TECHNISCHE UNIVERSITÄT
KAISERSLAUTERN

Einfluss hochreiner, nicht dioxin-artiger polychlorierter Biphenyle auf ausgewählte fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Leber im Nager und in Zellkulturmodellen.

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

Dissertation

(D386)

vorgelegt von
Diplom-Chemiker

Robert Roos

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Kaiserlautern 2011

Eröffnung des Promotionsverfahren: 06.2010

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 20.01.2011

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. H. Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Die vorliegende Dissertation entstand zwischen September 2007 und Oktober 2010 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern im Rahmen des EU geförderten ATHON-Projekts (*Assessing the Toxicity and Hazard of Non-dioxin-like PCBs Present in Food*, FOOD-CT-2005-022923).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i
Abkürzungsverzeichnis v
Abbildungsverzeichnis vi
Tabellenverzeichnis viii
Kurzfassung viii
Abstract xi
I. Einleitung 1
II. Theoretischer Hintergrund 2
II.1. Polychlorierte Biphenyle (PCBs) 2
II.1.1. Struktur und Nomenklatur 2
II.1.2. Chemo-physikalische Eigenschaften 4
II.1.3. Dioxin-artige und nicht dioxin-artige PCBs 4
II.1.4. Anwendung und Exposition 6
II.1.4.1. Anwendung in der Industrie 6
II.1.4.2. Belastung durch Nahrungs- und Futtermittel 7
II.1.4.3. Besonders belastete Gruppen 12
II.1.4.4. Belastung von Säuglingen durch die Muttermilch 12
II.1.4.5. Weitere Expositionsquellen 15
II.1.5. Toxikologische Daten 15
II.1.5.1. Gemische 16
II.1.5.2. Individuelle PCBs 17
II.1.5.3. Humane Daten 18
II.2. Fremdstoffmetabolismus 19
II.2.1. Cytochrom P450 Enzyme 20
II.2.1.1. CYP1 Subfamilie 21
II.2.1.2. CYP2B-Subfamilie 23
II.2.1.3. CYP3A Subfamilie 25
II.2.2. Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen 27
III. Zielsetzung 30
IV. Ergebnisse und Diskussion 31
IV.1. Ratten-Studien 31

IV.1.1. 28 Tage-Studie 31
IV.1.1.1. Genexpression 32
IV.1.1.2. Proteinanalyse 37
IV.1.1.3. Enzymaktivität 38
IV.1.2. Perinatal-Studie 41
IV.1.2.1. Enzymaktivität 42
IV.1.2.1.1. NDL-PCB 180 42
IV.1.2.1.2. NDL-PCB 52 44
IV.1.3. Zusammenfassung und Diskussion der Ratten-Studien 46
IV.2. Maus-Studie 53
IV.2.1. 1 Tag 54
IV.2.1.1. Relatives Lebergewicht 54
IV.2.1.2. Genexpression 54
IV.2.1.3. Enzymaktivität 56
IV.2.2. 5 Tage 57
IV.2.2.1. Relatives Lebergewicht 57
IV.2.2.2. Genexpression 58
IV.2.2.3. Enzymaktivität 59
IV.2.3. 28 Tage 61
IV.2.3.1. Relatives Lebergewicht und Körpergewichtszunahme 61
IV.2.3.2. Genexpression 63
IV.2.3.3. Enzymaktivität 65
IV.2.4. Vergleich der EROD- und PROD-Aktivität 66
IV.2.5. Zusammenfassung und Diskussion der Maus-Studien 68
IV.3. In vitro 73
IV.3.1. Transiente Transfektion in HepG2 74
IV.3.1.1. hXRE 75
IV.3.1.2. hPBREM/hCAR 76
IV.3.2. Stabil transfizierte HepG2-hXREM-Zellen 77
IV.3.2.1. SEAP Messung 77
IV.3.3. Zusammenfassung und Diskussion der *in vitro* Daten 79
IV.4. Abschließende Zusammenfassung und Diskussion 81
IV.4.1. Studiendesign 81
IV.4.2. Mögliche Folgen der Enzym-Induktion 82

V. Methoden und Material 84
V.1. Methoden 84
V.1.1. *In vivo*-Rattenstudien 84
V.1.1.1. 28 Tage-Studie 84
V.1.1.2. Ein-Generations-Studie 85
V.1.2. *In vivo*-Mausstudien 86
V.1.2.1. Behandlungsschema 1 Tag 86
V.1.2.2. Behandlungsschema 5 Tage 86
V.1.2.3. Behandlungsschema 28 Tage 86
V.1.3. Aufarbeitung der Gewebeproben 87
V.1.3.1. Mikrosomenpräparation 87
V.1.3.2. mRNA-Isolation 87
V.1.3.3. Proteinbestimmung 88
V.1.4. Biomolekulare Arbeiten 89
V.1.4.1. SDS-Palyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) 89
V.1.4.2. Western-Blot (semi-dry Blot) 91
V.1.4.3. Immunoblot und Chemolumineszenz 92
V.1.4.4. Real-Time PCR 93
V.1.4.4.1. Reverse Transkription 93
V.1.4.4.2. RT-PCR 94
V.1.4.4.3. Berechnung 96
V.1.4.5. Enzym-Aktivität nach Kennedy 96
V.1.5. In vitro-Arbeiten 99
V.1.5.1. Transfektion 99
V.1.5.2. Transiente Transfektion in HepG2 99
V.1.5.3. Stabil transfizierte HepG2-hXREM-Zellen 100
V.1.5.4. Reportergenanalysen 101
V.1.5.5. Dual-Luciferase Reporter Assay System 101
V.1.5.6. SEAP Reporter Gene Assay 102
V.1.6. Statistik 103
V.2. Material 104
V.2.1. NDL-PCBs 104
V.2.1.1. Chemikalienliste 106
V.2.1.2. Geräteliste 108

V.2.2. Lösungen 109
V.2.2.1. Enzym Aktivität 109
V.2.2.2. Mikrosomenpäparation 110
V.2.2.3. Proteinbestimmung 111
V.2.2.4. Zellkultur 113
V.2.2.4.1. Medien für transiente Transfektion 113
V.2.2.5. Kits 114
VI. Literaturverzeichnis 115
Anhang ..... a
Danksagung ..... e
Eidesstattliche Erklärung ..... f
Lebenslauf ..... g

Abkürzungsverzeichnis

AhR	Arylhydrocarbon Receptor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovine Albumin Serum
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CYP	Cytochrome P450
DCC/FKS	steroidarmes fötales Kalbserum
DEN	Diethylnitrosamin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DL-PCB	Dioxin-like Polychlorinated Biphenyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	Estrogen Receptor
FKS	Fötales Kalbserum
GD	Gestation Day
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-hydroxy-propan-3-sulfonsäure
KG	Körpergewicht
LD	Ladedose
MD	Erhaltungsdose (Maintenance Dose)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NDL-PCB	Non Dioxin-like Polychlorinated Biphenyl
P/S	Penicilin/Streptomycin
PB	Phenobarbital
PBREM	PB Responsive Enhancer Module
PCB	Polychlorinated Biphenyl
PND	Post Natal Day
POP	Persistent Organic Pollutant
PXR	Pregnan X Receptor
RIF	Rifampicin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin
TD	Totaldose
TEF	Toxic Equivalency Factor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEQ	Toxic Equivalents
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
XRE	Xenobiotic Responsive Element
XREM	Xenobiotic Responsive Enhancer Module

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Allgemeine Struktur der Polychlorierten Biphenylen 2
Abbildung 2 Struktur von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD)..... 5
Abbildung 3 Mechanismus der CYP abhängige Oxidation 21
Abbildung 4 Mechanismus der Induktion von CYP1-Ezymen über AhR 23
Abbildung 5 Struktur von Phenobarbital 24
Abbildung 6 Mechanismus der Induktion der CYP2B-Enzyme durch direkte Ligandenbindung oder durch indirekte Aktivierung von CAR. 25
Abbildung 7 Struktur von Rifampicin..... 26
Abbildung 8 Mechanismus der Induktion der Transkription von CYP3A-Enzyme durch Aktivierung des PXR durch Ligandenbindung. 27
Abbildung 9 Struktur der Glucuronsäure 28
Abbildung 10 RT-PCR von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180 32
Abbildung 11 RT-PCR von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 52 33
Abbildung 12 RT-PCR von CYP2B1 und CYP3A1, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180 34
Abbildung 13 RT-PCR von CYP2B1 und CYP3A1, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 52, ... 35
Abbildung 14 RT-PCR von UGT1A1 und UGT1A6, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180 36
Abbildung 15 RT-PCR von UGT1A1 und UGT1A6, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 52 36
Abbildung 16 Repräsentative Western Blots, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180 37
Abbildung 17 Repräsentative Western Blots, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 52 38
Abbildung 18 EROD- und PROD-Aktivität. 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180 39
Abbildung 19 EC_{50}-Ermittlung für PROD-Aktivität, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180 40
Abbildung 20 EROD- und PROD-Aktivität. 28 Tages-Studie, NDL-PCB 52 41
Abbildung 21 Vergleich der EROD-Aktivität von hepatischen Mikrosomen der Perinatal-Studie mit NDL-PCB 180, ... 43
Abbildung 22 Vergleich der PROD-Aktivität von hepatischen Mikrosomen der Perinatal Studie mit NDL-PCB 180, ... 44
Abbildung 23 Vergleich der EROD-Aktivität von Leberproben der Perinatal Studie mit NDL-PCB 52 44

Abbildung 24 Vergleich der PROD-Aktivität von Leberproben der Perinatal Studie mit NDL-PCB 52 45
Abbildung 25 Relatives Lebergewicht, Versuchsdauer 1 Tag 54
Abbildung 26 RT-PCR von CYP1A1, CYP2B10 und CYP3A44, Versuchsdauer 1 Tag 55
Abbildung 27 EROD- und PROD-Aktivität, Versuchsdauer 1 Tag 56
Abbildung 28 Relatives Lebergewicht, Versuchsdauer 5 Tage 58
Abbildung 29 RT-PCR von CYP1A1, CYP2B10 und CYP3A44, Versuchsdauer 5 Tage 59
Abbildung 30 EROD- und PROD-Aktivität, Versuchsdauer 5 Tage 60
Abbildung 31 Relatives Lebergewicht, Versuchsdauer 28 Tage 61
Abbildung 32 Körpergewichtszunahme der Gruppe behandelt mit niedrigchlorierten PCBs, Versuchsdauer 28 Tage 62
Abbildung 33 Körpergewichtszunahme der Gruppe behandelt mit hochchlorierten PCBs, Versuchsdauer 28 Tage 62
Abbildung 34 RT-PCR von CYP1A1, CYP2B10 und CYP3A44, Versuchsdauer 28 Tage ... 63
Abbildung 35 EROD- und PROD-Aktivität, Versuchsdauer 28 Tage 65
Abbildung 36 Vergleich der EROD-Aktivität der 1-, 5-, und 28-Tage-Studie 66
Abbildung 37 Vergleich der PROD-Aktivität der 1-, 5-, und 28-Tage-Studie 67
Abbildung 38 Veen-Diagramm der Whole Genome Microarray-Daten der 5 Tage-Studie 69
Abbildung 39 HepG2 mit hXREM transient transfiziert 75
Abbildung 40 HepG2 transient co-tranfiziert mit hPBEM und hCAR 76
Abbildung 41 Änderung der alkalischen Phospatase-Aktivität in stabil transfizierten HepG2-Zellen. 78
Abbildung 42 Behandlungsschema der 28 Tages-Studie mit adulten Ratten 85
Abbildung 43 Aufbau der semi-dry Blot-Apparatur 92
Abbildung 44 Umsetzung von Etoxyresorufin bzw. Pentoxyresorufin zu Resorufin 96
Abbildung 45 Entstehung des Fluorescamin-Protein Komplexes 97
Abbildung 46 Bioluminiszenz-Reaktionen katalysiert von Firefly- und Renilla-Luciferase 102
Abbildung 47 Chemolumineszenz-Reaktion katalysiert durch SEAP 103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Nmmerierung und Struktur der PCB-Kongener Nach BZ 1992 3
Tabelle 2 Liste der 12 DL-PCBs 6
Tabelle 3 Zusammensetzung ausgewählter Aroclor-Mischungen 7
Tabelle 4 Liste der 6 Indikator-PCBs (Σ6PCB) resp. der 7 Indikator-PCBs (Σ7PCB) 8
Tabelle 5 Belastung mit NDL-PCBs ausgewählter Nahrungsmittel und Futtermittel 9
Tabelle 6 Belastung der Muttermilch 13
Tabelle 7 Prozentuelle Anteile der Indikator-PCBs an der Gesamtkontamination der Muttermilch 14
Tabelle 8 Schematische Zusammenfassung der mRNA- und Protein-Ergebnisse der 28 Tage-Studien mit adulten Ratten, NDL-PCB 52 und NDL-PCB 180 47
Tabelle 9 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der EROD- und PROD-Aktivität von der 28 Tage-Studie mit NDL-PCB 52 und NDL-PCB 180 49
Tabelle 10 Schematische Zusammenfassung EROD- und PROD- Aktivitäten der Perinatal-Studien mit NDL-PCB 52 und NDL-PCB 180 50
Tabelle 11 Verwendete PCBs in der Maus-Studie 53
Tabelle 12 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Maus-Studien 70
Tabelle 13 Verwendete PCBs für die *in vitro* Versuche 74
Tabelle 14 Pipettierschema für BSA-Standardreihe 89
Tabelle 15 Pipettierschema für Trenn und Sammelgel 91
Tabelle 16 Eingesetzte Antikörper beim Immunoblot 93
Tabelle 17 RT-Reaktionsverlauf 94
Tabelle 18 Verwendete Primer für RT-PCR 95
Tabelle 19 Pipettierschmea für Standardreihenplatte 98
Tabelle 20 Protein- und Resorufingehalte pro Well der Standardreihen 98
Tabelle 21 Transfektionsansatz 100
Tabelle 22 Verwendete PCBs für die Tierstudien 105
Tabelle 23 Verwendete PCBs für *in vitro* Studie 105
Tabelle 24 Chemikalienliste 106
Tabelle 25 Geräteliste 108

Kurzfassung

Polychlorierte Biphenyle (PCBs) gehören zu den persistenten organischen Kontaminanten (eng. *Persistent Organic Pollutants*, POPs). Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften wurden die PCBs in der Vergangenheit vielseitig in der Industrie eingesetzt. Jedoch reicherten sich die persistenten Stoffe in der Umwelt an und gelangten so in die Nahrungskette. Daher ist die Hauptexpositionsquelle für den Menschen die Nahrung, insbesondere fetthaltige Nahrung wie Fisch- und Fleischprodukte. Nach der Aufnahme lagern sich die PCBs im Fettgewebe und in der Muttermilch an. Folglich stellen Säuglinge eine besondere Personengruppe dar, die über die möglich belastete Muttermilch einer hohen Belastung ausgesetzt werden können.

Die 209 PCB-Kongenere können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die dioxin-artigen PCBs (DL-PCBs) bilden eine kleine Gruppe von 12 PCBs, die strukturelle und toxikologische Gemeinsamkeiten mit Dioxinen, wie z.B. dem 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin haben. Die nicht dioxin-artigen PCBs (NDL-PCBs) stellen den Rest der 209 Kongenere dar. Sie sind toxikologisch noch wenig charakterisiert, obwohl sie 90% der PCBs repräsentieren, die als Kontaminanten in Lebensmitteln vorkommen.

Das Ziel der Arbeit war es die Effekte von ausgewählte NDL-PCBs auf fremdstoffmetabolisierender Leberenzyme, wie die Cytochrome P450 Monooxygenasen (CYP) und die UDP-Glucuronocyltransferasen (UGT), zu untersuchen. Da kommerziell erhältliche Produkte meistens mit dioxin-artigen Verunreinigungen kontaminiert sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit hochreine NDL-PCBs verwendet, die geringe dioxin-artige Verunreinigungen aufwiesen.

In einer subakuten Studie wurden adulte Sprague-Dawley Ratten mit in Maiskeimöl gelöstem NDL-PCB 52 oder NDL-PCB 180 wiederholt per Schlundsonde behandelt. Beide PCBs sind Kongenere die in hohen Konzentrationen in Nahrungsmittelproben gefunden werden können. Die Gesamtdosen betrugen 0 bis 3000 mg/kg KG bei NDL-PCB 52 und 0 bis 1700 mg/kg KG bei NDL-PCB 180. Die Behandlungsdauer betrug 28 Tage. Auf Gen- und Proteinebene wurde keine Induktion von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 in der Leber festgestellt. Die CYP2B1-Expression hingegen wurde von beiden PCBs auf Gen- und Proteinebene induziert, wobei NDL-PCB 180 potenter schien. CYP3A1, UGT1A1 und UGT 1A6 wurde nur durch NDL-PCB 180 auf Gen- und Proteinebene induziert. Außerdem induzierten beide Kongenere die katalytische CYP2B1-Aktivität (PROD-Aktivität), wobei wiederum NDL-PCB 180 eine höhere Induktion verursachte. Es konnte auch nur für dieses

PCB ein EC_{50}-Wert der PROD-Aktivität von 34,5 ± 4,2 mg/kg KG für männliche und 120 ± 46,7 mg/kg KG für weibliche Tiere ermittelt werden. Die katalytische CYP1-Aktivität (EROD-Aktivität) wurde auch durch beide PCBs induziert, wobei bei NDL-PCB 52 nur bei den Männchen die Aktivität anstieg.

In einer perinatal Studie wurden trächtige Spraque-Dawley Ratten mit NDL-PCBs 52 und 180 behandelt. Die Gesamtdosen betrugen 0 bis 3000 mg/kg KG bei NDL-PCB 52 und wurden auf zehn Einzeldosen verteilt, die bis 21 Tage nach der Geburt verabreicht wurden. Bei NDL-PCB 180 betrugen die Gesamtdosen 0 bis 1000 mg/kg KG, die auf vier Einzeldosen während der Trächtigkeit aufgeteilt wurden. Die Jungtiere wurden jeweils 7, 35 und 84 Tage nach der Geburt (PND) getötet. Die EROD- und PROD-Akivität der Leberenzyme wurde bei den Jungtieren gemessen. NDL-PCB 52 induzierte in keiner Gruppe die EROD-Aktivität. Die PROD-Aktivität wurde nur in der PND7-Gruppe in beiden Geschlechtern induziert. NDL-PCB 180 induzierte die EROD-Aktivität bei der PND7-Gruppe nur in der höchsten Gesamtdosis von 1000 mg/kg KG. Die PROD-Aktivität wurde jedoch konzentrations- und zeitabhängig induziert.

In einer Maus-Studie wurden sechs NDL-PCBs (28, 52, 101, 138, 153, 180) und das DL-PCB 126 gestestet. Mit niedrigen Dosen (20 mg/kg KG bei NDL-PCBs, 200 µg/kg KG bei DL-PCB) sollten kurzfristige (1 Tag, eine Dosis), mittelfristige (5 Tage, 2 Dosen) und subakute (28 Tage, zehn Dosen bei NDL-PCBs 28, 52, 101 und fünf Dosen bei DL-PCB 126 und NDL-PCBs 138, 153, 180) Effekte auf Leberenzyme bestimmt werden. Das relative Lebergewicht wurde durch die Behandlung mit NDL-PCB 28 und DL-PCB 126 nach 5 und 28 Tagen erhöht und durch NDL-PCB 153 nach 28 Tagen. Die CYP1A1-Genexpression wurde nur durch DL-PCB 126 induziert. Die CYP2B10-Genexpression wurde in jeder Behandlungsgruppe durch die NDL-PCBs erhöht, mit der Ausnahme von NDL-PCB 28 und DL-PCB 126. Die PROD-Aktivität wurde nach 28 Tagen durch alle PCBs erhöht, nach 5 Tagen verursachte nur NDL-PCB 28 keine Induktion. Bei der 1 Tag-Studie wurde die Aktivität nur durch hochchlorierte PCBs 126, 153 und 180 induziert. Die EROD-Aktivität wurde durch DL-PCB 126 sehr hoch induziert. Erst nach 28 Tagen verursachten die andere PCBs ein Erhöhung der Aktivität.

Bei *in vitro*-Versuchen mit transfizierten humanen Hepatomzellen (HepG2) wurden 20 PCBs getestet. Nach einer 48 stündigen Inkubationszeit vermochte nur DL-PCB 126 das transient transfizierte XRE (*Xenobiotic Responsive Element*), das sich in der Promoterregion des CYP1A-Gen befindet, zu induizieren. Außerdem wurden auch die humanen PBREM/CAR (*Phenobarbital Responsive Enhancer Module/Constitutive Androstane*

Receptor, Promoterregion CYP2B) und XREM (*Xenobiotic Responsive Enhancer Module*, Promoterregion von CYP3A) transient resp. stabil transfiziert. Es zeigte sich, dass die Induktion vom Chlorierungsgrad abhing. Die fünf- und siebenfach chlorierten PCBs induzierten beide, wogegen vier und sechsfach chlorierte eher PBREM/CAR induzierten.

Es konnte gezeigt werden, dass die große Gruppe der NDL-PCBs bezüglich ihrer Wirkung keine homogene Gruppe bilden. Bei den Tierversuchen scheinen die hochchlorierten PCBs Mixtyp-Induktoren zu sein, wogegen die niedrigchlorierten eher CYP2B induzierten oder kein Effekt bewirkten. *In vitro* bestätigte sich, dass der Chlorierungsgrad bei der Induktion der Gene eine wichtige Rolle spielt.

Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a subgroup of persistent organic pollutants (POPs). Due to their chemical and physical properties PCBs were used in a number of industrial and commercial products. Because of their persistence, they accumulated in nature. Despite being banned in the 1980s, they still occur in food and feed. Due to the PCBs lipophilic quality, they especially accumulated in fatty aliments such as fish and meat products. For this reason the primary source of human exposure is the daily diet. In the human body PCBs are primarily stored in the fat tissue. Hence a highly exposed group are breast fed newborns due to the high levels of PCBs in human milk.

The 209 PCB congeners can be divided into two groups. The dioxin-like PCBs (DL-PCBs) form a small group of 12 congers, which have structural and toxicological similarities with dioxins, like 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. The remaining PCB congeners are the non dioxin-like PCBs (NDL-PCBs). They are toxicologically poorly characterized, but represent 90% of the PCBs which can be found in food and feed samples.

The aim of the present work was to characterize the effects of selected NDL-PCBs on xenobiotic metabolizing liver enzymes, such as the monooxygenase Cytochrome P450 (CYP) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT). The NDL-PCBs used in this work had very low dioxin-like impurities in order to ensure that the observed effects are caused by the NDL-PCBs.

For this purpose 28 days studies with adult Sprague-Dawley rats were carried out. NDL-PCBs 52 and 180 solved in corn oil were given to the animals by oral gavage. The total doses ranged from 0 to 3000 mg/kg bw and 0 to 1700 mg/kg bw, respectively. The gene and protein expression of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 in the liver stayed unchanged after the treatment with NDL-PCBs 52 and 180. The CYP2B1 expression was however highly induced by both. Here the potency of NDL-PCB 180 was higher. CYP3A1, UGT1A1 and UGT1A6 were only induced by NDL-PCB 180. Both PCBs induced the CYP2B-activity (PROD). Yet again PCB 180 was again more potent. The male rats were more sensitive. This is confirmed by the EC_{50} values for PROD which were 34,5 ± 4,2 mg/kg KG for male rats and 120 ± 46,7 mg/kg KG for female rats.

Furthermore perinatal studies with NDL-PCBs 52 and 180 were conducted to analyze the placental transfer and exposition through mother milk to offspring. Pregnant Sprague-Dawley rats were treated with total doses from 0 to 3000 mg/kg bw and 0 to 1000 mg/kg bw,

respectively. The total doses of NDL-PCB 180 were divided into 4 doses and were given by oral gavage during pregnancy. The total doses of PCB 52 were divided into 10 doses and were given to the adult rat up to post natal day 21 (PND21). Offspring were killed on PND7, PND35 and PND84 and the liver enzyme activities were measured. NDL-PCB 52 did not induce the EROD-activity. The PROD-activity was only induced in PND7 offspring. PCB 180 induced the EROD-activity only in the highest dose of 1000 mg/kg bw in PND7 offspring. The PROD-activity was induced in a concentration and time depending manner.

Additionally a mouse study was performed with six NDL-PCBs (28, 52, 101, 138, 153, 180) and the DL-PCB 126. The doses were 20 mg/kg bw for the NDL-PCBs and 200 µg/kg bw for the DL-PCB. Three different time points were selected, namely 1 day (1 dosis), 5 days (2 doses) and 28 days (10 doses NDL-PCB 28, 52, 101 and 5 doses NDL-PCB 138, 153, 180 und DL-PCB 126). The relative liver weights were increased by PCB 28 and 126 after 5 and 28 days, where PCB 153 also induced the relative liver weights. The CYP1A1 expression was only induced by DL-PCB 126, whereas the CYP2B10 expression was induced by all PCBs with the exception of NDL-PCB 28 and DL-PCB 126 which did not alter the expression. After 28 days the PROD-activity was induced by the seven PCBs, whereas after 5 days only PCB 28 did not induce the activity. In the 1 day group only the high chlorinated PCBs 126, 138, 153 and 180 induced PROD. The EROD-activity was only induced by DL-PCB 126. Only after 28 days all PCBs induced EROD.

Applying *in vitro* studies using transient and stable transfected human hepatoma cells (HepG2), 20 PCBs were analyzed to reveal structure-activity-relationships between the PCBs. The transient transfected “xenobiotic response element” (XRE), located in the promoter region of CYP1A, was only induced by DL-PCB 126. All PCBs induced the transient co-transfected “Phenobarbital responsive enhancer module/constitutive androstane receptor” (PBREM/CAR) situated in the promoter region of CYP2B, and the stable transfected “xenobiotic responsive enhancer module” (XREM) situated in the promoter region of CYP3A. It was shown that the induction was related to the chlorination degree of these PCBs. The five and seven time chlorinated PCBs induced both, PBREM/CAR and XREM, to the same extent. Here the four and six time chlorinated PCBs rather induced PBREM/CAR.

In conclusion it was shown that, regarding their effects, the large group of NDL-PCB is not a homogenous group. Considering the analyzed enzymes, the *in vivo* studies showed that the lower chlorinated NDL-PCBs (PCB 52, 101) are rather CYP2B inducer or no inducer at all (PCB 28). The higher chlorinated NDL-PCBs on the other hand are mixed type inducers

(PCB 138, 153, 180). Eventually the *in vitro* studies confirmed that the degree of chlorination plays an important role in the induction of genes.

I. Einleitung

Unsere moderne Zivilisation ist geprägt durch den Verbrauch an Chemikalien, die unser Leben einfacher und sicherer machen sollen und uns einen hohen Lebensstandard ermöglichen. Vieler dieser Chemikalien sind in alltäglichen Produkten präsent und können sich durch ihre Eigenschaften, wie Fettlöslichkeit und chemische Stabilität, in der Natur anreichern. In folge dessen treten sie in der Nahrungskette der Menschen auf. Die Auswirkung dieser Kontaminanten auf die menschliche Gesundheit ist bei weitem noch nicht geklärt.

Eine große Klasse dieser Kontaminanten sind die persistenten organischen Verunreinigungen (engl. *Persistent Organic Pollutants*, POPs). Von großem Interesse ist die Unterklasse der polychlorierten Biphenyle (PCBs), deren Herstellung schon in den 1980er Jahren in den meisten Industrieländern verboten wurden, jedoch durch Altlasten noch in die Natur eingebracht werden und so innerhalb der Nahrungskette nachzuweisen sind.

Die Gruppe der PCBs besteht aus 209 Kongeneren, die sich durch die Anzahl und Position der Chloratome unterscheiden. Diese Kongenere werden in zwei Gruppen unterteilt. Die dioxin-artigen (engl. *Dioxin-like PCB*, DL-PCB) und die nicht dioxin-artigen PCBs (engl. *Non-Dioxin-like PCB*, NDL-PCBs). Die DL-PCB, bestehend aus 12 Kongeneren, haben strukturelle und toxikologische Gemeinsamkeiten mit Dioxinen wie das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin. NDL-PCBs sind aus toxikologischer Sicht wenig charakterisiert. Das Wissen über deren Auswirkung auf die menschliche Gesundheit ist begrenzt und in der EU gibt es keine gesetzlichen Grenzwerte für NDL-PCBs in Lebensmitteln.

Hinsichtlich dieser Tatsachen wurde 2005 ein wissenschaftliches Konsortium aus 14 Partner gebildet dessen Ziel es ist, die toxikologischen Konsequenzen einer NDL-PCB-Exposition zu verstehen und wissenschaftlich zu bewerten. Das EU finanzierte Projekt ATHON (*Assessing the Toxicity and Hazard of Non-dioxin-like PCBs Present in Food*) wurde gegründet, bei dem die Technische Universität Kaiserslautern durch den Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk vertreten wird.

II. Theoretischer Hintergrund

II.1. Polychlorierte Biphenyle (PCBs)

II.1.1. Struktur und Nomenklatur

Die große Gruppe der PCBs besteht aus 209 Kongenere die die empirische Formel $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ haben (n=1-10, Abbildung 1). Die einzelne Kongenere unterscheiden sich strukturell durch die Anzahl und die Position der Chlorsubstituenten an den beiden Phenylringen.

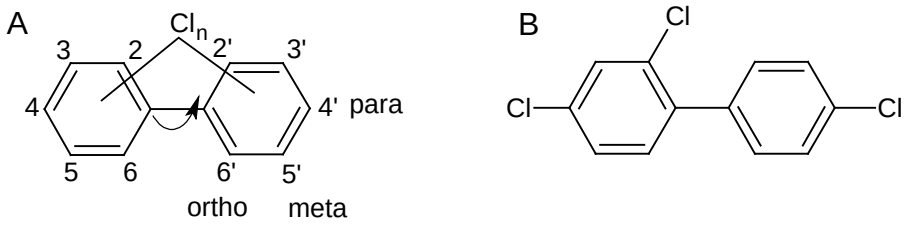


Abbildung 1 Allgemeine Struktur der Polychlorierten Biphenylen (A) Grundstruktur mit Nummerierung an den Phenylringen und Substitutionspositionen, Drehung der Phenylringe (B) Beispiel 2,4,4'-Trichlorbiphenyl

Die Nomenklatur der 209 einzelnen Kongenere ist relativ komplex. Die Pioniere der PCB-Nomenklatur waren Ballschmiter und Zell (BZ) im Jahr 1980. Sie führten ein System ein das die Kongenere vom Mono- zum Decachlorbiphenyl sortierte und ordneten den jeweiligen Strukturen Nummern von 1 bis 209. Die Position der Chlorsubstituenten wird durch die Nummern an den beiden Phenylringen angegeben, z.B. 2,4,4'-Trichlorbiphenyl. Nach BZ 1980 erhält diese Struktur die Zuordnung PCB 28 (Abbildung 1). Diese Art der Nummerierung folgt nicht den Regeln der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) der Namensgebung für organische Stoffe. Nach IUPAC würde PCB 28 folgender Maße beschrieben 2,4,4'-Trichloro-1,1'-biphenyl. Im Laufe der Zeit wurde mehrmals versucht die Fehler des BZ 1980 Systems zu verbessern, auch eine Liste die der IUPAC zugeordnet wurde, war im Umlauf, obwohl die IUPAC nie eine solche Liste veröffentlichte. In der vorliegenden Arbeit wird die Verbesserung des BZ 1980 Systems durch Schulte und Malisch 1983 verwendet. Schulte und Malisch stellten Fehler bei der Nummerierung von PCB 201 fest. Dies hatte zur Folge, dass die Nummerierung weiterer PCBs angepasst werden musste. Diese Korrektur wurde 1992 von Ballschmiter und Zell angenommen. In Tabelle 1

sind alle 209 Kongenere nach BZ 1992 aufgelistet (Ballschmiter and Zell, 1980; Schulte and Malisch, 1983; Ballschmiter *et al.*, 1992; Mills *et al.*, 2007).

Tabelle 1 Nmmerierung und Struktur der PCB-Kongener Nach BZ 1992(Ballschmiter *et al.*, 1992)

PCB	Struktur	PCB	Struktur	PCB	Struktur	PCB	Struktur	PCB	Struktur
1	2	43	22'35	85	22'344'	127	33'455'	169	33'44'55'
2	3	44	22'35'	86	22'345	128	22'33'44'	170	22'33'44'5
3	4	45	22'36	87	22'345'	129	22'33'45	171	22'33'44'6
4	22'	46	22'36'	88	22'346	130	22'33'45'	172	22'33'455'
5	23	47	22'44'	89	22'346'	131	22'33'46	173	22'33'456
6	23'	48	22'45	90	22'34'5	132	22'33'46'	174	22'33'456'
7	24	49	22'45'	91	22'34'6	133	22'33'55'	175	22'33'45'6
8	24'	50	22'46	92	22'355'	134	22'33'56	176	22'33'466'
9	25	51	22'46'	93	22'356	135	22'33'56'	177	22'33'4'56
10	26	52	22'55'	94	22'356'	136	22'33'66'	178	22'33'55'6
11	33'	53	22'56'	95	22'35'6	137	22'344'5	179	22'33'566'
12	34	54	22'66'	96	22'366'	138	22'344'5'	180	22'344'55'
13	34'	55	233'4	97	22'3'45	139	22'344'6	181	22'344'56
14	35	56	233'4'	98	22'3'46	140	22'344'6'	182	22'344'56'
15	44'	57	233'5	99	22'44'5	141	22'3455'	183	22'344'5'6
16	22'3	58	233'5'	100	22'44'6	142	22'3456	184	22'344'66'
17	22'4	59	233'6	101	22'455'	143	22'3456'	185	22'3455'6
18	22'5	60	2344'	102	22'456'	144	22'345'6	186	22'34566'
19	22'6	61	2345	103	22'45'6	145	22'3466'	187	22'34'55'6
20	233'	62	2346	104	22'466'	146	22'34'55'	188	22'34'566'
21	234	63	234'5	105	233'44'	147	22'34'56	189	233'44'55'
22	234'	64	234'6	106	233'45	148	22'34'56'	190	233'44'56
23	235	65	2356	107	233'4'5	149	22'34'5'6	191	233'44'5'6
24	236	66	23'44'	108	233'45'	150	22'34'66'	192	233'455'6
25	23'4	67	23'45	109	233'46	151	22'355'6	193	233'4'55'6
26	23'5	68	23'45'	110	233'4'6	152	22'3566'	194	22'33'44'55'
27	23'6	69	23'46	111	233'55'	153	22'44'55'	195	22'33'44'56
28	244'	70	23'4'5	112	233'56	154	22'44'56'	196	22'33'44'56'
29	245	71	23'4'6	113	233'5'6	155	22'44'66'	197	22'33'44'66'
30	246	72	23'55'	114	2344'5	156	233'44'5	198	22'33'455'6
31	24'5	73	23'5'6	115	23'44'6	157	233'44'5'	199	22'33'4566'
32	24'6	74	244'5	116	23456	158	233'44'6	200	22'33'45'66'
33	2'34	75	244'6	117	234'56	159	233'455'	201	22'33'455'6'
34	2'35	76	2'345	118	23'44'5	160	233'456	202	22'33'55'66'
35	33'4	77	33'44'	119	23'44'6	161	233'45'6	203	22'344'55'6
36	33'5	78	33'45	120	23'455'	162	233'4'55'	204	22'344'566'
37	344'	79	33'45'	121	23'45'6	163	233'4'56	205	233'44'55'6
38	345	80	33'55'	122	2'33'45	164	233'4'5'6	206	22'33'44'55'6
39	34'5	81	344'5	123	2'344'5	165	233'55'6	207	22'33'44'566'
40	22'33'	82	22'33'4	124	2'3455'	166	2344'56	208	22'33'455'66'
41	22'34	83	22'33'5	125	2'3456'	167	23'44'55'	209	22'33'44'55'66'
42	22'34'	84	22'33'6	126	33'44'5	168	23'44'5'6		

II.1.2. Chemo-physikalische Eigenschaften

Das Molekulargewicht der 209 PCB-Kongenere variiert von 188,7 bis 498,7 g/mol abhängig von der Anzahl der Chlorsubstituenten. Sie sind in organischen Lösungsmitteln, Ölen und Fetten löslich, besitzen jedoch in Wasser eine geringe Löslichkeit, die mit zunehmendem Chloranteil noch weiter abnimmt. Sie sind chemisch stabil und dadurch schwer entflammbar und besitzen eine geringe elektrische Leitfähigkeit (BFR, 2006).

Eine weitere wichtige Eigenschaft der PCBs ist die Fähigkeit um die Phenyl-Phenyl-Bindung rotieren zu können (Abbildung 1). Die Konformation der PCBs hat großen Einfluss auf ihre Toxizität und Verteilung in verschiedenen Medien. Die non-Ortho-PCBs, d.h. keine Chlorsubstituenten auf Position 2, 2', 6 und 6', werden als coplanare Kongenere bezeichnet. Jedoch sind die Phenylringe aller PCBs, unabhängig vom Chlorierungsgrad, gegeneinander verdreht (Abbildung 1). Trotzdem werden in der wissenschaftlichen Literatur non-Ortho-PCBs als coplanar bezeichnet um die Unterteilung in Untergruppen der PCBs zu erleichtern (McKinney and Singh, 1981).

II.1.3. Dioxin-artige und nicht dioxin-artige PCBs

Die 209 Kongenere werden in eine dioxin-artige (DL-PCBs) und eine nicht dioxin-artige Gruppe (NDL-PCBs) unterteilt, basierend auf deren toxikologischen Wirkungen. Die toxikologische Wirkung der DL-PCBs wird auf das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) bezogen, das bislang als das toxischste Dioxin identifiziert worden ist. Hierfür wurde 1998 von Van der Berg *et al.* auf Anfrage der *World Health Organisation* (WHO) ein Konzept erarbeitet, das auf früheren ähnlichen Konzepten basierte. Dabei wird dioxin-artigen Substanzen ein Faktor zugeordnet, der deren toxikologische Potenz im Vergleich zum TCDD ausdrückt. Dieser Faktor wird als toxikologischer Äquivalenz Faktor (engl. *Toxic Equivalency Factor*, TEF) bezeichnet. Wird das Gewicht der zu bestimmenden Substanz mit dem TEF multipliziert, erhält man das „Toxische Äquivalent" dieser Substanz (engl. *Toxic Equivalents*, TEQ). Bei einem Gemisch werden die einzelnen TEQs der Komponenten bzw. dioxin-artigen Verunreinigungen addiert und man erhält den TEQ-Wert des Gemisches. Im Jahr 2006 veröffentlichte Van der Berg *et al.* nach einem neuen WHO-Experten Meeting, eine neue Bewertung der TEFs und neue Richtlinien zur korrekten Anwendung des TEF-Konzeptes (Van den Berg *et al.*, 1998; Knerr and Schrenk, 2006; La Rocca and Mantovani, 2006; Van den Berg *et al.*, 2006).

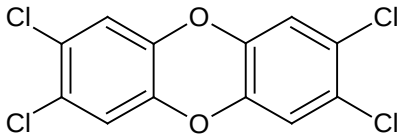


Abbildung 2 Struktur von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

Einer Substanz wird ein TEF-Wert zugeordnet, wenn sie folgende Kriterien erfüllt. Sie muss

- Strukturelle Gemeinsamkeit mit TCDD haben
- Affinität zum Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) haben
- AhR vermittelte Effekte verursachen
- Persistent und bioakkumulierend sein

Von den 209 Kongeneren entsprechen 12 Kongenere diesen Kriterien. Diese 12 Kongenere (DL-PCBs) sind non-ortho oder mono-ortho substituierte PCBs und werden als coplanar angesehen. Durch viele Veröffentlichungen ist auch die AhR vermittelte Toxizität der DL-PCBs belegt. Unter Berücksichtigung von alten Daten und neuen Studien wurden den 12 PCBs bei der Neuevaluierung von 2006 teilweise neue TEFs zugeordnet (Tabelle 1). Mit dem TEF-Konzept und einer ermittelten tolerablen täglichen Aufnahme (engl. *Tolerable Daily Intake*, TDI) von 1-4 ng TEQ/kg Körpergewicht (KG) kann das Risiko einer DL-PCB Exposition gut abgeschätzt werden (JECFA, 2001; Knerr and Schrenk, 2006; Van den Berg *et al.*, 2006).

Tabelle 2 Liste der 12 DL-PCBs mit BZ-Nomenklatur und WHO-TEF-Werte von 1998 und korrigierten Werten von 2005 (Van den Berg *et al.*, 2006)

Kongener	BZ 1992	WHO 1998 TEF	WHO 2005 TEF
Non-ortho–PCBs			
3,3',4,4'-tetraCB	(PCB 77)	0.0001	0.0001
3,4,4',5-tetraPCB	(PCB 81)	0.0001	0.0003
3,3',4,4',5-pentaPCB	(PCB 126)	0.1	0.1
3,3',4,4',5,5'-hexaPCB	(PCB 169)	0.01	0.03
Mono-ortho–PCBs			
2,3,3',4,4'-pentaPCB	(PCB 105)	0.0001	0.00003
2,3,4,4',5-pentaCB	(PCB 114)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5-pentaCB	(PCB 118)	0.0001	0.00003
2',3,4,4',5-pentaCB	(PCB 123)	0.0001	0.00003
2,3,3',4,4',5-hexaCB	(PCB 156)	0.0005	0.00003
2,3,3',4,4',5'-hexaCB	(PCB 157)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5,5'-hexaCB	(PCB 167)	0.00001	0.00003
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB	(PCB 189)	0.0001	0.00003

Die restlichen PCB-Kongenere werden in der Gruppe der NDL-PCBs zusammengefasst. Für diese größte Gruppe, die über 90% der PCBs beinhaltet die als Kontaminanten in Lebensmittelproben und menschlichem Gewebe vorkommen, gibt es kein dem TEF-Konzept entsprechendes System. Auch eine Risikoabschätzung ist sehr schwierig, da die meisten vorhandenen Studien mit kommerziellen Gemischen durchgeführt wurden, die mit Kongeneren beider Gruppen zusammengesetzt sind. Zusätzlich problematisch ist, auch wenn einzelne Kongenere untersucht wurden, wurde in den Studien meistens nicht auf die Reinheit insbesondere auf die TEQ_{WHO}-Verunreinigung des DL-Anteil hingewiesen. Mit dieser Ungewissheit können die erhaltenen Daten nicht dem untersuchten NDL-PCB zugewiesen werden, da man nicht ausschließen kann, dass der beobachtete Effekt durch die Verunreinigung verursacht wurde (Knerr and Schrenk, 2006).

II.1.4. Anwendung und Exposition

II.1.4.1. Anwendung in der Industrie

Aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften wurden PCBs in der Vergangenheit in einer Vielzahl von industriellen und kommerziellen Produkten eingesetzt. Ab den frühen 1930er Jahren wurde über eine Dauer von 50 Jahren weltweit über eine Million Tonnen technischer PCB-Gemische hergestellt. Diese Gemische kamen unter anderen

mit den Namen Aroclor (Monsanto, USA), Clophen (Bayer, Deutschland), Phenoclor (Caffaro, Italien) und Kanechlor (Kanegafuchi, Japan) in den Handel und deren Anwendung reichte vom Einsatz in Transformatoren und in Hydraulikflüssigkeiten. Weiterhin wurden sie als Weichmacher in Gummiprodukten, Plastifizierer in Farben und Brandverzögerer in Klebstoffen und Dichtungsmassen eingesetzt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Gemische wird durch einen Zahlencode zusätzlich zu den kommerziellen Namen angegeben. Bei Aroclor 1254 liegt der Massenanteil von Chlor bei 54%, die 12 ist der Code für PCBs. Analog zu Aroclor 1254 wurden Clophen A50, Kanechlor 500 und Phenoclor DP-5 hergestellt die alle ungefähr den gleichen Massenanteil an Chlor haben. In Tabelle 3 sind die PCB-Zusammensetzungen verschiedener kommerziell erhältlichen Aroclor-Mischungen angeben (Jarman *et al.*, 1998; BFR, 2006; La Rocca and Mantovani, 2006).

Tabelle 3 Zusammensetzung ausgewählter Aroclor-Mischungen. Die angegeben PCBs kommen in großen Konzentrationen in der Umwelt vor. Die Angaben sind Massenprozent, fehlende Massenprozent sind weitere PCBs und dioxin-artige Substanzen. (Frame *et al.*, 1996)

	PCB 105	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 156	PCB163	PCB 180	PCB 183
Aroclor 1221	0,04	0,07	-	-	-	-	-	-
Aroclor 1242	0,47	0,66	0,1	0,06	0,01	0,01	-	-
Aroclor 1254	7,37	13,59	5,95	3,29	1,13	0,7	0,42	0,09
Aroclor 1262	0,09	0,15	2,74	7,1	0,16	1,52	14,13	2,88

Trotz der möglichen 209 Kongeneren wurden nur rund 130 verschieden PCBs für die Herstellung der technischen Gemischen verwendet. In den 1960er Jahren wuchsen die Bedenken bezüglich der Persistenz in der Umwelt und der Anreicherung in der Natur, auch das Unwissen über Langzeitnachwirkungen auf das Immun- und Nervensystem lebender Organismen ließ die Bedenken wachsen. Besonders der Einsatz in „offenen Systemen“ wie Farben und Dichtungsmassen stellte eine große Expositionsquelle dar. In Deutschland wurde die Verwendung 1978 auf „geschlossene Systeme“, wie in Transformatoren und Kondensatoren, eingeschränkt. Mitte der 1980er Jahren wurde dann die Produktion, das in Verkehr bringen und die Verwendung in den USA und Europa verboten. Dieses Verbot wurde in Europa durch die EG-Richtlinie 85/467/EWG durchgesetzt und in Deutschland 1989 in nationales Recht umgesetzt (BFR, 2006; La Rocca and Mantovani, 2006; Fattore *et al.*, 2008).

II.1.4.2. Belastung durch Nahrungs- und Futtermittel

Trotz des Verbotes in den 1980er ist die Kontamination der Umwelt mit PCBs wegen ihrer hohen Stabilität heute noch von Bedeutung. Durch Altlasten in alten Geräten und

Gebäuden, Mülldeponien, Müllverbrennung und durch unsachgemäße Entsorgung ist weltweit der PCB-Eintrag in die Nahrungskette noch vorhanden.

Beim Menschen ist die hauptsächliche Exposition über die Nahrung, die ca 90% ausmacht. Dabei sind fetthaltige Produkte wie Fleisch, Fisch und Milch stärker belastet als pflanzliche Produkte wie Obst und Gemüse. Um die Exposition zu quantifizieren werden die PCB-Gehalte oft als Summe mehrerer Kongenere angeben. Hierfür gibt es bislang noch keine einheitlichen Richtlinien. Die europäische DG SANCO (*Directorate General for Health and Consumer Affairs*) schlägt vor, dass die Gehalte als Summe der sechs NDL-PCBs (Σ6PCB) angegeben werden, die am meisten in der Nahrung vorkommen. Diese 6 NDL-PCBs, auch Indikator-PCBs genannt, stellen ca. 50% der NDL-PCBs dar, die in Nahrungsmitteln nachgewiesen werden (Tabelle 4). In manchen Fällen wird noch das DL-PCB 118 mit angegeben, dann spricht man von Σ7PCB (La Rocca and Mantovani, 2006).

Tabelle 4 Liste der 6 Indikator-PCBs (Σ6PCB) resp. der 7 Indikator-PCBs (Σ7PCB) mit Struktur.

Struktur	Σ6PCB	Σ7PCB
2,4,4'	PCB 28	PCB 28
2,2',5,5'	PCB 52	PCB 52
2,2',4,5,5'	PCB 101	PCB 101
2,3',4,4',5		PCB 118
2,2',3,4,4',5'	PCB 138	PCB 138
2,2',4,4',5,5'	PCB 153	PCB 153
2,2',3,4,4',5,5'	PCB 180	PCB 180

In der EU gibt es zur Zeit keine gesetzlichen Grenzwerte für NDL-PCBs in Nahrungsmitteln. Es besteht jedoch bei der Überwachung der Dioxine zusätzlich eine Beobachtungspflicht bezüglich der Indikator-PCBs. Im Jahr 2010 veröffentlich die EFSA (*European Food Safety Authority*) die Ergebnisse dieser Überwachung (Tabelle 5). Der Zeitraum für die Überwachung lag zwischen 1995 und 2008 und die Proben stammen aus 20 europäischen Ländern. Die Ergebnisse zeigen, dass die am höchsten kontaminierten Nahrungsmittel Aalfleisch (Σ6PCB 223 µg/kg Frischgewicht) und Fischleber (Σ6PCB 163 µg/kg Frischgewicht) sind. Fischprodukte ohne Aal sind im Vergleich geringer belastet (Σ6PCB 3 µg/kg Frischgewicht). Dieser Unterschied ist auf den hohen Fettgehalt von Aalen zurück zuführen. Am geringsten sind Früchte, Gemüse und Getreide belastet (Σ6PCB 0,08 µg/kg Frischgewicht) (BFR, 2006; EFSA, 2010).

Tabelle 5 Belastung mit NDL-PCBs ausgewählter Nahrungsmittel und Futtermittel. Angabe der Summe der 6 Indikator-PCBs (Σ6PCB), der einzelne Kongenere und der prozentuellen Massenanteile an Gesamt-PCB-Kontamination. Proben aus 20 europäischen Ländern. Zeitraum von 1995 bis 2008 (EFSA, 2010).

Nahrungsmittel	Σ6PCB	PCB 28		PCB 52		PCB 101		PCB 138		PCB 153		PCB 180		Anzahl der Proben
	µg/kg	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%	
Fleisch und Fleischprod, Wiederkäuer	4,64 a	0,37	8	0,32	7	0,36	8	1	22	1,75	38	0,83	18	132
Fleisch und Fleischprod, Geflügel	2,88 a	0,31	11	0,21	7	0,25	9	0,79	27	0,87	30	0,44	15	111
Fleisch und Fleischprod, Schwein	3,69 a	0,3	8	0,2	5	0,25	7	0,92	25	1,22	33	0,78	21	181
Leber und Leberprodukte landlebende Tiere	2,1 a	0,17	8	0,13	6	0,09	4	0,52	25	0,92	44	0,27	13	62
Fischfleisch und Produkte excl, Aal	23,4 b	0,5	2	2,17	9	4,49	19	5,49	23	6,92	30	3,8	16	2834
Aalfleisch	223 b	2,71	1	13,6	6	24,9	11	64,1	29	85,7	38	32,1	14	182
Rohmilch und Produkte incl, Butter	9,2 a	1,27	14	0,05	1	0,78	8	2,51	27	3,17	34	1,42	15	5640
Hühnereier und Eierprodukte	16,7 a	1,6	10	1,53	9	1,61	10	4,08	24	4,54	27	3,35	20	721
Fett Wiederkäuer	8,71 a	0,78	9	0,76	9	0,82	9	1,98	23	2,86	33	1,51	17	143
Fett Geflügel	2,85 a	0,47	16	0,2	7	0,32	11	0,83	29	0,71	25	0,32	11	53
Fett Schwein	1,04 a	0,07	7	0,06	6	0,1	10	0,29	28	0,37	36	0,14	13	40
Pflanzliche Öle und Fette	3,21 a	0,2	6	0,21	7	0,39	12	1,03	32	0,95	30	0,42	13	51
Meeresfrüchte Öle	117 a	0,53	0	2,34	2	7,79	7	29,0	25	46,4	40	31,2	27	40
Fischleber	163 b	2,92	2	9,26	6	24,6	15	46,2	28	61,9	38	18,1	11	22
Andere Produkte	21,1	3,59	17	2,47	12	3,4	16	4,04	19	4,82	23	2,82	13	759
Früchte, Gemüse und Getreide	0,08 b	0,01	13	0,01	13	0,01	13	0,02	25	0,02	25	0,01	13	210

Fortsetzung Tabelle 5														
Säuglings- und Babynahrung	5,65 a	0,42	7	0,54	10	0,95	17	1,32	23	1,86	33	0,56	10	32
Futtermittel														
Pflanzlisches Futtermaterial excl. Öle	0,52 c	0,1	19	0,08	15	0,08	15	0,1	19	0,1	19	0,06	12	262
Pflanzlische Öle und Nebenprodukte	0,8 c	0,12	15	0,1	13	0,1	13	0,16	20	0,21	26	0,1	13	65
Tierisches Fett, incl, Milchfett und Eierfett	2,51 c	0,2	8	0,2	8	0,26	10	0,62	25	0,85	34	0,37	15	26
Andere Produkte landlebender Tiere incl, Milch, Eier und deren Produkte	0,93 c	0,18	19	0,13	14	0,1	11	0,17	18	0,21	23	0,12	13	32
Fischöl	58,7 c	2,04	3	5,6	10	10,7	18	17,4	30	18,1	31	4,93	8	69
Wassertiere excl, Fischöl und Proteine	5,47 c	0,31	6	0,47	9	0,87	16	1,59	29	1,8	33	0,43	8	136
Fertigfutter, excl, Pelztiere, Haustiere und Fische	0,46 c	0,07	18	0,07	15	0,07	16	0,08	18	0,09	18	0,07	14	359
Fertigfutter für Pelztiere, Haustiere und Fische	11,1 c	0,36	6	0,91	10	1,9	17	3,4	28	3,5	30	0,8	9	153

a.) µg/kg Fett b.) µg/kg Frischgewicht c.) 12% Feuchtigkeit

Bei Futtermittel für Nutztiere zeigt sich ein ähnliches Bild. So ist Fischöl am höchsten belastet (Σ6PCB 58,7 µg/kg 12% Feuchtigkeitsgehalt), die geringste Belastung wurde auch hier bei pflanzlichen Produkte, darunter pflanzliches Futtermaterial (Σ6PCB 0,52 µg/kg 12% Feuchtigkeitsgehalt) und pflanzliche Öle (Σ6PCB 0,8 µg/kg 12% Feuchtigkeitsgehalt), festgestellt. Aber auch das Fertigfutter für Haustiere weist hohe Wert auf (Σ6PCB 11,1 µg/kg 12% Feuchtigkeitsgehalt). Mengenmäßig betrachtet machen die PCBs 153 und 138 den größten Anteil unter den 6 Indikator-PCBs aus, gefolgt von den NDL-PCBs 180, 28, 101 und 52. Die PCBs 153 und 180 stellen zusammen 50% der Summe der gemessenen Σ6PCB in den Nahrungsmitteln dar (EFSA, 2010).

Ein Problem bei der Interpretation der Daten aus diesen Proben ist, dass nicht darauf hingewiesen wurde ob es zufällige Proben waren oder ob die Proben aus einem bestimmten Grund genommen wurden. So wurden z.B. Proben aus Belgien von 1999 dabei, die zur Zeit des dioxin-kontaminierten Futtermittel Vorfalls, genommen wurden. Es wurde aber nicht explizit auf den Proben darauf hingewiesen (EFSA, 2010).

Die täglichen Aufnahmen von NDL-PCBs wurde in mehreren Studien wurden ermittelt. Bakker *et al.* veröffentlichte 2003 eine Studie, bei der niederländische Nahrungsmittel untersucht wurden (Bakker *et al.*, 2003). Für diese Studie wurden die PCB-Konzentrationen verschiedener Nahrungsmitteln gemessen und mit den Verbrauchsdaten der Datenbank der nationalen niederländischen Nahrungsmittelverbrauchszentrale verglichen. Die individuellen Aufnahmen der 6 Indikator-PCBs durch die Nahrung an zwei aufeinander folgenden Tagen wurden für 6250 Personen berechnet und als Funktion des Alters geschätzt. Nach dieser Schätzung nimmt der Mensch über den Zeitraum seines gesamten Lebens (70 Jahre) im Mittel 5,6 ng (Σ6PCB) /kg KG pro Tag auf. In Italien wurde von Zuccato *et al.* in den 1990er Jahren eine ähnliche Studie durchgeführt. Duplikat der Mahlzeit von 20 Personen wurden an zwei Tagen auf ihr Gehalt ab PCBs hin untersucht. Aus den erhaltenen Daten wurde für die 6 Indikator-PCBs eine durchschnittliche tägliche Aufnahme von 18 ng/kg KG pro Tag ermittelt (Zuccato *et al.*, 1999).

Neben den Unterschieden in den Aufnahmemengen zwischen den Ländern gibt es auch Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Frattore *et al.* verglichen 2008 in ihrer Studie die Daten der EFSA zum Gehalt von NDL-PCBs in Nahrungsmitteln (Tabelle 1) mit den italienischen Nahrungsgewohnheiten. Dafür wurden die individuellen Ernährungsgewohnheiten von 1940 Personen über eine Dauer von drei bis sieben Tagen aufgezeichnet und gemittelt. Die Personen wurden in drei Altergruppen aufgeteilt, 0-6 Jahre (ohne gestillte Säuglinge), 7-12 Jahre und 13-94 Jahre. Die durchschnittliche tägliche

Aufnahme der 6 Indikator-PCBs der 0-6 Jährigen liegt demnach bei 24,6 ng/kg KG pro Tag, der 7-12 Jährigen bei 16,1 ng/kg KG pro Tag und die der 13-94 Jährigen bei 10,9 ng/kg KG pro Tag. Diese Abnahme der NDL-PCB-Aufnahme mit zunehmendem Alter ist vermutlich auf eine geringere Nahrungsaufnahme von älteren Personen zurück zu führen. Des Weiteren besteht die Ernährung der Kleinkinder-Gruppe (0-6) zu 74% aus Milch und Milchprodukten sowie Fisch und deren Produkten. Die höchste NDL-PCB-Aufnahme wurde in den ersten zwei Lebensjahren festgestellt, hier wurde ein Maximalwert von 111 ng (Σ6PCB)/kg KG pro Tag ermittelt (EFSA, 2005; Fattore *et al.*, 2008).

II.1.4.3. Besonders belastete Gruppen

Die vorgestellten Expositionsdaten repräsentiert Durchschnittswerte für die europäische Bevölkerung. Es gibt jedoch Bevölkerungsgruppen die durch ihre Arbeit und Lebensgewohnheiten einer höheren Belastung ausgesetzt sind. Zu einer dieser Gruppen gehören Fischer und deren Familien aus nordischen Ländern wie Schweden, Norwegen und Finnland.

In den frühen 1990er Jahren wurde in Schweden eine Studie durchgeführt die die Essengewohnheiten, aber auch den Kaffee-, Alkohol- und Zigarettenkonsum von schwedischen Fischern ermittelte. Dafür wurden Fischer aus Ost- und Westschweden befragt und mit Durchschnittsverbrauchern verglichen. Aus den Daten wurden mittlere wöchentliche Verbrauchsmengen ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass der Fischkonsum (magerer, fetthaltiger und geräucherter Fisch) bei den Fischern und deren Familien im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung fast doppelt so hoch, nämlich 0,7 kg pro Woche gegenüber 0,340 kg pro Woche. Betrachtet man den hohen Σ6PCB-Gehalt von Fisch (23,4 µg/kg Frischgewicht, Tabelle 5) und geht von einem Körpergewicht von 80 kg aus, kann errechnet werden, dass die Belastung der Fischer 5 – 10 mal höher als die der Durchschnitsbevölkerung die bei 5,3 ng (Σ6PCB)/kg KG pro Tag liegt. Dies konnte auch bei den Frauen der Fischer beobachtet werden (Svensson *et al.*, 1995; Grimvall *et al.*, 1997; EFSA, 2005; EFSA, 2010).

II.1.4.4. Belastung von Säuglingen durch die Muttermilch

Im Vergleich zu Erwachsenen und Jugendlichen sind Säuglinge die gestillt werden einer viel höheren Belastung ausgesetzt. Da für die Muttermilch die Fettreserven der Mutter mobilisiert werden ist die Milch, durchschnittlich 3,5% Fett, mit PCBs hoch belastet. Die WHO initiierte drei große Feldstudien (1988, 1993, 2001) bei der PCB-Konzentrationen in Muttermilchproben weltweit bestimmt wurden. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse verschiedener Länder der dritten Studie von 2001/2002 aufgelistet.

Es zeigt sich, dass die Belastungen zwischen den Ländern stark variieren. Die niedrigsten Werte wurden in Ländern gemessen die sich auf der südlichen Hemisphäre befinden wie Fiji, Brasilien, Philippinen, Australien und Neuseeland. In manchen europäischen Ländern, wie Bulgarien, Kroatien, Ungarn und Irland sind die Werte ebenfalls gering, ebenso ist dies der Fall in den USA. Hohe Werte wurden dagegen in westeuropäischen Ländern wie Italien, Spanien, Deutschland, Luxemburg, Belgien und den Niederlanden festgestellt. In der Ukraine wurden sehr hohe TEQ_{WHO}-Werte gemessen, obwohl die Indikator-PCB-Kontamination im Vergleich zu anderen Ländern gering ist (van Leeuwen and Malisch, 2003).

Tabelle 6 Belastung der Muttermilch. Angegeben sind die ermittelten Mittelwerte, minimale und maximale Werte für TEQ_{WHO} in pg/g Fett, die Indikator-PCBs (Σ6PCB) in ng/g Fett und die Anzahl der Pools (zusammengefügte Milchproben). Dritte WHO Muttermilch Feldstudie 2001/2002 (van Leeuwen and Malisch, 2003).

Land	PCBs TEQ_{WHO} pg/g Fett		Σ6PCB ng/g Fett		Anzahl der Pools
	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich	
Australien	2.89	2.52 – 3.26	30	25 – 36	2
Belgien	12.6	11.22 – 13.98	191	169 – 213	2
Brasilien	1.77	1.30 – 12.28	16	10 – 97	11
Bulgarien	4.21	3.74 – 4.70	42	32 – 52	3
Kroatien	7.17	6.82 – 7.52	135	121 – 150	2
Tschechische Rep.	15.24	14.32 – 28.48	502	496 – 1009	3
Ägypten	5.48	4.41 – 8.26	106	12 – 140	9
Fiji	1.75	1.70 – 1.80	17	16 – 19	2
Finnland	5.85	5.66 – 6.03	91	84 – 98	2
Deutschland	13.67	12.80 – 14.31	220	188 – 238	4
Hong Kong SAR	4.73	2.80 – 6.58	45	16 - 80	11
Ungarn	2.87	2.38 – 4.24	34	29 – 59	3
Irland	4.57	2.72 – 5.19	60	41 – 65	4
Italien	16.29	11.02 – 19.33	253	195 – 323	4
Luxemburg	13.67	12.98 – 14.36	217	196 – 237	2
Neuseeland	3.92	3.50 – 4.71	37	30 – 41	3
Norwegen	8.08	6.56 – 9.61	119	106 – 132	2
Philippinen	2.38	2.22 – 2.54	26	26 – 26	2
Rumänien	8.06	8.05 – 8.11	173	165 – 198	3
Russland	13.45	12.92 – 22.95	126	84 – 311	7
Slowakische Rep.	12.60	10.72 – 19.49	443	331 – 621	4
Spain	9.42	6.93 – 17.94	241	162 – 467	6
Schweden	9.71	–	146	–	1
Die Niederlande	11.57	10.90 – 13.08	192	178 – 210	3
Ukraine	19.95	14.10 – 22.00	136	103 – 148	3
USA	4.61	3.69 – 5.52	54	43 – 64	2

In Tabelle 7 werden aus der gleichen Feldstudie 58 Proben aus 18 europäischen Ländern betrachtet. Die Tabelle zeigt die einzelnen Beiträge der 6 Indikator-PCBs und deren Summe. Die Σ6PCB stellen 64,4% der Gesamt-PCB-Kontamination dar. Wird die

Gesamtbelastung berechnet, erhält man einen Mittelwert von 326,2 ng/g Fett und ein Maximum von 1513,6 ng/g Fett. Um die mittlere tägliche Belastung zu ermitteln geht man, bei einem Körpergewicht eines Säuglings von 5 kg, von 800 ml Muttermilch pro Tag aus. Der Fettgehalt von Muttermilch liegt im Durchschnitt bei 3,5%. Somit beläuft sich die tägliche PCB-Belastung der Säuglinge auf einen mittleren Wert von 1826,72 ng/kg KG pro Tag und auf einen maximalen Wert von 8476,16 ng/kg KG pro Tag. Werden diese Werte mit den mittleren Belastungen von Erwachsenen verglichen (Σ6PCB, Niederlande 5,6 ng/kg KG pro Tag, Italien 18 ng/kg KG pro Tag) sind Säuglinge 100-300 mal höher exponiert (EFSA, 2005).

Betrachtet man die TEQ_{WHO}-Werte aus Tabelle 6 für Deutschland (13,67 pg/g Fett) und rechnet man die mittlere tägliche Belastung aus kommt man auf ein Wert von 76 pg/kg KG pro Tag. Dieser Wert liegt noch unterhalb dem TDI von 1-4 ng/kg KG pro Tag für Dioxine.

Tabelle 7 Prozentuelle Anteile der Indikator-PCBs an der Gesamtkontamination der Muttermilch. Angeben sind des Weiteren die Mittelwerte, Minimum und Maximum in ng/g Fett. 58 menschliche Milchprobenpools aus 18 europäischen Ländern. Dritte WHO Muttermilch Feldstudie 2001/2002. (EFSA, 2005)

PCB Kongener	Mittelwert	Minimum	Maximum	Anteil
	ng/g Fett	ng/g Fett	ng/g Fett	%
28	4,6	0,9	92,1	0,88
52	0,51	0,09	4,6	0,13
101	0,86	0,16	3	0,28
138	64	9,6	286	22,19
153	81,7	10,9	378,9	27,11
180	58,5	6,1	336,9	18,31
Σ6PCB	210,1	29,1	1009,1	64,4

Die WHO Studien zeigten aber auch, dass die Kontamination der Muttermilch über die Jahre weltweit abnimmt. In den meisten Ländern lag dieser Trend bei einer Abnahme von 30-70%. Eine Ausnahme bildet die Tschechische Republik bei der das Niveau der Kontamination nicht abnahm. Dies könnte daran liegen, dass es in Tschechien Regionen mit bekannter hoher Belastung gibt, da hier große Produktionsstätten für PCBs angesiedelt waren (EFSA, 2005).

II.1.4.5. Weitere Expositionsquellen

Neben der Nahrungsaufnahme, die die größte Expositionsquelle für den Menschen darstellt, gibt es noch weitere Aufnahmequellen. Dichtungsmassen die in den 1960er bis 1970er Jahren beim Bau von Gebäuden im Innen- und Außenbereich eingesetzt wurden enthielten 5-30% PCB als Plastifizierer. In den 90iger Jahren wurde festgestellt, dass durch Erosion und durch das Entfernen der Dichtungsmassen bei Renovierungen die PCBs in die Umwelt freigesetzt wurden.

In Deuschland wurden in kontaminierten Schulen Werte von 500 bis 10.000 ng/m³ Luft gemessen. Gabrio *et al.* untersuchten das Blut von Lehrern aus kontaminierten Schulen und verglichen die Were mit Proben von Kontrollgruppen. Besonders häufig wurden niedrigchlorierte PCBs, wie PCB 28 und 52, in der Luft gemessen. Die Gehalte in den Proben der exponierten Lehrer waren trotz der sehr hohen Luftbelastung nur 4-7% höher als die der Kontrollgruppe (Gabrio *et al.*, 2000).

Der Außenbereich von Gebäuden bei denen Dichtungsmassen eingesetzt wurden kann auch kontaminiert sein. 2005 untersuchten Priha *et al.* Bodenproben aus der Umgebung von kontaminierten Gebäuden in Finnland. Bis zu einer Distanz von 2 Metern betrug die Konzentration an PCBs 6,83 mg/kg, weiter entfernt nur noch 0,5 mg/kg. In der Studie wurde festgestellt, dass durch diese Exposition die Grenzwerte nicht überschritten wurden. Nur in extremen Fällen könnten Kinder diese Grenzwerte überschreiten, dieser Fall ist aber als sehr unwahrscheinlich anzusehen (Priha *et al.*, 2005).

Hinsichtlich der geringen Expositionswerte durch kontaminierte Innenraumluft und durch kontaminierte Außenbereiche spielen diese Expositionsquellen keine große Rolle in der täglichen Belastung durch PCBs.

II.1.5. Toxikologische Daten

Die PCB wurden von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) in Gruppe 2A (möglicherweise humankanzerogen) eingestuft und gelten als tumorpromovierend (IARC, 1978; Knerr and Schrenk, 2006). Die Wirkungsweise der NDL-PCBs auf verschiedene Organismen ist vielfältig. In *in vitro*-Studien zeigte sich, dass PCBs eine Einfluss auf die intrazelluläre Kommunikation (Umannova *et al.*, 2008) und auf die Apoptose von Zellen haben (Bohnenberger *et al.*, 2001). Außerdem wurde von hormonartigen Wirkungen von NDL-PCBs berichtet (Garritano *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007). In Tierstudien wurden unter anderem neurotoxische und entwicklungsstörenden Effekte festgestellt (Vitalone *et al.*; Dziennis *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde von Veränderungen im

Hormonhaushalt und von Organen, wie Anschwellen der Leber und der Schilddrüse, berichtet (Gray *et al.*, 1993; Burgin *et al.*, 2001). Aber auch beim Menschen wurden Veränderungen bei der Entwicklung von Kindern und Einfluss auf den Hormonhaushalt festgestellt (Plíšková *et al.*, 2005; Lamb *et al.*, 2006).

Im folgenden werden Studien mit kommerziell erhältlichen Gemischen, zusammengesetzte Gemische und individuellen PCBs vorgestellt, die primär Effekte in der Leber untersucht. Hinsichtlich der potentiellen kanzerogenen und tumorpromovierenden Wirkung von PCBs, wird auch dieser Aspekt hervorgehoben.

II.1.5.1. Gemische

Gemische sind kommerziell erhältliche Produkte wie Aroclor aber auch „künstlich“ im Labor hergestellte Gemische. Das Problem bei Gemischen, besonders die kommerziellen ist, dass meistens keine Angaben über die genaue Zusammensetzung und die Reinheit der Produkte vorhanden sind. Aroclor besteht nicht nur aus NDL-PCBs, sondern zusätzlich sind Dioxine und dioxinartigen Komponenten enthalten.

In einer chronischen Studie mit Ratten über zwei Jahre wurden Aroclor 1242, 1254 und 1260 in drei verschiedenen Dosen eingesetzt, 5, 50 und 100 ppm (ca. 1,2, 2,5 und 5 mg/kg KG pro Tag). Untersucht wurden unter anderem die körperliche Entwicklung, die Veränderungen der Organe und die Blutwerte. Das eingesetzte Aroclor 1254 hatte einen ungewöhnlich hohen TEQ-Wert der ungefähr sechsmal höher war als die Werte der anderen Aroclors. Die Mortalität der männlichen Tiere nach 24 Monaten entsprach der Kontrollgruppe, die der Weibchen war reduziert. Es zeigte sich, dass die Lebergewichte und die Schilddrüsengewichte erhöht waren. Bei der histologischen Untersuchung wurden neoplastische und nicht-neoplastische Veränderungen der Leber bei den Weibchen und zusätzlich der Schilddrüse bei den Männchen festgestellt. Bei beiden Geschlechtern traten früher und meistens häufiger als in der Kontrollgruppe Adenome und Karzinome auf was auf die karzinogene Wirkung der PCBs hinweist. Außerdem wurden Blutwerte ausgewertet die auf eine konzentrationsabhängige Leberschädigung hinwiesen, dies war jedoch nur bei den Weibchen der Fall. (Mayes *et al.*, 1998).

In einem weiteren Tierversuch mit männlichen Sprague-Dawley Ratten wurde Aroclor 1242 in zwei verschiedenen Dosen, 0,3 und 1,5 mg/kg KG pro Tag (5 und 25 ppm) über zwei, vier und sechs Monate verabreicht. Es wurde zu keinem Zeitpunkt Änderungen der Blutwerte festgestellt. Das Lebergewicht war nach vier und sechs Monaten bei beiden Dosen signifikant erhöht, zusätzlich wurden erhöhte Leberenzymaktivitäten gemessen. Bei histologischen Untersuchungen wurden erhöhte Lipideinschlüsse in den Lebern der Tiere die mit der

höchsten Dosis behandelt wurden, festgestellt. (Bruckner *et al.*, 1974; Bruckner *et al.*, 1977). In einer ähnlichen Studie die neben Aroclor 1242 auch Aroclor 1248, 1254 und 1260 verwendete, wurden ebenfalls gegenüber den Kontrolltieren erhöhte Lebergewichte und erhöhte Enzymaktivitäten gemessen (Litterst *et al.*, 1972).

Studien zur Übertragung von PCBs während der Schwangerschaft und nach der Geburt auf die Nachkommen sind wichtig um die Exposition und Entwicklung von Föten und Jungtieren zu erforschen. Um diese Aspekte zu untersuchen behandelte Hany *et al.* weibliche Long-Evans Ratten 50 Tage vor der Verpaarung bis 21 Tage nach der Geburt mit Aroclor 1254 und einem Gemisch das der Belastung humaner Muttermilch nachgeahmt wurde. Die Dosis betrug 4 mg/kg KG pro Tag. Das Körpergewicht der Neugeborenen beider Behandlungsgruppen war bei der Geburt verringert ebenso die Körpergewichtsentwicklung. Bei beiden Gruppen gab es eine hohe Mortalität bei der Geburt. Bei den überlebenden Tiere war das Lebergewicht erhöht. Nach 170 Tagen wurde durch den Zuckerwassertest festgestellt, dass es eine Verweiblichung der männlichen Nachkommen gab. Dieser Test beruht darauf, dass weibliche Ratten bevorzugt Zuckerwasser trinken (Hany *et al.*, 1999). Bei einer ähnlichen Studie von Dziennes *et al.* von 2008 bei der nur Aroclor 1254 verabreicht wurde, wurde eine erhöhte CYP1A-Aktivität bei den weiblichen Nachkommen gemessen. Dagegen wurde die CYP2B-Aktivität nur bei den Männchen erhöht (Dziennis *et al.*, 2008).

II.1.5.2. Individuelle PCBs

In diesem Abschnitt werden einzelnen Kongenere behandelt. Die im Folgenden vorgestellten *in vitro*- und *in vivo*-Studien behandeln primär NDL-PCBs und deren Wirkung.

Bei *in vitro* Studien wurden karzinogene und turmorpromovierende Effekte von NDL-PCBs festgestellt. Bohnenberger *et al.* zeigte 2001, dass die NDL-PCBs 28, 101 und 187 in Rattenhepatozyten die Apoptose verhinderten. Außerdem wurde die CYP2B-Aktivität erhöht, aber die CYP1A-Aktivität blieb unverändert (Bohnenberger *et al.*, 2001). In einer ähnlichen Veröffentlichung von 2008 wurden Rattenepithelzellen mit dem NDL-PCB 153 und dem DL-PCB 126 behandelte. Das NDL-PCB induzierte die Freilassung von Arachidonsäure, einem sekundärem Messanger, der eine wichtige Rolle beim Überleben der Zelle spielt, wogegen das DL-PCB keine Veränderung verursachte. Der Einfluss auf die Arachidonsäure-Signalwege könnte zur kanzerogenen Wirkung von NDL-PCBs beitragen (Umannova *et al.*, 2008).

Um die Fähigkeit der Tumorpromotion von Substanzen zu ermitteln muss zuerst ein Initiator appliziert werden. Strathman *et al.* verabreichten Mäusen eine einmalig Dosis von 90 mg/kg KG des Tumorinitiators Diethylnitrosamin (DEN). Anschließend wurden den Tieren

20 Dosen, jeweils zwei pro Woche, des NDL-PCBs 153 verabreicht. Die Dosis pro Injektion betrug 300 µmol/kg KG. Nach 64 Wochen wurden die Tiere auf die Häufigkeit von Tumoren untersucht. Die mit dem NDL-PCB behandelten Tiere hatten eine erhöhte Tumoranzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren (Strathmann *et al.*, 2006). Bei der einzelnen und kombinierten Applikation von NDL-PCB 153 und DL-PCB 126 nach der Initiierung durch DEN, wurde eine erhöhte Häufigkeit von Leberfoci festgestellt. Bei den weiblichen Ratten die mit DL-PCB 126 behandelt wurden war der Effekt ausgeprägter (Dean *et al.*, 2002).

In unserer Arbeitsgruppe untersuchten Kunz *et al.* die tumorpromovierende Wirkung von NDL-PCB 28 und 101. Die weiblichen Ratten wurden mit DEN (10 mg/kg KG pro Tag) über 10 Tage vorbehandelt und nach einer Woche Erholung wurden die Tiere mit den PCB 28 und PCB 101 über 8 resp. 16 Wochen behandelt (50 µmol/kg KG pro Woche oder 150 µmol/kg KG pro Woche). Es wurde keine Anzeichen von tumorpromovierenden Effekte bei den Tieren beobachtet die nur mit den PCBs behandelt wurden. Bei den DEN vorbehandelten Tieren dagegen zeigten sich bei der 16 wöchigen Behandlungsdauer tumorpromovierender Effekte in der Leber. Die Ergebnisse zeigten, dass die NDL-PCBs 28 und 101 keine effektiven Tumorpromoter sind (Kunz *et al.*, 2006).

II.1.5.3. Humane Daten

Die toxikologischen Erkenntnisse über Effekte die durch PCBs beim Menschen verursacht wurden, stammen aus Fall-Kontroll-Studien, und von Arbeitern die eine besondere PCB-Exposition durch ihre Arbeitsstelle hatten, wie z.B. Arbeiter in Kondensatorenfabriken. Ein großes Problem bei solchen Studien ist, dass die Personen meistens neben den PCBs anderen Chemikalien ausgesetzt waren, wie Lösungsmittel und Schwermetalle. Zusätzlich sind die PCB-Gemische mit Dibenzofuranen und Dioxinen verunreinigt. Die größten Vergiftungsvorfälle mit PCBs fanden 1968 in Japan statt, bekannt als „Yusho"-Vorfall und 1979 in Korea, bekannt als „Yu-Cheng"-Vorfall. In beiden Fällen wurde mit PCB kontaminiertes Reisöl verzehrt.

Beim „Yusho"-Vorfall, was übersetzt, soviel heißt wie die „Öl-Krankheit", wurde Reisöl verwendet, das mit dem PCB-Gemisch Kanechlor 400 kontaminiert war. Neben den PCBs enthielt Kanechlor 400 auch dioxinartige Verunreinigungen. Die durch Ärzte festgestellte akuten Symptomen waren typisch für eine PCB- und Dioxin-Vergiftung. Bei 38% der 325 Patienten kam es zum Anschwellen des oberen Augenlieds und bei 33% kam es zur starker Chlorakne. Weiterhin kam es zu ödematösem Anschwellen der Extremitäten (6%), Trägheit (3%), Beeinträchtigung des Verdauungsapparates (2%) und zur Pigmentation der Haut (10%) (Kuratsune *et al.*, 1972). Spätere Veröffentlichungen über den „Yusho"-Vorfall

berichteten von menstruellen Problemen, einer erhöhten Häufigkeit von Fehlgeburten, geringeres Gewicht der Säuglinge bei der Geburt und kürzere Schwangerschaftszeiten. Die Betroffenen zeigten verringerte motorische und sensorische Fähigkeiten und die IQ-Werte waren niedriger als üblich. (EFSA, 2005; Knerr and Schrenk, 2006).

Bei Mortalitätsstudien von beruflich exponierten Kohorten wurde in manchen Berichten von erhöhten Fällen an Krebs in der Leber, der Gallenblase, des Gallentrakts und des Darmtraktes berichtet. Zusätzlich wurde auch eine erhöhte Anzahl an malignen Melanomen festgestellt. Trotz der hohen Anzahl der Personen in den Studien, waren viele Personen nicht länger als zehn Jahre den PCBs exponiert. Außerdem wurden die Erhebungen der Daten der Geschädigten nicht lange nach der Exposition weitergeführt (EFSA, 2005).

Manche Studien fokussierten sich auf Brustkrebs in Verbindung mit PCBs. Doch es wurde keine signifikante Korrelation zwischen der PCB-Exposition und den Brustkrebsvorfällen festgestellt (Knerr and Schrenk, 2006).

II.2. Fremdstoffmetabolismus

Alle Organismen werden tagtäglich mit Stoffen konfrontiert, die sie weder als physiologische Bausteine noch als Energielieferanten verwerten können. Um diese endogenen und exogenen Fremdstoffe aus dem Organismus zu entfernen, hat sich ein Mechanismus entwickelt um die Fremdstoffe auszuscheiden, der Fremdstoffmetabolismus. Dieser setzt in mehreren Phasen lipophile Fremdstoffe so um, dass sie als hydrophile Konjugate aus dem Körper ausgeschieden werden können.

In der Phase I des Fremdstoffmetabolismus, der metabolischen Funktionalisierungs-Reaktion, entstehen durch Bindung von funktionellen Gruppen (OH, SH,...) an die Substrate polarere Metabolite. Daran beteiligt sind unter anderem die Oxidoreduktasen der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP), Flavinabhänigen Monooxygenasen (FMO), Monoaminooxidasen (MAO) und die Cyclooxygenasen (COX) (Eisenbrand G, 2001).

In der Phase II wird der funktionalisierte Stoff in der Konjugationsreaktion mit hydrophilen Substraten durch Sulfotransferasen (SULT), Glucuronosyltransferasen (UGT), Glutathiontransferasen (GST), Methyltransferasen (MT) oder Aminoacetyltransferasen (NAT) stark hydrophilisiert.

In der Phase III wird der stark hydrophile Metabolit aus der Zelle heraustransportiert und kann in den wässrigen Medien wie der Gallenflüssigkeit, Blut, Harn oder Schweiß bis zum Ausscheidungsort gelangen. Die Transportsysteme dieser Phase sind u.a. ABC-Transporter und die große Gruppe der löslichen Carriersysteme (SLC), wie organische Anion-

und Kation-Transporter (OAT, OCT) und organische Anion-Transport-Polypeptide (OATP) (Mizuno *et al.*, 2003; Marquardt and Schäfer, 2004).

II.2.1. Cytochrom P450 Enzyme

Bei den Cytochrom P450 Enzymen, kurz als CYP bezeichnet, handelt es sich um hämbeinhaltende Monooxygenasen, die unter Verbrauch von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) molekularen Sauerstoff aktivieren (Substrat + O_2 + NADPH + H^+ à oxygeniertes Substrat +H_2O + $NADP^+$). Sie bilden die größte Enzymgruppe, die in der Oxidation von Stoffen in der Zelle eingebunden ist und sind am Abbau und an der Synthese von vielen endogenen Steroiden, Vitaminen und Fettsäuren beteiligt. Doch auch die Metabolisierung von exogenen Fremdstoffen wie Medikamente, Umweltgifte und Karzinogene gehört zum großen Aufgabenbereich dieser Enzymgruppe (Honkakoski and Negishi, 2000; Moore *et al.*, 2000).

Abbildung 3 gibt einen Einblick in die mehrstufigen, mechanistischen Vorgänge der Redoxreaktionen. Dabei wird mithilfe der assoziierten NADPH-abhängigen CYP-Reduktase das komplex gebundene Eisen(III)-Ion des Hämin zu Eisen(II) reduziert. Das resultierende Häm kann molekularen Sauerstoff binden. Ein weiteres Elektron wird von der CYP-Reduktase transferiert. Der entstandene, hochreaktive [Fe^{2+}-O_2^-]-Komplex kann nun über instabile Zwischenstufen Sauerstoff auf das Substratmolekül übertragen, wobei Eisen(II) zu Eisen(III) oxidiert wird. Nach Dissoziation des oxygenierten Substratmoleküls liegt das Hämin wieder im Ausgangsstadium vor (Marquardt and Schäfer, 2004).

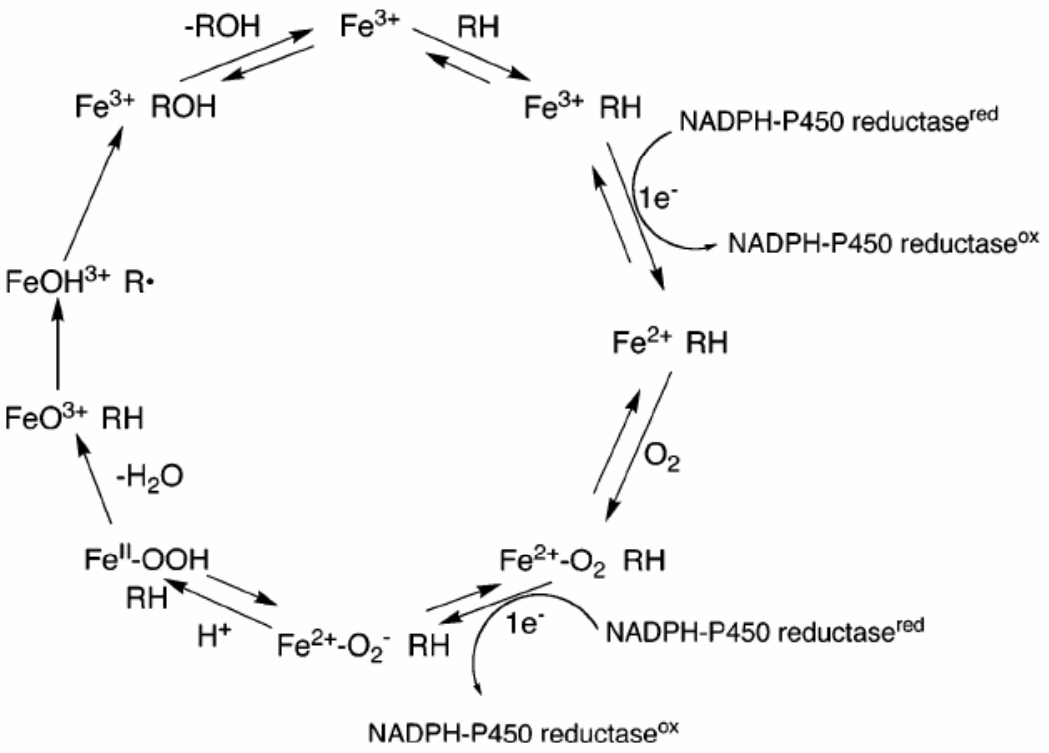


Abbildung 3 Mechanismus der CYP abhängige Oxidation (Marquardt and Schäfer, 2004)

Die Familie der CYPs beinhaltet bis dato 50-60 individuelle P450 Gene, davon allein 17 verschiedene in Säugern. Die wichtigsten Vertreter für den Fremdstoffmetabolismus sind die Familien der CYP1 – 4. Bedingt durch die Vielzahl an verschiedenen CYP-Enzymen wurde eine einheitliche Nomenklatur eingeführt. Sie erfolgt durch die Abkürzung CYP, gefolgt von einer arabischen Ziffer, welche die Familie benennt (z.B. CYP2). Die Sequenzübereinstimmung muss bei Zugehörigkeit zu einer Familie mindestens 40 % betragen. Diese Hauptfamilie wird wiederum in Sub- bzw. Unterfamilien unterteilt. Diese werden mit einem Großbuchstaben bezeichnet (z.B. CYP2B) Die Sequenzhomologie muss bei Zugehörigkeit zu einer Unterfamilie mindestens 55 % betragen. Individuelle Mitglieder einer Unterfamilie werden mit arabischen Ziffern benannt (z.B. CYP2B6). Ein individuelles CYP sollte sich in seiner Sequenz mit mehr als 3 % von anderen unterscheiden (Waxman, 1999; Honkakoski and Negishi, 2000).

II.2.1.1. CYP1 Subfamilie

Die CYP1 Subfamilie besteht beim Mensch und bei den Nagern aus den Isoenzymen CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1. Sie können polycyclische Kohlenwasserstoffe, wie Benzo[a]pyren und Arylamine zu Kanzerogenen metabolisch aktivieren. Während die CYP1A1 und CYP1B1 hauptsächlich in außerhepatischen Gewebe exprimiert werden, kommt

CYP1A2 ausschließlich in der Leber vor, wo es mit 12% einer der wichtigsten CYP-Vertreter in der Leber ist. CYP1A1 wird nur zu sehr geringem Teil konstitutiv exprimiert. Induziert werden sie durch polyaromatische Kohlenwasserstoffe wie das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), dioxin-artige PCBs und andere dioxin-artige Verbindungen. Dabei binden diese Induktoren an den Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR). Im Speziesvergleich zeigt sich, dass die humanen CYP1A-Enzyme durch starke Induktoren, wie TCDD und PCBs, wesentlich schwächer induzierbar sind als die der Ratte (Honkakoski and Negishi, 2000; Hukkanen, 2000; Zeiger *et al.*, 2001).

Abbildung 4 zeigt die Transkription von CYP1-Enzymen über den AhR-ARNT-Transkriptionsweg. Der zytosolische Transkriptionsfaktor AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) ist genau wie ARNT (*AhR nuclear translocator*) ein basic helix-loop-helix (bHLH) Protein. AhR ist im Zytosol inaktiv und an die Hitzeschockproteine HSP90 gebunden. Die anderen assoziierten Proteine wie XAP2 und p23 sind an der Faltung des AhR beteiligt. Bindet ein AhR-Agonist an den AhR, lösen sich die Proteine HSP90, XAP2 und p23 ab und der AhR-Ligand-Komplex wandert in den Kern, wo er ein Heterodimer mit ARNT bildet. Dieses Dimer bindet als aktivierter Transkriptionsfaktor an besondere Stellen der DNA, den so genannten XREs (*Xenobiotic Responsive Elements*) und induziert damit die Transkription einer Reihe verschiedener Gene wie z.B. CYP1A1 (Mimura *et al.*, 1999; Hukkanen, 2000; MacDonald *et al.*, 2001)

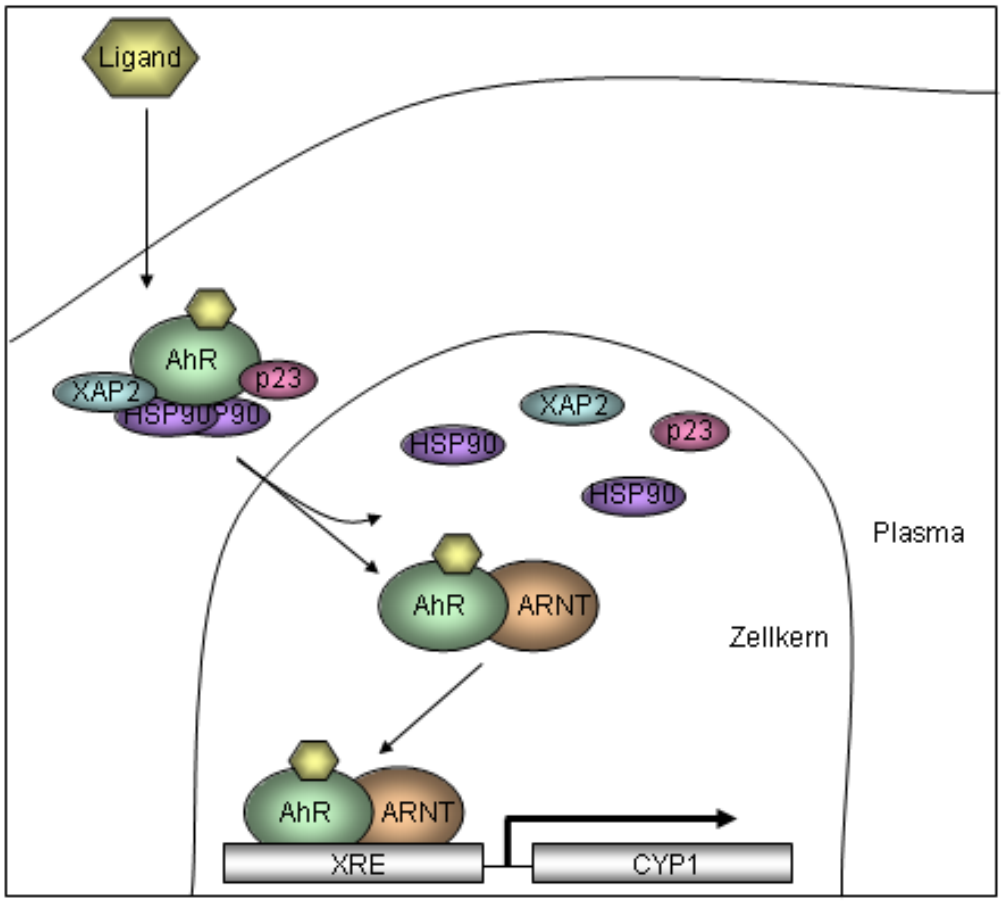


Abbildung 4 Mechanismus der Induktion von CYP1-Ezymen über AhR durch Binden eines Liganden an den Rezeptor (Hukkanen, 2000; Knerr, 2006a)

Weiterhin spielt bei der Transkription von CYP1B1 auch der Östrogen Rezeptor (ER) eine wichtige Role. Der ER scheint auch an der Proteinsynthese von CYP1A1 beteiligt zu sein (Honkakoski and Negishi, 2000; Han *et al.*, 2005).

II.2.1.2. CYP2B-Subfamilie

Die CYP2B-Subfamilie besteht in der Ratte aus den Enzymen CYP2B1, CYP2B2, CYP2B3, CYP2B12, CYP2B15, CYP2B21 und CYP2B31, wobei die Enzyme CYP2B1 und CYP2B2 von größter Bedeutung sind. Das humane Analogon ist das Enzym CYP2B6 und bei der Maus CYP2B9, CYP2B10 und CYP2B13. Die CYP2B-Subfamilie wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, sie wurden aber auch in extrahepatischen Geweben wie Nieren, Lungen und Gehirn nachgewiesen. Ihr Enzyme katalysieren die Hydroxylierung von einer Vielzahl an Xenobiotika und Steroiden. Stark induzierend wirken viele verschiedene exogene Stoffe wie z.B. industrielle Lösungsmittel, Barbiturate und NDL-PCBs. Ein bekannter Vertreter dieser

Gruppe ist das Barbiturat Phenobarbital (PB) (Abbildung 5) (Kawamoto *et al.*, 1999; Hukkanen, 2000; Guo *et al.*, 2007).

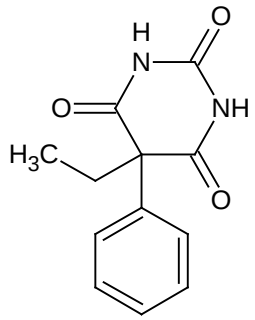


Abbildung 5 Struktur von Phenobarbital

Der Mechanismus der CYP2B-Transkription ist in Abbildung 6 dargestellt. Der verantwortliche Rezeptor ist der *Constitutive Adrostane Receptor* (CAR). CAR wird als „constitutive" bezeichnet, weil er in der Lage ist Responseelemente zu transaktivieren ohne an einen Liganden gebunden zu sein. CAR wird besonders stark in der Leber exprimiert und regelt vor allem, wie bereits erwähnt, die Induktion von CYP2B, aber auch zu einem geringen Teil die von CYP3A. Wird CAR aktiviert, wandert dieser mit Hilfe der Phosphatase 2A (PP-2A) in den Kern, wo das Hitzeschockchaperon HSP90 und das C*ytoplasma CAR Retention Protein* (CCRP) durch PP-2A abgespalten werden. Die Induktoren von CAR müssen nicht zwangsläufig Liganden sein, z.B. bindet PB nicht an CAR. Dabei bildet CAR mit dem Retinoidsäure Rezeptor (RXR) ein Heterodimer und bindet mit Hilfe von Cofaktoren wie S*teroid Receptor co-Activator* (SRC-1) an das *PB-responsive enhancer module* (PBREM) wodurch die Transkription der CYP2B-Enzyme induziert wird. Endogene inverse Agonisten wie das Steroid Androstanol inhibieren die Transkription, werden jedoch durch starke Agonisten entfernt. Bei Ratten ist CAR in der Leber von männlichen Tieren höher exprimiert als bei Weibchen (Kawamoto *et al.*, 1999; Waxman, 1999; Hukkanen, 2000; Moore *et al.*, 2000; Dvorak *et al.*, 2003; Slitt *et al.*, 2006).

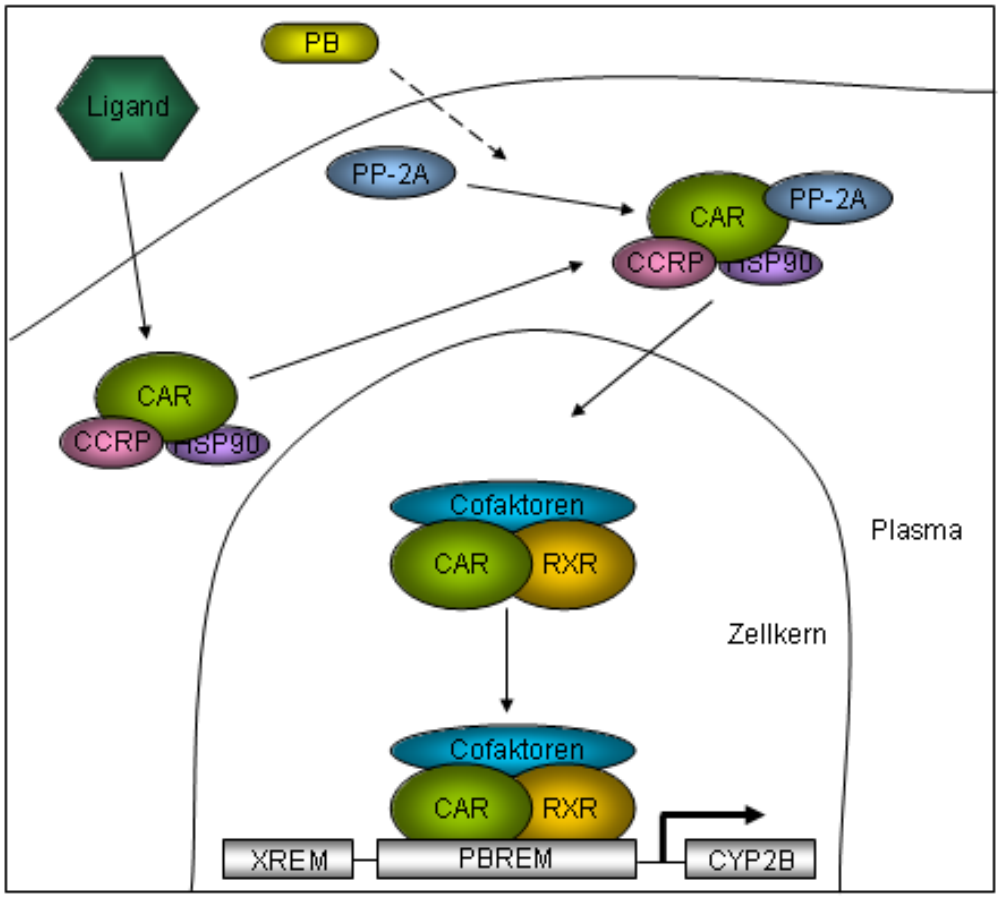


Abbildung 6 Mechanismus der Induktion der CYP2B-Enzyme durch direkte Ligandenbindung oder durch indirekte Aktivierung von CAR. PB=Phenobarbital (Hukkanen, 2000; Swales and Negishi, 2004)

Bei Ratten kann die Gabe des Induktors PB den Abbau des Gerinnungshemmers Dicoumarol so deutlich steigern, dass dessen gerinnungshemmende Wirkung aufgehoben wird (Pearce *et al.*, 1992). Schon seit längerem wird ein Zusammenhang von CYP2B-Induktion und Tumorpromotion diskutiert, da viele Induktoren auch tumorpromovierende Eigenschaften haben. Ein bekanntes Beispiel ist PB das während *in vitro*-Versuchen die Produktion von Connexin32 verminderte, welches zur Formation von interzellulären Kommunikationswegen gebraucht wird. Microarray-Experimente mit CAR-knockout-Mäusen und Wildtypmäusen zeigten, dass über CAR durch die Induktion mit PB eine Vielzahl von Genen reguliert werden die mit der Tumorpromotion in Verbindung gebracht werden (Ueda *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2006).

II.2.1.3. CYP3A Subfamilie

Die CYP3A Subfamilie besteht bei der Ratte aus den Isoenzymen CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9,CYP3A18 und CYP3A62. Das Vorkommen scheint Geschlechtspezifisch zu sein. CYP3A2 und CYP3A18 sind bei den Männchen höher exprimiert, CYP3A9 und CYP3A62

eher bei den Weibchen. Ihr Wirkungsort ist vorwiegen in der Leber und im Darm angesiedelt, wo sie die größte Gruppe der CYP-Enzyme darstellen, die mit dem Metabolismus von Medikamenten beschäftigt sind. Daneben wurden sie aber auch in anderen Gewebe wie Gehirn, Nieren und Lungen nachgewiesen (Honkakoski and Negishi, 2000; Martignoni *et al.*, 2004). Bei der Maus besteht die Subfamilie aus den Isoenzymen CYP3A11, CYP3A13, CYP3A16, CYP3A41 und CYP3A44. Auch bei der Maus werden sie vorwiegend in der Leber und im Darm exprimiert. CYP3A41 und CYP3A44 sind die dominanten Isoenzyme dieser Subfamilie bei den Weibchen (Sakuma *et al.*, 2002).

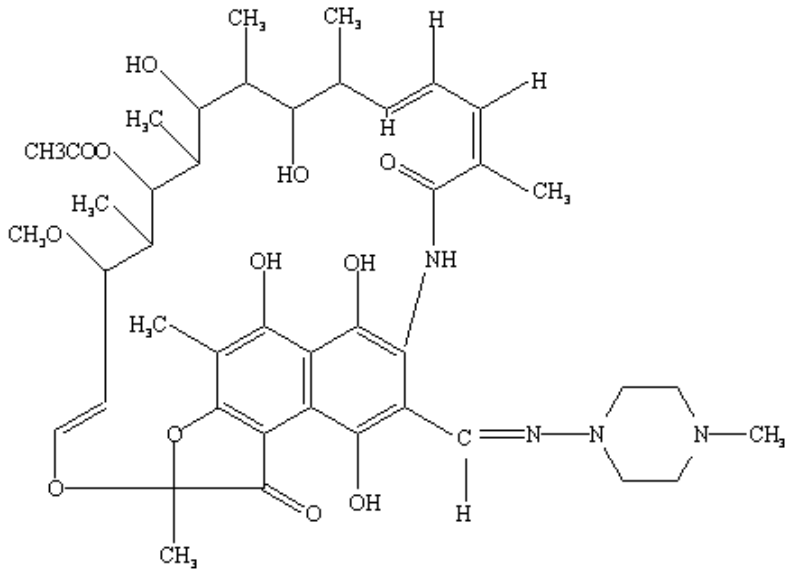


Abbildung 7 Struktur von Rifampicin

Die CYP3As sind verantwortlich für die Metabolisierung von endogenen Steroiden, wie z.B. Testosteron und Progesteron, aber auch für die Metabolisierung von über 50 % der gebräuchlichsten Medikamente, wie Lidocain und Cyclosporin (Anakk *et al.*, 2003). Ein bekannter starker Induktor von CYP3A4 beim Menschen ist Rifampicin (Abbildung 7), ein Tuberkulostatikum. Durch die Induktion der Transkription von CYP3A4 durch Rifampicin wird der Abbau der Wirkstoffe von Kontrazeptiva wie der „Anti-Baby-Pille“ beschleunigt und so deren Wirkung vermindert. Die Folge kann eine ungewollte Schwangerschaft sein. Ein Inhibitor der CYP3A4-Transkription ist Naringenin, ein Flavonoid, das beispielsweise in Zitrusfrüchten, insbesondere in Grapefruit vorkommt (Zachariasen, 1994).

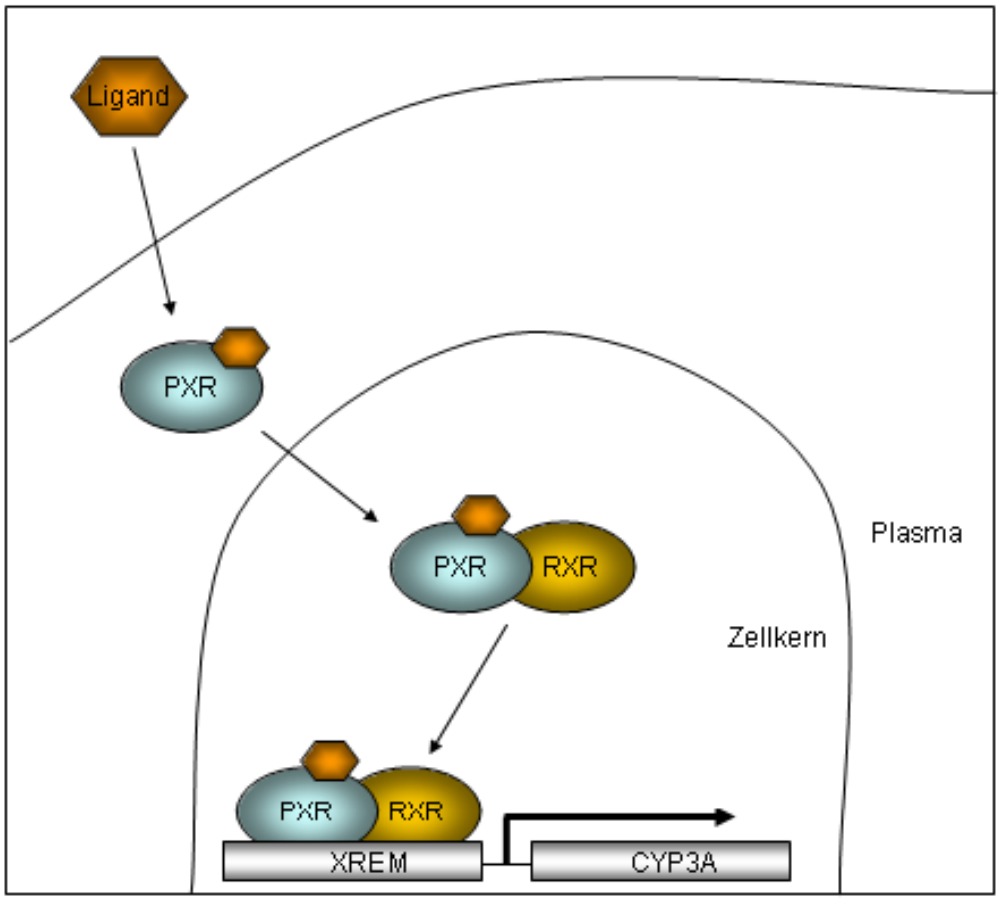


Abbildung 8 Mechanismus der Induktion der Transkription von CYP3A-Enzyme durch Aktivierung des PXR durch Ligandenbindung.

Der Mechanismus der CYP3A-Transkription beim Menschen ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Der Induktor bindet als Ligand an den *Pregnane Xenobiotic Receptor* (PXR). PXR bildet im Zellkern wiederum ein Heterodimer mit RXR, welcher an die proximale Promotor-Region des CYP3A-Gens bindet. Diese enthält zwei Kopien eines AG(G/T)TCA-Hexamers (ER-6), die Wiedererkennungssequenz zur Transkription, die durch die Bindung an die Promotor-Region aktiviert wird. ER-6 ist mit einem *Distal Enhancer Module* (XREM) gekoppelt, das wiederum die Aktivierung bzw. die transkriptionelle Induktion von CYP3A kontrolliert (Honkakoski and Negishi, 2000).

II.2.2. Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen

Die Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen (UDP-GT, UGT) sind Phase II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus. Sie gehören zu der Klasse der Typ 1 Transmembranproteine, die im endoplasmatischem Retikulum lokalisiert sind. Ihr aktives Zentrum auf der befindet sich auf luminalen Seite der Membran. UGTs katalysieren die Konjugation der Glucuronsäure (Abbildung 9) an eine Vielfalt von endogenen und exogenen

Substraten um diese wasserlöslicher zu machen und so die Ausscheidung in die Galle oder Urin zu erleichtern. Zu den endogene Substraten zählen unter anderem Bilirubin, Gallensäuren, Serotonin, Schilddrüsenhormone und Steroide. Zusätzlich zählen unter anderem zu den exogenen Substraten fettlösliche Vitamine, Kanzerogene und Umweltkontaminanten, ebenso Medikamente wie Acetaminophen (Paracetamol), Chloramphenicol und Morphin (Bock and Köhle, 2005).

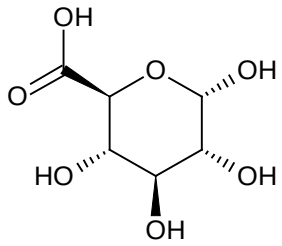


Abbildung 9 Struktur der Glucuronsäure

Basierend auf Sequenzähnlichkeiten werden die UGTs in zwei Gruppen unterteilt, UGT1 und UGT2. Alle UGT1 Isoformen sind Splicingformen einer Grundform. Die UGT1-Familie in der Ratte besteht aus 9 Isoformen: UGT1A1, UGT1A2, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8 und UGT1A9. UGT1A4 und UGT1A9 sind Pseudogene da sie für kein funktionelles Protein codieren (Shelby *et al.*, 2003).

Die UGT2 Isoformen dagegen sind alle individuelle Gene und werden nochmals unterteilt. Dieser Genfamilie gehören 7 Isofomen an: UGT2A1, UGT2B1, UGT2B2, UGT2B3, UGT2B6, UGT2B8 und UGT2B18. Da in dieser Arbeit nur Vertreter der UGT1-Familie untersucht werden, wird im folgenden nur die UGT1-Familie besprochen (Shelby *et al.*, 2003).

Von der UGT1-Familie sind UGT1A6 und UGT1A1 die Hauptvertreter. Sie kommen ubiquitär im ganzen Körper vor aber werden primär in der Leber exprimiert. Die Expression von UGT1A1 und UGT1A6 wird durch Hormone, Medikamente und andere Xenobiotika die auch als Ligand/Induktor von AhR, CAR und PXR gelten.

Versuche zeigen, dass die Expression von UGT1A1 durch Induktoren von CAR, wie z.B. PB, NDL-PCB 99 erhöht wird. Außerdem induzieren auch Linganden von PXR, wie z.B. Dexamethason, die UGT1A1-Expression. Dagegen wird die Expression von UGT1A6 durch CAR und AhR Induktoren erhöht. Versuche mit transgenen Mäusen bestätigten diese Ergebnisse (Xie *et al.*, 2003; Shelby and Klaassen, 2006).

Eine Erhöhung der UGT1A1- und UGT1A6-Expression kann zu einer erhöhten Metabolisierung von Schilddrüsenhormonen und Bilirubin kommen. Ein schwacher Defekt

im UGT1A1 Gen führt zum Gilbert Syndrom, eine leichte nicht gefährliche Störung des Bilirubinhaushalts. Das Crigler-Najjar Syndrom dagegen ist eine schwere Krankheit die zur schädigenden Anreicherung von Bilirubin führt. Dieses Syndrom wird durch einen starken Defekt am Gen verursacht (Xie *et al.*, 2003).

III. Zielsetzung

Aufgrund der hohen ubiquitären Verbreitung der PCBs in der Umwelt und der Nahrungskette wurde ein Projekt gegründet, dessen Ziel es war das Risiko, das im speziellen von den nicht-dioxin artigen PCBs (NDL-PCBs) ausgeht, für den Menschen abschätzen zu können. Das ATHON-Projekt (*Assessing the Toxicity and Hazard of Non-dioxin-like PCBs Present in Food*) wurde innerhalb des 6. Rahmenprogramms von der Europäischen Kommission gefördert. Das Gesamtziel des Projektes war eine Risikoabschätzung der NDL-PCBs, unter Betrachtung der neu gewonnenen Erkenntnisse über deren Neurotoxizität und Hepatotoxizität aus *in vivo* und *in vitro* Studien. Zusätzlich wurden auch Entwicklungsstudien und Studien zur Exposition von Neugeborenen über die Muttermilch mit Ratten durchgeführt. Hinsichtlich des Fehlens von Grenzwerten für NDL-PCBs in Nahrungsmitteln in der EU, könnten diese Studien zu einer Festlegung maximaler Konzentrationen in Nahrungsmittel herangezogen werden.

Als Teilprojekt war es unsere Aufgabe den Einfluss von ausgewählten NDL-PCBs auf Enzyme des Fremdstoffmetabolismus in der Leber von Ratten und Mäusen zu untersuchen. Die ausgewählten PCBs sind die 6 Indikator-PCBs 28, 52, 101, 126, 138, 153 und 180. Sie stellen 50% der PCB dar die in Lebensmitteln gefunden werden können. Zusätzlich sollen Daten erhalten werden die eine Klassifizierung entsprechend ihrer Wirkung ermöglichen.

Hierzu wurden wichtige Enzyme des Fremdstoffmetabolismus in der Leber ausgewählt. Die Cytochrom P450 Enzyme (CYP) spielen beim Abbau von Fremdstoffen und endogenen Stoffen eine wichtige Rolle in der Phase I des Fremdstoffmetabolismus. Des Weiteren gelten CYP1A, CYP2B und CYP3A als Markerenzyme zur Detektion von AhR, CAR- und PXR-vermittelten Effekten. Zusätzlich wurden der Einfluss auf UDP-Glucuronsyltransferasen (UGT), Enzyme der Phase II des Fremdstoffmetabolismus, untersucht. Diese spielen eine wichtige Rolle beim Ausscheiden von Fremdstoffen und körper eigenen Stoffen. Alle Enzyme wurden auf mRNA und Poteinebene mittels RT-PCR bzw Western Blot untersucht. Außerdem wurde die kataltische Aktivität von CYP1A und CYP2B-Enzymen bestimmt.

Mittels *in vitro* Versuchen sollte durch den Einsatz einer großen Anzahl von strukturell unterschiedlichen PCBs ein Zusammenhang zwischen der Struktur und der Wirkung von NDL-PCBs ermittelt werden.

IV. Ergebnisse und Diskussion

IV.1. Ratten-Studien

Die Ratten-Versuche fanden im Rahmen des ATHON Projektes in *Department of Environmental Health, National Institute for Health and Welfare* in Kuopio, Finnland unter der Leitung von Matti Viluksela statt. Die NDL-PCBs 180 und 52 wurden an der Universität von Umeå, im Fachbereich der Chemie unter der Leitung von Patrik Andersson auf dioxinartige Verunreinigungen überprüft und wenn nötig aufgereinigt (Danielsson *et al.*, 2008), Es ergab sich für NDL-PCB 180 ein TEQ_{WHO}-Wert von 2,7 ng/g und für NDL-PCB 52 0,5 ng/g. Diese Verunreinigungen lagen unterhalb einer Dioxin-Dosis die im Tierversuch Effekte zeigte (Viluksela *et al.*, 2000). Die gefrorenen Leberproben wurden entsprechend der V Methoden und Material verarbeitet, weitere Details unter Kapitel Material und Methoden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Ratten-Studien dargestellt.

IV.1.1. 28 Tage-Studie

Bei der 28 Tage-Studie wurde erwachsenen Ratten, fünf männlichen und fünf weiblichen pro Gruppe, über 28 Tage verteilt eine Gesamtdosis an hochreinem NDL-PCB 180 per Schlundsonde verabreicht. Die Gesamtdosen betrugen 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 1700 mg/kg KG und bei NDL-PCB 52 die folgenden 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 und 3000 mg/kg KG. Aus den Leberproben wurde mRNA und Mikrosomen isoliert, die dann respektive für Gen- und Protein-Analysen verwendet wurden. Das genaue Behandlungsschema kann im Kapitel V Methoden und Material und Methoden nachgelesen werden.

Das Ziel der Rattenstudien war die subakuten Effekte die durch die hochreine NDL-PCBs 180 und 52 in verschiedenen Dosen nach 28 Tagen zu ermitteln. Des Weiteren sollen die Studien dazu beitragen, die NDL-PCBs zu hinsichtlich ihrer Wirkungsweise zu charakterisieren, da bei vorangegangen Studien nicht auf die dioxin-artige Verunreinigung geachtet wurde. Ferner könnten die Studien die Unterschiede zwischen den Geschlechtern zeigen. Mehrere Projektpartner erhielten unterschiedliche Organe und ermittelten die Effekte. Die uns zur Verfügung gestellten Leberproben wurden auf die Genexpression wichtiger fremdstoffmetabolisierender Enzyme untersucht. Um die Genexpression zu bestätigen wurden die Expression der selben Enzyme auf Proteinebene untersucht. Zusätzlich wurde die katalytische Enzymaktivität gemessen.

IV.1.1.1. Genexpression

Zur Bestimmung der Genexpression wurde die Methode der Real-Time PCR (RT-PCR) verwendet. Die mRNA wurde isoliert und auf Reinheit überprüft. Anschließend wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und jeweils 1 µg cDNA für die RT-PCR eingesetzt. Die Veränderung des Transkriptionslevels der Gene wird in x-facher Erhöhung bezogen auf die 0 mg/kg KG Kontrollgruppe angegeben.

Die Behandlung mit NDL-PCB 180 verursachte keine Veränderung der Transkriptionslevel von CYP1A2 und CYP1B1, mit Ausnahme von CYP1A1 bei den Weibchen. Der CYP1A1-mRNA-Level wurde bei einer Gesamtdosis von 1000 mg/kg KG signifikant erhöht (Abbildung 10).

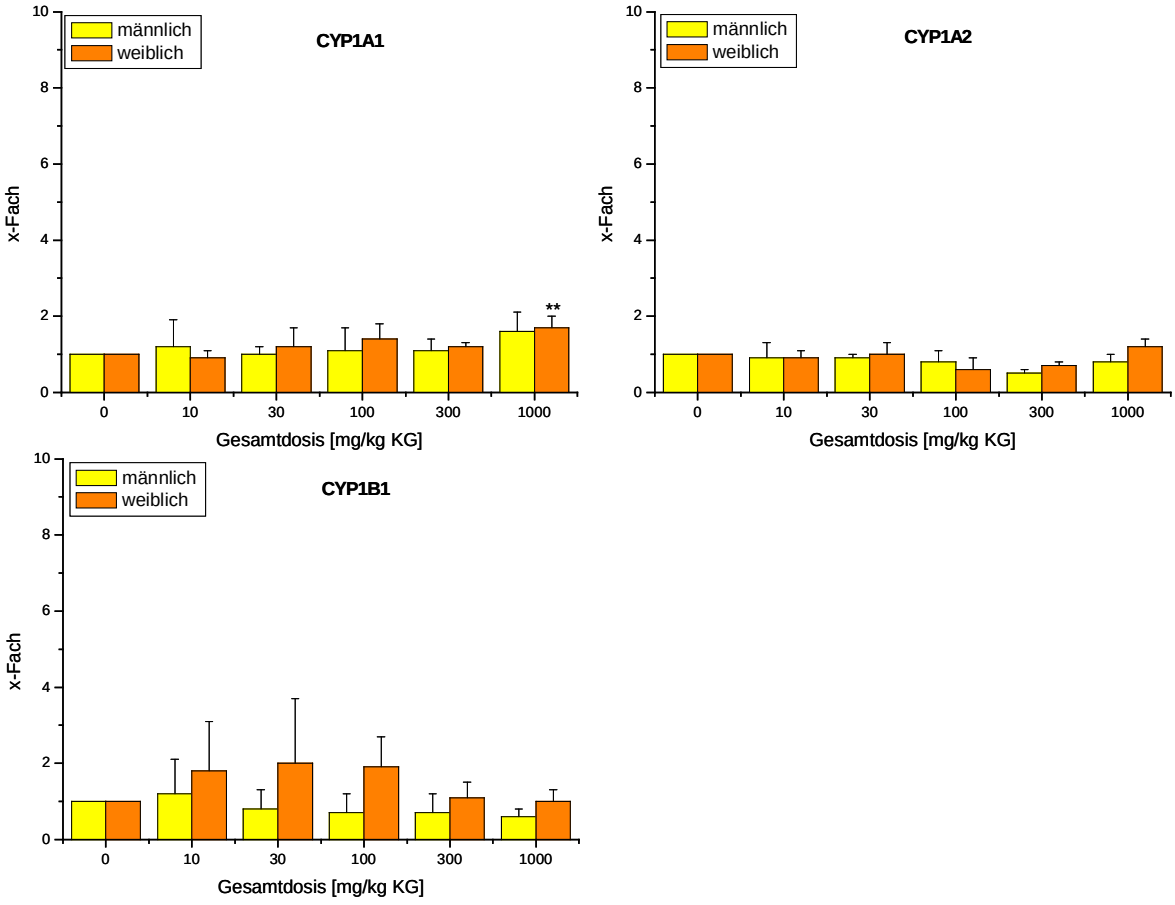


Abbildung 10 RT-PCR von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180, adulte männliche und weibliche Ratten, 4≤n≤5, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test **=p<0,01, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)

Die mRNA-Levels von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 wurden durch die Behandlung mit NDL-PCB 52 nicht signifikant verändert (Abbildung 11). Ausschließlich bei einer Gesamtdosis von 1000 mg/kg KG wurde die Expression von CYP1A1 bei den

Weibchen hoch signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Vergleicht man die Geschlechter untereinander kann festgestellt werden, dass die Weibchen sensibler reagierten. Bei einer Gesamtdosis von 30 mg/kg KG war die Induktion von CYP1A1 in den Weibchen signifikant höher als bei den Männchen, bei einer Gesamtdosis von 1000 mg/kg KG war dieser Unterschied sogar hoch signifikant. Bei CYP1A2 zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei nur bei der Gesamtdosis von 1000 mg/kg KG die Expression des Enzyms in den Weibchen signifikant gegenüber der der Männchen erhöht war.

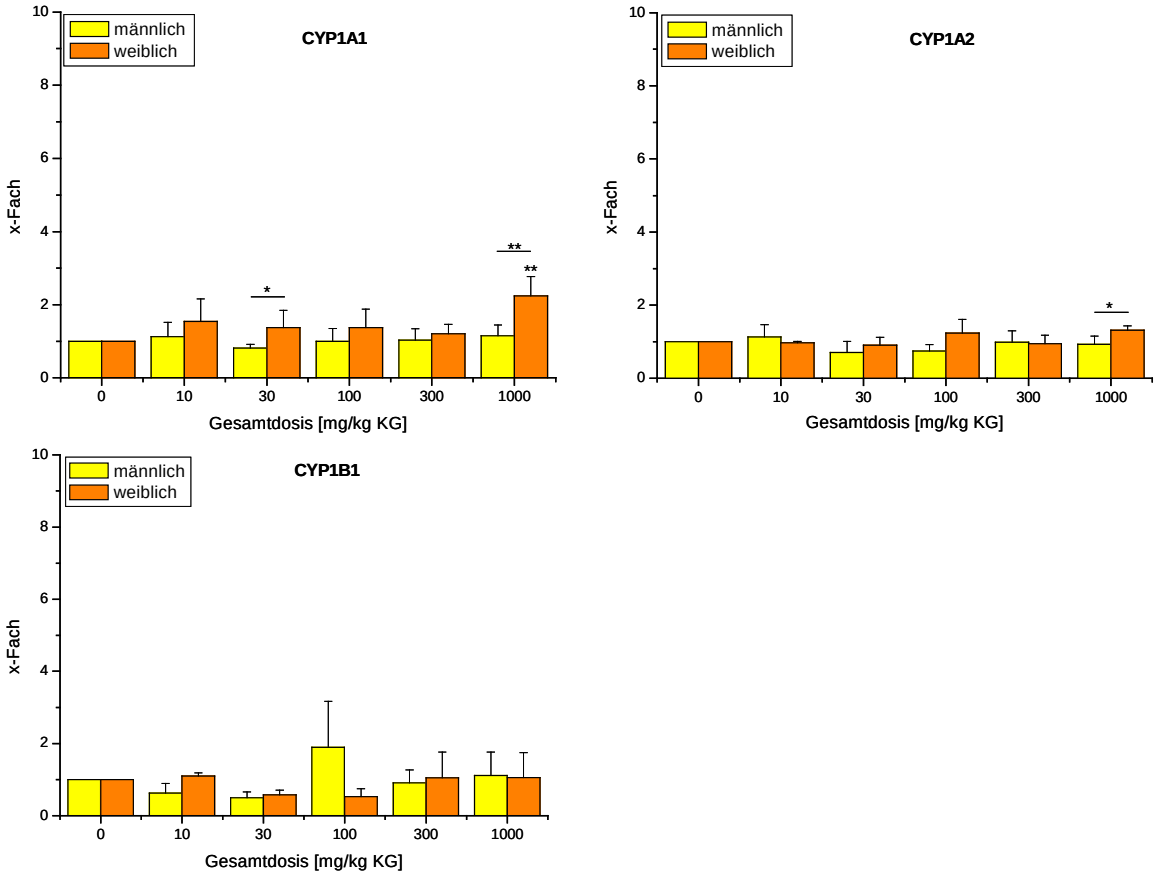


Abbildung 11 RT-PCR von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 52, adulte männliche und weibliche Ratten, 4≤n≤5, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen) *=p<0,05, **=p<0,01,

Die Transkription von CYP2B1 wurde durch NDL-PCB 180 hoch signifikant induziert (Abbildung 12). Ab einer Gesamtdosis von 100 mg/kg KG war die Expression von CYP2B1 in männlichen Tieren hoch signifikant erhöht. Bei den weiblichen Tieren war die Expression erst ab einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG signifikant erhöht. Einen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen den Geschlechtern war nur bei den Gesamtdosen von 10 und 100 mg/kg KG feststellbar, die Expression war bei den männlichen Tieren signifikant

gegenüber den weiblichen erhöht. CYP3A1 wurde in den weiblichen Tieren bei einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG signifikant induziert. Bei den männlichen Tieren wurde die Expression bei 1000 mg/kg KG hoch signifikant erhöht. Der Unterschied in einer Dosisgruppe zwischen den Geschlechtern war bei keiner Gesamtdosis signifikant.

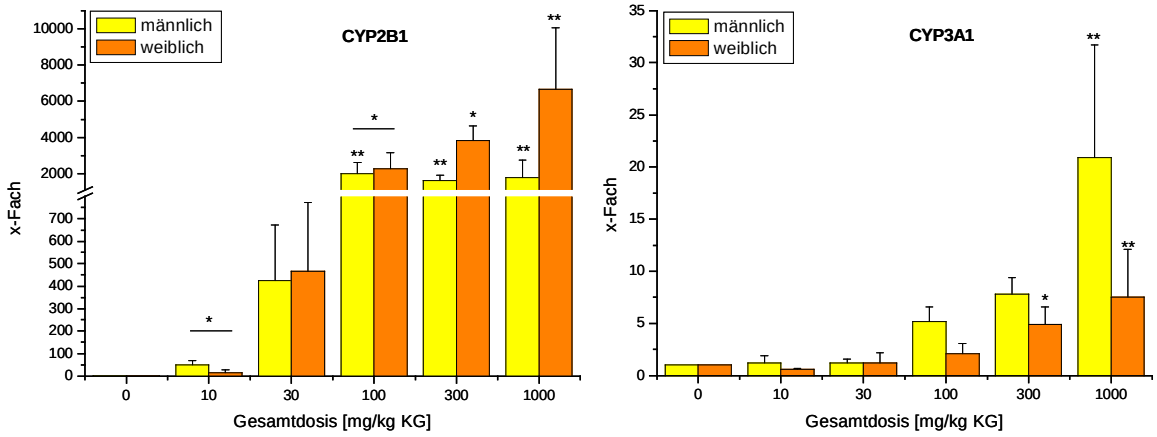


Abbildung 12 RT-PCR von CYP2B1 und CYP3A1, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180, adulte männliche und weibliche Ratten, 3≤n≤5, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen), , *=p<0,05, **=p<0,01

Die Verabreichung des NDL-PCB 52 verursachte dagegen eine hohe Induktion der CYP2B1-Expression. Abbildung 13 zeigt eine signifikante Erhöhung bei den Männchen ab einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG. Dagegen war die Induktion bei den Weibchen erst bei einer Gesamtdosis von 1000 mg/kg KG hoch signifikant. In zwei Dosisgruppen, 10 und 100 mg/kg KG, war die Induktion der CYP2B1-Expression in den Leberproben der Männchen signifikant höher als die bei den Proben der Weibchen. Die mRNA-Levels von CYP3A1 wurden nicht signifikant durch die Behandlung verändert. Des Weiteren konnte kein Unterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt werden.

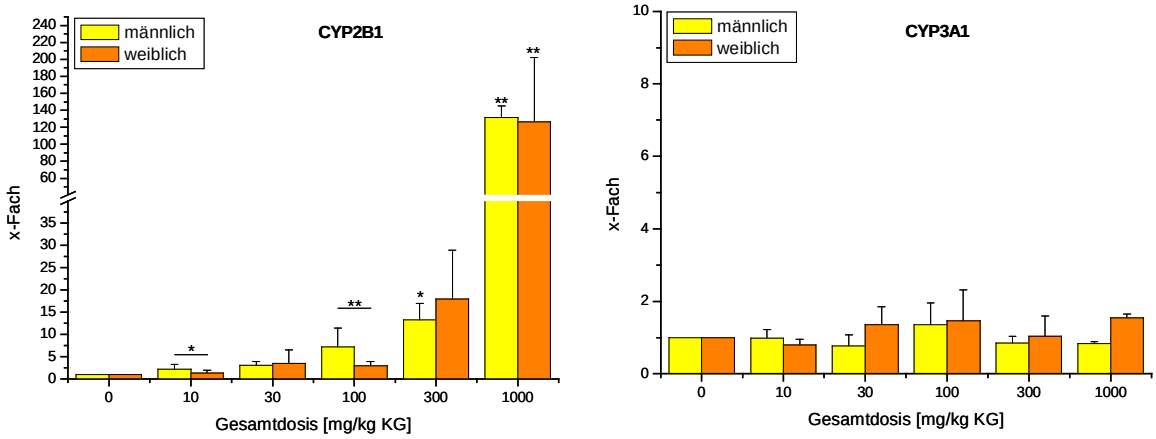


Abbildung 13 RT-PCR von CYP2B1 und CYP3A1, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 52, adulte männliche und weibliche Ratten, 4≤n≤5, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen), *=p<0,05, **=p<0,01

Die Expression von UGT1A1 und UGT1A6 wurde durch NDL-PCB 180 erhöht. Bei den männlichen Tieren war die Erhöhung von UGT1A1 ab einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG hoch signifikant, bei den weiblichen erst ab 1000 mg/kg KG (Abbildung 14). Der Unterschied zwischen den Geschlechtern war bereits bei der geringen Gesamtdosis von 10 mg/kg KG signifikant, die Expression war bei den männlichen Tieren höher als bei den weiblichen. Bei den höheren Gesamtdosen von 300 und 1000 mg/kg KG war der Unterschied hoch signifikant. Die Expression von UGT1A6 wurde in den weiblichen Tieren erst bei einer Gesamtdosis von 1000 mg/kg KG hoch signifikant erhöht, in den männlichen Tieren war dies bereits bei 100 mg/kg KG der Fall. Die Expression bei den männlichen Tieren war bei einer Gesamtdosis von 100 und 300 mg/kg KG signifikant und bei 1000 mg/kg KG hoch signifikant höher als die der weiblichen Tiere.

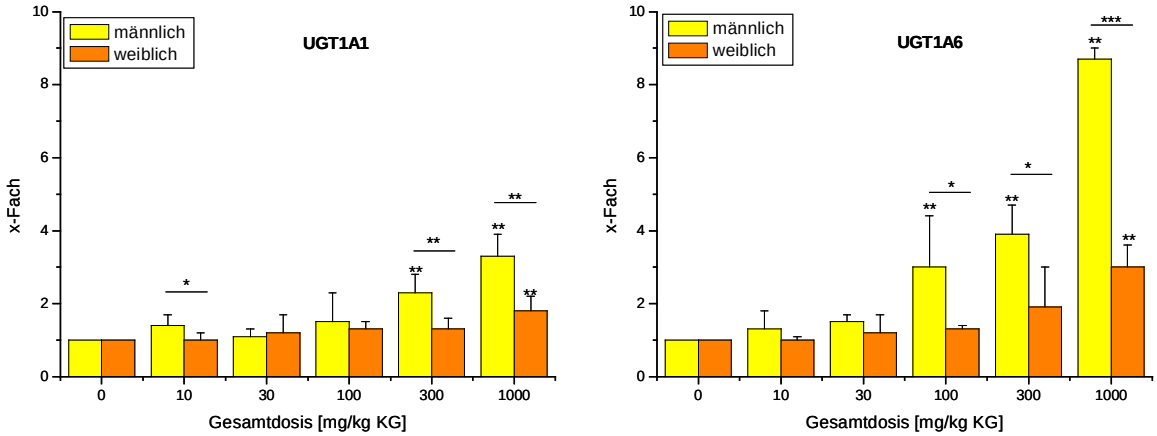


Abbildung 14 RT-PCR von UGT1A1 und UGT1A6, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180, adulte männliche und weibliche Ratten, Kontrollgruppe auf 1 normiert, n=5, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen), *=p>0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001

Die mRNA-Levels der Phase-II-Enzyme UGT1A1 und UGT1A6 wurden durch die Gabe von NDL-PCB 52 nicht verändert (Abbildung 15). Allein bei einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG wurde bei den Männchen die Expression von UGT1A6 signifikant erhöht. Bei Vergleich der Geschlechter konnte man eine höhere Induktion bei den Männchen beobachten, jedoch war dieser Unterschied nur bei einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG signifikant.

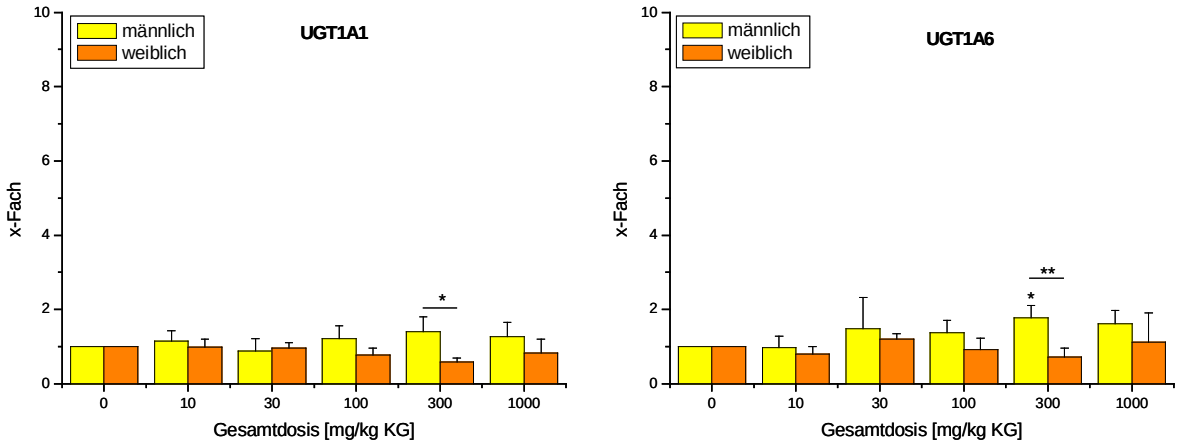


Abbildung 15 RT-PCR von UGT1A1 und UGT1A6, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 52, adulte männliche und weibliche Ratten, n=5, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen), *=p<0,05, **=p<0,01

IV.1.1.2. Proteinanalyse

Um die auf Genexpressionsebene erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen wurde die Änderung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Enzyme in den Leberproben mittels Western Blot-Methode bestimmt. Hierfür wurden aus den Leberproben Mikrosomen isoliert. Daraufhin wurde ein Pool aus jeweils fünf Tieren pro Gruppe so hergestellt, dass der Anteil jedes Tiers in jeder Probe gleich groß war. Aus diesen Pools wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein für jede Elektrophorese verwendet. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot pro Enzym und Geschlecht. Das Protein VDAC1 (*Voltage Dependent Anion Chanel 1*) diente als Ladungskontrolle.

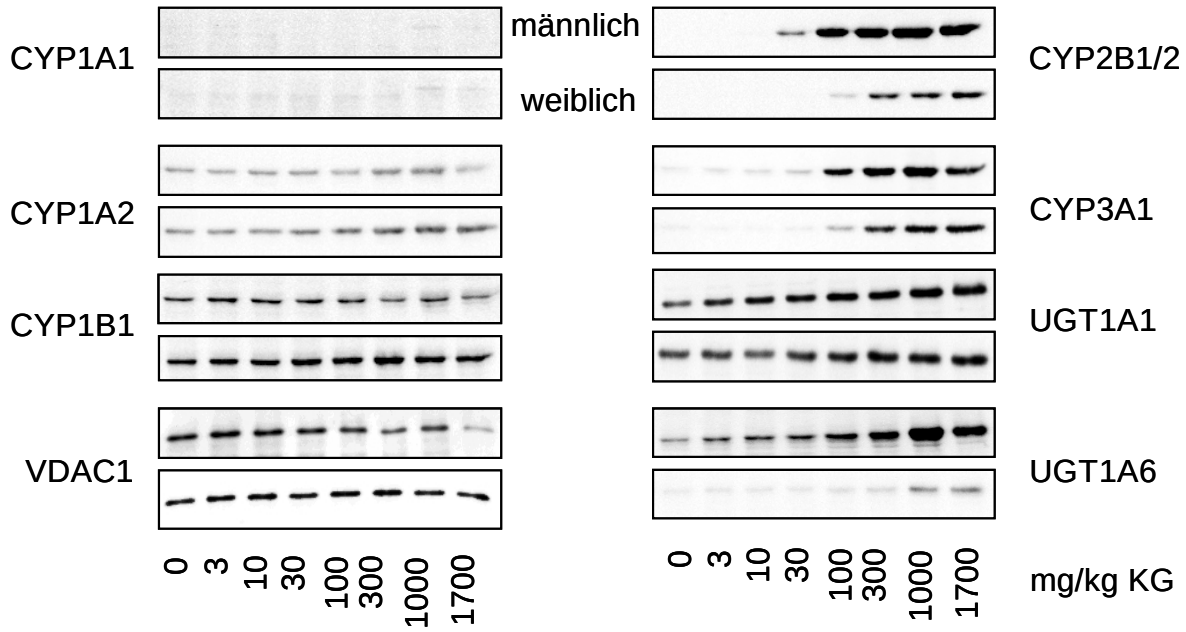


Abbildung 16 Repräsentative Western Blots, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180, adulte männliche und weibliche Ratten, 10 µg Mikrosomen pro Bande, VDAC1 diente als Ladungskontrolle

Abbildung 16 zeigt repräsentative Western Blots der Mikrosomenpools der NDL-PCB 180 Studie. Die Proteinkonzentration der Ladungskontrolle VDAC1 in den einzelnen Proben war nahezu konstant. Die CYP1A1-Proteinlevels wurden nicht durch die Behandlung verändert. Bei CYP1A2 war eine leichte dosisabhängige Erhöhung der Proteinkonzentration bei den weiblichen Tieren in den höheren Gesamtdosen zu erkennen. CYP1B1 blieb unverändert. Betrachtet man die Western Blots von CYP2B1/2 sieht man eine deutliche dosisabhängige Erhöhung der Proteinlevel bei beiden Geschlechtern. Beim Vergleich der männlichen Tiere mit den weiblichen zeigten die männlichen Tiere bei kleineren Gesamtdosen eine deutlichere dosisabhängige Erhöhung der Proteinlevels. Diese

Beobachtung konnte auch bei den Proteinlevels von CYP3A1 und UGT1A6 gemacht werden. Der UGT1A1-Blot zeigte nur eine leichte Erhöhung der Proteinlevels. Der Geschlechterunterschied war auch nicht so ausgeprägt wie bei CYP2B1/2, trotzdem konnte bei den männlichen Tieren ein leicht stärkerer Trend beobachtet werden.

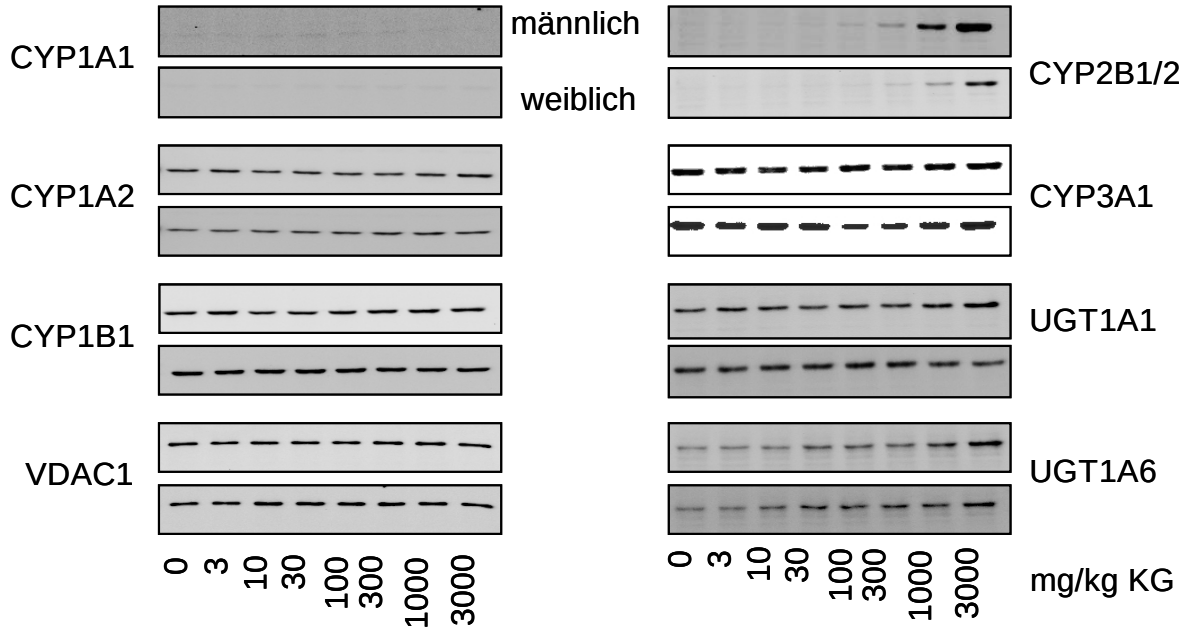


Abbildung 17 Repräsentative Western Blots, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 52, adulte männliche und weibliche Ratten, 10 µg Mikrosomen pro Bande, VDAC1 dient als Ladungskontrolle

Die Effekte die durch die Behandlung mit NDL-PCB 52 auf Proteinebene hervorgerufen wurden zeigt Abbildung 17. Die Western Blots von CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP3A1 und UGT1A1 wiesen keine Veränderung der Proteinkonzentration in den Leberproben auf. Bei dem Blot von UGT1A6 konnte eine leichte Induktion bei beiden Geschlechtern gezeigt werden, wobei der Effekt bei den Männchen ausgeprägter zu sein scheint. Einzig der Blot von CYP2B1 zeigt eine klare Induktion der Proteinmenge. Ab einer Gesamtdosis von 100 mg/kg KG stieg die Intensität der Banden bei den männlichen Tieren stetig an, wogegen die Intensität Banden bei den Weibchen erst ab einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG erhöht war.

IV.1.1.3. Enzymaktivität

Um die metabolische Aktivität von CYP1- und CYP2b-Enzymen zu ermitteln wurde die Enzymaktivität der Leberproben nach einer modifizierten Methode von Kennedy und Jones bestimmt. Hierfür wurden die isolierten Lebermikrosomproben in eine 96 Well-Platte gegeben und nach Zugabe von Substrat und Kofaktoren gemessen. Als Substrate dienten 7-

Ethoxyresorufin (CYP1-Aktivität, EROD) bzw. 7-Pentoxyresorufin (CYP2B-Aktivität, PROD). Die Substrate wurden durch die jeweiligen Enzyme zu dem fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Anschließend wurde die Menge des entstandenen Resorufins, ermittelt durch eine externe Resorufin-Kalibriergrade ermittelt, auf die Proteinmenge bezogen und durch die Reaktionszeit geteilt. Die Aktivität wurde demnach in pmol/(mg min) angegeben (Kennedy and Jones, 1994). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

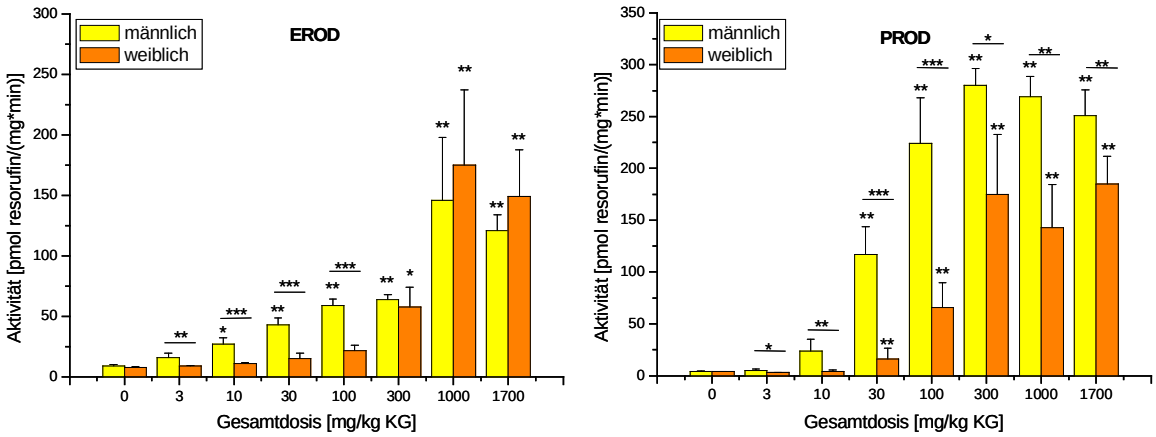


Abbildung 18 EROD- und PROD-Aktivität. 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180, adulte männliche und weibliche Ratten, n=5, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen), *=p<0,05, **=p<0,01, *=p0,001**

Durch die Behandlung mit NDL-PCB 180 wurde die Aktivität der Phase I Enzyme CYP1 und CYP2B hoch signifikant induziert (Abbildung 18). In den männlichen Tieren fand bereits bei einer Gesamtdosis von 10 mg/kg KG eine signifikante Erhöhung der EROD-Aktivität statt. Bei den weiblichen Tieren stieg die Aktivität erst ab einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG signifikant über die der Kontroll-Gruppe. Die EROD-Aktivität der männlichen Tiere war bei den unteren Gesamtdosen von 3 bis 100 mg/kg KG hoch bis extrem signifikant höher über der Aktivität der weiblichen Tiere. Bei höheren Dosen näherten sich die Aktivitäten wieder an.

Betrachtet man die PROD-Aktivität war dieser Unterschied zwischen den Geschlechtern ausgeprägter (Abbildung 18). Die PROD-Aktivität der männlichen Tiere war in jeder Behandlungsgruppe signifikant bis extrem signifikant höher. Bei beiden stieg die PROD-Aktivität bei einer Gesamtdosis von 30 mg/kg KG signifikant über die Grundaktivität der Kontrollgruppe.

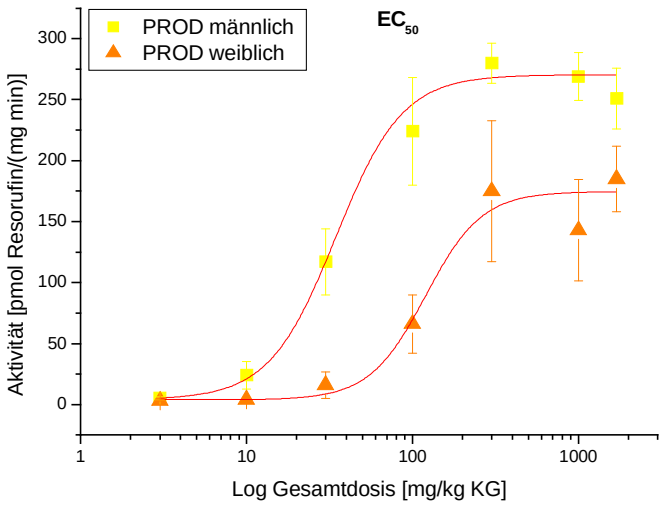


Abbildung 19 EC_{50}-Ermittlung für PROD-Aktivität, 28 Tages-Studie, NDL-PCB 180, adulte männliche und weibliche Ratten, n=5

In Abbildung 19 wurde der EC_{50}-Wert für die PROD-Aktivität männlicher und weiblicher Tiere ermittelt die mit NDL-PCB 180 behandelt wurden. Hierfür wurde die Gesamtdosis logarithmisch gegen die Aktivität aufgetragen und sigmoidal gefittet. Der Wert bei der die Aktivität um 50% angestiegen ist wird als EC_{50}-Wert bezeichnet. Für die PROD-Aktivität der männlichen Tiere wurde ein EC_{50}-Wert von 34,5 ± 4,2 mg/kg KG ermittelt und für die Weibchen einen Wert von 120 ± 46,7 mg/kg KG. Für die EROD-Aktivität konnte kein EC_{50}-Wert ermittelt werden. Das selbe gilt auch für die Tiere die mit NDL-PCB 52 behandelt wurden.

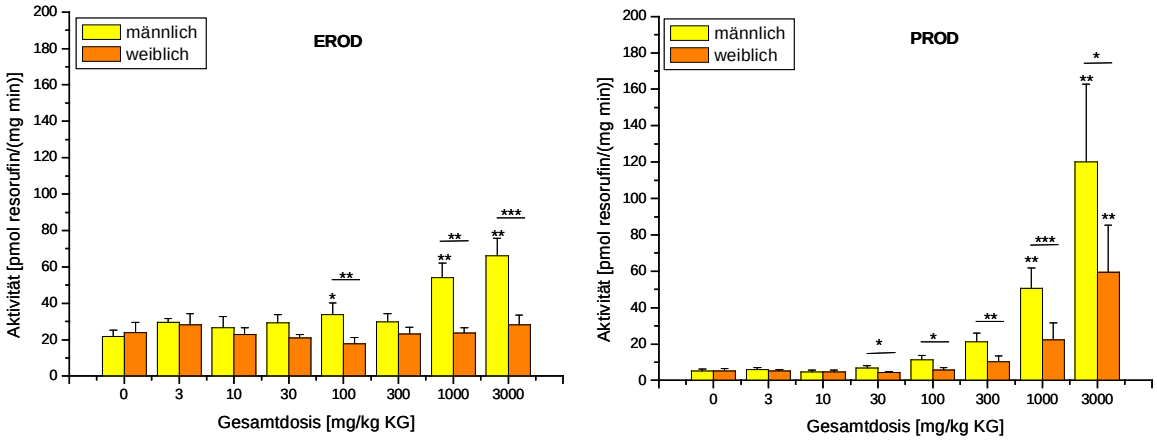


Abbildung 20 EROD- und PROD-Aktivität. 28 Tages-Studie, NDL-PCB 52, adulte männliche und weibliche Ratten, n=5, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen), *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001

Die Verabreichung von NDL-PCB 52 verursachte eine schwache Induktion der EROD-Aktivität in der Leber der Ratten (Abbildung 20). Bei den weiblichen Tieren stieg die Aktivität jedoch nicht auf ein signifikantes Niveau. Bei den Männchen stieg sie ab einer Gesamtdosis von 100 mg/kg KG signifikant an. Die EROD-Aktivität in der Leber der Männchen war ab einer Gesamtdosis vom 100 mg/kg KG signifikant höher als bei den Weibchen.

Die PROD-Aktivität war ab einer Gesamtdosis von 1000 mg/kg KG hoch signifikant in den Lebermikrosomen der Männchen erhöht. Bei den Weibchen war dies erst bei der höchsten Gesamtdosis von 3000 mg/kg KG der Fall. Der Unterschied zwischen Männchen und Weibchen zeigte sich ausgeprägter als bei der EROD-Aktivität. Ab einer Gesamtdosis von 30 mg/kg KG lag die PROD-Aktivität in den Mikrosomen der Männchen stetig signifikant über der der weiblichen Proben.

IV.1.2. Perinatal-Studie

Für die Perinatal-Studie wurden schwangere Ratten mit in Maiskeimöl gelöstem NDL-PCB 180 per Schlundsonde behandelt. Die Gesamtdosen betrugen 0, 10, 30,100, 300 und 1000 mg/kg KG und wurden auf vier Einzeldosen verteilt. Bei NDL-PCB 52 betrugen die Gesamtdosen 0, 30,100, 300, 1000 und 3000 mg/kg KG und wurden auf 10 Einzeldosen verteilt. Im Gegensatz zu der NDL-PCB 180 Studie, wurden dem Muttertier auch nach der Geburt der Nachkommen noch Einzeldosen verabreicht, bis PND21 (*post natal day*). Die Würfe wurden gleichmäßig auf die Muttertiere aufgeteilt, so dass abgegebne Milchmenge bei

jedem Muttertier gleich war. Jedes Muttertier hatte 4 männliche und 4 weibliche Nachkommen zu versorgen. Die Stilldauer betrug 28 Tage (PND28). Die Tötung der Jungtiere fand zu drei bestimmten postnatalen Zeitpunkten statt, nämlich PND7, 35 und 84. Dabei wurde neben anderen Organen - die von Projektpartnern untersucht wurden - auch die Leber entnommen und tiefgefroren. Aus den tiefgefrorenen Leberstücken wurden Mikrosomen isoliert und für die Enzymaktivitätsmessung verwendet. Weitere Details zu der Studie stehen im Kapitel Methoden und Material.

Die Perinatal-Studien dienten dazu den Einfluss der hochreinen NDL-PCBs auf die fötale Entwicklung, durch transplazentalen Transport zu bestimmen. Zusätzlich durch die späteren Tötungszeitpunkte konnten auch die Effekte die durch die Exposition der Jungtiere, durch die Muttermilch bedingt sind, ermittelt werden. Ferner sollten die Unterschiede zwischen den Geschlechtern gezeigt werden. Mehrere Partner aus dem Projekt untersuchten die unterschiedlichsten Parameter. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Enzymaktivität von Leberproben bestimmt um so die Effekte auf fremdstoffmetabolisierende Proteine zu ermitteln.

IV.1.2.1. Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wurde nach einer modifizierten Methode von Kennedy und Jones bestimmt. Hierfür wurde aus den Leberproben der Perinatal-Studie Mikrosomen isoliert und wie bereits in Kapitel IV.1.1.3 beschrieben inkubiert und vermessen (Kennedy and Jones, 1994).

IV.1.2.1.1. NDL-PCB 180

Abbildung 21 zeigt die gemessene EROD-Aktivität der Leberproben der Jungtiere. Die Aktivität stieg erst bei einer Gesamtdosis von 1000 mg/kg KG hoch signifikant über die der Kontroll-Gruppe an. Die EROD-Aktivität der PND7-Gruppe war sichtlich am höchsten und nahm bis PND84 deutlich ab.

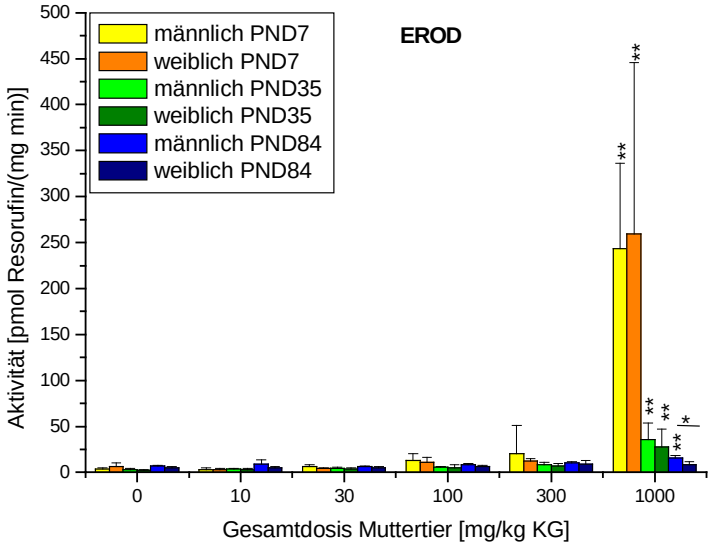


Abbildung 21 Vergleich der EROD-Aktivität von hepatischen Mikrosomen der Perinatal-Studie mit NDL-PCB 180, 4≤n≤7, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen), *=p<0,05, **=p<0,01, (PND = *post natal day*)

Wird die PROD-Aktivität betrachtet zeigt sich ein anderes Bild (Abbildung 22). An PND7 stieg die PROD-Aktivität der männlichen Jungtiere bereits bei einer Gesamtdosis von 100 mg/kg KG hoch signifikant an, bei den weiblichen ab einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG. Bei den ältern Jungtieren der PND35-Gruppe stieg die PROD-Aktivität beider Geschlechter ab einer Gesamtdosis von 30 mg/kg KG hoch signifikant an. Die PROD-Aktivität der ältesten Tiere, PND 84, war erst bei der höchsten Gesamtdosis hoch signifikant erhöht. Hierbei muss die Aktivität der ältesten Kontrollgruppe berücksichtigt werden, die hoch signifikant über der der PND7 Tiere lag. Bei den ältesten Tieren zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern. Bei 300 mg/kg KG war die Aktivität der männlichen Jungtiere hoch signifikant höher als die der weiblichen Jungtiere, bei der höchsten Dosis waren die Unterschiede sogar extrem signifikant. In der PND35-Gruppe (10 mg/kg KG) ist die Aktivität der Leberproben der Männchen signifikant höher als die der Weibchen .

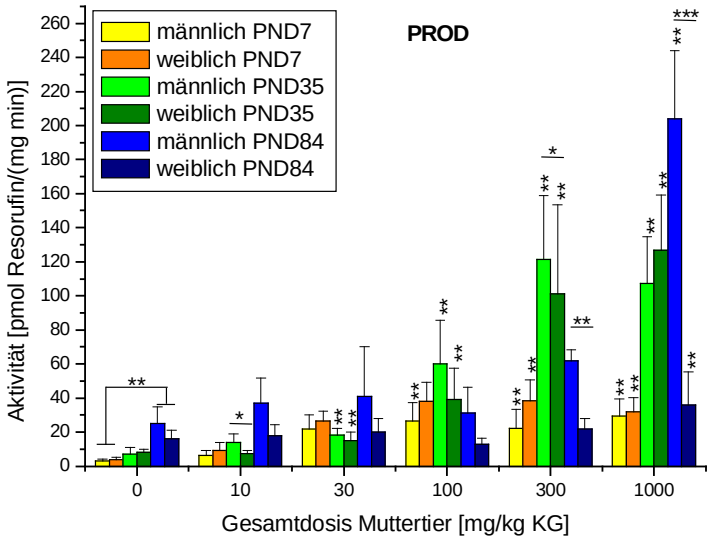


Abbildung 22 Vergleich der PROD-Aktivität von hepatischen Mikrosomen der Perinatal Studie mit NDL-PCB 180, 4≤n≤7, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen), *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001, (PND = *post natal day*)

IV.1.2.1.2. NDL-PCB 52

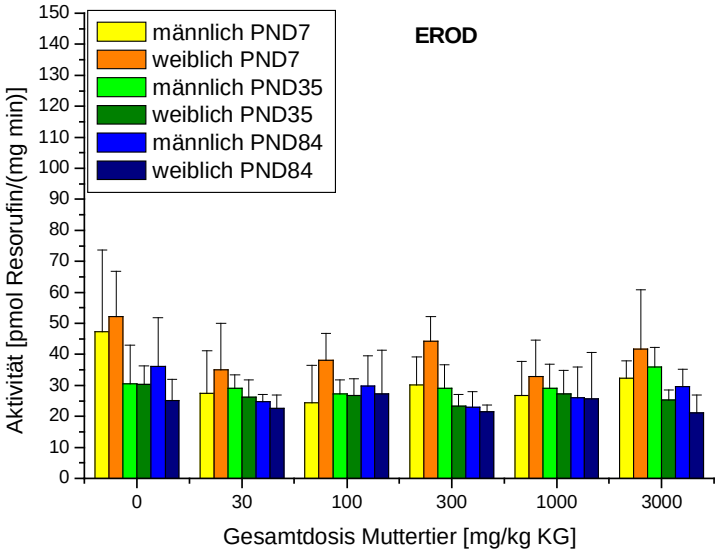


Abbildung 23 Vergleich der EROD-Aktivität von Leberproben der Perinatal Studie mit NDL-PCB 52, 4≤n≤7, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen), (PND = *post natal day*)

Trotz der langen Behandlungsdauer der Muttertiere zeigte die EROD-Aktivität bei den Jungtieren keine Veränderung (Abbildung 23). Die Abbildung 24 zeigt jedoch eine klare Erhöhung der PROD-Aktivität bei den Säuglingen der PND7-Gruppe. Bei den männlichen Säuglingen war dies erst ab einer Gesamtdosis von 1000 mg/kg KG der Fall. Ab einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG war die PROD-Aktivität der weiblichen Tiere signifikant höher als die der Männchen. Nach dem Ende der PCB-Behandlung (PND21) fiel die PROD-Aktivität auf die Werte der Kontrollgruppe zurück. Die Jungtiere der PND35-Gruppe zeigten bereits keine signifikante Aktivität mehr.

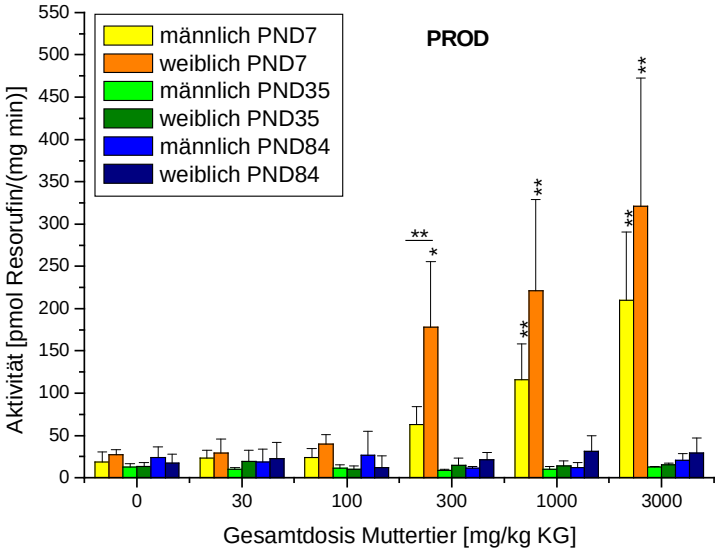


Abbildung 24 Vergleich der PROD-Aktivität von Leberproben der Perinatal Studie mit NDL-PCB 52, 4≤n≤7, Mittelwert plus Standardabweichung, one-way ANOVA mit Dunnett's post-Test (bei Konzentrationsverlauf, bezogen auf die Kontrollgruppe (0 mg/kg KG)), one-tailed unpaired Student's t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen), *=p<0,05, **=p<0,01, (PND = *post natal day*)

IV.1.3. Zusammenfassung und Diskussion der Ratten-Studien

Bei den Ratten-Studien wurden hochreine NDL-PCBs 52 und 180 verwendet. Die Gesamtdosen bei den adulten Ratten der 28 Tage-Studie betrugen 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 1700 mg/kg KG und bei NDL-PCB 52 die folgenden 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 und 3000 mg/kg KG. Die Perintal-Studie wird weiter unten diskutiert.

Beide NDL-PCBs gehören zu den 6 Indikator-PCBs. NDL-PCB 52 ist ein niedrigchloriertes PCB mit vier Chlorsubstituenten an den Positionen 2,2',5 und 5' und mit einer TEQ_{WHO}-Verunreinigung von 0,5 ng/g. Das NDL-PCB 180 hat sieben Chlorsubstituenten an den Positionen 2,2',3,4,4',5 und 5' und zählt zu den hochchlorierten PCBs. Bei NDL-PCB 180 wurde eine TEQ_{WHO}-Verunreinigung von 2,7 ng/g ermittelt.

Die 28 Tage-Studie hatte das Ziel subakute Effekte hochreiner NDL-PCBs auf ausgewählte Leberenzyme, wie CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2B1, CYP3A1, UGT1A1 und UGT1A6, zu untersuchen und so in Verbindung mit anderen Daten von Kooperationspartner einen möglichen Wirkmechanismus zu bestimmen. Es gibt wenige vorangegangene Studien die mit Einzelkongeneren durchgeführt wurden. Die meisten Veröffentlichungen testeten technische Gemische. Erschwerend kommt hinzu, dass bei den Studien mit Einzelkongeneren nicht auf die DL-Verunreinigung geachtet wurde und so eine Charakterisierung der Effekte der NDL-PCBs schwierig war.

In unserem Arbeitskreis wird eine Veröffentlichung über die Rattenstudie mit NDL-PCB 180 vorbereitet. Nach den 28 Tagen wurde ein Anstieg der relativen Lebergewichte beobachtet, jedoch gab es keine signifikante Zunahme des Körpergewichtes. Außerdem wurden keine erhöhte Werte des Serum ALT- (Alanin Aminotransferase) und ALP-(Alkalische Phosphatase)Wertes gemessen, was darauf hinweist, dass es innerhalb der 28 Tagen zu keiner Schädigung der Leber kam. Die histopathologischen Untersuchungen stellten jedoch eine erhöhte Häufigkeit von zentrilobularer Hypertrophie in der Leber fest, die bei den Männchen ausgeprägter war. Eine Hypertrophie ist eine Zunahme des Zellvolumens ohne Proliferation der Zellen. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass es innerhalb der 28 Tage zu adaptiven Änderungen in der Leber kam (Roos *et al.*, NDL-PCB 180). Bei einer zwei Jahres-Studie mit Aroclor 1242 und 1260 wurden ebenfalls keine erhöhten ALT- und ALP-Werte gemessen. Ebenfalls wurde eine hohe Häufigkeit von zentrilobularer Hypertrophy der Leber beobachtet (Mayes *et al.*, 1998).

Eine ähnliche Veröffentlichung über das NDL-PCB 52 ist auch in Vorbereitung in unserem Arbeitskreis. Bei NDL-PCB 52 waren die Effekte weniger ausgeprägt. Die rel.

Lebergewichte waren erhöht, die Körpergewichte nicht. Doch es wurde keine zentrilobulare Hypertrophie festgestellt (Roos *et al.*, NDL-PCB 52).

In Tabelle 8 und Tabelle 9 sind alle Ergebnisse der 28 Tage-Studien schematisch zusammengefasst.

Tabelle 8 Schematische Zusammenfassung der mRNA- und Protein-Ergebnisse der 28 Tage-Studien mit adulten Ratten, NDL-PCB 52 und NDL-PCB 180

	mRNA				Protein			
	NDL-PCB 52		NDL-PCB 180		NDL-PCB 52		NDL-PCB 180	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
CYP1A1	→	→	→	→	→	→	→	→
CYP1A2	→	→	→	→	→	→	→	→
CYP1B1	→	→	→	→	→	→	→	→
CYP2B1a	↑	↑	↑	↑	↑↑	↑	↑↑	↑
CYP3A1	→	→	↑↑	↑	→	→	↑↑	↑
UGT1A1	→	→	↑↑	↑	→	→	↑	↑
UGT1A6	→	→	↑↑	↑	→	→	↑↑	↑

a.) bei Protein CYP2B1/2

„→“ kein Anstieg der Expression

„↑“ Erhöhung der Expression

Da es über die Genexpression und NDL-PCB 180 keine Veröffentlichungen gibt, werden im Rahmen dieser Arbeit die Expression mit NDL-PCB 153 vergleichen. NDL-PCB 153 ist auch ein PCB der Σ6PCB und ist sechsfach chloriert (2,2',4,4',5,5'), hat also ein ähnliches Substitutionsmuster wie NDL-PCB 180. Die Arbeitsgruppe von Vezina analysierte 2004, mittels RT-PCR und Microarray, Proben aus einer NTP-Studie mit NDL-PCB 153 (Vezina *et al.*, 2004). Weiblichen Sprague-Dawley Ratten wurden Dosen von 0 bis 1000 µg/kg KG pro Tag verabreicht und nach 5 Tagen die Leber entnommen. Die RT-PCR und die Microarray Experimente zeigten keine Induktion der CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 durch PCB 153, CYP2B1 jedoch wurde hoch induziert. Dies bestätigt die hier vorgestellten Ergebnisse für die mRNA-Expression aus Tabelle 8. NDL-PCB 153 und auch NDL-PCB 180 sind demnach keine Liganden des AhR aber durch die Induktion von CYP2B1 Induktoren von CAR. Jedoch wurde UGT1A6 bei der Analyse von Vezina nicht induziert. Dies könnte daran liegen, dass die NTP-Studie nur 5 Tage dauerte und die höchste Gesamtdosis über die 5 Tage nur 5 mg/kg KG betrug. Im Rahmen der aktuellen Studie wurde UGT1A6 erst ab einer Gesamtdosis von 100 mg/kg KG über 28 Tage signifikant induziert.

Das bei Vezina *et al.* mitgetestete TCDD induzierte die UGT1A6-Expression auch nur gering. Die möglichen Rezeptoren die bei der Regulation der Expression von UGT1A6 eine Rolle spielen sind CAR und AhR. Bei UGT1A1, das in der Studie von Vezina nicht analysiert wurde, sind CAR und PXR die möglichen regulierenden Rezeptoren (Xie *et al.*, 2003; Shelby and Klaassen, 2006). Da im aktuellen Tierversuch die CYP3A1-Expression hoch induziert wurde, dessen Regulation primär über den PXR abläuft, lässt vermuten, dass NDL-PCB 180 ein Mixtyp-Induktor von CAR und PXR ist aber kein AhR-Ligand, hinsichtlich dem Mangel einer AhR vermittelter Induktion von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1. Diese Vermutung wird durch die UGT-Expressionen unterstützt.

Bei NDL-PCB 52 zeigt sich ein ähnliches Bild bis auf die fehlende Induktion von CYP3A1 und den UGTs. Dies lässt vermuten, dass NDL-PCB 52 ein reiner CAR-Induktor ist. Betrachtet man die Potenz der CYP2B1-Induktion ist die Affinität von NDL-PCB 52 zu CAR viel geringer als die von NDL-PCB 180. Dies könnte an der geringeren Halbwertszeit von NDL-PCB 52 (1-2 Tage, dagegen NDL-PCB 180 ca. 100 Tage) liegen. Außerdem wurde bei niedrigchlorierten PCBs öfters eine schnellere Metabolisierung beobachtet (Tanabe *et al.*, 1981; Öberg *et al.*, 2002). Bei einer anderen Studie war NDL-PCB 52 nach einer vier wöchigen Behandlung (Gesamtdosis Aroclor 1254 600 mg/kg KG) in der Leber nicht mehr nachweisbar, NDL-PCB 180 dagegen konnte noch nachgewiesen werden (Kodavanti *et al.*, 1998).

Die Trends auf der Proteinebene bestätigen die RT-PCR-Resultate. Die Western Blots zeigen klar einen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren. CYP2B1/2, CYP3A1 und UGT1A6 wurden in den Lebermikrosomen der männlichen Tiere durch NDL-PCB 180 höher induziert als in den Weibchen. Bei NDL-PCB 52 konnte dies nur für CYP2B1/2 gezeigt werden, da die anderen Proteine keine Veränderung aufwiesen. Dies könnte darauf zurück zuführen sein, dass in den männlichen Ratten CAR in der Leber höher exprimiert wird als in den weiblichen Tieren (Slitt *et al.*, 2006).

Tabelle 9 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der EROD- und PROD-Aktivität von der 28 Tage-Studie mit NDL-PCB 52 und NDL-PCB 180

	NDL-PCB 52		NDL-PCB 180	
adult	♂	♀	♂	♀
EROD	↑ 100a	→	↑ 10a	↑ 300a
PROD	↑↑ 1000a	↑ 3000a	↑↑ 30a	↑ 30a
EC_{50}(PROD)	-	-	34,5 ± 4,2b	120,0 ± 46,7b

a.) Gesamtdosis bei der die erste Signifikanz berechnet wurde in mg/kg KG

b.) EC_{50}-Wert in mg/kg KG

„→" kein Anstieg der Expression

„↑" Erhöhung der Expression

In Tabelle 9 sind die EROD- und PROD-Aktivtäten schematisch dargestellt. Die PROD-Aktivität bestätigt die Ergebnisse der mRNA-Expression und der Proteinmengen von CYP2B1/2. Die absolute PROD-Aktivität die durch NDL-PCB 52 verursacht wurde ist ca. zweifach geringer als die, die durch die Behandlung mit NDL-PCB 180 induziert wurde (Abbildung 18, Abbildung 20). Dies bestätigte Ergebnisse von Connor at al. aus dem Jahr 1995. Diese Arbeitsgruppe hatte eine ca. vierfach höhere PROD-Aktivtät bei NDL-PCB 180 gemessen als bei NDL-PCB 52 (Connor *et al.*, 1995). Des Weiteren ist der Geschlechtsunterschied wieder zu beobachten. Die ermittelten EC_{50}-Werte der PROD-Aktivitäten zeigen, dass die Männchen empfindlicher reagieren als Weibchen (34,5 ± 4,2 gegenüber 120,0 ± 46,7 mg/kg KG). Im Gegenzug wurde bei einer Studie mit TCDD behandelten Ratten, mit Gesamtdosen von 0 bis 170 µg/kg KG über 28 Tage, festgestellt, dass eher die Weibchen sensitiver reagieren, was auf den nicht-dioxinartigen Charakter der NDL-PCBs hinweist (Viluksela *et al.*, 2000). Für die durch NDL-PCB 53 verursachte PROD-Aktivität konnten kein EC_{50}-Wert ermittelt werden. Außerdem konnten bei beiden PCBs keine EC_{50}-Werte für die EROD-Aktivität berechnet werden.

Die erhöhte EROD-Avtivität bei NDL-PCB 180 steht im Kontrast zu der mangelnden Erhöhung der CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 Genexpression. Der leichte Anstieg von CYP1A2 auf der Proteinebene bei einer Gesamtdosis von 300 mg/kg KG bei den Männchen kann die signifikante Erhöhung der EROD-Aktivität bei 10 mg/kg KG nicht erklären. Die DL-Kontamination von NDL-PCB 180 von 2,7 ng TEQ/g wird nicht als Ursache angenommen. Wird die tägliche TEQ-Dosis bei der Gesamtdosis von 10 mg PCB 180/kg KG berechnet, so wurde den Tieren eine Menge von 0,0007 ng TEQ/kg KG pro Tag verabreicht. Viluksela *et al.* stellten in einer TCDD-Studie mit Ratten fest, dass erst bei einer Dosis von

0,7 ng TEQ/kg KG pro Tag die EROD-Aktivität in der Leber induziert wurde (Viluksela *et al.*, 2000).

Eine mögliche Erklärung ist, dass es eine Überschneidung der EROD- und PROD-Aktivitäten gab. Burke *et al.* berichteten 1994, dass bei Ratten die mit Phenobarbital behandelt wurden, das Substrat 7-Ethoxyresorufin nicht explizit als Substrat für CYP1A diente (Burke *et al.*, 1994). Eine andere Möglichkeit wäre ein post-transkriptioneller Mechanismus, der für die Induktion von CYP1A-Enzyme durch aromatische Chemikalien diskutiert wurde (Zacharova *et al.*, 2003).

Die Perinatal Studie sollte den Transfer der NDL-PCBs 52 und 180 durch die Plazenta und nach der Geburt über die Milch simulieren. Für diese Studie wurden folgenden Gesamtdosen verwendet. Bei NDL-PCB 180: 0, 10, 30,100, 300 und 1000 mg/kg KG, die auf vier Einzeldosen verteilt wurden. Bei NDL-PCB 52 betrugen die Gesamtdosen 0, 30,100, 300, 1000 und 3000 mg/kg KG und wurden auf 10 Einzeldosen verteilt. Im Gegensatz zu der NDL-PCB 180 Studie, bei der die Einzeldosen an den Schwangerschaftstagen 16-19 verabreicht wurden, wurde den Muttertieren auch nach der Geburt der Nachkommen bis zu PND21 Einzeldosen verabreicht, bis PND21. In Tabelle 10 sind diese Ergebnisse schematisch zusammengefasst.

Tabelle 10 Schematische Zusammenfassung EROD- und PROD- Aktivitäten der Perinatal-Studien mit NDL-PCB 52 und NDL-PCB 180

	NDL-PCB 52						NDL-PCB 180					
Perinatal	♂			♀			♂			♀		
PNDa	7	35	84	7	35	84	7	35	84	7	35	84
EROD	→	→	→	→	→	→	↑↑↑	↑	↑	↑↑↑	↑	→
PROD	↑↑	→	→	↑↑	→	→	↑	↑↑	↑↑↑	↑	↑↑	↑↑

a.) *Post Natal Day*

„→“ kein Anstieg der Expression

„↑“ Erhöhung der Expression

Bei der Induktion der Enzym-Aktivität durch NDL-PCB 52 und 180 zeigten sich große Unterschiede. Wo NDL-PCB 52 die EROD-Aktivtät in keiner Gruppe induzierte, war durch die Behandlung mit der höchsten Gesamtdosis an NDL-PCB 180 die EROD-Aktivität in der PND7-Gruppe hoch induziert. Die PROD-Aktivität stieg dagegen bei NDL-PCB 180 nach der Geburt zeit- und dosisabhängig kontinuierlich an, wobei der Trend für die Männchen ausgeprägter war. Bei NDL-PCB 52 war dies nur der Fall für die säugende Gruppe der PND7-

Tiere. Bei späteren Zeitpunkten (PND35 und PND 84) war die PROD-Aktivität nicht induziert.

Es muss beachtet werden, dass die Behandlung mit NDL-PCB 52 bis 21 Tage nach der Geburt durchgeführt wurde (PND21). Wegen der kurzen Halbwertszeit von NDL-PCB 52 (1-2 Tage (Öberg *et al.*, 2002)), kann man davon ausgehen, dass nach der Applikation das PCB schnell wieder ausgeschieden wurde. Deswegen konnte nur bei der säugenden PND7-Gruppe ein Anstieg der PROD-Aktivität gemessen werden, da diese Tiere wegen der andauernden Behandlung, dem PCB über die Muttermilch ausgesetzt waren. Bei PND35 war die Behandlung bereits seit 14 Tagen vorbei und das meiste NDL-PCB 52 bereits ausgeschieden.

Bei NDL-PCB 180 ist die Datenlage anders. Dessen Halbwertszeit beträgt ca. 100 Tage und es wird größtenteils im Fettgewebe gespeichert (Öberg *et al.*, 2002). Die hohe EROD-Aktivität, die nur in der höchsten Behandlungsgruppe der PND7-Gruppe auftritt, könnte auf eine Sättigung des Organismus mit PCB 180 zurückzuführen sein. Es wurde berichtet, dass CAR und CYP2B1 nur in geringen Mengen in der fötalen Leber exprimiert werden, wogegen CYP1A1 hoch exprimiert wird. Daher könnte die EROD-Aktivität ein Ersatzmechanismus der fötalen Leber sein als Antwort auf die hohe Dosis NDL-PCB 180 (Borlakoglu *et al.*, 1993; Bonfanti *et al.*, 2009). Auffällig ist auch der signifikante Unterschied der Kontrollgruppen von PND7 und PND84, der die Ergebnisse von Borlakoglu *et al.* und Bonfanti *et al.* bestätigt. Jedoch konnte dieser Unterschied bei NDL-PCB 52 nicht beobachtete werden. Der dosis- und zeitabhängender Anstieg der PROD-Aktivität könnte auf die Einlagerung von NDL-PCB 180 im Fettgewebe zurückzuführen sein. Zur Produktion der Muttermilch werden die Fettreserven des Muttertiers mobilisiert und so auch das eingelagerte PCB. Die Aufnahme des NDL-PCB 180 über die Muttermilch scheint so hoch gewesen zu sein, dass sogar nach dem Absetzen der Jungtiere die PROD-Aktivität weiter anstieg.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass die Halbwertszeit bei den Effekten die ein PCB auf den Organismus einen wichtigen Einfluss haben. Die aktuellen Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, bestätigten die schnellere Ausscheidung von niedrigchlorierten PCBs, wie NDL-PCB 52. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass die Effekte die durch NDL-PCB 52 in der 28 Tage-Studie nicht so ausgeprägt waren und sich ausschließlich auf CAR vermittelte Effekte beschränkten. Außerdem könnte dies auch der Grund dafür sein, dass die Auswirkungen in der Perinatal-Studie so schnell wieder abgeklungen waren. Das hochchlorierte NDL-PCB 180 lagert sich länger im Körper ein und verursachte in der Perinatal-Studie nachhaltigere Effekte auf die PROD-Aktivität. Für NDL-

PCB 180 kann ein CAR/PXR vermittelten Mechanismus angenommen werden, basierend auf dessen Wirkspektrum.

IV.2. Maus-Studie

Die Versuche mit den C57BL/6NCrl-Mäusen wurden im Rahmen dieser Arbeit an der Technischen Universität von Kaiserslautern im Rahmen des ATHON-Projektes durchgeführt. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten. In einer Behandlungsgruppe waren sechs Tiere die im Alter von sechs Wochen bei der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bestellt worden. Die Applikation der in Maiskeimöl gelösten PCBs wurde per Schlundsonde durchgeführt. Die Dosis für NDL-PCBs betrug 20 mg/kg KG und die für das DL-PCB 126 200 µg/kg KG. Bei der Studie wurden drei unterschiedliche Expositionsdzeiträume gewählt, 1 Tag, 5 Tage, sowie 28 Tage. Weitere Details zu den Behandlungsschemen werden im Kapitel V Methoden und Material erläutert.

Die verwendeten NDL-PCBs wurden an der Universität von Umeå, Schweden auf dioxinartige Verunreinigungen geprüft und wenn nötig aufgereinigt (Danielsson *et al.*, 2008). Dabei wurde darauf geachtet, dass die TEQ_{WHO}-Werte unterhalb eines Niveaus lagen, bei dessen Wert noch keine Effekte durch Dioxin zu beobachten war (Tabelle 11).

Die Mausstudie sollte in erster Linie die Effekte von Niedrigdosen an NDL-PCBs auf die Genexpression und Enzymaktivität in der Leber zeigen. Zusätzlich diente die Studie zu einer möglichen Einteilung der NDL-PCBs nach ihrer Wirkungsweise. Ferner sollte die Studie auch die Unterschiede zwischen den Geschlechtern zeigen. Hierfür wurden Leberproben zu Projektpartnern geschickt, die unter anderem Microarray-Analysen durchführten.

Tabelle 11 Verwendete PCBs in der Maus-Studie unter Angabe des Chlorierungsgrades, der Chlorsubstitutionsstelle an den Phenylringen, der Reinheit und der dioxinartigen Verunreinigung angegeben in TEQ_{WHO}.

BZ Nr.	Cl-Position	Anzahl Cl	Reinheit	TEQ_{WHO} [ng/g]
28	2,4,4'	3	<99,9	40,9
52	2,2',5,5'	4	99,9	0,39
101	2,2',4,5,5'	5	99,4	0,79
126	3,3',4,4',5	5	98,9	-
138	2,2',3,4,4',5'	6	<99,9	11,90
153	2,2',4,4',5,5'	6	99,2	0,7
180	2,2',3,4,4',5,5'	7	98,9	0,3

IV.2.1. 1 Tag

Mit der Versuchsdauer von einem Tag sollte eine akute Wirkung einer niedrigen Dosis an NDL-PCBs auf die Lebergewichte, die Expression ausgewählter Gene und die Enzymaktivität untersucht werden. Die Tiere wurden per Schlundsonde behandelt und am folgenden Tag getötet, wobei die Leber entnommen und gewogen wurde.

IV.2.1.1. Relatives Lebergewicht

In Abbildung 25 sind die relativen Lebergewichte der einzelnen Gruppen dargestellt. Hierfür wurde das Lebergewicht auf das Körpergewicht des jeweiligen Tieres bezogen und in % des Körpergewichts angeben.

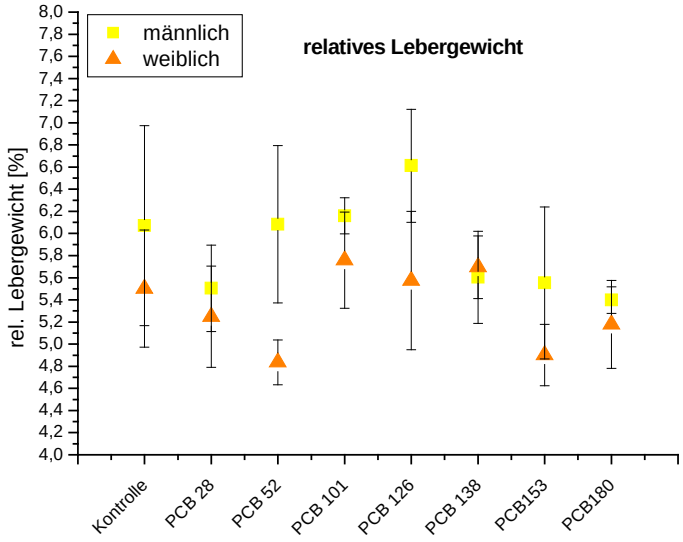


Abbildung 25 Relatives Lebergewicht männlicher und weiblicher Mäuse, absolutes Lebergewicht bezogen auf Körpergewicht, Versuchsdauer 1 Tag, Dosis NDL-PCB 20 mg/kg KG, DL-PCB 126 200 µg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, Mittelwert mit Standardabweichung, n=6, bezogen auf die Kontrollgruppe

Nach der Versuchdauer von einem Tag gab es keine signifikante Änderung der relativen Lebergewichte. Die hohen Standardabweichungen zeigen die natürlichen Unterschiede zwischen den Tieren.

IV.2.1.2. Genexpression

Auf mRNA-Ebene wurden Gene untersucht, die im Fremdstoffmetabolismus eine wichtige Rolle spielen. Außerdem wurden diese Gene gewählt um Rezeptor spezifische Wirkungen der PCBs zu ermitteln. Ein Effekt einer Substanz auf die Expression von CYP1A1 zeigt eine mögliche Bindung der Substanz an den AhR. CYP2B10 ist das murine Analogon

zu CYP2B1 der Ratte und dem humanen CYP2B6 und wird primär durch CAR reguliert. Für einen PXR vermittelten Effekt wurde CYP3A44 gewählt. Die erzielten Effekte zeigt Abbildung 26.

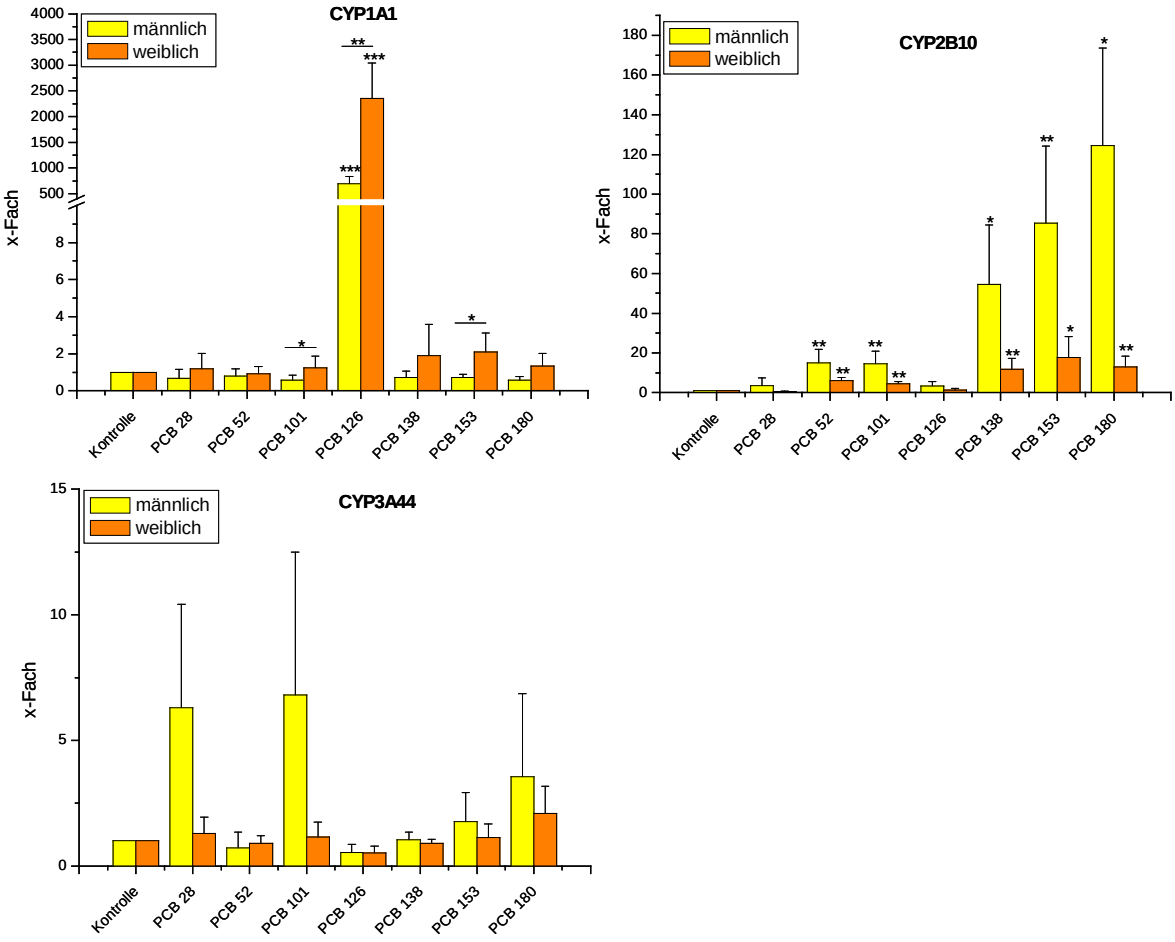


Abbildung 26 RT-PCR von CYP1A1, CYP2B10 und CYP3A44 männlicher und weiblicher Mäuse, isolierte hepatische mRNA, Versuchsdauer 1 Tag, Dosis NDL-PCB 20mg/kg KG, DL-PCB 126 200 µg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, 4≤n≤6, Mittelwert plus Standardabweichung, one-tailed unpaired Student's t-Test, Kontrolle auf 1 normiert, *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001, bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe

Abbildung 26 zeigt, dass nach der kurzen Versuchsdauer von einem Tag bereits Effekte auf die Expression der untersuchten Gene zu sehen sind. Das DL-PCB 126 induzierte in hohem Maße die Expression von CYP1A1. Bei beiden Geschlechtern wurde eine extrem signifikante Erhöhung der CYP1A1 mRNA gemessen. Auch der Unterschied zwischen den Geschlechtern war hoch signifikant, die Weibchen scheinen sensitiver zu reagieren.

Bei der Expression von CYP2B10 zeigt sich eine klare Unterscheidung zwischen hochchlorierten (NDL-PCBs 138, 153, 180) und niedrigchlorierten PCBs (NDL-PCBs 28, 52,

101). Die hochchlorierten NDL-PCBs verursachten eine höhere Induktion der CYP2B10-Expression. Im Einzelnen betrachtet verursachten NDL-PCBs 138 und 180 bei den männlichen Tieren eine signifikante Erhöhung der Expression, der Effekt durch NDL-PCB153 war sogar hoch signifikant. Bei den Weibchen wurden die mRNA Level von CYP2B10 ebenfalls signifikant (NDL-PCB 153) und hoch signifikant (NDL-PCBs 138 und 180) induziert. Von den niedrigchlorierten PCBs verursachten NDL-PCBs 52 und 101 bei beiden Geschlechtern eine hoch signifikante Erhöhung der Expression. NDL-PCB 28 und DL-PCB 126 dagegen verursachten keine Veränderungen.

Bei der Expression von CYP3A44 waren keine signifikanten Effekt zu beobachten. Zu erwähnen sind die hohen Standardabweichungen besonders bei den männlichen Tieren.

IV.2.1.3. Enzymaktivität

Die Messung der Enzymaktivitäten wurde nach einer modifizierten Methode von Kennedy *et al.* durchgeführt. Aus den Leberproben wurden Mikrosomen isoliert und entsprechend der Methode für die Aktivitätsmessung eingesetzt. Weitere Details befinden sich im Kapitel Material und Methoden.

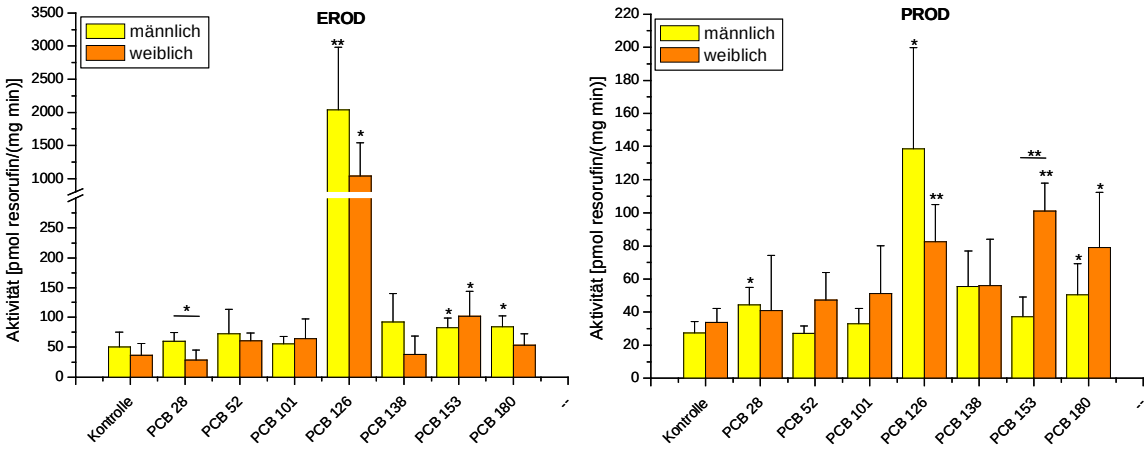


Abbildung 27 EROD- und PROD-Aktivität, hepatische Mikrosomen von männlichen und weiblichen Mäusen, Versuchsdauer 1 Tag, Dosis NDL-PCB 20mg/kg KG, DL-PCB 126 200 µg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, Mittelwert mit Standardabweichung, 5≤n≤6, one-tailed unpaired Student's t-Test, *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001, bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe

Die EROD-Aktivität der männlichen Tiere wurde durch die Behandlung mit DL-PCB 126 hoch signifikant induziert, bei den Weibchen konnte ein signifikanter Effekt gemessen werden. Abbildung 27 zeigt ebenfalls, dass auch durch NDL-PCBs 138 und 180 die EROD-

Aktivität signifikant erhöht wurde. Im Gegensatz zu NDL-PCB 153 war dies bei NDL-PCB 180 nur für die männlichen Tiere der Fall.

Die katalytische Aktivität von CYP2B-Enzymen, die PROD-Aktivität wurde durch einzelne PCBs verändert. NDL-PCB 28 verursachte in männlichen Tieren eine signifikante Erhöhung. Das gleiche wurde auch bei NDL-PCB 180 beobachtet, wobei bei diesem PCB auch die Weibchen eine signifikant erhöhte Aktivität aufweisen. Aber auch DL-PCB 126 induzierte die PROD-Aktivität signifikant bei den Weibchen und bei den männlichen Tieren sogar hoch signifikant. Bei NDL-PCB 138 war die PROD-Aktivität der weiblichen Tiere hoch signifikant höher als die der männlichen.

IV.2.2. 5 Tage

Bei der Versuchsdauer von fünf Tagen soll eine subchronische Wirkung auf die ausgewählten Parameter untersucht werden. Die Tiere wurden in dieser Zeit zweimal, an Tag 0 und 2, per Schlundsonde behandelt. Dabei erhielten die Tiere jedes Mal die gleiche Dosis an PCB. An Tag 5 wurden die Tiere sediert und getötet, dabei wurde die Leber entnommen und entsprechend der Messmethode aufgearbeitet.

IV.2.2.1. Relatives Lebergewicht

Die relativen Lebergewichte wurden wie oben beschrieben ermittelt und sind in Abbildung 28 graphisch dargestellt. Es zeigt sich eine extrem signifikante Erhöhung der relativen Lebergewichte beider Geschlechter bei der Behandlungsgruppe mit DL-PCB 126. Aber auch NDL-PCB 28 verursachte eine signifikante Erhöhung bei den weiblichen Tieren. Der Unterschied zwischen Männchen und Weibchen war bei der NDL-PCB 28 Gruppe hoch signifikant. Die Werte der Kontrolltiere lagen nah beieinander.

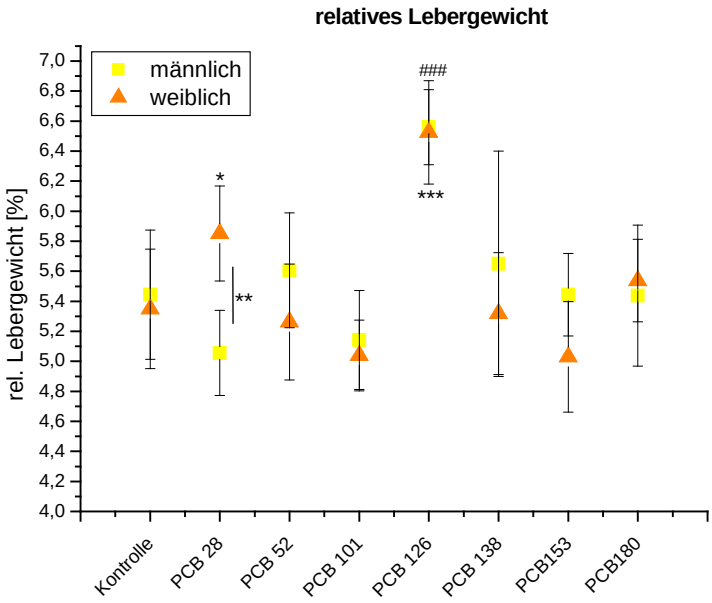


Abbildung 28 Relatives Lebergewicht männlicher und weiblicher Mäuse, absolutes Lebergewicht bezogen auf Körpergewicht, Versuchsdauer 5 Tage, verabreicht wurden 2 Dosen an Tag 0 und Tag 2, je Dosis NDL-PCB 20mg/kg KG, DL-PCB 126 200 µg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, Mittelwert mit Standardabweichung, n=6, one-tailed unpaired Student's t-Test, ###=p≤0,001 (Männchen), *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001 (Weibchen und Geschlechtsunterschied), bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe

IV.2.2.2. Genexpression

Auch beim Fünf-Tage-Versuch wurden die beim Ein-Tages-Versuch beschriebenen drei Gene untersucht. Abbildung 29 zeigt die x-fachen Veränderungen der Expression der einzelnen Behandlungsgruppen.

Bei CYP1A1 zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der akuten Studie von einem Tag. Einzig die Verabreichung von DL-PCB 126 zeigte bei beiden Geschlechtern eine extrem signifikante Erhöhung der CYP1A mRNA, wobei in diesem Fall die Expression bei den männlichen Tiere hoch signifikant höher war als die der Weibchen.

Das Diagramm der CYP2B10-Expression zeigt, dass die mRNA-Levels der Leberproben der Männchen stärker induziert wurden durch die Behandlung. Ausnahmen hierbei waren NDL-PCB 28 und DL-PCB 126 die keinen signifikanten Veränderungen sowohl bei den männlichen als auch den weiblichen Versuchstieren verursachten. Die NDL-PCBs 101, 153 und 180 riefen bei beiden Geschlechtern einen signifikanten Anstieg der Genexpression hervor. Bei NDL-PCB 52 war bei beiden Geschlechtern dieser Effekt hoch signifikant und bei NDL-PCB 138 sogar extrem signifikant.

Die mRNA des vorwiegend über PXR regulierten CYP3A44 wurde bei der untersuchten sub-chronischen Dauer von fünf Tagen ausschließlich bei den weiblichen Tieren signifikant erhöht. Abbildung 13 zeigt die signifikante Erhöhung durch NDL-PCB 180 und 153 und die sogar hohe Signifikanz der Induktion durch NDL-PCB 101

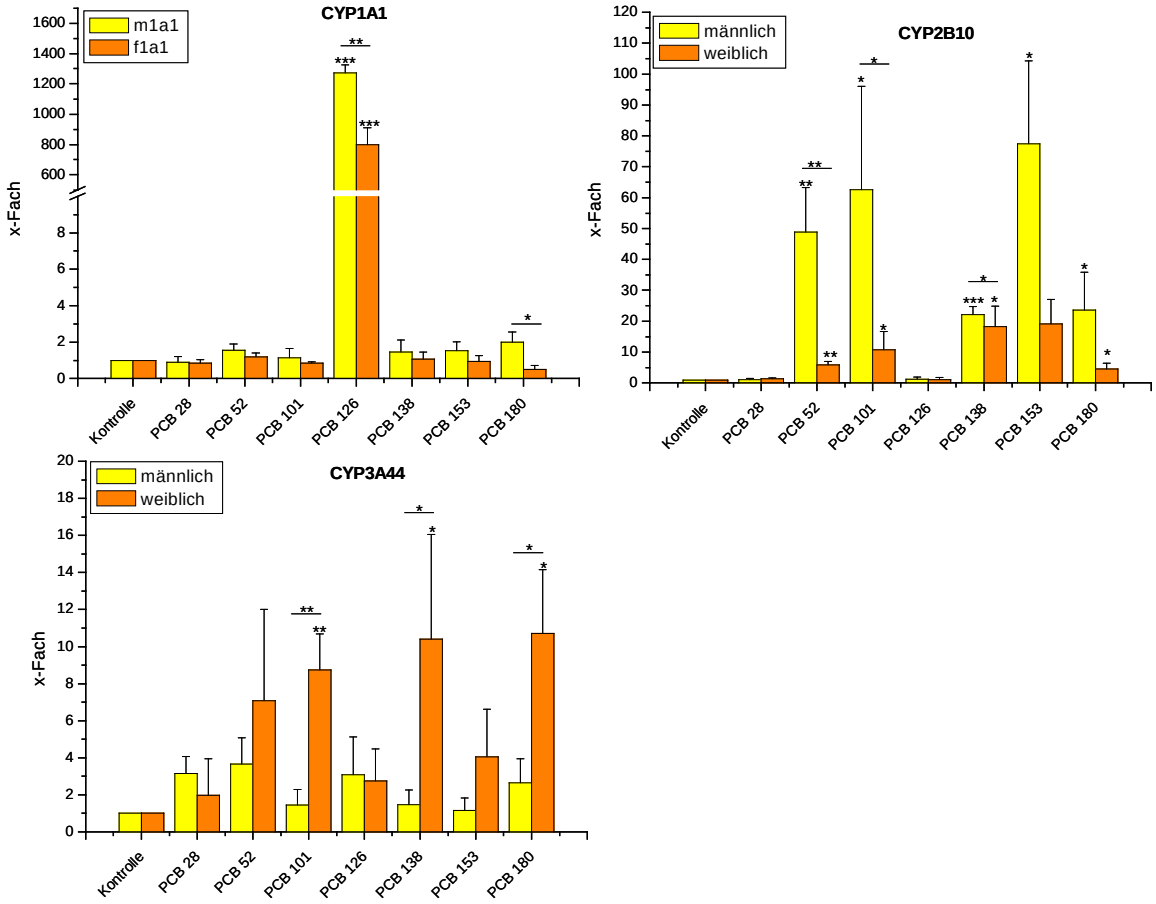


Abbildung 29 RT-PCR von CYP1A1, CYP2B10 und CYP3A44 männlicher und weiblicher Mäuse, isolierte hepatische mRNA, Versuchsdauer 5 Tage, verabreicht wurden 2 Dosen an Tag 0 und Tag 2, je Dosis NDL-PCB 20mg/kg KG, DL-PCB 126 200 µg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, Mittelwert mit Standardabweichung, n=4, Kontrolle auf 1 normiert, one-tailed unpaired Student's t-Test, *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001, bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe

IV.2.2.3. Enzymaktivität

In Abbildung 30 sind die EROD- und PROD-Aktivitäten der Leberproben der Mäuse der 5 Tage-Studie dargestellt. Es zeigte sich, dass die hepatische EROD-Aktivität der Lebermikrosomen beider Geschlechter extrem signifikant durch die Behandlung mit DL-PCB

126 erhöht wurde. Des Weiteren konnte bei den männlichen Tieren der Behandlungsgruppen mit den NDL-PCBs 101, 138 und 153 eine signifikante Erhöhung beobachtet werden. Bei NDL-PCB 180 war dieser Effekt sogar hoch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den weiblichen Tieren die mit NDL-PCB 153 behandelt wurden kann sogar ein extrem signifikanter Effekt beobachtet werden. Bei den weiblichen Tieren ist die Aktivität der NDL-PCB 138 Gruppe signifikant erhöht und die NDL-PCB 153 Tiere extrem signifikant erhöht.

Die PROD-Aktivität der Lebermikrosomen wurde durch alle untersuchten PCBs signifikant erhöht, NDL-PCB 28 bildete die einzige Ausnahme. Der Effekt durch die NDL-PCBs 101 und 138 war bei beiden Geschlechtern extrem signifikant. Auch DL-PCB 126 verursachte eine solch extrem signifikante Erhöhung der Aktivität. Ähnlich verhielt es sich bei NDL-PCB 52, wobei hier der Effekt bei den weiblichen Tieren nicht so ausgeprägt war und nur hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe war. Bei NDL-PCB 180 war der Effekt bei beiden Geschlechtern hoch signifikant, wobei die weiblichen Tiere eine hoch signifikant höhere Aktivität zeigten. Im Allgemeinen war die Aktivität bei den Weibchen signifikant höher als die bei den Männchen, sogar in der Kontrollgruppe.

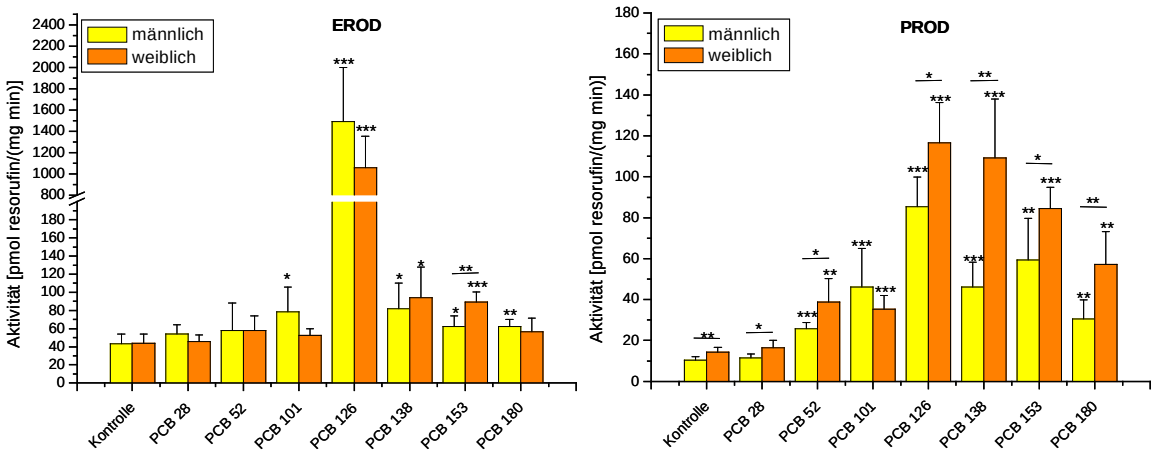


Abbildung 30 EROD- und PROD-Aktivität, hepatische Mikrosomen von männlichen und weiblichen Mäusen, Versuchsdauer 5 Tage, verabreicht wurden 2 Dosen an Tag 0 und Tag 2, je Dosis NDL-PCB 20mg/kg KG, DL-PCB 126 200 µg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, Mittelwert mit Standardabweichung, 5≤n≤6, one-tailed unpaired Student's t-Test, *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001, bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe

IV.2.3. 28 Tage

Die Versuchsdauer von 28 Tagen soll eine chronische Exposition simulieren. Bei dieser Dauer wurden zwei verschiedene Behandlungsschemen angewendet. Die Tiere in den Gruppen der niedrigchlorierten PCBs (28, 52, 101) bekamen über 28 Tage verteilt zehn gleiche Dosen, die der hochchlorierten PCBs (126, 138, 153, 180) fünf gleiche Dosen.

IV.2.3.1. Relatives Lebergewicht und Körpergewichtszunahme

Die relativen Lebegewichte wurden wie oben beschrieben berechnet und in Abbildung 31 aufgetragen. Zusätzlich wurden über die Zeitdauer der 28 Tage die Körpergewichte der Tiere aufgezeichnet und in zwei Diagrammen dargestellt.

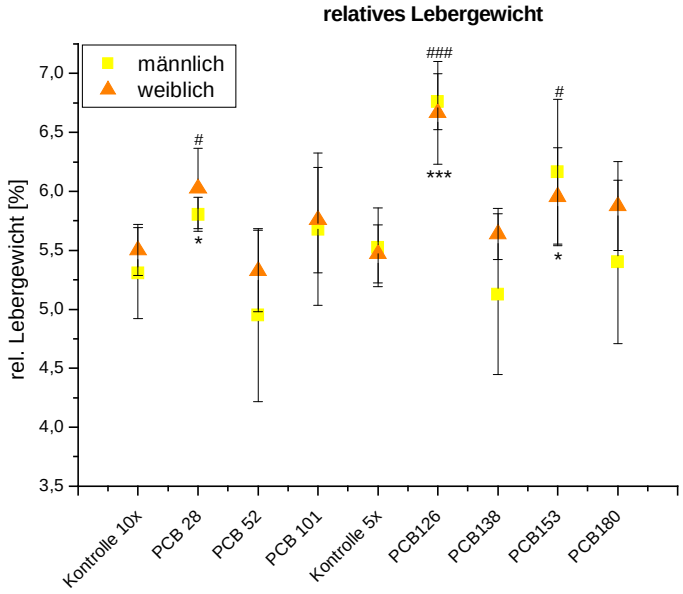


Abbildung 31 Relatives Lebergewicht männlicher und weiblicher Mäuse, absolutes Lebergewicht bezogen auf Körpergewicht, Versuchsdauer 28 Tage, verabreicht wurden 10 Dosen mit in Maiskeimöl gelösten PCBs 28, 52, 101 und 5 Dosen mit PCBs 126, 138, 153, 180, je Dosis NDL-PCB 20mg/kg KG, DL-PCB 126 200 µg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, Mittelwert mit Standardabweichung, n=6, one-tailed unpaired Student's t-Test, ###=p≤0,001 (Männchen), *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001 (Weibchen), bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe

Bei der Versuchsdauer von 28 Tagen führte die Behandlung mit DL-PCB 126 zu einer extrem signifikanten Zunahme der relativen Lebergewichte. Auch die NDL-PCBs 28 und 153 verursachten eine signifikante Zunahme bei beiden Geschlechtern.

Alle Gruppen wiesen einen ähnlichen Verlauf der Körpergewichtszunahmen vergleichbar mit der jeweilige Kontrollgruppe auf. Es gab keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 32 zeigt die Körpergewichtszunahmen der Gruppe der niedrigchlorierten PCBs. Die Abbildung zeigt, dass die Männchen im Schnitt schwerer waren als die Weibchen.

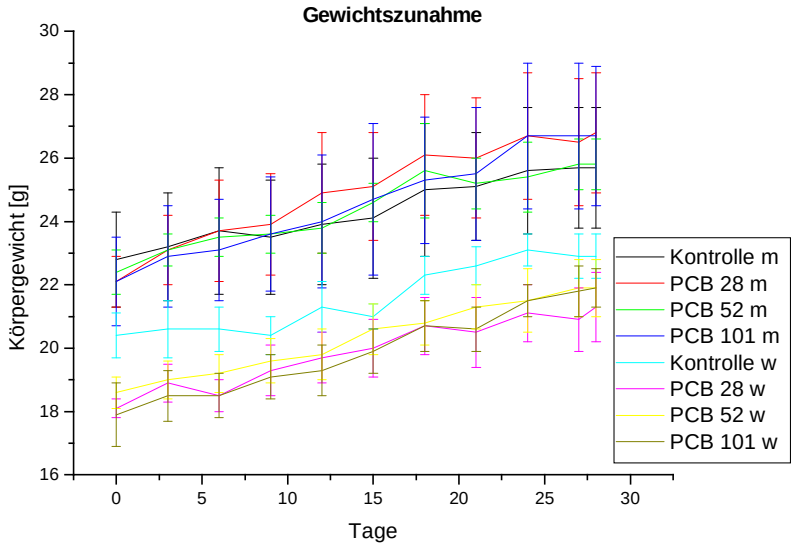


Abbildung 32 Körpergewichtszunahme der Gruppe behandelt mit niedrigchlorierten PCBs, männliche (m) und weibliche (w) Tiere, Versuchsdauer 28 Tage, verabreicht wurden 10 Dosen mit in Maiskeimöl gelösten PCBs 28, 52, 101, je Dosis NDL-PCB 20mg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, Mittelwert mit Standardabweichung, n=6

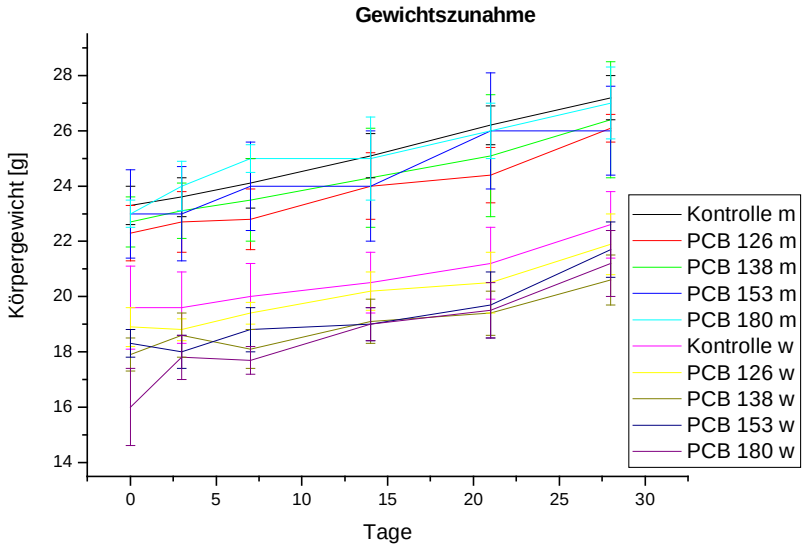


Abbildung 33 Körpergewichtszunahme der Gruppe behandelt mit hochchlorierten PCBs, männliche (m) und weibliche (w) Tiere, Versuchsdauer 28 Tage, verabreicht wurden 10 Dosen mit in Maiskeimöl gelösten PCBs 123, 138, 153, 180, je Dosis NDL-PCB 20mg/kg KG, DL-PCB 126 200 µg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, Mittelwert mit Standardabweichung, n=6

Abbildung 33 zeigt die Körpergewichtszunahme der Tiere die mit hochchlorierten PCBs behandelt wurden. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen den behandelten Tieren und den jeweiligen Kontrolltieren beobachtet werden.

IV.2.3.2. Genexpression

Bei der Darstellung der RT-PCR Ergebnisse wurden beide Kontrollgruppen mit aufgetragen. Die jeweiligen PCB-Gruppen sind entsprechend dem Behandlungsschema auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen.

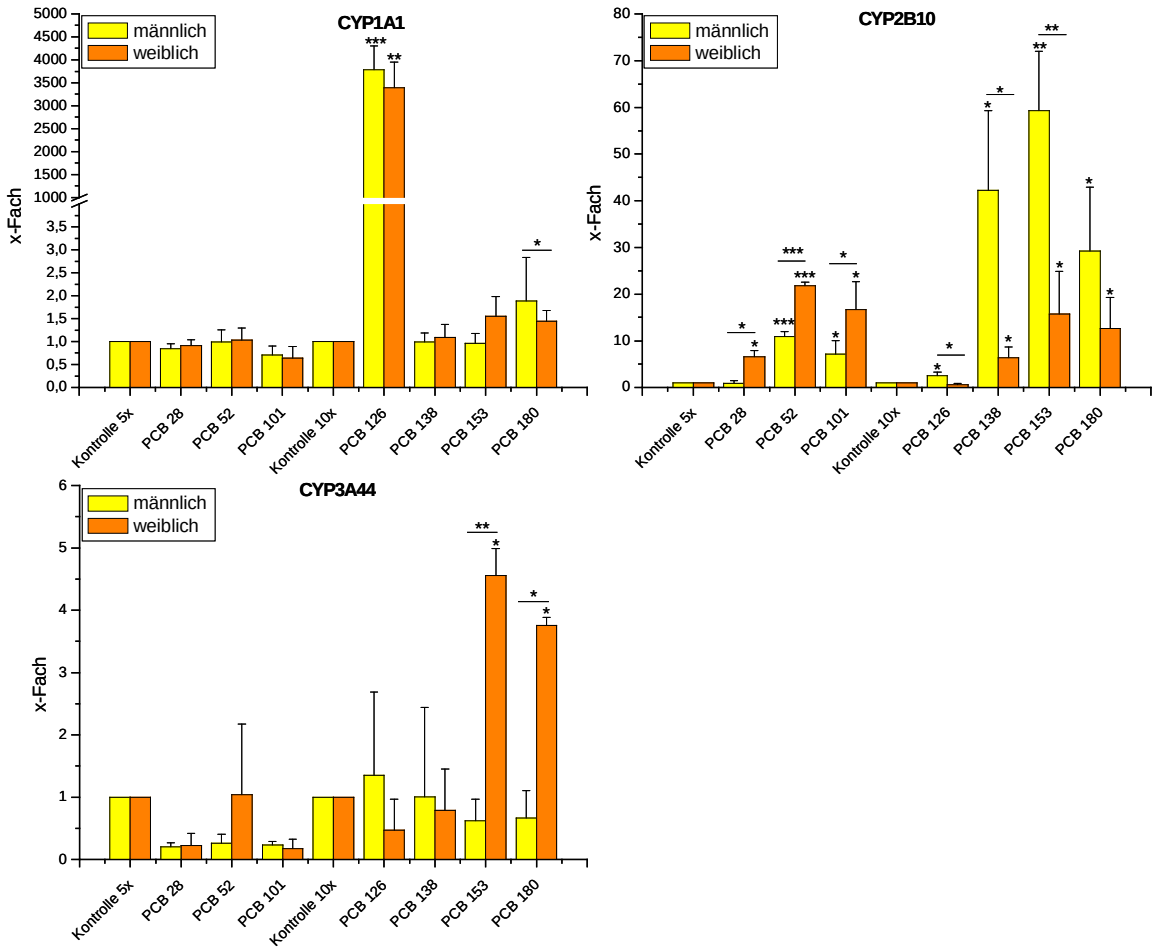


Abbildung 34 RT-PCR von CYP1A1, CYP2B10 und CYP3A44 männlicher und weiblicher Mäuse, isolierte hepatische mRNA, Versuchsdauer 28 Tage, verabreicht wurden 10 Dosen mit in Maiskeimöl gelösten PCBs 28, 52, 101 und 5 Dosen mit PCBs 126, 138, 153, 180, je Dosis NDL-PCB 20mg/kg KG, DL-PCB 126 200 µg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, Mittelwert mit Standardabweichung, n=4, one-tailed unpaired Student's t-Test, *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001, bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe

Die CYP1A1-mRNA wurde durch die Behandlung mit dem DL-PCB 126 hoch signifikant bei beiden Geschlechtern erhöht. Die NDL-PCBs induzierten die Expression nicht signifikant (Abbildung 34).

Die Transkription von CYP2B10 wurde durch alle PCBs induziert. Die Abbildung 34 zeigt einen Unterschied zwischen hochchlorierten und niedrigchlorierten PCBs. Bei den niedrigchlorierten NDL-PCBs war die Expression bei den weiblichen Tieren signifikant höher als bei den Männchen. NDL-PCB 52 verursachte eine hoch signifikante Erhöhung der Expression, wohingegen NDL-PCB 101 die Transkription nur signifikant erhöht. Bei der Behandlung mit NDL-PCB 52 zeigten nur die weiblichen Tiere eine signifikante Erhöhung. Im Gegensatz zu der höheren Expression der Weibchen bei den niedrigchlorierten PCBs war die CYP2B10-Expression bei den Männchen bei den hochchlorierten PCBs signifikant höher. Die NDL-PCBs 138 und 180 verursachten eine signifikante Erhöhung bei beiden Geschlechtern. NDL-PCB 153 erhöhte bei den Männchen die Expression hoch signifikant, bei den Weibchen dagegen nur signifikant. Die mRNA-Levels der mit DL-PCB 126 behandelten Männchen wurden ebenfalls signifikant induziert.

Die Expression von CYP3A44 wurde nur bei den Weibchen der NDL-PCB-Gruppen 153 und 180 signifikant erhöht. Diese Erhöhung war bei NDL-PCB 180 signifikant höher als bei den Männchen, bei NDL-PCB 153 sogar hoch signifikant.

IV.2.3.3. Enzymaktivität

In Abbildung 35 sind die EROD- und die PROD-Aktivität der 28 Tage-Studie aufgetragen

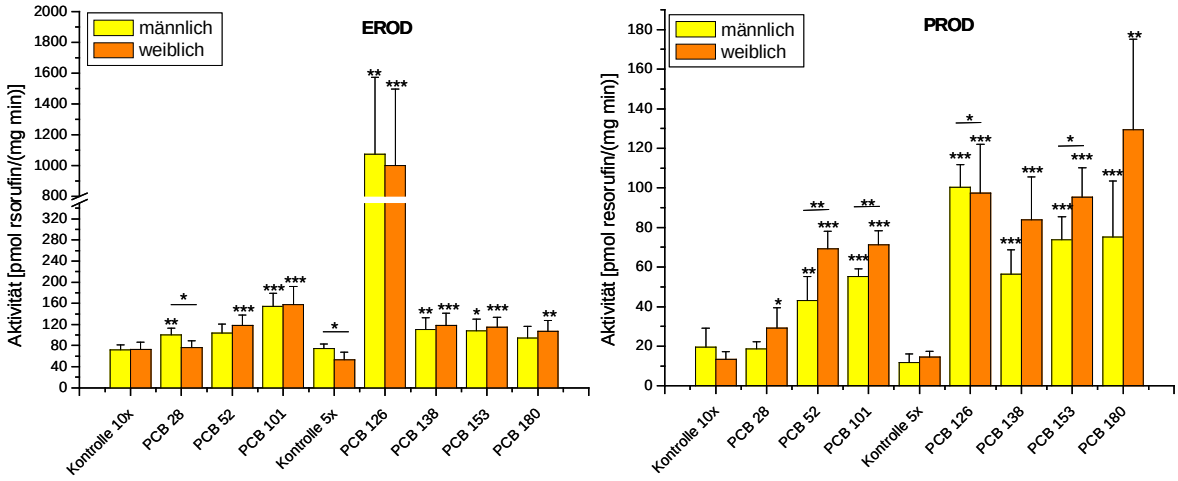


Abbildung 35 EROD- und PROD-Aktivität, hepatische Mikrosomen von männlichen und weiblichen Mäusen, Versuchsdauer 28 Tage, verabreicht wurden 10 Dosen mit in Maiskeimöl gelösten PCBs 28, 52, 101 und 5 Dosen mit PCBs 126, 138, 153, 180, je Dosis NDL-PCB 20mg/kg KG, DL-PCB 126 200 µg/kg KG, Applikationsvolumen 5 ml/kg KG, Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Menge Maiskeimöl behandelt, Mittelwert mit Standardabweichung, 5≤n≤6, one-tailed unpaired Student's t-Test, *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001, bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe

Das Diagramm der EROD-Aktivität zeigt, dass alle Behandlungsgruppen signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren aufweisen. Besonders DL-PCB 126 erhöhte hoch signifikant die katalytische Aktivität. NDL-PCB 101 induzierte die Aktivität extrem signifikant bei beiden Geschlechtern. Ebenfalls extrem signifikant induzierten die NDL-PCBs 138 und 153, dieser Effekt wurde aber nur bei den Proben der Weibchen beobachtet. Bei der Proben der Männchen wurde nur eine hoch signifikant respektiv signifikant Aktivität. In der Gruppe der Tiere die mit NDL-PCB 28 behandelt wurden, war lediglich die EROD-Aktivität der weiblichen Tiere hoch signifikant erhöht, bei NDL-PCB 52 war die Aktivität bei den Männchen extrem signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht.

Die hochchlorierten PCBs induzierten alle extrem signifikant die PROD-Aktivität. Die Aktivität bei den Weibchen war bei NDL-PCB 153 und DL-PCB 126 signifikant höher als bei den Männchen. Aus der Gruppe der niedrigchlorierten Kongenere verursachte NDL-PCB 28 bei den weiblichen Tieren eine signifikante Erhöhung der Aktivität. Bei den NDL-PCBs 52 und 101 die Aktivität bei den Weibchen hoch signifikant höher. Die PROD-Aktivität beider Geschlechter wurde durch NDL-PCB 101 extrem signifikant erhöht, bei NDL-PCB 52 wurde

dies nur bei den Weibchen beobachtet, die PROD-Aktivität der Männchen dagegen wurde hoch signifikant erhöht. Bei der Betrachtung des gesamten Diagramms kann der Trend erkannt werden, dass die hochchlorierten PCBs die PROD-Aktivität sichtlich höher induzieren als die niedrigchlorierten.

IV.2.4. Vergleich der EROD- und PROD-Aktivität

In den folgenden Diagrammen werden die EROD- und die PROD-Aktivität der drei Versuchsdauern miteinander verglichen. Zum besseren Vergleich wurde die jeweilige Kontrolle auf eins normiert und die Behandlungsgruppen darauf bezogen.

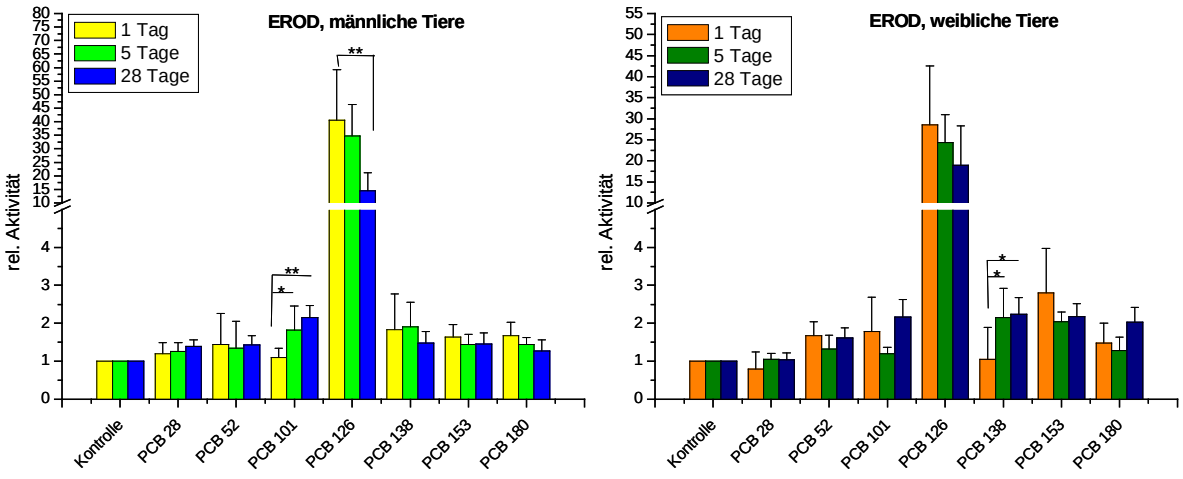


Abbildung 36 Vergleich der EROD-Aktivität der 1-, 5-, und 28-Tage-Studie. Mittelwert mit Stanardabweichung, n=6, one-tailed unpaired Student's t-Test, *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001, bezogen auf 1-Tag-Studie, Kontrollen auf eins normiert

In Abbildung 36 sind die EROD-Aktivtäten der einzelnen Versuchsdauern der männlichen und weiblichen Tiere verglichen. Bei den Männchen zeigte NDL-PCB 101 einen signifikanten ansteigenden Trend. Die anderen NDL-PCBs verursachten keine erhöhte Aktivität bezogen auf die Zeitdauer. DL-PCB 126 verursachte sogar einen signifikant abfallenden Trend. Bei den Weibchen zeigte NDL-PCB 138 einen signifikant ansteigenden Trend bezogen auf die 1-Tag-Tiere. Der Verlauf der DL-PCB 126 behandelten Tiere ist hier ebenfalls abfallend jedoch nicht signifikant.

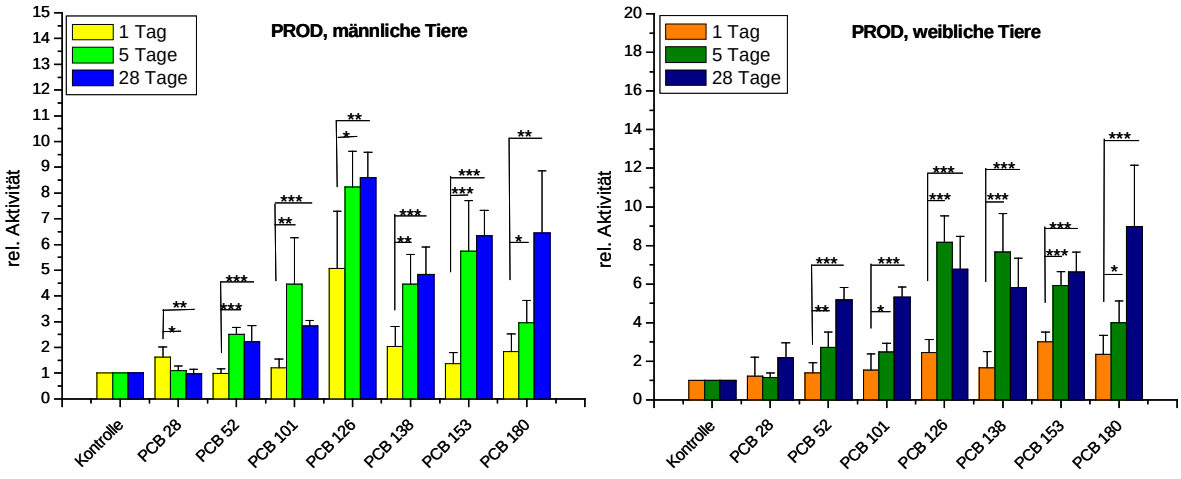


Abbildung 37 Vergleich der PROD-Aktivität der 1-, 5-, und 28-Tage-Studie. Mittelwert mit Standardabweichung, n=6, one-tailed unpaired Student's t-Test, *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001, Kontrollen auf eins normiert

Beim Vergleich der PROD-Aktivitäten in Abbildung 37, zeigte sich ein ganz anderes Bild. Bei den männlichen Tieren zeigten alle NDL-PCBs einen ansteigenden Trend, Ausnahme ist NDL-PCB 28 bei dem die Aktivität abnahm. Sogar bei DL-PCB 126 stieg die Aktivität signifikant mit der Versuchdauer an. Bei den weiblichen Tieren verursacht NDL-PCB 28 keine signifikante Veränderung. Bei NDL-PCB 138 und DL-PCB 126 fiel die Aktivität von auf die 28-Tage-Studie im Vergleich zur 5-Tage-Studie. Allen anderen NDL-PCBs zeigten wieder einen signifikant ansteigenden Verlauf.

IV.2.5. Zusammenfassung und Diskussion der Maus-Studien

Mit der Mausstudie sollten Effekte von niedrigen Dosen NDL-PCBs auf Leberenzyme ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden sechs in Öl gelöste hochreine NDL-PCBs und ein DL-PCB, als Referenzsubstanz für dioxin-artige Effekte, erwachsenen C57BL/6 Mäusen per Schlundsonde verabreicht. Es wurden drei verschiedene Versuchsdauern ausgewählt, 1 Tag, 5 Tage, sowie 28 Tage. Bei den NDL-PCBs betrug eine Dosis 20 mg/kg KG und für das DL-PCB 200 µg/kg KG. Die Gesamtdosen betrugen 20 mg/kg KG resp. 200 µg/kg KG bei 1 Tag, 40 mg/kg KG und 400 µg/kg KG bei 5 Tage und 200 µg/kg KG bei 28 Tage für niedrigchlorierte NDL-PCBs 28, 52 und 101, 100 mg/kg KG resp. 1000 µg/kg KG bei 28 Tage für hochchlorierte NDL-PCBs 138, 153 und 180 resp. DL-PCB 126.

Am Flämischen Institut für Technologie (VITO) in Mol, Belgien wurde mit den 5 Tage-Proben Whole Genome Microarrays durchgeführt. In Abbildung 38 sind in Form eines Veen-Diagramms ein Teil der Ergebnisse der Microarrays dargestellt. Die Daten zeigen, dass NDL-PCB 28 keine Schnittmenge mit einem der drei untersuchten Gene hat. DL-PCB 126 verursachte nur eine Erhöhung der CYP1A1-Expression. In den Proben der Tieren die mit NDL-PCB 52 behandelt wurden war nur CYP2B10 induziert. Das Diagram zeigt, dass mehrere NDL-PCBs Mixtyp-Induktoren von CAR/PXR sind, da NDL-PCBs 101, 153 und 180 eine Anstieg der CYP2B10- und CYP3A44-Expression hervorriefen. NDL-PCB 138 verursachte sogar eine Erhöhung aller untersuchten CYP-Enzyme und könnte so als ein AhR und CAR/PXR Mischtyp eingestuft werden.

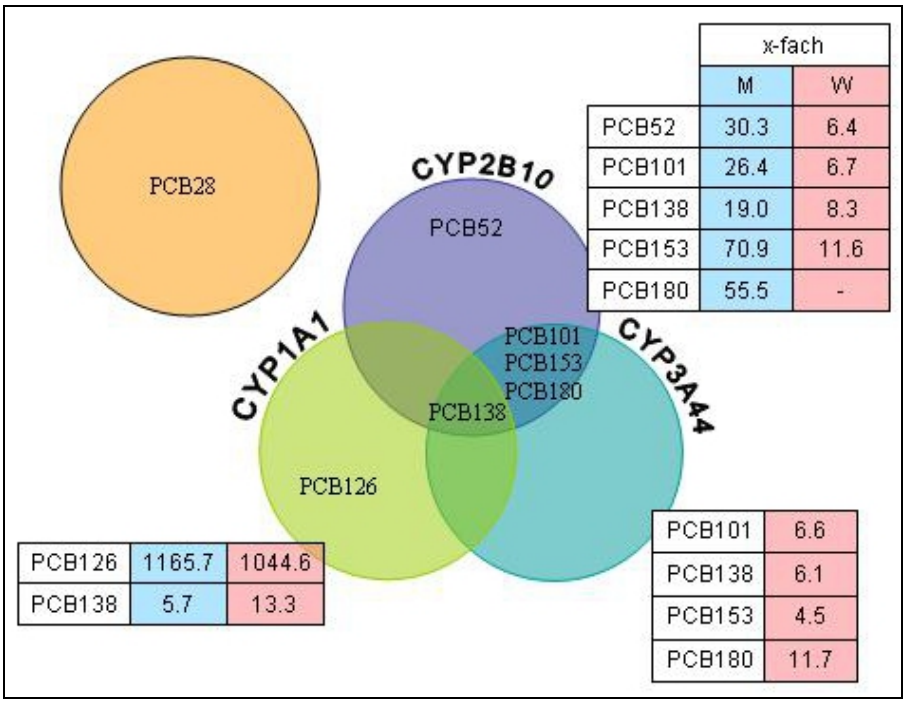


Abbildung 38 Veen-Diagramm der Whole Genome Microarray-Daten der 5 Tage-Studie mit Focus auf die Induktion der CYP-Enzyme. Angegeben sind x-fache Expression von CYP1A1, CYP2B10 und CYP3A44 jeweils bezogen auf die Kontrolle, n=4

Die Auswahl an Veröffentlichungen von Daten, die mit einzelnen PCBs gewonnen wurden, ist gering. Aus diesem Grund werden im Rahmen dieser Arbeit die gewonnenen Ergebnisse mit Daten von Gemischen oder strukturell ähnlichen PCBs verglichen. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse schematisch dargestellt. Das relative Lebergewicht wurde von dem einzigen dioxin-artigem PCB 126 bei der Versuchsdauer von 5 Tagen und 28 Tagen signifikant erhöht. Dies bestätigte eine Veröffentlichung von Robertson *et al.* aus dem Jahre 1984 (Robertson *et al.*, 1984). Er behandelte C57BL/6-Mäuse unter anderem mit PCB 126 und Aroclor 1254. Auch Aroclor 1254 erhöhte das relative Lebergewicht in der Studie von Robertson *et al.* Da NDL-PCB 153 ein wichtiger Bestandteil von Aroclor 1254 ist, könnte dies auch die Erhöhung des relativen Lebergewichtes bei der Versuchsdauer von 28 Tagen erklären.

Tabelle 12 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Maus-Studien, signifikante Änderungen des relativen Lebergewichtes (rel. LG), der Genexpression und der Enzym-Aktivität.

	PCB 28			PCB 52			PCB 101			PCB 126			PCB 138			PCB 153			PCB 180		
♂	1	5	28	1	5	28	1	5	28	1	5	28	1	5	28	1	5	28	1	5	28
rel. LG			↑								↑	↑						↑			
CYP1A1										↑	↑	↑									
CYP2B10				↑	↑	↑	↑	↑	↑				↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
CYP3A44																					
EROD								↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
PROD	↑				↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
♀	1	5	28	1	5	28	1	5	28	1	5	28	1	5	28	1	5	28	1	5	28
rel. LG		↑	↑								↑	↑						↑			
CYP1A1										↑	↑	↑									
CYP2B10			↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑			↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
CYP3A44								↑						↑				↑		↑	↑
EROD						↑			↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑			↑
PROD			↑		↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑

„↑“ Gewicht resp. Expression erhöht

Im Rahmen der 28 Tage-Studie wurde zusätzlich das Körpergewicht der Tiere aufgetragen. Die Körpergewichtsentwicklung aller Behandlungsgruppen war der der Kontrolltiere gleich. Dies wurde auch bei der Studie von Robertson *et al.* beobachtet. Die Körpergewichtszunahme der C57BL/6-Mäuse, die mit Aroclor 1254 behandelt worden, unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe (Robertson *et al.*, 1984).

Das aus den Mäusen gewonnene Serum wurde in dem medizinischen Labor von Drs. Püttmann und Rathenberg in Neustadt/Weinstraße untersucht. Es wurde, außer für NDL-PCB 126, keine erhöhten Werte des Serum ALT- (Alanin Aminotransferase) und ALP- (Alkalische Phosphatase) gemessen. Dies zeigt, dass es womöglich zu keiner Schädigung der Leber kam.

Die CYP1A1-Genexpression wurde bei allen drei Versuchsdauern nur durch das DL-PCB 126 signifikant erhöht. Jedoch wurde die EROD-Aktivität nicht nur durch DL-PCB 126 erhöht, sondern auch durch mehrere NDL-PCBs. Da die Genexpression von CYP1A1 jedoch nicht verändert wurde, könnte dies auf ein Überschneiden der katalytischen Aktivität von EROD und PROD zurück zu führen sein. Burke *et al.* beobachteten in ihren Versuchen, dass 7-Ethoxyresorufin auch von Microsomen metabolisiert wurde, die von Phenobarbital behandelten Ratten stammten (Burke *et al.*, 1994).

Die CYP2B10-Genexpression wurde durch alle NDL-PCBs hoch induziert, außer durch NDL-PCB 28 und dem DL-PCB 126. NDL-PCB 28 wurde 1989 von McFarland und Clarke als nicht dioxin- und nicht phenobarbital-artig (PB) eingestuft. NDL-PCB 52 und 101,

niedrigchlorierte PCBs, wurden als schwache PB-artige und die hochlorierten NDL-PCB 138, 153 und 180 als starke PB-Induktoren eingestuft. NDL-PCB 138 wurde als dioxin/PB-atiger Mixtyp beschrieben, was sich mit den RT-PCR-Daten nicht bestätigen ließ, jedoch die Array-Daten zeigten eine CYP1A1-Erhöhung für NDL-PCB 138. Außerdem wurden durch die Daten der Microarrays auch die PB-artige Wirkung der anderen PCBs bestätigt respektive nicht bestätigt im Falle des NDL-PCB 28 (McFarland and Clarke, 1989). Die PROD-Aktivität wurde durch die Behandlung mit allen PCBs induziert. Auch DL-PCB 126 induzierte die PROD-Aktivität. Da die CYP2B10-Genexpression jedoch nicht durch das dioxin-artige PCB erhöht wurde, könnte die erhöhte PROD-Aktivität mit der sehr hoch induzierten EROD-Aktivität zusammenhängen. Die EROD-Enzyme könnten durch ihre hohe Expression das 7-Pentoxyresorufin umgesetzt haben (Burke *et al.*, 1994). De Jongh *et al.* berichteten davon, dass durch DL-PCBs die PROD-Aktivität erhöht wurde. Die vermuten, dass bei Mäusen die PROD-Aktivität nicht nur durch CYP2B-Enzyme sondern auch zu einem geringen Teil durch CYP1A-Enzyme zustande kommt (de Jongh *et al.*, 1993).

Die Wahl von CYP3A44 scheint auf den ersten Blick etwas außergewöhnlich zu sein, da eigentlich CYP3A11 der Hauptvertreter der CYP3A-Familie bei der Maus ist. Jedoch zeigten die Array-Daten, dass CYP3A44 das einzige Enzym der CYP3A-Familie war, das induziert wurde. CYP3A44 ist ein Gen das vor allem bei den weiblichen Mäusen exprimiert wird (Anakk *et al.*, 2007; Bhadhprasit *et al.*, 2007). Dies erklärt, dass mittels RT-PCR nur bei den Weibchen signifikant erhöhte Expression gemessen wurden. NDL-PCBs 101, 138, 153 und 180 induzieren die Genexpression von CYP3A44 bei den Weibchen, was die Array-Daten aus Abbildung 38 bestätigte.

Werden die Enzymaktivitäten der einzelnen Versuchdauern miteinander verglichen, wie in Abbildung 36 und Abbildung 37 dargestellt, zeigten sich zwei verschiedene Trends. Obwohl mehrere NDL-PCBs die EROD-Aktivität erhöhen, zeigte sich beim Vergleich kein zeitabhängiger Verlauf. Nur NDL-PCB 101 verursachte über die Zeit bei den Männchen einen signifikanten Anstieg der 5 Tage- und 28 Tage-Studie gegenüber der 1 Tag-Studie. Bei den Weibchen ist es NDL-PCB 138 das, bei einem Vergleich der drei Versuchsdauern, einen signifikanten Anstieg verursachte. Dies würde die Ergebnisse der Arrays und von McFarland und Clarke bestätigen, dass NDL-PCB 138 ein AhR/CAR/PXR-Mixtyp-Induktor ist (McFarland and Clarke, 1989).

Beim Vergleich der PROD-Aktivitäten zeigte sich ein anderes Bild. Die Aktivität wurde von fast allen PCBs kontinuierlich über die drei Zeitdauern erhöht. Es scheint so, dass die niedrigchlorierten PCBs die Aktivität etwas geringer induzieren als die hochchlorierten,

was an einer schnelleren Verstoffwechslung und Ausscheidung liegen könnte (Öberg *et al.*, 2002).

Zusammenfassend könnten die PCBs in fünf unterschiedliche Gruppen unterteilt werden. Das DL-PCB 126 als reiner AhR-Induktor, da nur die CYP1A1-Expression verändert wurde und die PROD-Aktivität durch ein Überschneiden der Aktivitäten herrühren könnte NDL-PCB 52 als reiner CAR-Agonist und NDL-PCBs 101, 153 und 180 als CAR/PXR-Induktor. Außerdem könnte NDL-PCB 138 als AhR/CAR/PXR-Mixtyp-Induktor gesehen werden, wegen der Induktion aller drei Enzyme bei den Array-Daten und unter Berücksichtigung der Veröffentlichung von McFarland, der NDL-PCB 138 als AhR/CAR-Induktor einstufte. NDL-PCB 28 scheint bei den Array keins der untersuchten Enzyme induziert zu haben. Bei den RT-PCR-Daten gab es eine leichte Erhöhung der CYP2B10-Genexpression bei der 28 Tage-Studie. NDL-PCB 28 könnte dementsprechend als sehr schwacher CAR-Induktor eingestuft werden.

IV.3. In vitro

Für die *in vitro* Versuche wurde anhand einer Veröffentlichung von Mia Stenberg eine Gruppe bestehend aus 20 PCBs ausgewählt (Tabelle 13), die alle wichtigen strukturelle Eigenschaften der PCBs abdeckte (Stenberg and Andersson, 2008). Das Set wurde in Schweden an der Universität von Umeå, im Fachbereich der Chemie unter der Leitung von Patrik Andersson auf dioxinartige Verunreinigungen überprüft und wenn nötig aufgereinigt auf (Danielsson *et al.*, 2008). Für die Inkubation wurden die PCBs in DMSO so gelöst, dass nach Inkubation im Medium eine Endkonzentrationen von, 0,5% DMSO, 10 µM, 1µM, 0,1 µM, sowie 0,01 µM vorlagen. Als Positivproben wurde bei den Versuchen entsprechend 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD, 1 nM), Phenobarbital (PB, 5 M) oder Rifampicin (RIF, 10 µM) verwendet. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden. Anschließend wurden die Zellen entsprechend den sich anschließenden Methoden aufgearbeitet (Kapitel V Methoden und Material).

Die verwendete Zelllinie HepG2 ist eine humane Hepatomzelllinie. Es ist bekannt, dass in permanenten Zelllinien manche Genexpressionen vermindert oder gar nicht mehr durchgeführt werden. Um diesen Umstand zu verbessern, wird durch die Methode der Transfektion versucht, funktionsfähige Teile von Genen in die Zellen einzuführen. Diese sollen die verloren gegangenen Anlagen übernehmen oder sogar ganz neue Fähigkeiten zur Verfügung stellen.

Die *in vitro* Studien sollen Struktur-Wirkungsbeziehungen der NDL-PCBs aufzeigen. Dazu wurden HepG2-Zellen mit Plasmiden stabil und transient transfiziert. Die Plasmide enthielten Elemente wichtiger Rezeptoren des Fremdstoffmetabolismus.

Tabelle 13 Verwendete PCBs für die *in vitro* Versuche unter Angabe des Chlorierungsgrades und der Chlorsubstitutionsstelle an den Phenylringen. Zusätzlich wurde auf ortho-Substitution und Dioxin-Ähnlichkeit hingewiesen.

BZ Nr.	Cl-Position	Anzahl Cl	mono-ortho	Dioxinartig
19	2,2',6	3		
28	2,4,4''	3	X	
47	2,2',4,4'	4		
51	2,2',4,6'	4		
52	2,2',5,5'	4		
53	2,2',5,6'	4		
95	2,2',3,5,6	5		
100	2,2',4,4',6	5		
101	2,2',4,5,5'	5		
104	2,2',4,6,6'	5		
118	2,3',4,4',5	5	X	X
122	2,3,3',4,5'	5	X	
126	3,3',4,4',5	5		X
128	2,2',3,3',4,4'	6		
136	2,2',3,3',6,6'	6		
138	2,2',3,4,4',5'	6		
153	2,2',4,4',5,5'	6		
170	2,2',3,3',4,4',5	7		
180	2,2',3,4,4',5,5'	7		
190	2,3,3',4,4',5,6	7		

IV.3.1. Transiente Transfektion in HepG2

Bei der transienten Transfektion wird vor jeder Inkubation mit PCBs das Plasmid mit dem gewünschten Genabschnitt mittels Transfektionsreagenz in die Zellen transfiziert. Die Zelllinie HepG2 wurde vor der Transfektion unter Standardbedingungen gehalten. Die eingesetzten Medien und die Methoden werden unter dem Kapitel Methoden und Material.

Bei der transienten Transfektion wurde neben dem Plasmid mit dem zu untersuchenden Genabschnitt auch ein Plasmid co-transfeziert, das zur Effizienzkontrolle der Transfektion diente. Das Kontrollplasmid enthielt die Renilla-Luciferase, wogegen das andere

Plasmid die Firefly-Luciferase trug. Die Lumineszenz der Firefly-Luciferase wurde auf die der Renilla-Luciferase bezogen und man erhält eine relative Lumineszenz (rel. RLU).

IV.3.1.1. hXRE

Das humane XRE (*Xenobiotic Response Element*) spielt eine wichtige Rolle bei der Genexpression von CYP1A1, ein Enzym das bei Effekten die durch Dioxin vermittelt werden als wichtigster Biomarker gilt. Mittels der transienten Transfektion von hXRE in HepG2-Zellen soll der dioxinartige Charakter der PCBs ermittelt werden.

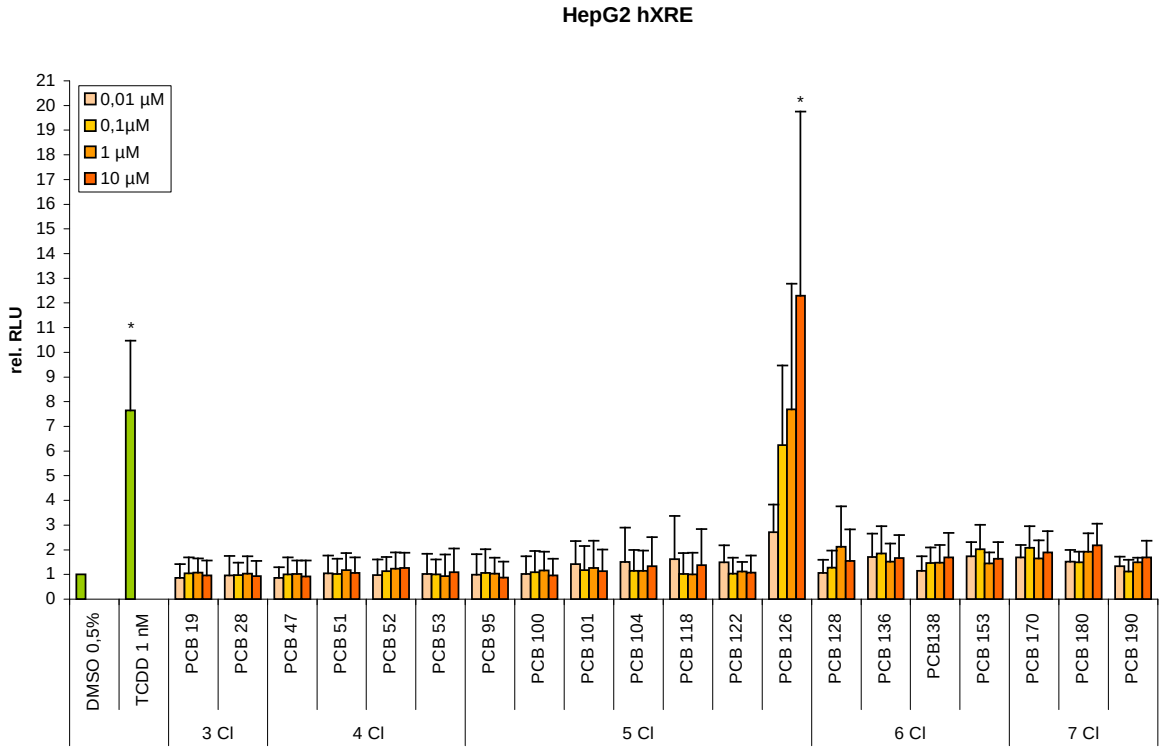


Abbildung 39 HepG2 mit hXREM transient transfiziert, angeben in relativer Lumineszenz bezogen auf die DMSO-Kontrolle, 48h Inkubation, n=3, *=p≤0,05

Es zeigt sich in Abbildung 39, dass nur die Inkubation mit der Positivkontrolle TCDD und mit dem DL-PCB 126 eine signifikante Erhöhung der relativen Lumineszenz hervor rief. Die Inkubation mit DL-PCB 126 zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Lumineszenz, jedoch war die relative Lumineszenz lediglich nach der Inkubation mit der Konzentration von 10 µM signifikant höher als die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Ebenfalls signifikant erhöht war die relative Lumineszenz nach der Inkubation mit TCDD in einer Konzentration von 1 nM. Das zweite DL-PCB 118 im Set veränderte die Lumineszenz nicht. Die NDL-PCBs vermochten nicht die relative Lumineszenz zu erhöhen, diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von hXRE durch die NDL-PCBs nicht induziert wurde.

IV.3.1.2. hPBREM/hCAR

Das PBREM (*Phenobarbital Responsive Enhancer Module*) und der Kernrezeptor CAR (C*onstitutive Active Receptor*) sind beide unerlässlich bei der Genexpression von CYP2B-Enzymen. Diese Enzyme sind ein wichtiger Baustein der Phase I des Fremdstoffmetabolismus in der Leber und gilt als Biomarker für ein phenobarbitalartiges Verhalten von Fremdstoffen. Der Nachweis einer Veränderung der CYP2B-Expression in Zellkultur gestalltet sich aber als sehr schwierig. Deshalb wurden die hPBREM/hCAR-Plasmide in HepG2-Zellen co-transfiziert, um diesen Mangel auszugleichen und um den PB-artigen Charakter der PCBs zu bestimmen.

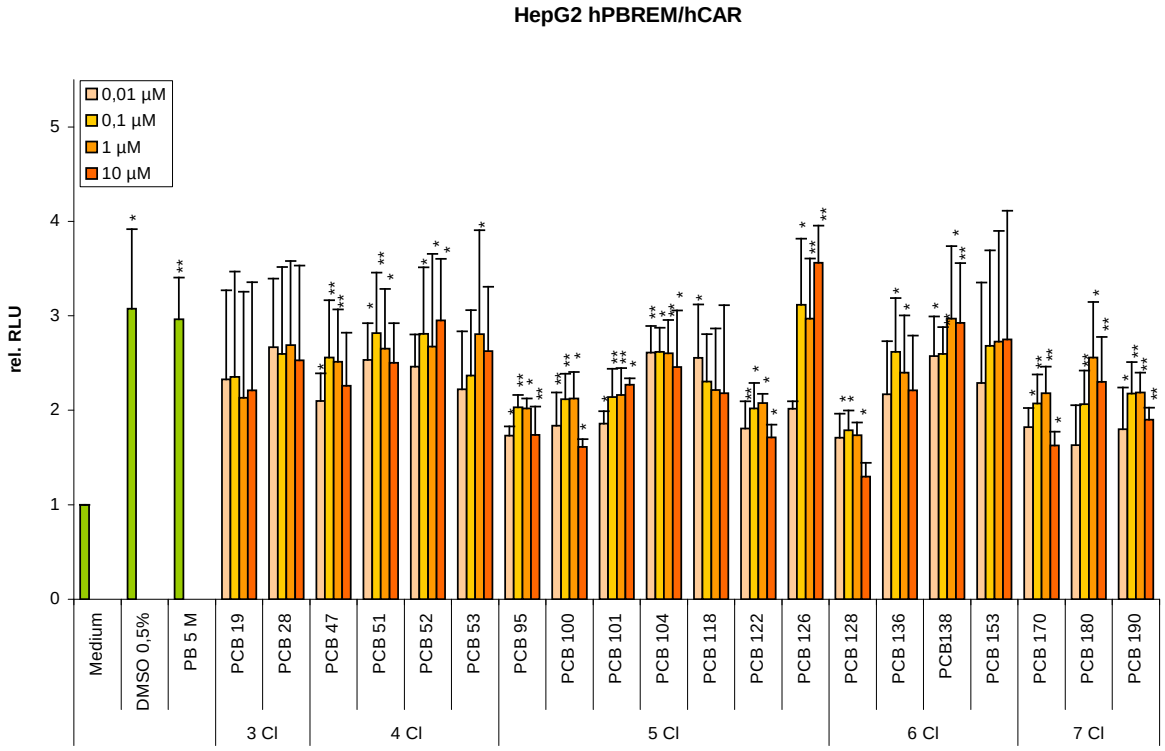


Abbildung 40 HepG2 transient co-tranfiziert mit hPBEM und hCAR, angeben in realtiver Lumineszenz bezogen auf die Mediumkontrolle, 48h Inkubation, n=3, *=p≤0,05, **=p≤0,01

Abbildung 40 zeigt die Veränderung der relativen Lumineszenz hervorgerufen durch die Inkubation mit den PCBs und der Positivprobe PB. Hierbei erhöhte PB in einer Konzentration von 5 M die relative Lumineszenz hoch signifikant. Werden die PCBs in Gruppen zusammen gefügt, können mehrere unterschiedliche Trends beobachtet werden. Manche PCBs zeigten keine signifikante konzentrationsabhängige Erhöhung der relativen Lumineszenz (NDL-PCB 19, 28) oder der Verlauf war sichtlich konzentrationsabhängig, die Änderungen waren jedoch nicht signifikant (NDL-PCB 153) was auf die hohe Standardabweichung zurück zu führen sein könnte. Andere PCBs zeigten jedoch eine

signifikante konzentrationsabhängige Induktion (NDL-PCB 52, 101, 138, DL-PCB 126). Die meisten PCBs dieser Gruppe zeigten einen Abfall der Induktion bei der höchsten Konzentration von 10 µM (NDL-PCB 47, 51, 95, 100, 122, 128, 136, 170, 180, 190). Betrachtet man den Chlorierungsgrad zeigte sich, dass die fünf- und siebenfach chlorierten PCBs im Vergleich zu den vier- und sechsfach chlorierten die Lumineszenz nicht so ausgeprägt induzierten.

IV.3.2. Stabil transfizierte HepG2-hXREM-Zellen

Die stabil transfizierten HepG2-hXREM-Zellen werden wie nicht stabil transfizierten HepG2 Zellen behandelt mit dem Unterschied, dass die hXREM-Zellen unter Selektionsdruck gezüchtet werden. Hierfür enthält das transfizierte Plasmid eine Antibiotika-Resistenz, wobei die Zellen unter Antibiotikaexposition absterben, die das gewünschte Plasmid nicht mehr enthalten. Die verwendeten Medien und Methoden werden im Kapitel V Methoden und Material im Detail beschrieben.

Das XREM (*Xenobiotic Responsive Enhancer Module)* spielt eine wichtige Rolle im Fremdstoffmetabolismus. Es liegt in der Promoterregion des CYP3A4-Gens und ist wichtig für dessen Induktion. Anhand der HepG2-hXREM-Zellen kann dementsprechend indirekt die Induktion von CYP3A durch die PCBs ermittelt werden.

IV.3.2.1. SEAP Messung

Bei der stabilen Transfektion dient die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) als Reportergen. Dabei entsteht bei der Dephosphorylierung des Substrats durch die alkalische Phosphatase (AP) ein instabiles Intermediat das beim Zerfall Licht mit der Wellenlänge von 477 nm emittiert. Wird diese Aktivität der AP gemessen erhält man indirekt die Fähigkeit einer Substanz XREM zu aktivieren und so die mögliche Transkription von CYP3A4.

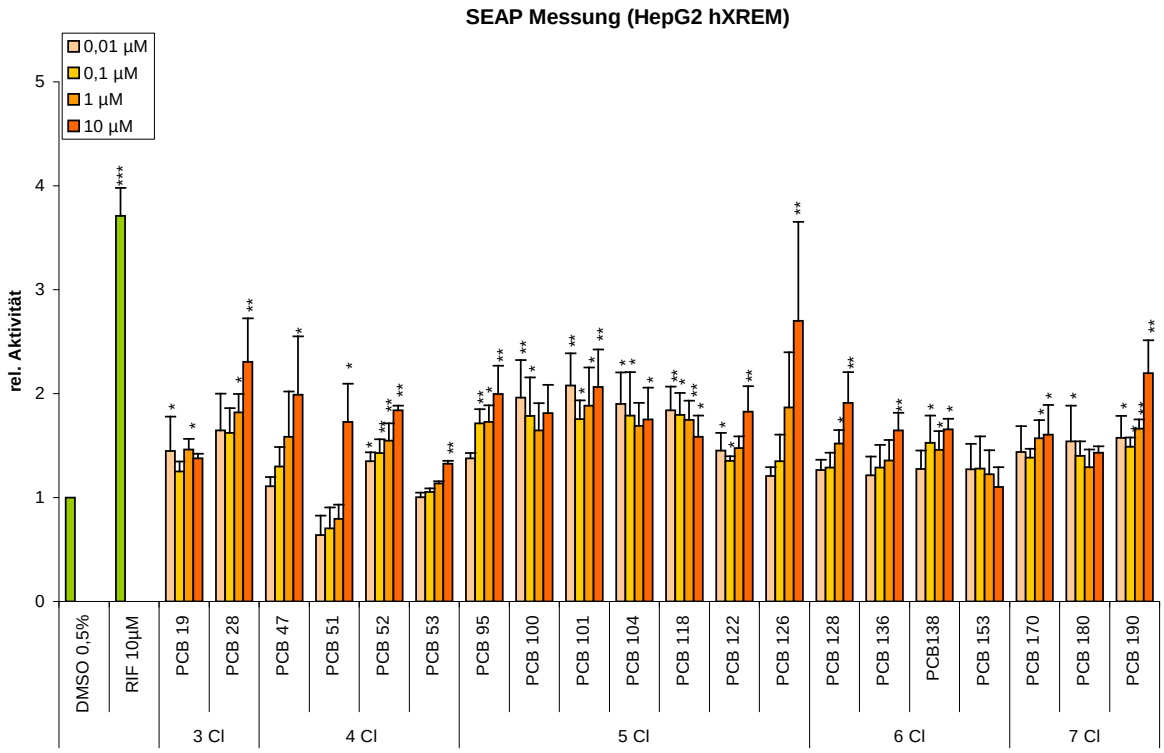


Abbildung 41 Änderung der alkalischen Phospatase-Aktivität in stabil transfizierten HepG2-Zellen. 48h Inkubation, gemessen nach der SEAP-Methode von Roche , n=3, *=p≤0,05, **=p≤0,01, ***=p≤0,001

Abbildung 41 zeigt die durch die Inkubation mit den PCBs und der Positiv-Kontrolle RIF hervorgerufenen Änderungen der AP-Aktivität. Die Erhöhung der AP-Aktivität durch RIF war extrem signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Des Weiteren erhöhten fast alle PCBs signifikant die AP-Aktivität in einer konzentrationsabhängigen Weise. Ausnahme hiervon war unter anderen NDL-PCB 153, das die AP-Aktivität nicht signifikant veränderte. Die NDL-PCBs 19, 100, 101, 104 und DL-PCB 118 steigerten zwar signifikant die AP-Aktivität aber ein konzentrationsabhängiger Trend war nicht zu erkennen. Weiterhin ist zu bemerken, dass DL-PCB 126 die AP-Aktivität in der höchsten Konzentration von 10 µM hoch signifikant induzierte.

IV.3.3. Zusammenfassung und Diskussion der *in vitro* Daten

Die in vitro Studie sollte Zusammenhänge zwischen strukturellen Eigenschaften der 20 PCBs und deren Wirkung auf unterschiedliche responsiven Elemente zeigen. Die responsive Elemente liegen in den Promotorregionen wichtiger fremdstoffmetabolisierender Enzyme.

Das XRE liegt in der Promotorregion von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1. XRE wird durch den AhR/ARNT-Komplex aktiviert. Das Dioxin TCDD ist ein wichtiger Ligand des AhR/ARNT-Komplexes, der dann an XRE bindet. Erfolgte durch die Inkubation mit den PCBs eine Aktivierung des XREs, zeigt dies einen dioxinartigen Charakter des PCBs. Das zweite ausgesuchte Element ist das PBREM, das in der Promotorregion von CYP2B-Enzyme liegt. An PBREM bindet der aktivierte CAR/RXR-Komplex. Ein wichtiger Vertreter der CAR-Induktoren ist das Barbiturat Phenobarbital. Wurde eine Aktivierung des PBREM gemessen, kann auf eine phenobarbitalartige Eigenschaft der PCBs zurückgeschlossen werden. Das XREM liegt in der Promotorregion von CYP3A-Enzymen. An dieses Modul bindet der Komplex aus PXR mit RXR. Wurde eine erhöhte XREM-Aktivität gemessen, kann ein PXR vermittelter Signalweg vermutet werden.

Die Transfektion bietet eine elegante Methode Gene in Zellen einzuschleusen und anschließend deren Funktion zu messen. Für das humane XRE und PBREM/CAR wurde die Methode der transienten Transfektion gewählt. Für das humane XREM wurde von Frau Dr. Fery im Arbeitskreis von Prof. Schrenk eine stabil transfizierte Zelllinie hergestellt. Gemessen wird die Lumineszenz die durch ein mittransfiziertes Reportergen verursacht wird.

Der Vergleich der Ergebnisse mit veröffentlichten Daten stellt sich als sehr schwer heraus da es noch keine vergleichbaren Versuche vorher gab.

Keines der NDL-PCBs induzierte XRE. Nur die Inkubation mit dem DL-PCB 126 verursachte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der relativen Lumineszenz, was zu erwarten war. Das zweite DL-PCB 118 induzierte XRE nicht. DL-PCB 118 wurde ein TEF von 0,00003 zugewiesen was es als sehr schwaches dioxinartiges PCB kennzeichnet.

Bei der Transfektion von hPBREM/hCAR wurde festgestellt, dass alle PCBs die relative Lumineszenz erhöhten. Betrachtet man den Chlorierungsgrad der PCBs, stellt man fest, dass die mit vier und sechs Chlors die Expression höher induziert als die fünf- und siebenfach chlorierten PCBs. Bei hXREM scheinen die fünf- und siebenfach chlorierten PCBs die Lumineszenz höher zu induzieren als die anderen.

Werden die hPBREM/hCAR- und hXREM-Transfektionen miteinander verglichen, zeigen sich Unterschiede in der Amplitude der Induktionen durch die einzelnen PCBs. Fasst man auch hier die PCBs bezüglich ihres Chlorierungsgrades zusammen, zeigt sich, dass die vier- und sechsfach chlorierten, zwar beide Transkritpionen erhöhen, aber eher ein CAR-Ligand Charakter besitzen. Die fünf- und siebenfach chlorierten induzieren beide Transkriptionen gleich stark und könnten so als Mixtyp-Lignaden gesehen werden.

Um diese Versuche besser auszuwerten müssten computergestützte Auswertungen der Struktur-Wrikungs-Beziehungen durchgeführt werden, wobei zahlreiche Faktoren, wie Bindungslängen, Winkel, chemo-physikalische Eigenschaften und viele weitere berücksichtigt werden. Solche Analysen werden als quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR) bezeichnet.

IV.4. Abschließende Zusammenfassung und Diskussion

Trotz des Verbotes der Produktion in den 80er Jahren ist der Eintrag von PCBs in die Natur noch immer vorhanden. Obwohl die Belastung unserer Nahrung über die Jahre abgenommen hat, sind manche Nahrungsmittel, wie Fischprodukte, nach wie vor sehr hoch belastet. Besonders die hohe Belastung Neugeborener mit PCBs über die Muttermilch stellt ein Problem dar, da potentielle Spätfolgen resultierend aus dieser Exposition noch nicht ausreichend geklärt worden sind.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen ein breites Wirkspektrum der NDL-PCBs. Außerdem zeigte sich, dass die große Gruppe der NDL-PCBs keine einheitliche Effekte verursachte, sondern unterschiedliche Enzyme induzierten. Jedoch zeigte sich, dass die Effekte die durch NDL-PCBs hervorgerufen wurden unterschiedlich zu denen sind die bei DL-PCBs beobachtet wurden.

Darum ist es empfehlenswert neben den Höchstmengen für DL-PCBs auch Höchstmengen für NDL-PCBs in der EU einzuführen. Die teure DL-PCB-Analytik könnte durch die billigere Analytik der NDL-PCBs ersetzt werden und bei Überschreitung der Grenzwerte, zusätzlich die Konzentration der DL-PCBs ermittelt werden.

IV.4.1. Studiendesign

Die Ratten-Studien wurden im Rahmen des ATHON Projektes am *Department of Environmental Health, National Institute for Health and Welfare* in Kuopio, Finnland unter der Leitung von Matti Viluksela statt. Die Verabreichung per Schlundsonde, der in Maiskeimöl gelösten PCBs, garantierte eine gleiche Dosierung aller Tiere. Zudem entspricht die orale Aufnahme der hauptsächlichen Expositionsart die beim Menschen auftritt. Die maximalen Gesamtdosen der NDL-PCBs 180 und 52 bei der 28 Tage-Studie von 1700 resp. 3000 mg/kg KG waren sehr hoch und entsprechen keines Falls der tatsächlichen Exposition des Menschen, jedoch wurden so Effekte verursacht die zur Charakterisierung der NDL-PCBs beitragen. Außerdem können so Grenzwert-Dosen berechnet werden. Bei den Perinatal-Studien waren die Dosen der PCBs auch sehr hoch gewählt worden. Da keine Informationen über den transplazentalen Transfer der PCBs und über die PCB-Konzentrationen der Muttermilch vorliegen, kann man keine Aussage nichts über die tatsächliche Exposition der Föten und anschließend der Jungtiere treffen.

Die Maus-Studien wurden von im Rahmen dieser Arbeit an der Technischen Universität Kaiserslautern durchgeführt. Auch hier wurde die Methode der Schlundsondierung angewendet, da diese die oben beschriebene Vorteile hat, gegenüber einer

intra peritonialen Behandlung, bzw. einer Verabreichung über das Futter. Die PCB-Konzentrationen in den Leberproben wurden am *Institute of Environmental Studies* der Freien Universität von Amsterdam, Niederlanden bestimmt. Basierend auf den Gehalten der 1 Tag-Studie wurden die Dosen der 5 Tage-Studie festgelegt. Dies wurde auch bei der 28 Tage-Studie angewendet, wobei hier die Konzentrationen der 5 Tage-Studie als Grundlage dienten. Die PCB-Konzentrationen in den Leberproben befinden sich im Anhang.

Die *in vitro*-Studien sollten Zusammenhänge zwischen der Wirkungsweise der PCBs mit deren strukturellen Eigenschaften aufzeigen. Die Erhöhung der Lumineszenz durch die Positivkontrollen zeigte, dass die Konstrukte funktionieren. Es ziegte sich jedoch kein eindeutiges Profil der PCBs. Einzig die fehlende Induktion des XRE-Plasmides durch die meisten PCBs, bestätigt deren nicht dioxin-aritgen Charakter. Um eine Struktur-Wirkungsbeziehung aufzustellen fehlen weitere Parameter.

IV.4.2. Mögliche Folgen der Enzym-Induktion

Fremdstoffmetaboliserende Enzyme spielen eine wichtige Rolle in der Metabolisierung von exogenen und endogenen Stoffe. Besonders die in dieser Arbeit untersuchte Phase I Enzyme CYP1A, CYP2B und CYP3A werden als Markerenzyme für Effekte betrachtet auf die im Folgenden eingegangen wird. Aber auch die Phase II Enzyme UGTs sind Teil wichtiger Vorgänge im Körper die auch im Folgenden erläutert werden.

Bei diesen Studien wurden die AhR-abhängigen CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 nicht wesentlich induziert. Induzierte CYP1A metabolisieren polyaromatische Kohlenwasserstoffe zu Intermediate, die an die DNA binden können und so zu Mutationen führen können. Folgen können neoplastische Transformationen sein (Eisenbrand G, 2001). Des Weiteren wurde berichtet, dass CYP1A zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beiträgt, die wiederum zu DNA-Schäden führen können (Schlezinger *et al.*, 1999). Außerdem ist CYP1B1 in der Metabolisierung von Östrogen involviert, was bei einer Induktion zur Folge haben könnte, dass es zu einem Ungleichgewicht im Hormonhaushalt kommen kann (Pang *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2005).

Die durch NDL-PCBs hochinduzierten CYP2B- und CYP3A-Enzyme sind maßgeblich an der Metabolisierung von Hormonen wie Testosteron, Progesteron und Androstendion beteiligt (Hukkanen, 2000). Eine Induktion dieser Enzyme könnte zu einem hormonellen Ungleichgewicht führen und eine Verweiblichung oder Vermännlichung bewirken. Eine Verweiblichung durch Aroclor wurde von Hany *et al.* berichtet (Hany *et al.*, 1999). Zudem sind CYP2B und CYP3A auch bei der Metabolisierung von vielen

Medikamenten beteiligt. Dies könnte dazu führen, dass Arzneimittel schneller oder langsamer wirken und so nicht die gewünschte Wirkung haben, wie das Beispiel von Dicumarol, das, wenn es zu schnell abgebaut wird, seine gerinnungshemmende Wirkung verliert (Pearce *et al.*, 1992).

Die UGTs sind an der Metabolisierung von endogenen Stoffen wie Billirubin und Schilddrüsenhormonen beteiligt. Bei Kooperationspartner wurde bei der 28 Tage-Studie mit adulten Ratten ein vermindeter Serumspiegel des Schilddrüsenhormons Thyroxin festgestellt. Dies wurde auch bei anderen Studien beobachtet. Die Erhöhung der UGTs verursachte eine Senkung der Konzentration der Schilddrüsenhormonen. Dies könnte zu krankhaften Veränderungen der Schilddrüse führen (Jemnitz *et al.*, 2000; Burgin *et al.*, 2001).

Bei perinatalen und postnatalen Studien mit Aroclor wurden hormonelle Ungleichgewichte der Jungtiere festgestellt die zu geschlechtsunspezifischen Verhalten führten. Dies könnte unter anderem auf die Induktion der CYP- und UGT-Enzyme zurück zuführen sein (Kaya *et al.*, 2002; Dziennis *et al.*, 2008).

V. Methoden und Material

V.1. Methoden

V.1.1. *In vivo*-Rattenstudien

Die folgenden Studien mit Ratten fanden im Rahmen des EU geförderten ATHON-Projekts im *National Institute for Health and Welfare* in Kuopio, Finnland statt. An der Analyse der entnommenen Organe waren mehrere Kooperations-Partner in Europa beteiligt. Wir erhielten schockgefrorene Leberproben die für die weiteren Analysen entsprechend verarbeitet wurden.

V.1.1.1. 28 Tage-Studie

Die aus einer Auszucht stammenden Sprague-Dawley Ratten waren zu Beginn der Studie 6 Wochen alt und gesund. Sie hatten bei einem 12h / 12h Tag-Nacht Rhythmus freien Zugang zu Wasser und Standardfutterpellets (Lactamin, Schweden). Die Gruppen bestanden aus 5 männlichen und 5 weiblichen Tieren pro Behandlungspunkt und wurden dem entsprechend in Standardkäfigen gehalten.

Die hochreinen PCB 180 und PCB 52 wurden in Maiskeimöl gelöst und per Schlundsonde mehrmals über 28 Tage verteilt appliziert. Um früh einen stationären Zustand zu erreichen wurde ein Behandlungsschema mit Ladedosen (LD) und Erhaltungsdosen (MD) gewählt, wobei beide zusammen die Gesamtdosis (TD) ergeben (Abbildung 42). Die Berechung der einzelnen Dosen verlief folgendermaßen:

$TD = LD+n\ MD$	wobei TD, LD, MD in mg/kg KG
$LD = MDa$	n = Anzahl der LDs
$a = 1/(1-e^{-k\tau})$	τ = Intervall zwischen LDs in Tagen
$k = 0{,}693/t_{1/2}$	K = Elimintationsrate
	$t_{1/2}$ = Halbwertszeit in Tagen

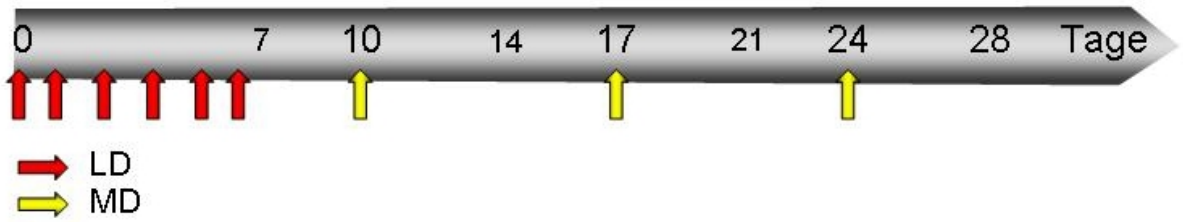


Abbildung 42 Behandlungsschema der 28 Tages-Studie mit adulten Ratten

Für PCB 180 lagen die Gesamtdosen bei 0/3/10/30/100/300/1000 und 1700 mg/kg KG und bei PCB 52 wurden folgende Dosen eingesetzt: 0/3/10/30/100/300/1000 und 3000 mg/kg KG. Die Tiere mit der Gesamtdosis 0 mg/kg KG wurden als Kontrolltiere für die anschließenden Analysen verwendet.

V.1.1.2. Ein-Generations-Studie

Die aus einer Auszucht stammenden Sprague-Dawley Ratten waren zu Beginn der Studie 6 Wochen alt und gesund. Sie hatten bei einem 12h / 12h Tag-Nacht Rhythmus freien Zugang zu Wasser und Standardfutterpellets (Lactamin, Schweden). Die Studie wird mit sechs PCB-Dosisgruppen durchgeführt, die jeweils aus 6 Muttertieren pro Gruppe bestanden. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten.

Die hochreinen NDL-PCBs 52 und 180 wurden in Maiskeimöl gelöst und per Schlundsonde den Muttertieren verabreicht. Das Schlündeln fand während der Trächtigkeit der Tiere statt, Details folgen bei den jeweiligen PCBs. Die Würfe wurden so aufgeteilt, dass jedes Muttertier 4 männliche und 4 weibliche Jungen versorgen konnte. Probenentnahmen von Jungtiere fanden postnatal am Tag 7 (PND7), PND35 und PND84 statt. Die Säugedauer betrug 28 Tage (PND28), wonach die Muttertiere zu weiteren Untersuchungen, die von anderen Projektpartner durchgeführt wurden, getötet wurden.

Die embryonale Entwicklung von Ratten hat in dem Zeitraum von Trächtigkeitstag 7 (GD7) bis GD10 ihren Höhepunkt. Darum wurde dieser Zeitraum für die Applikationen ausgewählt. Die Gesamtdosen an PCB52 betrugen 0/30/100/300/1000 und 3000 mg/kg KG des Muttertieres. Die Gesamtdosen wurden in 10 gleiche Einzeldosen unterteilt und an folgenden Tagen verabreicht: GD7, 9, 11, 14, 16, 23 (= PND1), 25, 28, 30, 32 (= PND10).

Die Gesamtdosen an PCB180 betrugen 0/10/30/100/300 und 1000 mg/kg KG des Muttertieres. Die Gesamtdosen wurden in 4 gleiche Einzeldosen unterteilt und an folgenden Tagen verabreicht: GD7, 8, 9, 10.

V.1.2. *In vivo*-Mausstudien

Als Versuchmodel für die folgenden Studien dienten Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6NCrl. Die Tiere wurden im Alter von 6 Wochen von Charles River, Sulzfeld bezogen und im Tierhaus an der TU Kaiserslautern gehalten. Sie hatten bei einem 12h / 12h Tag-Nacht-Rhythmus freien Zugang zu Wasser und Standardfutterpellets.

Getestet wurden die NDL-PCBs 28, 52, 101, 138, 153 und 180 und als Vergleich das DL-PCB 126. Die PCBs wurden in Maiskeimöl gelöst und per Schlundsonde appliziert. Das Applikationsvolumen betrug 5 ml/kg KG. Die Behandlungsgruppen bestanden aus jeweils 6 männlichen und 6 weiblichen Tiere. Die Dosis für die NDL-PCBs betrug bei jeder Applikation 20 mg/kg KG und beim DL-PCB 200 µg/kg KG. Die Kontrollgruppen erhielten die entsprechende Menge an reinem Maiskeimöl. Die Studie umfasste drei verschieden Versuchsdauern: 1 Tag, 5 Tage und 28 Tage.

Nach der entsprechenden Versuchsdauer wurden die Tiere mit Nembutal, einer Pentobarbital-Lösung i.p. sediert. Nach Überprüfung auf Schmerzfreiheit, wurde der Bauchraum geöffnet und der Magendarmtrakt zur Seite geschoben. Aus der Vena Cava wurde anschließend Blut entnommen und in einer mit Heparin beschichteten Monovette (Sarstedt, Nümbrecht) bei 2000g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde bei -20°C gelagert und zur weiteren Analyse an das medizinische Labor Drs. Püttmann und Rathenberg, Neustadt verschickt. Des Weiteren wurde die Leber herauspräpariert, aufgeteilt und schockgefroren. Teilweise wurden Teile an Kooperationspartner zur weiteren Analysen verschickt.

V.1.2.1. Behandlungsschema 1 Tag

Die Tiere wurden an Tag 0 jeweils mit 20 mg/kg KG resp. 200 µg/kg KG behandelt und an Tag 1 getötet.

V.1.2.2. Behandlungsschema 5 Tage

Die Tiere wurden an Tag 0 und Tag 2 jeweils mit 20 mg/kg KG respektiv 200 µg/kg KG behandelt und an Tag 5 getötet. Daraus ergab sich eine Gesamtdosis für die 5 Tage von 40 mg/kg KG resp. 400 µg/kg KG.

V.1.2.3. Behandlungsschema 28 Tage

Für die 28 Tage-Studie sind die PCBs bezüglich ihres Chlorierungsgrades in zwei Gruppen wie folgt aufgeteilt worden.

Von den niedrig chlorierten NDL-PCB28, 52 und 101 wurden den Tieren 10 Dosen à 20 mg/kg KG, an Tag 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 und 27 verabreicht. Die Entnahme fand am Tag 28 statt.

Von den hoch chlorierten NDL-PCB138, 153 und 180 und von dem DL-PCB126 wurden 5 Dosen verabreicht. Das Schlündeln fand am Tag 0, 3, 7, 14 und 21 statt und die Entnahme folgte am Tag 28 der Behandlung.

V.1.3. Aufarbeitung der Gewebeproben

V.1.3.1. Mikrosomenpräparation

Von den bei -80°C gelagerten Leberproben wurde ein ca. 0,5 cm großes Stück Gewebe mit Hilfe eines Skalpells abgeschnitten. Das Gewebe wurde mit 3,5 ml eiskaltem 1xIEB mittels eines Homogenisators auf Eis homogenisiert bis keine Gewebestückchen mehr zu erkennen waren. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und der Potter mit 0,5 ml 1xIEB abgespült und mit dem Homogenat vereinigt. Die Proben wurden in einer auf 4°C gekühlte Zentrifuge bei 1000g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und bei 12.000g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Überführen des Überstandes in Ultrazentrifugen-(UZ)-Eppis wurde bei 4°C für 60 Minuten bei 100.000g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100 µl Na/P_i-Puffer aufgenommen und mittels Ultraschallsonde homogenisiert. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

V.1.3.2. mRNA-Isolation

Für die Arbeiten mit RNA wurden zunächst sowohl die Arbeitsfläche gereinigt als auch die Pipetten gründlich mit RNase *AWAY* behandelt, um vorhandene RNasen zu inhibieren. Zusätzlich wurden mit Filtern verschlossene Pipettenspitzen sowie RNase-freie Lösungen verwendet.

Die Isolierung der mRNA erfolgte mittels TRIR (ABgene) nach Vorschrift des Herstellers. Von den bei -80 °C gelagerten Gewebeproben wurde ein 0,5 cm großes Stück abgetrennt und mit 2 ml kaltem Trizol in einem Glaspotter unter Kühlung homogenisiert bis keine Gewebereste mehr zu sehen waren. Das Homogenat wurde in ein 14 ml Zentrifugenröhrchen überführt und der Potter mit 1 ml TRIR nachgespült

Zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe wurde das Homogenat noch weitere 5 min auf Eis inkubiert, dem Ansatz anschließend 600 µl Chloroform hinzugegeben und für 15 Sekunden per Hand durchmischt.

Nach erneuter 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Homogenat durch anschließende Zentrifugation bei 12000g und 4 °C für 15 min in drei Phasen aufgetrennt: die untere Phenol-Chloroform-Phase, die Interphase und die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält.

Die wässrige Phase wurde nun vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und zur Fällung der RNA ein gleiches Volumen an vorgekühltem Isopropanol auf die Proben gegeben, anschließend wurde der Ansatz vorsichtig invertiert, bis eine Schlierenbildung sichtbar wurde. Zur vollständigen Fällung der RNA wurden die Proben für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend erneut bei 12000g und 4 °C für 10 min zentrifugiert.

Nach Entfernen des Überstands wurde das erhaltene RNA-Pellet mit 1,5 ml RNase-freiem Ethanol (75 %) zweimal gewaschen, indem es kurz gevortext und bei 7500g und 4 °C für 5 min erneut zentrifugiert wurde.

Der Überstand wurde verworfen und die Proben für ca. 10 min zum Verdampfen des restlichen Ethanols bei Raumtemperatur getrocknet, wobei darauf zu achten war, dass das Pellet nicht vollständig austrocknet, da dies die Löslichkeit stark herabsetzt.

Das getrocknete mRNA-Pellet wurde anschließend in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen, mittels 1-minütigem vortexen solubilisiert und durch anschließende Inkubation bei 60 °C für 10-15 min vollständig gelöst. Die wässrige mRNA-Lösung wurde bei -80 °C gelagert.

V.1.3.3. Proteinbestimmung

Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Der blaue Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau wird nach Bradford zum Nachweis von Proteinen verwendet. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffs verschiebt sich in Gegenwart von Proteinen in sauerem Milieu von 465 nm zu 595 nm, da der Farbstoff durch Komplexbildung mit den Proteinen stabilisiert wird. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische oder nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine, wobei die Wechselwirkung mit Arginin am wichtigsten ist. Mit einer Nachweisgrenze von 0,05 – 0,5 µg Protein pro ml ist der Bradford-Assay die empfindlichste Methode Proteine nachzuweisen..

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Mikrosomenproben wurde eine Bovine Serum Albumin (BSA)-Eichgrade mitgeführt. Dazu wurde eine 5 mg/ml Standard-BSA-Lösung mit ddH_2O im Verhältnis 1:10 auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml verdünnt. Aus

dieser Verdünnung wurde nach folgendem Pipettierschema die BSA-Standardkurve hergestellt und in einem Plattenreader gemessen.

Tabelle 14 Pipettierschema für BSA-Standardreihe

µg Protein/Well	µl 0,5 mg/ml BSA	µl H_2O
0	0	100
1	10	90
2	20	80
4	40	60
6	60	40
8	80	20
10	100	0
15	12 µl der 5 mg/ml Standardlösung	68

Von jeder Konzentration wurden jeweils 20 µl/Well in eine 96 Well-Platte pipettiert (Dreifachbestimmung). Von den Mikrosomenhomogenaten wurden jeweils 4 µl Probe mit 80 µl ddH_2O vermischt und ebenfalls jeweils 20µl/Well in eine 96 Well-Platte pipettiert (Dreifachbestimmung). Das Bradford-Reagenz (Biorad) wurde im Verhältnis 1:5 mit ddH_2O verdünnt und davon jeweils 200 µl/Well pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 570 nm im Plattenreader gemessen. Anhand der Gradengleichung der BSA-Standardreihe wurde die Konzentration der Proben ermittelt.

V.1.4. Biomolekulare Arbeiten

V.1.4.1. SDS-Palyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein Verfahren bei dem Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes „wandern“ die Proteine durch das Polyacrylamid-Gel und werden dabei aufgetrennt.

Durch die Behandlung der Proben mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die individuellen Ladungsunterschiede der Protein überdeckt, Wasserstoffbrückenbindungen gespalten, sowie hydrophobe Wechselwirkungen und die Sekundärstrukturen aufgehoben. Zusätzlich werden durch Zugabe von ß-Mercaptoethanol alle Disulfidbrücken gespalten, so dass die Proteine voll gestreckt vorliegen. Die Anzahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der nun negativ geladenen Proteine und können so entsprechend dem Gewicht aufgetrennt werden.

Das Gel besteht aus Polyacrylamid das durch eine chemische Kolpolymerisation eines Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisches entsteht. Als Katalysator dient N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und als Radikalstarter dient Ammoniumperoxodisulfat (APS).

Um die Auftrennung der Proteine zu verbessern verwendet man die diskontinuierliche Gelelktrophorese. Hierbei werden Zwei verschiedene Polyacrylamidgele semkrecht übereinander polymerisiert. Die beiden Gele unterscheiden sich dabei in der Dichte, dem pH-Wert und der Ionenladung. Das großporige Sammelgel (pH 6,8) fokussiert die Probe zu einer scharfen Bande. Im darunterliegendem engporigen Trenngel (pH 8,8) werden die Proteinen dann aufgetrennt. Im Elektrodenpuffer werden als Anionen ausschließlich langsame Folgeionen verwendet, z.B. Glyzin, im Gel ausschließlich schnelle Leitionen, z.B. Cl^-. Bei Gleichspannung wandern die Cl^-Ionen dem Protein und dem Glyzin im Sammelgel voraus. Durch den niedrigen pH-Wert von 6,8 im Sammelgel wird das Glyzin-Ion protoniert und fällt als Ladungsträger aus. Die Proteine bewegen sich langsam auf die Grenze der beiden Gele zu wo sie dann auf den hohen Widerstand des engporigen Trenngels treffen. Hier werden die Banden nochmals aufkonzentriert. Das niedrigmolekulare Glyzin überholt nun die Proteine, so dass diese sich nun in einem homogenen Puffermillieu befinden und anfangen sich nach ihrer Molekulargröße aufzutrennen.

Mit Hilfe eines Gießstandes wird zuerst das 15%ige Trenngel gegossen und anschließend das 5%ige Sammelgel (Tabelle 15). Dafür wird jeweils eine dicke Glasplatte mit Spacern und eine dünne Glasplatte mit Isopropanol von Fett befreit und im Gießstand befestigt. Dann wird das Trenngel zusammenpipettiert und zügig bis zu ¾ der Plattenhöhe eingefüllt. Zum Glätten der Oberfläche werden einige Tropfen n-Butanol aufpipettiert. Nach dem Polymerisieren wird mittels Filterpapier das n-Butanol vollständig entfernt. Nun wird das Sammelgel zusammenpipettiert und bis zur Oberkante eingefüllt und anschließend der Probenkamm hineingesteckt. Nach vollständiger Polymerisation werden jeweils 2 Platten mittels Plattenhalter in eine Elektrophoresekammer gestellt. Die Kammer wird mit 1x Elektrophoresepuffer so befüllt, dass der Puffer nicht bis über die Glasplatten reicht. Nun wird vorsichtig der Probenkamm herausgezogen.

Tabelle 15 Pipettierschema für Trenn und Sammelgel

	Trenngel (15% Acrylamid)	Sammelgel (5% Acrylamid)
Acrylamid (30%)	2,5 ml	0,33 ml
Aqua bidest	1,15 ml	1,09 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	1,25 ml	/
0,5 M Tris, pH 6,8	/	0,5 ml
SDS (10%)	50 µl	20 µl
APS (10%)	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl

Im Vorfeld werden die Proben wie folgt vorbereitet: eine Proteinmengenlösung von 10 µg, werden auf 10 µl mit ddH_2O aufgefüllt und mit 5 µL 6x Lämmli-Puffer versetzt und bei 95°C für 5 min inkubiert und dann runterzentrifugiert. Anschließend werden 15 µl der abgekühlten Probe in eine Tasche pipettiert. Als Molekulargewichtstandard dient der Kaleidoskope Standard von BioRad, von dem jeweils 5µl in eine Tasche gefüllt werden. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 100 V.

V.1.4.2. Western-Blot (semi-dry Blot)

Um die durch die SDS-Page aufgetrennten Proteine zu detektieren bedient man sich der Methode des semi-dry Blots. Der Western Blot ist ein Verfahren bei dem durch eine angelegte Stromstärke die Proteine aus dem Gel auf eine Membran transferiert werden. In unseren Fall handelt es sich um eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran von BioRad. Anschließend werden mittels proteinspezifischer Antikörper die Proteine sichtbar gemacht.

Die hier verwendete semi-dry-blot-Apparatur besteht aus zwei Plattenelektroden zwischen denen ein Stapel aus Filterpapier, Membran und Gel gelegt wird. Das mit Anodenpuffer I getränkte Filterpapier (7 x 9,5 cm) liegt auf der mit Anodenpuffer I benetzten Anode. Dann folgen zwei mit Anodenpuffer II getränkte Papiere worauf die mit Methanol aktivierte und mit Anodenpuffer II äquilibrierte Membran (6,5 x 9 cm) gelegt wird. Dann folgt das Gel worauf drei mit Kathodenpuffer getränkte Papiere gelegt werden. Eventuelle Luftbläschen werden mittels Glasstab durch vorsichtiges Rollen herausgedrückt. Die Apparatur wird mit der Kathode geschlossen und mit einem Gewicht beschwert. Es wird eine

Stromstärke von 45 mA pro Membran angelegt. Nach einer Stunde ist der Transfer abgeschlossen.

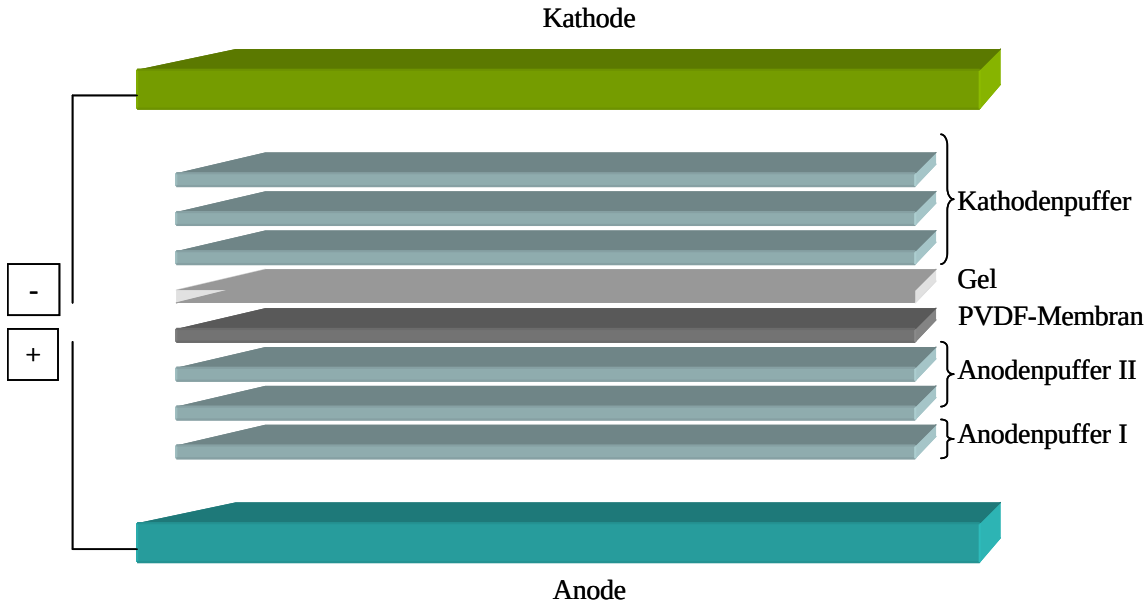


Abbildung 43 Aufbau der semi-dry Blot-Apparatur

V.1.4.3. Immunoblot und Chemolumineszenz

Beim Immunoblot können bestimmte Proteine mittels Immunoglobulin (IgG) oder monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden. Beim Enzym gekoppelten Immunoblot wird ein mit einem Enzym markierter Antikörper gegen den spezifisch bindenden Antikörper gerichtet. Meistens ist eine Peroxidase an den Antiköper gekoppelt die dann über eine Enzym-Substrat-Reaktion den Nachweis des Proteins ermöglicht.

Nach dem Western Blot wird die PVDF-Membran in ca. 10 ml Blockingpuffer eine Stunde lang bei Raumtemperatur geschüttelt, dabei blocken die inerten Proteine des Milchpulvers unspezifische Bindungsstellen. Das enthaltende Detergenz Tween-20 unterstützt dabei beim Entfernen von unsozierten Bestandteilen. Anschließend wird die Membran mit dem Erst-Antikörper inkubiert, der spezifische gegen das Zielantigen gerichtet ist. Je nach Antikörper wird mit oder ohne Milchpulver inkubiert. Wird ohne Milchpulver inkubiert muss die Membran viermal mit TBS-T vorm Inkubieren gewaschen werden. Die Einzelheiten kann man aus entnehmen. Nach der Erst-Antikörper-Inkubation wird die Membran dreimal mit TBS-T jeweils 5 Minuten lang gewaschen um überschüssige Antikörper zu entfernen. Nach dem Waschen wird die Membran mit dem Zweit-Antikörper inkubiert, der spezies-spezifisch an einer konstanten Region des Erst-Antikörpers bindet. Dieser ist mit der

Meerretichperoxidase gekoppelt die später durch eine Ezym-Substrat-Reaktion die Detektion ermöglicht. Dieser wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wird die Membran viermal mit TBS-T gewaschen und danach einmal mit TBS.

Tabelle 16 Eingesetzte Antikörper beim Immunoblot

Protein	Species	Verdünnung in TBS-T mit/ohne 5% Milchpulver	Katalog	Firma
CYP1A1 (H-70)	m,r,h	1:1000 mit	Sc-20772	Santa Cruz Biotechnologie
CYP1A2 (D1tkt5)	m,r,h	1:1000 mit	Sc-53241	Santa Cruz Biotechnologie
CYP1B1 (H-105)	m,r,h	1:1000 mit	Sc-32882	Santa Cruz Biotechnologie
CYP2B1/2 (9.14)	m,r	1:1000 mit	Sc-73546	Santa Cruz Biotechnologie
CYP3A1 (P6)	m,r,h	1:1000 mit	Sc-53246	Santa Cruz Biotechnologie
UGT1A1	m,r,h	1:1000 mit	AB10339	Millipore
UGT1A6 (D-20)	m,r	1:1000 mit	Sc-27434	Santa Cruz Biotechnologie
VDAC1	m,r,h	1:1000 ohne	4866	Cell Signaling
Goat anti-mouse		1:3000 ohne	Sc-2005	Santa Cruz Biotechnologie
Goat anti-rabbit		1:3000 ohne	Sc-2004	Santa Cruz Biotechnologie

m=Maus, r=Ratte, h=Mensch

Im Anschluss findet die Detektion der Chemolumineszenz mittels Ezym-Substrat-Reaktion statt. Dafür wird die Membran mit 9 ml Luminol, 1 ml Lösung B und 100 µl H_2O_2-Lösung (1 ml Tris pH=8,5 und 50 µl H_2O_2) während einer Minute inkubiert. Dabei wird das Luminol, ein Diazylhydrazid, im alkalischen Milieu von der Meerrettich-Peroxidasa oxidiert, wobei es einen elektronisch angeregten Zustand erfährt. Beim Übergang vom angeregten Zustand zum Grundzustand emittiert das Luminol blaugrünes Licht, dessen Intensitätsmaximum bei einer Wellenlänge von 428 nm liegt. Die aktivierten Membranen werden mit Hilfe des LumiImager und der Software LumiAnalyst 3.1 (Roche Diagnostics, Mannheim) detektiert. Die Dauer der Detektion kann von 30 Sekunden bis zu 10 Minuten dauern, abhängig von der Bandenintensität.

V.1.4.4. Real-Time PCR

V.1.4.4.1. Reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT-Reaktion) ermöglicht die Umschreibung von RNA in komplementäre cDNA, die anschließend bei der *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) verwendet wird. Für diese Arbeit wurde der iScript-Kit (BioRad) verwendet und nach Anleitung des Herstellers im MyIQ-Cycler (BioRad) durchgeführt. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

5xReaktionsmix	4µl
Reverse Transkriptase	1µl
Nukleasefreies Wasser	14 µl
mRNA 1µg/µl	1µl

Tabelle 17 RT-Reaktionsverlauf

Temperatur	Dauer
25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min
4°C	∞

V.1.4.4.2. RT-PCR

Die qRT-PCR wurde mittels ABsolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix (ABgeen) im iCycler (BioRad) durchgeführt. Als Probe diente die zufuhr hergestellt cDNA. Die PCR besteht aus drei Hauptschritten erstens die Denaturierung der doppelsträngigen cDNA, zweitens die Anlagerung der Primer bei einer spezifischen Temperatur und drittens die Synthese der komplementären Stränge durch die Taq-Polymerase. Diese drei Schritte werden 40-mal wiederholt und in jedem Zyklus wird bei einer Wellenlänge von 490 nm die Fluoreszenz des in den Doppelstrang eingelagerte SybrGreens gemessen. Durch die spezifischen Primer wird das gewünschte Produkt bevorzugt amplifiziert. Steigt dessen Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz spricht man vom Cp-Wert (*Crossing Point).* Dieser Wert wird dann zur weiteren Berechnung verwendet. An die PCR schließt sich die Schmelzkurve an, wobei die Temperatur kontinuierlich erhöht wird. Diese Kurve dient zur Überprüfung der Spezifizität der PCR, da mit steigender Temperatur die Fluoreszenz beim Schmelzpunkt des gewünschten PCR-Produktes abrupt abfällt. Durch Ableitung der Kurve erhält man die Schmelztemperatur des Produktes. Würden Nebenprodukte entstehen würde die Fluoreszenz mehrmals abfallen und man erhielte mehrere Schmelztemperaturen. Das RT-PCR Programm verlief wie folgt:

Zyklus 1	1x	95°C	15 min	Aktivierung der Taq-Polymerase
Zyklus 2	40x	95°C	20 sec	Denaturierung
		50-64°C	30 sec	Anlagerung, Temperatur Primer spezifisch
		72°C	30 sec	Synthese bei optimaler Temperatur für Taq
Zyklus 3	1x	95°C	1 min	Denaturierung
Zyklus 4	1x	58°C	1 min	Beginn der Schmelzkurve
Zyklus 5	80x	55°C	10 sec	+ 0,5°C bei jedem Zyklus

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 18 aufgelistet. Die Primer wurden mit Hilfe von BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), online verfügbar von NCBI, ausgesucht und mittels Beacon-Designer 3.0 bestätigt. Bei der Validierung der Primer wurde darauf geachtet dass sie sehr spezifisch nur ein Produkt bilden. Des Weiteren sollten sie komplementär zu RNA-Sequenzen sein, die sich durch Exon-Brücken auszeichnen. Das gebildete Produkt sollte nicht größer als 200 bp sein, da sonst die Synthese zu lange dauert und die dNTPs schnell zur Neige gehen könnten. Die Anlagerungstemperatur (Ta) der Primer wurde mit Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt und anschließend wurde an Hand einer cDNA Verdünnungsreihe die Effizienz bestimmt. Es wurden nur Primer verwendet deren Effizienz bei annähernd 100% lag.

Tabelle 18 Verwendete Primer für RT-PCR

Primer		5' Sequencen 3'	bp	Ta
Ratte				
rCYP1A1	for	CCT CTT TGG AGC TGG GTT TG	20	55
	rev	CCT GTG GGG GAT GGT GAA	18	
rCYP1A2	for	TCA ATG ATA ACT TTG TGC TGT CTC TG	26	58
	rev	CTG GAT ACT GTT CTT GTT GAA GTC TTG	27	
rCYP1B1	for	GAG TTG GTG GCA GTG TTG	18	58
	rev	GCA TCG TCG TGG TTG TAC	18	
rCYP2B1	for	ATG GAG AAG GAG AAG TCG AAC C	22	64
	rev	CTT GAG CAT CAG CAG GAA ACC	21	
rCYP3A1	for	CCA GCA GCA CAC TTT CCT TTG	21	52
	rev	GGT GGG AGG TGC CTT ATT GG	20	
rUGT1A1	for	TTG TGG AAC TTG GGC GGA GTG	21	50
	rev	AGC AGC CAG ACA GCA GCA TAC	21	
rUGT1A6	for	TGG CTT GCC TTC TTC CTG CTG	21	50
	rev	CGT TCA CTG AGG TGC TCC ACT ATC	24	

rß-Actin	for	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CCA	21	58
	rev	TCT CCG GAG TCC ATC ACA ATG	21	
Maus				
mCYP1A1	for	ACT TCA TTC CTG TCC TCC GTT ACC	24	52
	rev	GCC CTT CTC AAA TGT CCT GTA GTG	24	
mCYP1A2	for	CCG AGG AGA AGA TTG TCA ACA TTG	24	52
	rev	GCC AAC CAC CGT GTC CAG	18	
mCYP2B10	for	AGT GTG GAG GAG CGG ATT CAG G	22	60
	rev	AAC AGC TCC AGC AGG CGC AA	20	
mCYP3A44	for	ACA GAG AGT CAC ACA TAC ATC TGG AGG	27	58
	rev	TGT GTA CGG GTC CCA TAT CGG TAG AG	26	
m36b4	for	GCC ACC TGG AGA ACA ACC	18	58
	rev	GCC AAC AGC ATA TCC CGA ATC	21	

V.1.4.4.3. Berechnung

Die RT-PCR wurde mittels der $\Delta\Delta C_P$ Methode ausgewertet. Dabei geht man davon aus, dass die Primer-Effizienz bei annähernd 100% liegt (weitere Erklärungen siehe oben). Während der RT-PCR zeichnet das Gerät die Fluoreszenz von SybrGreen auf. Steigt diese zum ersten Mal signifikant über die Hntergrundfluoreszenz spricht man vom C_P-Wert (*crossing point*). Die x-fache Induktion wird mit Hilfe der C_P-Werte des Referenzgenes (Bsp. β-Actin) und des zu messendem Gen (Bsp. CYP1A1) wie folgt berechnet.

$\Delta C_P = C_P$ (Gen) – C_P (Referenzgen)

$\Delta\Delta C_P = \Delta C_P$ (Behandlung) – ΔC_P (Kontrolle)

x-fache Ind. = $2^{-\Delta\Delta C_P}$

Die 2 ergibt sich aus der 100% Effizienz der Primer, da bei einer solchen Effizienz idealer Weise das Amplifikat bei jeden Zyklus verdoppelt wird.

V.1.4.5. Enzym-Aktivität nach Kennedy

Die Enzym-Aktivität von CYP1A (EROD) und CYP2B (PROD) wird nach einer modifizierten Methode von Kennedy *et al.* bestimmt (Kennedy and Jones, 1994). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Aktivität und die Proteinkonzentration in einem Lauf auf der gleichen Platte gemessen werden können.

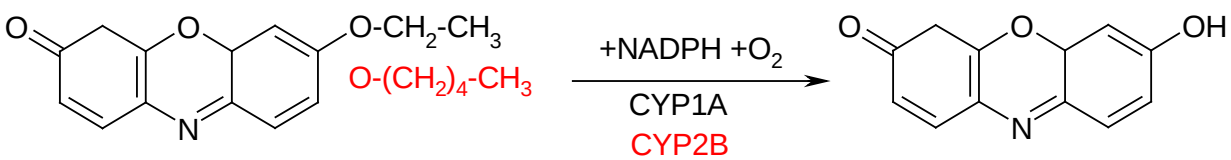


Abbildung 44 Umsetzung von Etoxyresorufin bzw. Pentoxyresorufin zu Resorufin

Die Monooxygenasen CYP1A bzw CYP2B setzen unter NADPH-Verbrauch durch Abspalten der Alkylgruppe von Etoxyresorufin (EROD) bzw. Pentoxyresorufin (PROD) das fluoreszierende Resorufin frei, das dann fluorometrisch gemessen werden kann. Anhand einer Resorufin-Standardreihe wird die Umsetzung bestimmt.

Anschließend wird der Proteingehalt der Proben durch die Zugabe von Fluorescamin bestimmt. Hierbei bildet sich ein Komplex aus Protein und Fluorescamin der dann fluorometrisch vermessen wird. Anhand einer BSA-Standardreihe werden die Proteingehalte bestimmt. Die Aktivität wird dann in pmol Resorufin pro mg Protein und Minute angegeben.

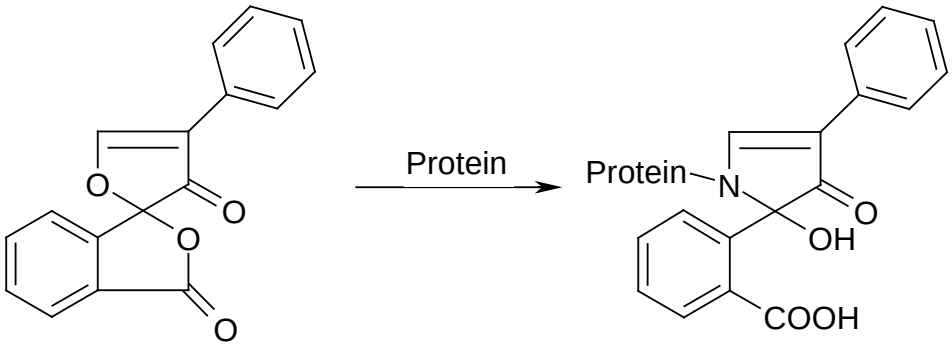


Abbildung 45 Entstehung des Fluorescamin-Protein Komplexes

Die Lösungen werden wie unter dem Kapitel Material angesetzt. Die Proben werden aufgetaut und auf Eis gelagert. Die Arbeiten sollten bei geringer Lichteinwirkung stattfinden da die Substrate lichtempfindlich sind. Zuerst wird nach folgendem Pipettierschema auf einer 96-well-Platte eine Standardreihenplatte erstellt und anschließend im Fluoroskan bei 37°C nach kurzer Inkubationszeit vermessen. Das NADPH und die Stop-Lösung (enthält Fluorescamin) werden über die Dispenser des Gerätes dazu pipettiert. Das Resorufin wird bei einer Extinktionswellenlänge (EX) von 544 nm und einer Emissionswellenlänge (EM) von 590 nm vermessen, für den Proteinkomplex gelten folgende Wellenlängen; EX:390 EM:460.

Tabelle 19 Pipettierschmea für Standardreihenplatte

	Kontrolle		Stan. 1	Stan. 2	Stan. 3	Stan. 4	Stan. 5	Blank	leer
	1		2	3	4	5	6	7	8
A	NaPi	125	114	101	83	66	50	135	-
B	NADPH	10	10	10	10	10	10	-	-
C	ER	25	25	25	25	25	25	25	-
D	BSA	-	10	20	30	40	50	-	-
E	Reso.	-	1	4	12	19	25	-	-
F	Stop	65	65	65	65	65	65	65	-

Für die Messplatte werden 5 µl der Probe in 120 µl NaPi-Puffer pipettiert das auf einer 96 Well-Platte vorgelegt wurde. Dann werden 25 µl der Etoxyresorufin- bzw. der Pentoxyresorufin-Arbeitslösung dazu gegeben und anschließend wird die Platte in den Plattenreader gestellt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von NADPH in jedes Well über den Dispenser startet die Reaktion. Nach 10 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe der acetonitril-haltigen Stop-Lösung abgestoppt, gleichzeitig wird das Fluorescamin dazugegeben. Es ist darauf zu achten dass die Zugabe der Stop-Lösung in jedem Well nach der gleichen Zeitspanne erfolgt. Die Dispensierzeiten müssen dementsprechend angepasst werden. Danach folgt die Messung bei den oben angegebenen Wellenlängen.

Mit Hilfe der unten stehenden Protein- und Resorufingehalte werden Standardgraden angefertigt. An Hand der Geradengleichungen werden die Resorufin- und Proteingehalte der Proben bestimmt. Bezieht man die Resorufingehalte auf die Proteingehalte der jeweiligen Proben und teilt diese durch die Inkubationszeit von 10 Minuten erhält man die Aktivität in pmol/(mg min)

Tabelle 20 Protein- und Resorufingehalte pro Well der Standardreihen

Reihe	Protein [mg / Well]	Resorufin [pmol / Well]
1	0	0
2	0,02	7
3	0,04	28
4	0,06	84
5	0,08	133
6	0,1	175

V.1.5. In vitro-Arbeiten

V.1.5.1. Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einschleusen von DNA in Säugerzellen. In unserem Arbeitskreis hat sich auf Grund ihrer leichten Anwendung und hoher Effizienz die Lipofektion durchgesetzt. Hierbei wird ein Lipid oder Lipidgemisch mit der zu transfizierenden DNA gemischt, wobei sich ein Liposom-DNA-Komplex bildet. Bei der Inkubation von Zellen fusioniert der Komplex mit der Zellmembran und die DNA gelangt bis in den Zellkern. Die Säugerzelle kann nun die Fremd-DNA transkribieren und die gewünschten Proteine können untersucht werden.

Verlieren die Zellen nach gewisser Zeit die Fähigkeit das gewünschte Protein zu synthetisieren, durch ausschleusen oder verdauen der Fremd-DNA, spricht man von transienter Transfektion. Bei der stabilen Transfektion hingegen behalten die Zellen die Fähigkeit die Fremd-DNA zu transkribieren. Eine stabil transfizierte Zelllinie erhält man durch Selektionsdruck, wobei durch miteingeschleuste Resistenzgene zum Beispiel gegenüber einem bestimmten Antibiotikum, nicht transfizierte Zellen abgetötet werden.

Als Lipofektionsreagenz wurde für diese Arbeit FuGENE HD (Roche Diagnostics GmBH) verwendet. Es handelt sich um eine geeignete Mischung von Lipiden mit anderen Bestandteilen, die die Transfektion zusätzlich unterstützen und so die Effizienz zusätzlich erhöhen.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide und stabil transfizierte Zellen wurden von Frau Yvonne Fery in unserem Arbeitskreis hergestellt. Weitere Details zum Aufbau und Herstellung können in Frau Ferys Dissertation nachgelesen werden(Fery, 2009).

V.1.5.2. Transiente Transfektion in HepG2

Für diese Arbeit wurden Palsmide verwendet, die zum einen humanes XRE (*xenobiotic response element*) enthalten und zum anderen humanes PBREM/CAR (*phenobarbital responsive enhancer module* / *constitutive active receptor*) verwendet. Die Palsmide wurden in die humane Hepatomzelllinie HepG2 transient transfiziert. Das optimale Verhältnis von FuGENE HD zu Plasmid-DNA ist 3:1. Der konstitutiv aktive Renilla Luciferase Reportergenvektor pRL-SV40 wurde zur Normalisierung der Transfektion eingesetzt. Alle Medienzusammensetzungen befinden sich im Kapitel Material.

Die HepG2 wurden unter Standard-Zellkulturbedingungen gezüchtet. Bei konfluenter Zellkulturfalsche wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin abgelöst und mit 10 ml Aussaatmedium aufgenommen. Zum Vereinzeln wurde die Zellsuspension mehrmals mit einer Glaspipette

aufgenommen und wieder in die Flasche zurückgegeben. Anschließend wurde mit einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl der Zellen bestimmt. Für die transiente Transfektion wurden 100.000 Zellen/Well ausgesät und 20-24 Stunden anwachsen gelassen.

FuGENE HD und die Plasmide wurde auf Raumtemperatur gebracht und die Medien bei 37°C warm gestellt. Ein 100 µl Transfektionsansatz reichte für 3 Wells einer 24 Well-Platte. Tabelle 21 zeigt die Zusammensetzung des Transfektionsansatzes der nach dem Ansetzen bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubieren musste. Beim Ansetzen ist darauf zu achten, dass es zu keinem direkten Kontakt zwischen FuGENE HD und dem Plastikgefäß kommt, sondern das OptiMEM vorgelegt wird. Währenddem wurde das Aussaatmedium der 24 Stunden angewachsenen HepG2 abgesaugt, mit sterilem, 37°C warmen PBS gewaschen und anschließend 475 µl Transfektionsmedium in die Wells vorgelegt. Nach der 15 minütigen Inkubationszeit wurden 25 µl des Transfektionsansatzes direkt in das vorgelegte Medium tropfenweise hinzu pipettiert. Die Zellen wurden anschließend für 6 Stunden im Brutschrank transfiziert. Anschließend gibt man zu den 500 µl Transfektionsmedium 500 µl Inkubationsmedium hinzu, das mit dem zu untersuchenden Substanzen zuvor versetzt wurde. Die Endkonzentration an DMSO betrug dann 0,5%. Die Zellen wurden 48 Stunden inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend für die nachfolgende Reportergenanalyse bei -80°C eingefroren oder gleich weiter verwendet.

Tabelle 21 Transfektionsansatz

OptiMEM	ad 100 µl
Vektor insgesamt	1 µg
pRL-SV40	0,05 µg
FuGene HD	3 µl

V.1.5.3. Stabil transfizierte HepG2-hXREM-Zellen

Für eine stabile Transfektion ist ein Selektionsmarker von Nöten. Für diese Transfektion wurde ein Plasmid gewählt auf dem sich ein Antibiotikaresistenzgen gegen Neomycin befindet. In diesen Vektor wurde von Frau Fery das humane XREM (*xenobiotic responsive enhancer module*) eingebaut und erfolgreich in HepG2 stabil transfiziert (Fery, 2009). Zur späteren Auswertung enthielt dieses Palsmid ein Reportergen für die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP), was weiter unten ausführlicher erklärt wird.

Die HepG2-hXREM wurden unter Standardbedingungen gezüchtet. Durch die Zugabe von G418 (Neomycin-Analogon) wird der Selektionsdruck ausgelöst, Zellen die das

gewünschte Plasmid nicht tragen sterben ab. Bei konfluenter Zellkulturflasche werden die Zellen mit 2 ml Trypsin abgelöst und mit 10 ml Aussaatmedium aufgenommen und vereinzelt. Die Zellzahl wird mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und anschließend werden 30.000 Zellen/Well auf einer 96 Well-Platte ausgesät. Die Anwachszeit betrug 20-24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit denen im Inkubationsmedium gelösten Substanzen für 48 Stunden inkubiert (DMSO 0,5%). Danach wurden die Well-Platten für die Reportergenanalyse vorbereitet.

V.1.5.4. Reportergenanalysen

Reportergensysteme werden genutzt um die Genexpression in eukaryonten Zellen zu untersuchen. Reportergene lassen sich mit biochemischen oder histochemischen Methoden nachweisen. Sie sind auf dem Plasmid dem nachzuweisenden Gen nachgeschaltet, so dass bei einer Aktivierung des zu untersuchendem Gens auch die Transkription des Reportergens stattfindet. Die einfache Messung der Reportergenaktivität ist dann der indirekte Nachweis für die Aktivierung des gewünschten Gens.

Unter den viel verschiedenen Systemen wurden in unserem Arbeitskreis zwei verschiedene Reportergensysteme eingesetzt. Bei der transienten Transfektion wurde ein System aus zwei Luciferasen eingestzt und das Gen für die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) diente bei der stabilen Transfektion als Readout.

V.1.5.5. Dual-Luciferase Reporter Assay System

Das Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega arbeitet mit zwei verschiedene Luciferasen, der Firefly- und der Renilla-Luciferase. Dabei dient die Firefly-Luciferase als experimenteller Reporter, der mit seiner Aktivität indirekt die Induktion des gewünschten Gens durch die Inkubation mit den Substanzen. Die Renilla-Luciferase dient als interne Kontrolle um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen. Durch Normalisierung der Firefly-Aktivität auf die interne Kontrolle wird die aus den unterschiedlichen Zellviabilitäten und Transfektionseffizienzen eine experimetelle Variabilität minimiert (Promega, 2006).

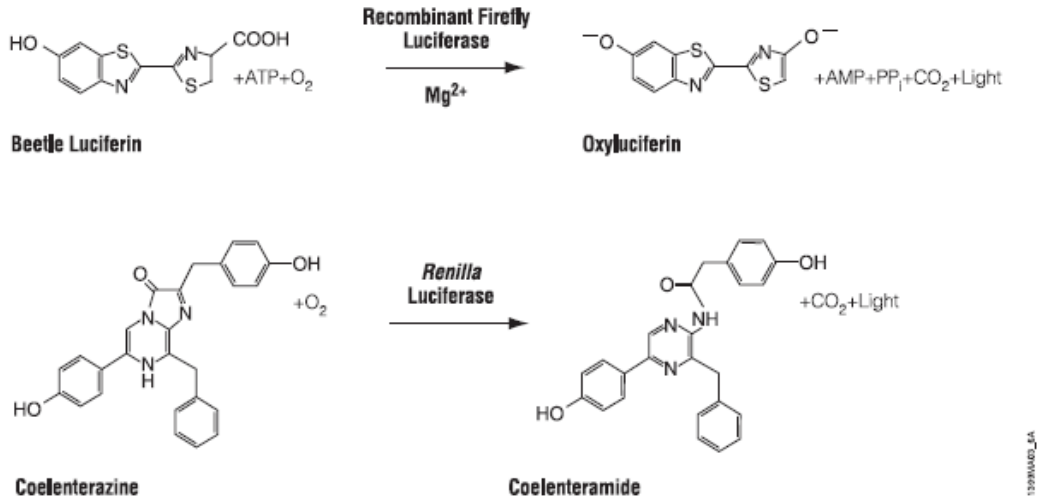


Abbildung 46 Bioluminiszenz-Reaktionen katalysiert von Firefly- und Renilla-Luciferase (Promega, 2006)

Die Durchführung verläuft leicht modifiziert nach dem Herstellerprotokoll. Die 24 Well-Platten mit den Zellen werden entweder direkt nach dem Waschen oder nach dem Einfrieren zu einem späteren Zeitpunkt vermessen. Mit 100 µl passiven Lysepuffer pro Well werden die Zellen lysiert. Dabei werden sie bei Raumtemperatur während 15 Minuten geschüttelt. 20 µl des Lysats werden in ein Well einer weißen 96 Well-Platte pipettiert und mittels Fluoroskan lumimetrisch vermessen. Das restliche Lysat kann bei -20°C aufbewahrt werden. Bei Raumtemperatur wird zuerst die Firefly-Luciferase vermessen, indem 65 µl Luciferase Assay Reagent II (LAR II) zum Lysat hinzudispensiert wird. Durch die Zugabe von LAR II wird ein stabiles Lumineszenzsignal generiert das mit einen Verzögerung von 2 Sekunden nach Zugabe für 10 Sekunden gemessen wird. Diese Reaktion wird durch die Zugabe von 65 µl des Stop and Glo Reagenz gestoppt und gleichzeitig wird die Renilla-Luciferase initiiert. Diese wird ebenfalls nach einer Verzögerung von 2 Sekunden für 10 Sekunden gemessen.

V.1.5.6. SEAP Reporter Gene Assay

Bei der stabilen Transfektion dient die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) als Reportergen. Dabei entsteht bei der Dephosphorylisierung des substrats durch die alkalische Phosphatase (AP) ein instabiles Intermediat das beim Zerfall Licht mit der Wellenlänge von 477 nm emittiert. Durch bestimmte Zusätze im SEAP Reporter Gen Assay wird diese Lumineszenz um das 500 fache verstärkt. Da im Zellkulturmedium auch endogene AP Aktivität vorhanden ist muss diese durch Hitze und spezifische Inhibitoren inaktiviert werden (Roche-Diagnostics, 2004).

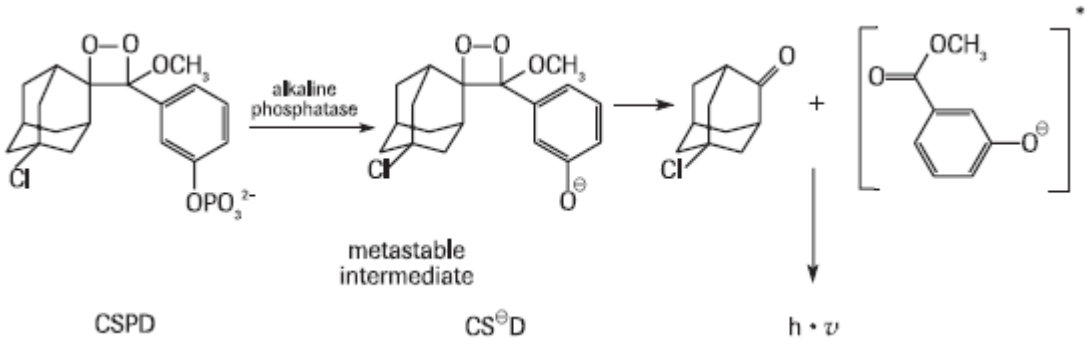


Abbildung 47 Chemolumineszenz-Reaktion katalysiert durch SEAP (Roche-Diagnostics, 2004)

Die Durchführung verläuft leicht modifiziert nach dem Herstellerprotokoll. Nach der Inkubation der Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen werden jeweils 50 µl des Zellkulturmediums in eine weiße 96 Well-Platte pipettiert und mit 50 µl des Verdünnungspuffers versetzt. Zur Inaktivierung der endogenen AP wird die Platte für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Um das Verdampfen der Lösung zu vermeiden wird die Platte vorher mit einer Klebefolie für 96 Well-Platten versiegelt. Anschließend wird die Platte für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend für 3 Minuten auf Eis gestellt. Zu den Proben werden 50 µl Inaktivierungspuffer dispensiert und für 5 Minuten inkubiert bevor 50 µl Substratreagenz dazu dispensiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wird die Lumineszenz jedes Well für 10 Sekunden vermessen.

V.1.6. Statistik

Bei den *in vivo*-Studien wurden die Werte aller Tiere einer Gruppe gemittelt und mit der Standardabweichung aufgetragen. Bei den in vitro-Studien wurden mindesten drei unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen bestimmt. Unabhängige Versuche bedeutet, dass für jede neue Transfektion eine andere Passage der Zelllinie HepG2 verwendet wurde.

Zur Bestimmung statistischer Signifikanzen zwischen einer Kontrollgruppe und mindestens zwei Behandlungen wird eine *one-way analysis of variance* (ANOVA) mit *Dunnett's post test* durchgeführt. Die *one-way* ANOVA wird zur Ermittelung statischer Signifikanzen zwischen drei und mehr Gruppen eingesetzt, um konzentrationsabhängige Effekte zu untersuchen. Der *Dunett's post test* wird verwendet, um Kontrollgruppen mit mehreren behandelten Gruppen zu vergleichen.

Der *one-tailed unpaired Student's t-test* mit *Welch-Korrektur* dient zur Bestimmung von Signifikanzen zwischen zwei Gruppen. Die *Welch-Korrektur* wird herangezogen wenn die Standardabweichungen der Gruppen zu unterschiedlich sind.

Die Statistik wurde mit der Software InStat 3 von Graphpad Software Inc., San Diego, USA durchgeführt.

*, # bedeutet statistisch signifikant ($p \leq 0{,}05$).

**, ## bedeutet statistisch hoch signifikant ($p \leq 0{,}01$)

***, ### bedeutet statistisch extrem signifikant ($p \leq 0{,}001$)

V.2. Material

V.2.1. NDL-PCBs

Die PCBs für die Tierstudien wurden bei Chiron, Trontheim in Norwegen gekauft und anschließend an der Universität von Umeå im Rahmen des EU-finanzierten ATHON-Projekts auf Reinheit überprüft (Tabelle 22). Dabei wurde vor allem auf dioxin-artige Verunreinigungen geachtet. War der Anteil der dioxin-artigen Verunreinigung zu hoch, wurden die NDL-PCBs aufgereinigt (Danielsson *et al.*, 2008). Lag der TEQ_{WHO}-Wert nach der Aufreinigung unterhalb einer 2,3,7,8-TCDD-Dosis, die im Tierversuch keinen Effekt verursachte, wurden die PCBs an die Projektpartner verschickt. Der Grenzwert für die TEQ_{WHO}-Kontamination wurde in Anlehnung an eine Veröffentlichung von Viluksela et al ausgewählt (Viluksela *et al.*, 2000). Für beide Studien wurden die PCBs in Maiskeimöl gelöst und den Versuchstieren per Schlundsonde verabreicht.

Tabelle 22 Verwendete PCBs für die Tierstudien unter Angabe des Chlorierungsgrades, Chlorposition am Phenylring, Reinheit und dioxinartigen Verunreinigung angegeben in TEQ_{WHO}

BZ Nr.	Cl-Position	Anzahl Cl	Reinheit	TEQ_{WHO} [ng/g]
		Ratten-Studie		
52	2,2',5,5'	4	99,9	0,5
180	2,2',3,4,4',5,5'	7	98,9	2,7
		Maus-Studie		
28	2,3',5'	3	<99,9	40,9
52	2,2',5,5'	4	99,9	0,39
101	2,2',4,5,5'	5	99,4	0,79
126	3,3',4,4',5	5	98,9	-
138	2,2',3,4,4',5'	6	<99,9	11,90
153	2,2',4,4',5,5'	6	99,2	0,7
180	2,2',3,4,4',5,5'	7	98,9	0,3

Die 20 PCBs für die *in vitro* Versuche wurden analog den PCBs im Tierversuch aufgearbeitet (Tabelle 14). Die PCBs wurden in 4 verschiedenen Konzentrationen in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Folgende Konzentrationen wurden hergestellt; 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM.

Tabelle 23 Verwendete PCBs für *in vitro* Studie unter Angabe die Position des Chlors und des Chlorierunggrades.

BZ Nr.	Cl-Position	Anzahl Cl	BZ Nr.	Cl-Position	Anzahl Cl
19	2,2',6	3	118	2,3',4,4',5	5
28	2,3',5'	3	122	2,3,3',4',5'	5
47	2,2',4,4'	4	126	3,3',4,4',5	5
51	2,2',4,6'	4	128	2,2',3,3',4,4'	6
52	2,2',5,5'	4	136	2,2',3,3',6,6'	6
53	2,2',5,6'	4	138	2,2',3,4,4',5'	6
95	2,2',3,5,6	5	153	2,2',4,4',5,5'	6
100	2,2',4,4',6	5	170	2,2',3,3',4,4',5	7
101	2,2',4,5,5'	5	180	2,2',3,4,4',5,5'	7
104	2,2',4,6,6'	5	190	2,3,3',4,4',5,6	7

V.2.1.1. Chemikalienliste

Für die Experimente wurden folgende Chemikalien benutzt.

Tabelle 24 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller/Bezieher
Acetonitril	Merck, Darmstadt, D
Acrylamid-Mix (rotiphorese 30)	Roth, Karlsruhe, D
APS	Merck, Darmstadt, D
Bradfordreagenz	Bio-Rad LaboratoriesGmBH, München, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
BSA	ICN Pharmaceuticals, Frankfurt/Main, D
Butanol	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
DCC/FKS	PAA Laboratories GmBH, Cölbe, D
DEPC	Sigma, Deisenhofen, D
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen, D
DMSO	Fluka, Neu-Ulm, D
Dinatriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Dinatrium-EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Dinatrium-NADPH	Biomol, Hamburg, D
DMEM-Medium low glucose	PAA Laboratories GmBH, Cölbe, D
EDTA	Merck, Darmstadt, D
EGTA	Sigma, Deisenhofen, D
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt, D
Ethoxyresorufin	Sigma, Deisenhofen, D
FKS Gold Standard	PAA Laboratories GmBH, Cölbe, D
Fluorescamin	Sigma, Deisenhofen, D
Glukose	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Sigma, Deisenhofen, D
G418	PAA Laboratories GmBH, Cölbe, D
Heparin	Serva, Heidelberg, D
HEPES	Roth, Karlsruhe, D

Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, D
Magermilchpulver	Spinnrad GmBH, Gelsenkirchen, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, D
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, D
Methanol p.a.	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
OptiMEM	Invitrogen, Darmstadt, D
Penicilin/Streptomycin	PAA Laboratories GmBH, Cölbe, D
Pentobarbital	Sigma, Deisenhofen, D
Pentoxyresorufin	Sigma, Deisenhofen, D
Phenobarbital	Sigma, Deisenhofen, D
Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg, D
SDS	Merck, Darmstadt, D
TCDD	Ökometric, Byreuth, D
TEMED	Serva, Heidelberg, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
TRIR	Fischer Scientific GmBH, Schwerte, D
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, D

V.2.1.2. Geräteliste

Für die Experimente wurden folgend aufgeführten Geräte benutzt.

Tabelle 25 Geräteliste

Gerät	Gerätebezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav 500	H+P Labortechnik, Oberschließheim, D
Biofreezer	MDF-U6086S	Sanyo, München, D
Brutschrank	Heraeus B 5060 E CO2	Heraeus, Hanau, D
	Köttermann 2737	Köttermann GmBH & Co. KG, Uetze/Hänigsen, D
Gelkammer	Protean II	Bio-Rad LaboratoriesGmBH, München, D
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf, D
Homogenisator	RZ R2 100	Heidolph Elektro GmBH & Co. KG,Kelheim,D
Cycler	iCycler Thermal Cycler	Bio-Rad LaboratoriesGmBH, München, D
	MyCycler Thermal Cycler	Bio-Rad LaboratoriesGmBH, München, D
LumiImager	LumiImager	Roche diagnostics GmBH, Mannheim, D
Magentrührer	MR 3001	Heidolph Elektro GmBH & Co. KG,Kelheim,D
Mikroscope	Leica DM IRB	Leica, Witzlar, D
Nanodrop	ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Plate Reader	Fluoroscan Ascent FL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spannungsgerät	Power Pac 300	Bio-Rad LaboratoriesGmBH, München, D
	Power Supply ST 305	Gibco BRL, Eggenstein, D
Sterilbank	UVF 6 125	BDK, Sonnenbühl-Genkingen,D
Ultrazentrifuge	Optimal TL	Beckman, München, D
Waage	BP 2105	Sartorius AG, Goettingen,D
	BP 4105	Sartorius AG, Goettingen,D
Wasserbad	GFL	Fischer/Merck, Frankfurt am Main, D
Zentrifugen	Kühlzentrifuge JA-14	Beckman, München, D
	Microfuge R	Beckman, München, D
	Zentrifuge GS-6R	Beckman, München, D

V.2.2. Lösungen

Nembutal Lösung

2 g Pentobarbital (Na Salz) in 16 ml ddH_2O, 4 ml Ethanol p.a. und 16 ml Propylenglycol geben, rühren bis alles gelöst ist.
pH auf 9,2 mittels HCl einstellen, muss wieder klare Lösung entstehen
auf 40 ml mit ddH_2O auffüllen
steril filtrieren mit 0,22 µm Filter
bei Raumtemperatur lagern, unter sterilen Bedingungen benötigte Menge abfüllen
wenn steril gelagert lange haltbar
Dosis i.p.: bei Mäusen 3 µl/g KG
bei Ratten 1 µl/g KG (sensitiver Stamm, wie Fischer)
2 µl/g KG (nicht sensitiver Stamm, wie Wistar)

V.2.2.1. Enzym Aktivität

Stammlösung Fluorescamin-Stop-Lösung (300 µg/ml)

100 mg/333 ml Acetonitril (HPLC grade)
Lagerung: abgedunkelt bei 4°C

Stammlösung Ethoxyresorufin bzw. Pentoxyresorufin (1,05 mM)

253 µg / ml in MeOH;
Gesamtmenge (10 mg) in 39,536 ml MeOH lösen und in 500 µl aliquotieren;
Lagerung: –20°C.

Stammlösung Resorufin-Eichlösung (140 µM)

33 mg Na-Resorufin /l in MeOH;
Lagerung: Abgedunkelt bei 4°C.

50mM Na-Phosphat pH 8,0 (NaPi):

= 47,4 mM Na_2HPO_4 + 2,6 mM NaH_2PO_4
= 8,437 g $Na_2HPO_4 \bullet 2H_2O$ + 359 mg $NaH_2PO_4 \bullet H_2O$ ad. 1 l
pH 8,0 nachprüfen
bei 4°C aufbewahren.

Arbeitslösung Fluorescamin-Stop-Lösung (150 µg/ml)

1:1 Verdünnung der Stammlösung mit Acetonitril (HPLC grade)

Pro Platte : 4 ml Stammlösung + 4 ml Acetonitril

Lagerung: Abgedunkelt bei 4°C.

Bei Gebrauch: auf RT erwärmen, abdunkeln.

Arbeitslösung für Ethoxyresorufin

1:30 Verdünnung mit NaPi-Puffer

pro Platte: 90 µl Ethoxyresorufin + 2,61 ml NaPi mischen

Lagerung: auf Eis

NADPH-Lösung (13,4 mM)

11,2 mg Na_4-NADPH / ml in NaPi;

bzw 50 mg in 4,464 ml NaPi (ganze Portion NADPH)

aliquotieren (möglichst keine Einfrier-Auftau-Zyklen)

Lagerung: abgedunkelt bei -20°C

BSA-Eichlösung:

2 mg / ml in NaPi;

aliquotieren in 1ml-Portionen;

Lagerung: bei –20°C.

Arbeitslösung Resorufin (zum Eichen)

1:20 Verdünnung mit NaPi

pro Eichplatte: 50 µl Stammlösung Resorufin + 950 µl NaPi

unmittelbar vor der Messung der Eichplatte frisch herzustellen

V.2.2.2. Mikrosomenpäparation

5x isotonic extraction buffer (IEB)

50 mM HEPES pH = 7,8	1,2 g
1,25 M Saccharose	42,8 g
5 mM EGTA	0,19 g
125 mM KCl	0,93 g

ad 100 ml steriles bidest. H_2O, sterilfiltrieren

Lagerung: 4 °C pH = 7,8

1x IEB

5x IEB : bidest. H2O = 1 : 5

unter der Sterilbank ansetzen

kurz vor Verwendung 0,1 % Proteaseinhibitor-Cocktail zugeben

50 mM NaP_i-Puffer

$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	7,52 g
NaH_2PO_4	1,07 g

ad 1000 ml bidest. H_2O

Lagerung: 4 °C pH = 7,6

V.2.2.3. Proteinbestimmung

Ladepuffer (6x)

Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)	50 ml
SDS	1,24 g
Glycerin	40 ml
Bromphenolblau	0,16 g

ad 100 ml; Lagerung 4°C

alliquotieren in 1 ml Eppis

kurz vor Gebrauch 118 µl Mercaptoethanol pro ml

TBS (20x)

NaCl (2,6 M)	304 g
Tris/HCl (0,4 M)	97 g

ad 2 Liter; pH 7,4

TBS-T (1x)

TBS 1x	2 Liter
Tween-20 (0,1%)	6 ml

Tris/HCl (1,5 M)

Tris	18,2 g

ad 100ml mit H_20_{bidest}; pH 8,8

Tris/HCl (0,5 M)

Tris	6,1 g
ad 100ml mit H_20_{bidest}; pH 6,8	

Elektrophorese-Puffer (10x)

Glycin (2 M)	720 g
Tris (250 mM)	150 g
SDS(20%-Lösung) (1% (v/v))	250 ml
ad 5 Liter	

Blocking-Puffer

1x TBS-T	100 ml
Milchpulver 5% (w/v)	5 g

Anoden-Puffer 1 (1x)

Tris (300 mM)	36,3 g
MeOH (10%)	100 ml
ad 1 Liter; pH 10,4	

Anoden-Puffer 2 (1x)

Tris (25 mM)	3 g
MeOH (10%)	100 ml
ad 1 Liter; pH 10,4	

Kathoden-Puffer (1x)

Glycin (40 mM)	3 g
Tris (25 mM)	3 g
MeOH (20%)	200 ml
SDS (20%-Lösung) (0,005%)	250 µl
ad 1 Liter; pH 9,4	

Luminol

Luminol	50 mg
in 200 ml 0,1 M Tris lösen, 4°C	

Lösung B

p-Cumarinsäure 22 mg

in 20 ml DMSO lösen, RT, dunkel

V.2.2.4. Zellkultur

V.2.2.4.1. Medien für transiente Transfektion

Kulturmedium

DMEM low glucose Phenolrot frei

10% FKS

1% P/S

2 mg/100 ml L-Glutamin

Aussaatmedium

DMEM low glucose Phenolrot frei

10% DCC/FKS (gestriptes, steroidarmes FKS)

1% P/S

2 mg/100 ml L-Glutamin

Transfektionsmedium

DMEM low glucose Phenolrot frei

5% DCC/FKS

2 mg/100 ml L-Glutamin

Keine Antibiotika

Medien für stabil transfizierte HepG2-hXREM

Kulturmedium

DMEM low glucose Phenolrot frei

10% FKS

1% P/S

2 mg/100 ml L-Glutamin

30 µl/ml G418 (immer frisch dazu geben)

Aussaatmedium

DMEM low glucose Phenolrot frei

10% DCC/FKS

1% P/S

2 mg/100 ml L-Glutamin

30 µl/ml G418 (immer frisch dazu geben)

Inkubationsmedium

DMEM low glucose Phenolrot frei

5% DCC/FKS

1% P/S

2 mg/100 ml L-Glutamin

30 µl/ml G418 (immer frisch dazu geben)

V.2.2.5. Kits

Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix	ABgene
iScript cDNA synthesis ki	BioRad
RNeasy mini kit	Qiagen
SEAP reporter gene Assay	Roche
Dual Luciferase Reporter Assay	Promega
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega

VI. Literaturverzeichnis

Anakk, S., Huang, W., Staudinger, J. L., Tan, K., Cole, T. J., Moore, D. D., and Strobel, H. W. (2007). Gender dictates the nuclear receptor-mediated regulation of CYP3A44. *Drug Metab Dispos* **35**, 36-42.

Anakk, S., Ku, C. Y., Vore, M., and Strobel, H. W. (2003). Insights into gender bias: rat cytochrome P450 3A9. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 703-709.

Bakker, M., Baars, A. J., Baumann, B., Boon, P., and Hoogerbrugge, R. (2003). Indicator PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands at the end of the 20th century.

Ballschmiter, K., Bacher, R., Mennel, A., Fischer, R., Riehle, U., and Swerev, M. (1992). The determination of chlorinated biphenyls, chlorinated dibenzodioxins, and chlorinated dibenzofurans by GC MS. *Journal of high resolution chromatography* **15**, 260-270.

Ballschmiter, K., and Zell, M. (1980). Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **302**, 20-31.

BFR (2006). Vorgeschlagene EU-Höchstgehalte für nicht dioxinähnliche Polychlorierte Biphenyle (ndl-PCB) in Lebensmitteln sind zu hoch, pp. 11. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Germany.

Bhadhprasit, W., Sakuma, T., Hatakeyama, N., Fuwa, M., Kitajima, K., and Nemoto, N. (2007). Involvement of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor in the regulation of mouse CYP3A44 female-predominant expression by glucocorticoid hormone. *Drug Metab Dispos* **35**, 1880-1885.

Bock, K. W., and Köhle, C. (2005). UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzymol* **400**, 57-75.

Bohnenberger, S., Wagner, B., Schmitz, H. J., and Schrenk, D. (2001). Inhibition of apoptosis in rat hepatocytes treated with 'non-dioxin-like' polychlorinated biphenyls. *Carcinogenesis* **22**, 1601-1606.

Bonfanti, P., Colombo, A., Villa, S., Comelli, F., Costa, B., and Santagostino, A. (2009). The effects of accumulation of an environmentally relevant polychlorinated biphenyl mixture on cytochrome P450 and P-glycoprotein expressions in fetuses and pregnant rats. *Chemosphere* **75**, 572-579.

Borlakoglu, J. T., Scott, A., Henderson, C. J., Jenke, H. J., and Wolf, C. R. (1993). Transplacental transfer of polychlorinated biphenyls induces simultaneously the

expression of P450 isoenzymes and the protooncogenes c-Ha-ras and c-raf. *Biochem Pharmacol* **45**, 1373-1386.

Bruckner, J. V., Jiang, W. D., Brown, J. M., Putcha, L., Chu, C. K., and Stella, V. J. (1977). The influence of ingestion of environmentally encountered levels of a commercial polychlorinated biphenyl mixture (Aroclor 1254) on drug metabolism in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **202**, 22.

Bruckner, J. V., Khanna, K. L., and Cornish, H. H. (1974). Effect of prolonged ingestion of polychlorinated biphenyls on the rat. *Food and Cosmetics Toxicology* **12**, 323-326.

Burgin, D. E., Diliberto, J. J., Derr-Yellin, E. C., Kannan, N., Kodavanti, P. R., and Birnbaum, L. S. (2001). Differential effects of two lots of aroclor 1254 on enzyme induction, thyroid hormones, and oxidative stress. *Environ Health Perspect* **109**, 1163-1168.

Burke, M. D., Thompson, S., Weaver, R. J., Wolf, C. R., and Mayer, R. T. (1994). Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* **48**, 923-936.

Connor, K., Safe, S., Jefcoate, C. R., and Larsen, M. (1995). Structure-dependent induction of CYP2B by polychlorinated biphenyl congeners in female Sprague-Dawley rats. *Biochemical pharmacology* **50**, 1913-1920.

Danielsson, C., Harju, M., Halldin, K., Tysklind, M., and Andersson, L. P. (2008). Comparison of levels of PCDD/Fs and non-ortho PCBs in PCB 153 from seven different suppliers. *Organohalogen Compounds* **70**, 001201- 001203.

de Jongh, J., Wondergem, F., Seinen, W., and Van den Berg, M. (1993). Toxicokinetic interactions between chlorinated aromatic hydrocarbons in the liver of the C57BL/6J mouse: I. Polychlorinated biphenyls (PCBs). *Arch Toxicol* **67**, 453-460.

Dean, C. E., Benjamin, S. A., Chubb, L. S., Tessari, J. D., and Keefe, T. J. (2002). Nonadditive hepatic tumor promoting effects by a mixture of two structurally different polychlorinated biphenyls in female rat livers. *Toxicological Sciences* **66**, 54.

Dvorak, Z., Modriansky, M., Pichard-Garcia, L., Balaguer, P., Vilarem, M. J., Ulrichova, J., Maurel, P., and Pascussi, J. M. (2003). Colchicine down-regulates cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C9, and 3A4 in human hepatocytes by affecting their glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Mol Pharmacol* **64**, 160-169.

Dziennis, S., Yang, D., Cheng, J., Anderson, K. A., Alkayed, N. J., Hurn, P. D., and Lein, P. J. (2008). Developmental exposure to polychlorinated biphenyls influences stroke outcome in adult rats. *Environmental Health Perspectives* **116**, 474.

EFSA (2005). OPINION OF THE SCIENTIFIC PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN ON A REQUEST FROM THE COMMISSION RELATED TO THE PRESENCE OF NON DIOXIN-LIKE POLYCHLORINATED BIPHENYLS (PCB) IN FEED AND FOOD (Question N° EFSA-Q-2003-114). In *EFSA Journal*, pp. 137. European Food Safety Authority.

EFSA (2010). Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. In *EFSA Journal*, pp. 35. European Food Safety Authority.

Eisenbrand G, M. M. (2001). Toxikologie für Naturwissenschaftler. Thieme.

Fattore, E., Fanelli, R., Dellatte, E., Turrini, A., and Domenico, A. D. (2008). Assessment of the dietary exposure to non-dioxin-like PCBs of the Italian general population. *Chemosphere*.

Fery, Y. (2009). Etablierung eines spezies-spezifischen in vitro-Instrumentariums zur Erfassung der Induktion des Fremdstoffmetabolismus. Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.

Frame, G. M., Cochran, J. W., and Bøwadt, S. S. (1996). Complete PCB congener distributions for 17 aroclor mixtures determined by 3 HRGC systems optimized for comprehensive, quantitative, congener specific analysis. *Journal of High Resolution Chromatography* **19**, 657-668.

Gabrio, T., Piechotowski, I., Wallenhorst, T., Klett, M., Cott, L., Friebel, P., Link, B., and Schwenk, M. (2000). PCB-blood levels in teachers, working in PCB-contaminated schools. *Chemosphere* **40**, 1055-1062.

Garritano, S., Pinto, B., Calderisi, M., Cirillo, T., Amodio-Cocchieri, R., and Reali, D. (2006). Estrogen-like activity of seafood related to environmental chemical contaminants. *Environmental health: a global access science source* **5**, 9.

Gray, L. E., Jr., Ostby, J., Marshall, R., and Andrews, J. (1993). Reproductive and thyroid effects of low-level polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposure. *Fundam Appl Toxicol* **20**, 288-294.

Grimvall, E., Rylander, L., Nilsson-Ehle, P., Nilsson, U., Strömberg, U., Hagmar, L., and Östman, C. (1997). Monitoring of polychlorinated biphenyls in human blood plasma: methodological developments and influence of age, lactation, and fish consumption. *Archives of environmental contamination and toxicology* **32**, 329-336.

Guo, Y., Lu, P., Farrell, E., Zhang, X., Weller, P., Monshouwer, M., Wang, J., Liao, G., Zhang, Z., and Hu, S. (2007). In silico and in vitro pharmacogenetic analysis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 17735.

Han, W., Pentecost, B. T., Pietropaolo, R. L., Fasco, M. J., and Spivack, S. D. (2005). Estrogen receptor increases basal and cigarette smoke extract-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1, but not GSTP1, in normal human bronchial epithelial cells. *Molecular carcinogenesis* **44**, 202-211.

Hany, J., Lilienthal, H., Sarasin, A., Roth-Harer, A., Fastabend, A., Dunemann, L., Lichtensteiger, W., and Winneke, G. (1999). Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* **158**, 231-243.

Honkakoski, P., and Negishi, M. (2000). Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* **347**, 321-337.

Hukkanen, J. (2000). Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes in Human Lung. In *Department of Pharmacology and Toxicology*. University of Oulu, Oulu.

IARC (1978). Polychlorinated biphenyls and Polybrominated biphenyls. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, WORLD HEALTH ORGANIZATION.

Jarman, W. M., Hilkert, A., Bacon, C. E., Collister, J. W., Ballschmiter, K., and Risebrough, R. W. (1998). Compound-specific carbon isotopic analysis of aroclors, clophens, kaneclors, and phenoclors. *Environ. Sci. Technol* **32**, 833-836.

JECFA (2001). COPLANAR POLYCHLORINATED BIPHENYLS (PCBs), PCDDs, PCDFs, POLYCHLORINATED DIBENZODIOXINS (PCDDs), POLYCHLORINATED DIBENZOFURANS (PCDFs). In *WHO Food Additives Series*. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Jemnitz, K., Veres, Z., Monostory, K., and Vereczkey, L. (2000). Glucuronidation of thyroxine in primary monolayer cultures of rat hepatocytes: in vitro induction of UDP-glucuronosyltranferases by methylcholanthrene, clofibrate, and dexamethasone alone and in combination. *Drug Metabolism and Disposition* **28**, 34.

Kawamoto, T., Sueyoshi, T., Zelko, I., Moore, R., Washburn, K., and Negishi, M. (1999). Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* **19**, 6318-6322.

Kaya, H., Hany, J., Fastabend, A., Roth-Härer, A., Winneke, G., and Lilienthal, H. (2002). Effects of maternal exposure to a reconstituted mixture of polychlorinated biphenyls on sex-dependent behaviors and steroid hormone concentrations in rats: dose-response relationship. *Toxicology and applied pharmacology* **178**, 71-81.

Kennedy, S. W., and Jones, S. P. (1994). Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Anal Biochem* **222**, 217-223.

Knerr, S. (2006a). Bedeutung von Arylcarbon Rezeptoren regulierten Phase I Enzymen für die Kanzerogenität von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin (TCDD). In *Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie*. Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.

Knerr, S., and Schrenk, D. (2006). Carcinogenicity of "non-dioxinlike" polychlorinated biphenyls. *Crit Rev Toxicol* **36**, 663-694.

Kodavanti, P. R., Ward, T. R., Derr-Yellin, E. C., Mundy, W. R., Casey, A. C., Bush, B., and Tilson, H. A. (1998). Congener-specific distribution of polychlorinated biphenyls in brain regions, blood, liver, and fat of adult rats following repeated exposure to Aroclor 1254. *Toxicol Appl Pharmacol* **153**, 199-210.

Kunz, S., Schwarz, M., Schilling, B., Päpke, O., Lehmler, H. J., Robertson, L. W., Schrenk, D., and Schmitz, H. J. (2006). Tumor promoting potency of PCBs 28 and 101 in rat liver. *Toxicology letters* **164**, 133-143.

Kuratsune, M., Yoshimura, T., Matsuzaka, J., and Yamaguchi, A. (1972). Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environmental Health Perspectives* **1**, 119.

La Rocca, C., and Mantovani, A. (2006). From environment to food: the case of PCB. *Ann Ist Super Sanita* **42**, 410-416.

Lamb, M. R., Taylor, S., Liu, X., Wolff, M. S., Borrell, L., Matte, T. D., Susser, E. S., and Factor-Litvak, P. (2006). Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and postnatal growth: a structural analysis. *Environ Health Perspect* **114**, 779-785.

Litterst, C. L., Farber, T. M., Baker, A. M., and Van Loon, E. J. (1972). Effect of polychlorinated biphenyls on hepatic microsomal enzymes in the rat* 1. *Toxicology and Applied Pharmacology* **23**, 112-122.

MacDonald, C. J., Ciolino, H. P., and Yeh, G. C. (2001). Dibenzoylmethane modulates aryl hydrocarbon receptor function and expression of cytochromes P50 1A1, 1A2, and 1B1. *Cancer Res* **61**, 3919-3924.

Marquardt, H., and Schäfer, S. G. (2004). *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschhaftliche Verlagsgesellschaft.

Martignoni, M., de Kanter, R., Grossi, P., Mahnke, A., Saturno, G., and Monshouwer, M. (2004). An in vivo and in vitro comparison of CYP induction in rat liver and intestine using slices and quantitative RT-PCR. *Chem Biol Interact* **151**, 1-11.

Mayes, B. A., McConnell, E. E., Neal, B. H., Brunner, M. J., Hamilton, S. B., Sullivan, T. M., Peters, A. C., Ryan, M. J., Toft, J. D., Singer, A. W., Brown, J. F., Jr., Menton, R. G., and Moore, J. A. (1998). Comparative carcinogenicity in Sprague-Dawley rats of the polychlorinated biphenyl mixtures Aroclors 1016, 1242, 1254, and 1260. *Toxicol Sci* **41**, 62-76.

McFarland, V. A., and Clarke, J. U. (1989). Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environmental Health Perspectives* **81**, 225.

McKinney, J. D., and Singh, P. (1981). Structure-activity relationships in halogenated biphenyls: unifying hypothesis for structural specificity. *Chem Biol Interact* **33**, 271-283.

Mills, S. A., 3rd, Thal, D. I., and Barney, J. (2007). A summary of the 209 PCB congener nomenclature. *Chemosphere* **68**, 1603-1612.

Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* **13**, 20-25.

Mizuno, N., Niwa, T., Yotsumoto, Y., and Sugiyama, Y. (2003). Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacological reviews* **55**, 425.

Moore, L. B., Parks, D. J., Jones, S. A., Bledsoe, R. K., Consler, T. G., Stimmel, J. B., Goodwin, B., Liddle, C., Blanchard, S. G., Willson, T. M., Collins, J. L., and Kliewer, S. A. (2000). Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem* **275**, 15122-15127.

Öberg, M., Sjodin, A., Casabona, H., Nordgren, I., Klasson-Wehler, E., and Hakansson, H. (2002). Tissue Distribution and Half-Lives of Individual Polychlorinated Biphenyls and Serum Levels of 4-Hydroxy-2, 3, 3, 4, 5-pentachlorobiphenyl in the Rat. *Toxicological Sciences* **70**, 171.

Oh, S. M., Ryu, B. T., Lee, S. K., and Chung, K. H. (2007). Antiestrogenic potentials of ortho-PCB congeners by single or complex exposure. *Archives of pharmacal research* **30**, 199-209.

Pang, S., Cao, J. Q., Katz, B. H., Hayes, C. L., Sutter, T. R., and Spink, D. C. (1999). Inductive and inhibitory effects of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls on

estrogen metabolism and human cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Biochem Pharmacol* **58**, 29-38.

Pearce, R., Greenway, D., and Parkinson, A. (1992). Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. *Arch Biochem Biophys* **298**, 211-225.

Plíšková, M., Vondrá ek, J., Canton, R. F., Nera, J., Ko an, A., Petrík, J., Trnovec, T., Sanderson, T., Van Den Berg, M., and Machala, M. (2005). Impact of polychlorinated biphenyls contamination on estrogenic activity in human male serum. *Environmental health perspectives* **113**, 1277.

Priha, E., Hellman, S., and Sorvari, J. (2005). PCB contamination from polysulphide sealants in residential areas-exposure and risk assessment. *Chemosphere* **59**, 537-543.

Promega (2006). Technical Manual Dual-Luciferase Reporter Assay System #TM040.

Robertson, L. W., Parkinson, A., Bandiera, S., Lambert, I., Merrill, J., and Safe, S. H. (1984). PCBs and PBBs: biologic and toxic effects on C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. *Toxicology* **31**, 191-206.

Roche-Diagnostics (2004). Instruction Manual - SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent.

Roos, R., Andersson, P. L., Halldin, K., Hakansson, H., Hamers, T., Hamscher, G., Heikkinen, P., Korkalainen, M., Leslie, H., Niittynen, M., Sankari, S., Van der Ven, L., Viluksela, M., and Schrenk, D. (NDL-PCB 52). Hepatic Effects of a Highly Purified 2,2',5,5'-Tetrachlorbiphenyl (PCB 52) in male and female rats (in Vorbereitung).

Roos, R., Andersson, P. L., Halldin, K., Hakansson, H., Hamers, T., Hamscher, G., Heikkinen, P., Korkalainen, M., Leslie, H., Niittynen, M., Sankari, S., Van der Ven, L., Viluksela, M., and Schrenk, D. (NDL-PCB 180). Hepatic Effects of a Highly Purified 2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorbiphenyl (PCB 180) in male and female rats (in Vorbereitung).

Sakuma, T., Endo, Y., Mashino, M., Kuroiwa, M., Ohara, A., Jarukamjorn, K., and Nemoto, N. (2002). Regulation of the expression of two female-predominant CYP3A mRNAs (CYP3A41 and CYP3A44) in mouse liver by sex and growth hormones* 1. *Archives of biochemistry and biophysics* **404**, 234-242.

Schlezinger, J. J., White, R. D., and Stegeman, J. J. (1999). Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3, 3, 4, 4 -tetrachlorobiphenyl:

production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As. *Molecular pharmacology* **56**, 588.

Schulte, E., and Malisch, R. (1983). Berechnung der wahren PCB-Gehalte in Umweltproben. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **314**, 545-551.

Shelby, M. K., Cherrington, N. J., Vansell, N. R., and Klaassen, C. D. (2003). Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Drug Metab Dispos* **31**, 326-333.

Shelby, M. K., and Klaassen, C. D. (2006). Induction of rat UDP-glucuronosyltransferases in liver and duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional pathways. *Drug Metab Dispos* **34**, 1772-1778.

Slitt, A. L., Cherrington, N. J., Fisher, C. D., Negishi, M., and Klaassen, C. D. (2006). Induction of genes for metabolism and transport by trans-stilbene oxide in livers of Sprague-Dawley and Wistar-Kyoto rats. *Drug Metab Dispos* **34**, 1190-1197.

Stenberg, M., and Andersson, P. L. (2008). Selection of non-dioxin-like PCBs for in vitro testing on the basis of environmental abundance and molecular structure. *Chemosphere* **71**, 1909-1915.

Strathmann, J., Schwarz, M., Tharappel, J. C., Glauert, H. P., Spear, B. T., Robertson, L. W., Appel, K. E., and Buchmann, A. (2006). PCB 153, a non-dioxin-like tumor promoter, selects for beta-catenin (Catnb)-mutated mouse liver tumors. *Toxicol Sci* **93**, 34-40.

Svensson, B. G., Nilsson, A., Jonsson, E., Schütz, A., Åkesson, B., and Hagmar, L. (1995). Fish consumption and exposure to persistent organochlorine compounds, mercury, selenium and methylamines among Swedish fishermen. *Scandinavian journal of work, environment & health* **21**, 96-105.

Swales, K., and Negishi, M. (2004). CAR, driving into the future. *Mol Endocrinol* **18**, 1589-1598.

Tanabe, S., Nakagawa, Y., and Tatsukawa, R. (1981). Absorption efficiency and biological half-life of individual chlorobiphenyls in rats treated with Kanechlor products. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**, 717-726.

Ueda, A., Hamadeh, H. K., Webb, H. K., Yamamoto, Y., Sueyoshi, T., Afshari, C. A., Lehmann, J. M., and Negishi, M. (2002). Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Molecular pharmacology* **61**, 1.

Umannova, L., Neca, J., Andrysik, Z., Vondracek, J., Upham, B. L., Trosko, J. E., Hofmanova, J., Kozubik, A., and Machala, M. (2008). Non-dioxin-like

polychlorinated biphenyls induce a release of arachidonic acid in liver epithelial cells: a partial role of cytosolic phospholipase A(2) and extracellular signal-regulated kinases 1/2 signalling. *Toxicology* **247**, 55-60.

Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A. T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J. P., Hanberg, A., Hasegawa, R., and Kennedy, S. W. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental health perspectives* **106**, 775.

Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., and Peterson, R. E. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* **93**, 223-241.

van Leeuwen, F. X. R., and Malisch, R. (2003). WHO EXPOSURE STUDY ON THE LEVELS OF PCBs, PCDDs AND PCDFs IN HUMAN MILK. Third WHO human milk field study 2000-2001. World Health Organisation.

Vezina, C. M., Walker, N. J., and Olson, J. R. (2004). Subchronic exposure to TCDD, PeCDF, PCB126, and PCB153: effect on hepatic gene expression. *Environ Health Perspect* **112**, 1636-1644.

Viluksela, M., Bager, Y., Tuomisto, J. T., Scheu, G., Unkila, M., Pohjanvirta, R., Flodstrom, S., Kosma, V. M., Maki-Paakkanen, J., Vartiainen, T., Klimm, C., Schramm, K. W., Warngard, L., and Tuomisto, J. (2000). Liver tumor-promoting activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive and TCDD-resistant rat strains. *Cancer Res* **60**, 6911-6920.

Vitalone, A., Catalani, A., Cinque, C., Fattori, V., Matteucci, P., Zuena, A. R., and Costa, L. G. Long-term effects of developmental exposure to low doses of PCB 126 and methylmercury during development. *Toxicology letters*.

Waxman, D. J. (1999). P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* **369**, 11-23.

Xie, W., Yeuh, M. F., Radominska-Pandya, A., Saini, S. P., Negishi, Y., Bottroff, B. S., Cabrera, G. Y., Tukey, R. H., and Evans, R. M. (2003). Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4150-4155.

Yamada, H., Ishii, Y., Yamamoto, M., and Oguri, K. (2006). Induction of the hepatic cytochrome P450 2B subfamily by xenobiotics: research history, evolutionary aspect, relation to tumorigenesis, and mechanism. *Current drug metabolism* **7**, 397-409.

Zachariasen, R. D. (1994). Loss of oral contraceptive efficacy by concurrent antibiotic administration. *Women Health* **22**, 17-26.

Zacharova, L. Y., Gulyaeva, L. F., Lyakhovich, V. V., Mikhailova, O. N., Timofeeva, O. A., Filipenko, M. L., and Kaledin, V. I. (2003). Cytochrome P4501A1 and 1A2 gene expression in the liver of 3-methylcholanthrene- and o-aminoazotoluene-treated mice: a comparison between PAH-responsive and PAH-nonresponsive strains. *Toxicol Sci* **73**, 108-113.

Zeiger, M., Haag, R., Hockel, J., Schrenk, D., and Schmitz, H. J. (2001). Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies. *Toxicol Sci* **63**, 65-73.

Zuccato, E., Calvarese, S., Mariani, G., Mangiapan, S., Grasso, P., Guzzi, A., and Fanelli, R. (1999). Level, sources and toxicity of polychlorinated biphenyls in the Italian diet. *Chemosphere* **38**, 2753-2765.

Anhang

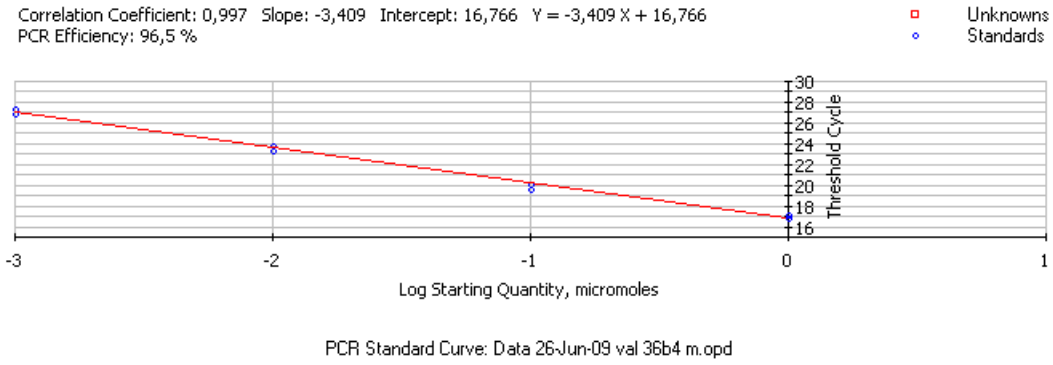
PCB-Konzentrationen in den Leberproben der Maus-Studien in ng/g Trockengewicht. Die Proben der 28 Tage-Studie wurden nicht mehr alle gemessen, weil diese Proben nach Beendigung des Projektes entstanden.

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 126	PCB 138	PCB 153	PCB 180
1 Tag							
♂ Kontrolle	14	14	4,6	<0.34	6,3	10	4,6
♂	8050	11100	13300	5450	37450	27200	39550
♀ Kontrolle	12	6,6	1,5	<3.9	0.71	26	250
♀	11450	12650	12600	5250	36550	28550	40800
5 Tage							
♂ Kontrolle	42	40	8,8	1.2	8,0	10	12
♂	4200	3400	4300	16200	34000	25100	23600
♀ Kontrolle	56	48	10	1.3	15	3,8	12
♀	3300	2600	2700	13100	32800	32100	42300
28 Tage							
♂ Kontrolle				<1.5	25	37	32
♂				11000	33600	39600	52000
♀ Kontrolle				<1.5	34	51	38
♀				9700	43500	47500	83700

Primereffizienz

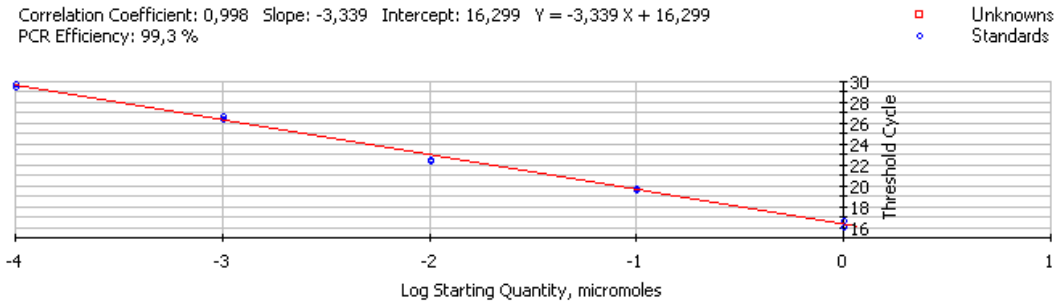
Maus

36b4



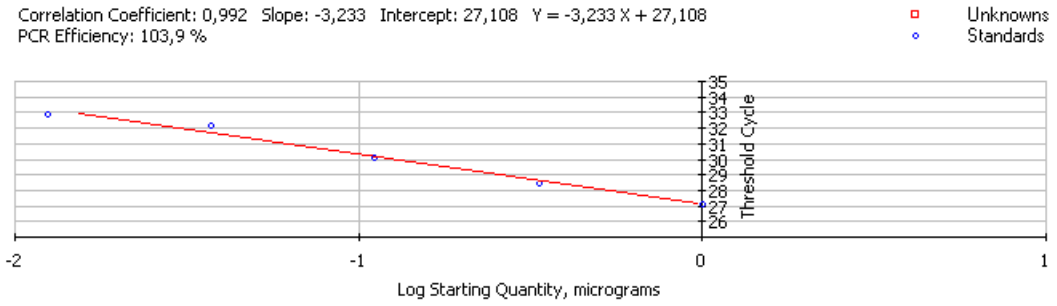
PCR Standard Curve: Data 26-Jun-09 val 36b4 m.opd

CYP1A1



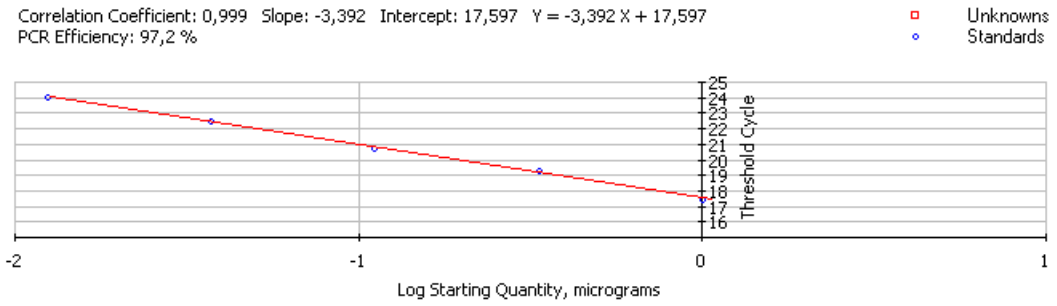
PCR Standard Curve: Data 23-Jun-09 val 1a1 1a2 52.opd

CYP2B10



PCR Standard Curve: Data 21-Jun-10 2b10 3x 60 55.opd

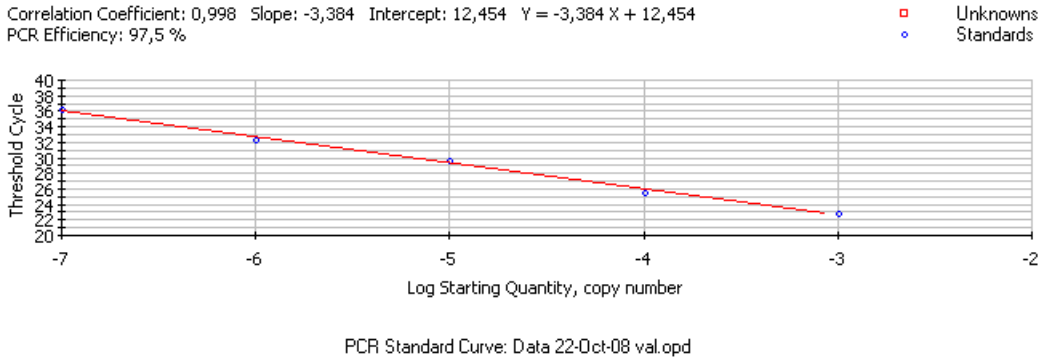
CYP3A44



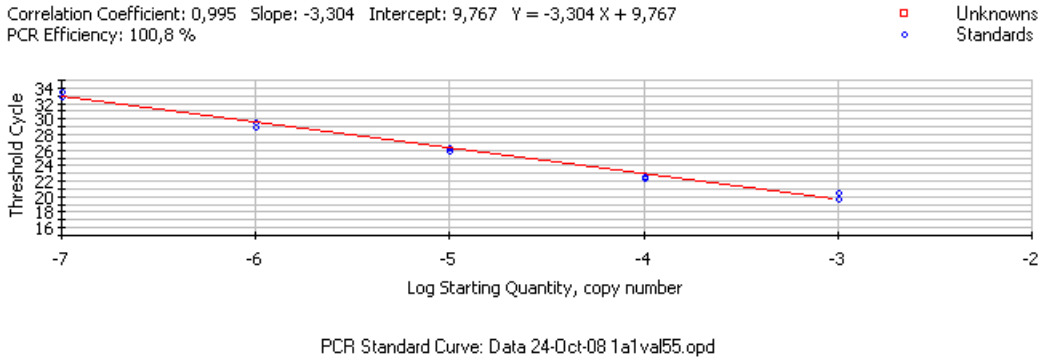
PCR Standard Curve: Data 30-Jun-10 3a44 58-50.opd

Ratte

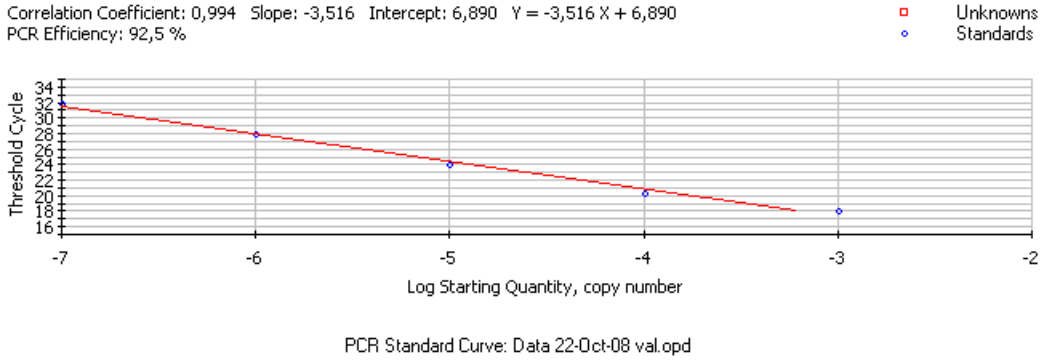
β-Actin



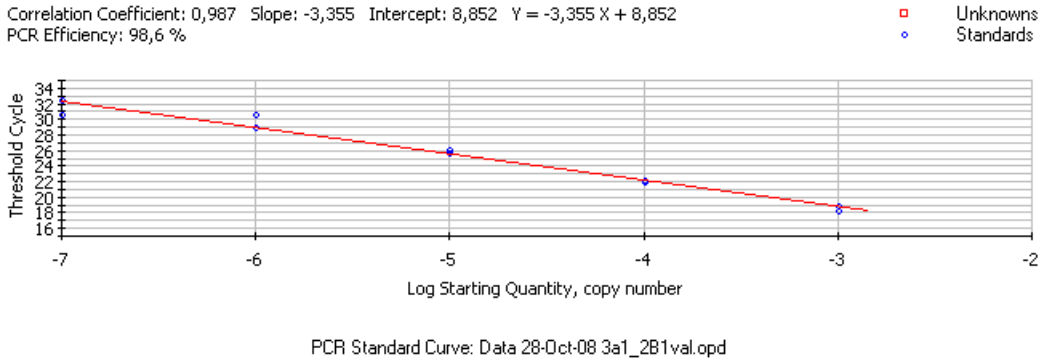
CYP1A1



CYP1A2

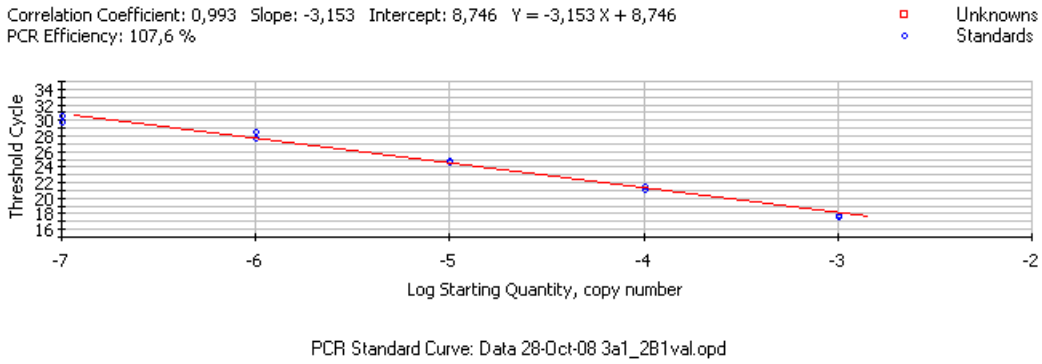


CYP2B1



PCR Standard Curve: Data 28-Oct-08 3a1_2B1val.opd

CYP3A1



PCR Standard Curve: Data 28-Oct-08 3a1_2B1val.opd

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Möglichkeit zur Promotion auf dem interessanten Gebiet der Umweltkontaminanten, für Ihren steten Willen zur Diskussion und das entgegengebrachte Vertrauen. Nicht zuletzt möchte ich Herrn Schrenk dafür danken, dass Sie mir die Möglichkeit gaben Teil des ATHON-Projektes zu sein. Diese Teilnahme eröffnete mir viel versprechende Möglichkeiten für meine akademische Zukunft.

Ein herzlicher Dank geht an meine Arbeitskollegen, für eure Freundschaft und Hilfe während den letzten drei Jahren. Besonders hervorheben will ich meine Büromitbewohnerin Helena Ufelmann, mein Padawan, für deinen steten „Kampf“ die Laune zu verbessern und Kevin Kohns für deine guten Ratschläge und Besuche in meinem Büro. In danke auch Jens Brück für deine Freundschaft, deine Ratschläge und Tüfteleien. Andreas Kamischnikov und Wilja Daub danke ich für eure Hilfe. Und nicht zu letzt Monika Groß, für deine große Hilfe im Labor und dafür, dass du mich „adoptiert“ hast.

Ich danke auch den Kollegen aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Elke Richling. Besonders Hannah Deußer, für deine Freundschaft und deine Hilfe bei der Dissertation.

Den Mitgliedern des ATHON-Projektes danke ich dafür, dass ich drei wissenschaftlich sehr anregende Jahre erleben durfte und viele interessante Menschen kennen lernen durfte. Ins Besondere Emma Westerholm will ich für ihre Freundschaft und Hilfe danken.

Stefanie „Steffi“ Knerr danke ich ganz besonders dafür, dass du neben deinem zeitintensivem Beruf die Zeit gefunden hast meine Arbeit zu verbessern.

Ich danke von ganzem Herzen meiner Mutter die mich bei allem was ich tat und vorhabe zu tun, immer unterstützt und mir immer den Rücken frei hielt so weit sie es konnte. Vielen Dank!

Ich danke auch der Familie Goergen, dass sie mich in ihrer Familie aufgenommen haben und mich die letzten vier Jahre bei allem unterstützt haben.

Nicht zu letzt danke ich Mike für deine Liebe und Unterstützung in den letzten vier Jahren. Du bereicherst mein Leben mit deiner Leidenschaft für viele schöne Dinge. Danke, dass es DICH gibt!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig verfasst, die für die Arbeit benutzen Hilfsmittel genannt habe und die Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter sowie anderer Autoren klar gekennzeichnet habe. Ich habe weder die Dissertation oder Teile der Dissertation als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht noch ein Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt.

Kaiserslautern, 30.11.2010 _____

Robert Roos

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Roos Robert
Adresse	Heinrich Heine Str. 5
	67655 Kaiserslautern
	Germany
Geburtsdatum	24.05.1980
Geburtsort	Luxemburg
Nationalität	Luxemburger

Akademischer Verlauf

09/2007 – 01/2011	Technische Universität Kaiserslautern
	Lebensmittelchemie und Toxikologie
	Professor Dr. Dr. D. Schrenk

Thema

"Einfluss hochreiner, nicht dioxin-artiger polychlorierter Biphenyle auf ausgewählte fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Leber im Nager und in Zellkulturmodellen."

11/2006 – 08/2007	Technische Universität Kaiserslautern
	Lebensmittelchemie und Toxikologie
	Professor Dr. Dr. D. Schrenk

Diplomarbeit

"HepaRG : Eine neuartige humane Hepatomazelllinie"

10/2000 – 08/2007	Technische Universität Kaiserslautern Diplom Chemie	

11/2003 – 01/2004 Technische Universität Kaiserslautern
Lebensmittelchemie und Toxikologie
"Charakterisierung von Phase I und II Enzymen und Proteinen in Gewebeproben von Ratten behandelt mit TBBPA"

05/2004 – 07/2004 École nationale supérieure de chemie de Lille
Organische Chemie
"Asymmetrische Hydrogenierung von Ketonen, erhalten aus der Suzuki Reaktion"

08/2004 – 10/2004 Technische Universität Kaiserslautern
Anorganische Chemie
"Synthese von Ni(II)-Komplexen mit Amidothiol Liganden"

1994 – 2000	Sekundärschule in Luxemburg Lycée Technique Michel Lucius Schwerpunkt Naturwissenschaften	
1987 – 1993	Grundschule in Luxemburg	

Zusätzliche Qualifikationen

02/2007 Fortbildungskurs beim BfR zur Handhabung von Labortieren

Sprachliche Kenntnisse	Deutsch	verhandlungssicher
	Englisch	sehr gute Kenntnisse
	Französisch	sehr gute Kenntnisse
	Luxemburgisch	Muttersprache
Computerkenntnisse	Word, Excel, Powerpoint	sehr gute Kenntnisse
	Origine	gute Kenntnisse

Publikationen

Poster Präsentationen

R. Roos, P. Andersson, P. Heikkinen, H.-J. Schmitz, L. van der Ven, S. Sankari, M. Viluksela and D. Schrenk : Hepatic effects of a highly purified PCB 180 in adult male and female Sprague-Dawley rats. 45th Congress of the European Societies of Toxicology, 05th – 08th October 2008, Rhodes, Greece, *Toxicology Letters* **Vol. 180,** *pp. S39-S40*

Posterpreisgewinner für die beste europäische Zusammenarbeit EUROTOX 2008

R. Roos, P. Andersson; H. Schmitz; H. M. Miettinen; P. Heikkinen; L. van der Ven; M. Viluksela; D. Schrenk : Hepatic effects of very low TEQ contaminated NDL-PCBs 180 and 52 in adult Sprague-Dawley rats. 6th International PCB Workshop, 30th May – 2nd June 2010, Visby, Sweden.

Vorträge

R. Roos, P. Andersson; H. Schmitz; H. M. Miettinen; P. Heikkinen; L. van der Ven; M. Viluksela; D. Schrenk : Hepatic effects of very low TEQ contaminated NDL-PCBs 180 and 52 in adult Sprague-Dawley rats. 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 7th – 11th March 2010, Salt Lake City, USA.

R. Roos, P. Andersson, P. Heikkinen, H.-J. Schmitz, L. van der Ven, S. Sankari, M. Viluksela and D. Schrenk : Hepatic effects of a highly purified PCB 180 in adult Sprague-Dawley rats. International Conference on "Health and Environment 2009 - Frontiers in Environmental Health" Late consequences of early life exposure? Belvaux, Luxembourg, 28th October 2009

R. Roos, P. Andersson, P. Heikkinen, H.-J. Schmitz, L. van der Ven, S. Sankari, M. Viluksela and D. Schrenk : Hepatic effects of a highly purified PCB 180 in adult Sprague-Dawley rats. 46th Congress of the European Societies of Toxicology, 13th – 16th september 2009, Dresden, Germany, *Toxicology Letters* **Vol. 189,** *S197***.**

R. Roos, P. Andersson, P. Heikkinen, H.-J. Schmitz, L. van der Ven, S. Sankari, M. Viluksela and D. Schrenk : Hepatic effects of a highly purified PCB 180 in adult Sprague-Dawley rats. 48th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 15th – 19th march 2009, Baltimore, USA.