragt und auch vom Projektträger bewilligt, so dass sich das Projektende auf Dezember 2023 verschoben hat. Durch diese Verzögerung fokussierte sich die Durchführung des AP2 auf 2022, dessen Auswertung hauptsächlich auf 2023, und die Experimente zur Metabolommessung der Gaumenspalteninduktoren auf 2023 (AP4). AP6 (Publikation der Ergebnisse) wurde ebenfalls durchgeführt.

Kostenplanung: Keine größeren Abweichungen, siehe beiliegendem Verwertungsplan

4. **Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Berichtszeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert (Begründung)?**

Der Großteil der Ziele des Projektes wurde erreicht, siehe detailliertem Bericht.

5. **Sind inzwischen von dritter Seite FE-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?**

Publikation	Relevanz für das Projekt
<p>Atukorala ADS, Ratnayake RK (2021) Cellular and molecular mechanisms in the development of a cleft lip and/or cleft palate; insights from zebrafish (<i>Danio rerio</i>). <u>Anat Rec</u> (Hoboken) 304(8):1650-1660 doi:10.1002/ar.24547 (Atukorala et al. 2021)</p>	<p>Dieser Übersichtsartikel fasst die Gaumenbildung im Zebrafisch zusammen und zeigt auf welche Phänotypen bei Störungen der Entwicklung beobachtet wurden. Der Artikel eignet sich daher gut um unsere eigenen Untersuchungen zu planen und zu prüfen inwieweit Effekte im ZF-Embryo sich im Wildtyp und ohne die Hilfe von speziellen Färbetechniken z.B. für Knochenstrukturen, nachweisen lassen.</p>
<p>Haindl R, Deloria AJ, Sturtzel C, et al. (2020) Functional optical coherence tomography and photoacoustic microscopy imaging for zebrafish larvae. <u>Biomed Opt Express</u> 11(4):2137-2151 doi:10.1364/BOE.390410 (Haindl et al. 2021)</p>	<p>Ein komplexes mikroskopisches Verfahren wurde u.a. für die Darstellung von Blutgefäßen und Messung von Blutflussgeschwindigkeiten eingesetzt. Es erfolgte jedoch keine Analyse von Störungen auf die Blutgefäßentwicklung. Das Verfahren ist auch nicht einfach zu etablieren und erfordert spezielle mikroskopische Ausrüstung und Expertise. Mit dem von uns gewählten Videosubtraktionsverfahren konnten die Blutgefäße im Zebrafischembryo mit geringerem Aufwand darstelle.</p>
<p>Brotzmann K, Wolterbeek A, Kroese D, and Braunbeck T (2021) Neurotoxic effects in zebrafish embryos by valproic acid and nine of its analogues: the fish-mouse connection? <u>Arch Toxicol</u> 95, 641–657 doi:10.1007/s00204-020-02928-7 (Brotzmann et al. 2021)</p>	<p>Valproinsäure (VPA) und Derivate wurden im Zebrafisch getestet und die Ergebnisse mit in vivo Befunden aus der Maus verglichen. Der Fokus lag hier auf Endpunkten, die auf Neurotoxizität hinweisen. Die Publikation kann uns bei der Auswahl der VPA-Derivate unterstützen und ermöglicht später einen Vergleich der morphologischen Befunde.</p>
<p>Liu, W., et al. (2023). "Developmental toxicity of TCBPA on the nervous and cardiovascular systems of zebrafish (<i>Danio rerio</i>): A combination of transcriptomic and metabolomics." <u>J Environ Sci (China)</u> 127: 197-209. (Liu et al. 2023)</p>	<p>Transkriptom und Metabolomanalyse von TCBPA exponierten Zebrafischembryonen wurde durchgeführt. Die Studie zeigt, wie Transcriptomics und Metabolomics auf Pathway-Ebene kombiniert werden können und gemeinsam dazu beitragen einen AOP aufzudecken.</p>

Ribbenstedt, A., et al. (2022). "Toxicometabolomics and Biotransformation Product Elucidation in Single Zebrafish Embryos Exposed to Carbamazepine from Environmentally-Relevant to Morphologically Altering Doses." <u>Chem Res Toxicol</u> 35 (3): 431-439. (Ribbenstedt et al. 2022)	Toxicometabolomics in einzelnen Zebrafischembryos exponiert mit Carbamazepine wurde durchgeführt. Diese Daten zeigen die Durchführbarkeit von Metabolomics im Hinblick auf einzelne Zebrafischembryos auf und geben Hinweise in Richtung der Beurteilung des Hazard Potentials.
Xu, A., et al. (2023) "A comprehensive untargeted metabolomics study in zebrafish embryos exposed to perfluorohexane sulfonate (PFHxS)." <u>Sci Total Environ.</u> 887:163770. (Xu et al. 2023)	Diese Studie hat zeit- und dosisabhängiges untargeted Metabolomics von PFHxS durchgeführt. Diese Daten zeigen die Durchführbarkeit von untargeted Metabolomics im Zebrafisch in dosis- und zeitabhängiger Weise.

6. Jährliche Fortschreibung des Verwertungsplans.

Entsprechende Ergebnisse wurden als Abstract für folgende Kongresse in 2022 eingereicht:

ICT 2022 (Titel: „A targeted metabolomics approach for unravelling different modes of embryotoxicity in zebrafish“, P. Wilhelmi, B. Flick, V. Giri, F. Zickgraf, T. Walk, S. Scholz, W. Busch, S. Henkes, V. Haake, M. Barenys, B. Birk, R. Landsiedel, D. Funk-Weyer).

Zudem wurde ein Paper über die Ergebnisse zu der entwicklungsbiologischen Toxizität von PTU in Zebrafischen mit dem Titel „A metabolomics approach to reveal the mechanism of developmental toxicity in zebrafish embryos exposed to 6-propyl-2-thiouracil “ (Wilhelmi, P.; et al. (2023). "A metabolomics approach to reveal the mechanism of developmental toxicity in zebrafish embryos exposed to 6-propyl-2-thiouracil." Chem Biol Interact. 382:110565. doi: 10.1016/j.cbi.2023.110565.) 2023 bei dem Journal **Chemico-Biological interactions** publiziert

Eine weitere Publikation mit dem Titel „Molecular signatures of angiogenesis inhibitors: a single-embryo untargeted metabolomics approach in zebrafish“ wurde in 2024 in Archives of Toxicology publiziert (Wilhelmi, P., et al. (2024). "Molecular signatures of angiogenesis inhibitors: a single-embryo untargeted metabolomics approach in zebrafish." **Arch Toxicol.** 98(3):943-956. doi: 10.1007/s00204-023-03655-5.).

Referenzen

1. Liu, W., et al. (2023). "Developmental toxicity of TCBPA on the nervous and cardiovascular systems of zebrafish (Danio rerio): A combination of transcriptomic and metabolomics." J Environ Sci (China) **127**: 197-209.

2. Pang, Z., et al. (2021). "MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights." Nucleic Acids Res **49**(W1): W388-W396.
3. Ribbenstedt, A., et al. (2022). "Toxicometabolomics and Biotransformation Product Elucidation in Single Zebrafish Embryos Exposed to Carbamazepine from Environmentally-Relevant to Morphologically Altering Doses." Chem Res Toxicol **35**(3): 431-439.
4. Wilhelmi, P.; et al. (2023). "A metabolomics approach to reveal the mechanism of developmental toxicity in zebrafish embryos exposed to 6-propyl-2-thiouracil." Chem Biol Interact. 382:110565. doi: 10.1016/j.cbi.2023.110565.
5. Wilhelmi, P., et al. (2024). "Molecular signatures of angiogenesis inhibitors: a single-embryo untargeted metabolomics approach in zebrafish." Arch Toxicol. 98(3):943-956. doi: 10.1007/s00204-023-03655-5.
6. Hill, J., et al. (1995) "Exogenous retinoic acid causes specific alterations in the development of the midbrain and hindbrain of the zebrafish embryo including positional respecification of the Mauthner neuron." Mech Dev. 50(1):3-16.
7. Hoffmann, S., et al., (2007) "Retinoic acid inhibits angiogenesis and tumor growth of thyroid cancer cells." Mol. Cell Endocrinol. 264(1-2):74-81