

Programm Lebensgrundlage Umwelt  
und ihre Sicherung (BWPLUS)

Forschungsbericht

# **Molekular-toxikologische Wirkmechanismen (poly)bromierter Flammschutzmittel**

Bearbeitet von:

Markus Wahl  
René Günther  
Siegfried Strack

Forschungszentrum Karlsruhe  
Institut für Toxikologie und Genetik

Förderkennzeichen BWR 24013

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit Mitteln des  
Landes Baden-Württemberg gefördert

November 2008

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1</b> ..... Planung und Ablauf des Vorhabens .....	<b>7</b>
<b>1.2</b> ..... wissenschaftlicher und technischer Stand (Ausgangspunkt) .....	<b>8</b>
<b>1.3</b> ..... Bromierte Flammschutzmittel – ein Überblick .....	<b>8</b>
<b>1.4</b> ..... PBDE-Exposition von Umwelt und Mensch .....	<b>11</b>
<b>1.5</b> ..... PBDE und der Fremdstoffmetabolismus .....	<b>13</b>
<b>1.6</b> ..... PBDE und Toxizität .....	<b>14</b>
<b>1.7</b> ..... Der Xenosensor Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) und Cyp1A1 .....	<b>15</b>
<b>1.8</b> ..... AhR und die Proliferation .....	<b>18</b>
<b>1.9</b> Weitere Xenosensoren: der konst. Androstan-Rezeptor (CAR) und der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) .....	<b>19</b>
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1</b> ..... Detektion der Furan-Kontamination in der BDE47 Probe .....	<b>21</b>
<b>2.2</b> ..... Zytotoxizität des BDE47 <sup>hg</sup> sowie der PBDE-Kongenere BDE99, BDE153 und BDE209 .....	<b>22</b>
<b>2.3</b> ..... BDE47 <sup>hg</sup> und PBDE-Kongenere: keine Induktion der Cyp1A1 sondern Unterdrückung .....	<b>25</b>
<b>2.4</b> ..... BDE99, BDE153 und BDE209 induzieren nicht die Cyp1A1-Expression .....	<b>26</b>
<b>2.5</b> ..... BDE47 <sup>hg</sup> , BDE99, BDE153 und BDE209 führen nicht zur Translokation des AhRs .....	<b>28</b>
<b>2.6</b> ..... Genomweite Genexpressions-Analyse nach BDE47 <sup>hg</sup> -Inkubation .....	<b>30</b>
<b>2.7</b> ..... Verifizierung der Regulation von AhR-Zielgenen durch BDE47 <sup>hg</sup> .....	<b>32</b>
<b>2.8</b> ..... Regulation der Cyp2B1 und Cyp3A1/3 durch PBDEs in primären Ratten-Hepatozyten .....	<b>34</b>
<b>2.9</b> ..... BDE47 <sup>hg</sup> und BDE99 unterdrücken die TBDF- und TCDD-induzierte CYP1A1 .....	<b>35</b>
<b>2.10</b> .... BDE47 <sup>hg</sup> und PBDE-Kongenere: keine Effekte auf die Proliferation in 5L (AhR+)-Zellen .....	<b>36</b>
<b>2.11</b> ..... BDE47 <sup>hg</sup> verursacht morphologischen Defekt in Embryonen des Zebrafärbings .....	<b>37</b>
<b>2.12</b> ..... BDE47 <sup>hg</sup> führt zur Regulation von potentiellen Gen-Kandidaten in einer genomweiten Genexpressions-Analyse .....	<b>39</b>

<b>3. Schlussfolgerungen</b> .....	40
3.1.....Neue Zielgene der PBDEs in Hepatomzellen und primären Hepatozyten der Ratten .....	41
3.2 ..... Bewertung der Toxizität von PBDEs und TBDF in Hepatozyten und Zebrafisch-Embryonen .....	42
3.3.....Beitrag der Ergebnisse zu den Zielen des Förderprogramms BWPLUS .....	44
<b>4. Veröffentlichung der Ergebnisse</b> .....	45
4.1..... Publikationen in Fachzeitschriften .....	45
4.2..... Vorträge .....	46
4.3..... Seminare und Tagungen mit Posterbeiträgen .....	46
<b>5. Referenzen</b> .....	47
<b>Anhänge</b> .....	57
Abkürzungen .....	57
Material und Methoden.....	58

# Zusammenfassung

Die bromierten Flammschutzmittel (brominated flame retardants - BFR) und deren Zersetzungsprodukte wurden durch umfangreiche Monitoring-Programme weltweit und auch innerhalb von Baden-Württemberg in der Umwelt und in häuslichen Bereichen nachgewiesen. Für Risikobewertungen einer solchen Belastung der Umwelt mit persistenten Xenobiotika sind ausreichende Kenntnisse zur Exposition und Toxizität eine wichtige Voraussetzung. Zu Beginn der Arbeiten konnte man die toxikologische Datenbasis über die bromierten Flammschutzmittel durchaus als dürftig und sehr lückenhaft bezeichnen.

Die Gruppe der BFR umfasst eine Vielzahl von Substanzen, die als Additive in vielen Verbrauchsgütern zu finden sind, z.B. in Computerbauteilen und Textilien. Zu diesen BFR zählen die polybromierten Diphenylether (PBDE), die im Tierversuch neuronale Toxizität, Entwicklungstoxizität und endokrine Disruption erzeugen. Die zugrunde liegenden Mechanismen der PBDE-Toxizität sind bisher nur unzureichend verstanden. Strukturelle Ähnlichkeiten der PBDE mit dioxin-ähnlich wirksamen Substanzen, z.B. mit polychlorierten Biphenylen (PCB) und bromierten Furanen und Dioxinen, ließen auf eine Beteiligung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR) bzw. Dioxin-Rezeptors schließen. Der AhR ist ein Liganden-gesteuerter Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen wie der Cytochrom-P450-Monooxygenase 1A1 (Cyp1A1) reguliert.

In der vorliegenden Studie wurden vier einzelne Umwelt-relevante PBDE-Verbindungen (BDE47, BDE99, BDE153 und BDE209) zunächst in 5L-Ratten-Hepatomzellen und einem AhR-defizientem Subclon (BP8) auf toxische Wirkungen getestet. Neben der Induktion des Biomarkers Cyp1A1 wurden mögliche AhR-Aktivierungen auf verschiedenen Ebenen untersucht sowie genomweite Genexpressions-Analysen durchgeführt. Das in der Umwelt dominierende 2,2',4,4'-TetrabromBDE (BDE47) zeigte anfänglich dioxinartige Wirkungen, jedoch konnte in der einfach gereinigten Probe eine Kontamination mit 2,3,7,8-Tetrabromdibenzofuran (TBDF), einem hochpotenten AhR-Liganden identifiziert werden. Ein mehrfach speziell gereinigtes BDE47<sup>hg</sup> zeigte hingegen keine dioxinartigen Effekte mehr, wie auch für die übrigen getesteten PBDE-Kongenere beobachtet. Auch Experimente mit primären Ratten-Hepatozyten und humanen Hepatomzellen zeigten keine substanzielle Aktivierung des AhRs durch PBDE. Überraschenderweise hatten BDE47, BDE99 und z. T. BDE153 eher eine inhibierende Wirkung auf die durch TBDF bzw. TCDD induzierte Cyp1A1-Proteinmenge.

Entwicklungs- und Neurotoxizität sind bekannte schädliche PBDE-Wirkungen in Vertebraten. Studien der PBDE im Modell-Organismus Zebrafisch (*Danio rerio*) zeigten, dass allein BDE47 morphologische Fehlbildungen in den Embryonen des Zebrafisches induzierte, die sich von TCDD und TBDF induzierten Abnormalitäten unterschieden. Zudem wich das durch BDE47 differentiell regulierte Genexpressions-Profil stark von dem klassischer AhR-Agonisten ab. Zusammenfassend betrachtet führten die getesteten PBDE-Kongenere nicht zu einer Aktivierung des AhR-Signalweges in Vertebraten, so dass eine agonistische AhR-Interaktion als Grundlage der PBDE-Toxizität ausgeschlossen werden konnte. Genexpressions-Profile von BDE47 in Embryonen des Zebrafisches und in 5L-Hepatomzellen konnten neue Gen-Kandidaten der PBDE-Toxizität identifizieren. Die beobachtete Inhibierung des AhRs durch einzelne PBDE könnte zu einer Interferenz mit den physiologischen und detoxifizierenden Funktionen des AhRs führen.

Mit Ausnahme vom BDE209 (Deka) ist die Herstellung und Verwendung der PBDEs aufgrund der Bioakkumulation in der Umwelt und der gegebenen Exposition des Menschen (Muttermilch) inzwischen durch regulatorische Maßnahmen in der EU eingeschränkt. Die

vorliegende Studie hat bestätigt, dass die PBDEs keine Aktivatoren des Ah-Rezeptors sind und somit keiner Eingruppierung in ein Toxizitäts-Äquivalenzsystem für Dioxine bedürfen. Es wurden hingegen eher AhR-antagonistische Wirkungen bei den PBDEs festgestellt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass bromierte Dibenzo-Furane als mögliche Kontaminanten von technischen Mischungen sehr potente dioxinähnliche Wirkungen entfalten können. Des Weiteren konnten Wirkungen auf andere Regulatoren des Fremdstoffwechsels belegt werden, wie die Aktivierung der Pregnan-X-Rezeptor- (PXR) und konstitutiven Androstane Rezeptor- (CAR) abhängigen Genregulation. Eine Bewertung dieser Wirkung und die des AhR-Antagonismus steht noch aus, so dass eine endgültige Risikobewertung der PBDEs noch nicht möglich ist. Die Experimente mit Embryonen des Zebraärlings (*Danio rerio*) ermöglichten die Untersuchung von Entwicklungs- und Embryotoxizität in frühen Stadien der Entwicklung. Sie stellen ein interessantes toxikologisches Modell für den Tierersatz dar.

## Abstract

Brominated flame retardants (BFRs) and its products of degradation have been detected all over the world by extended monitoring programs, but also in Baden-Württemberg in environmental and domestic areas. For risk assessments of that environmental impact by persistent xenobiotica sufficient knowledge of exposition and toxicity is indispensable.

BFRs are a large group of substances used as additives in a variety of consumer goods, e.g. computer plastics and textiles. Among these BFRs are the polybrominated diphenyl ethers (PBDE) that have raised concern since there are reports from animal studies indicating neuronal toxicity, developmental toxicity and endocrine disruption. Major gaps in our knowledge on PBDE toxicity and underlying mechanisms still exist. Structural similarities of PBDE congeners with dioxin-like compounds such as polychlorinated biphenyls (PCB) or brominated furans and dioxins raised concern about possible activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) also known as the dioxin receptor. AhR is a ligand-activated transcription factor regulating the expression of xenobiotic metabolizing enzymes such as cytochrome P450 monooxygenase 1A1 (Cyp1A1).

To address this in the present study, we used four of the most abundant and environmentally most relevant PBDE compounds (BDE47, BDE99, BDE153 and BDE209) and analyzed their toxic effects in 5L rat hepatoma cells and an AhR-deficient subclone (BP8). Cyp1A1-induction and several steps of possible AhR activation were studied including genome-wide alterations in target gene expression. The environmentally predominating 2,2',4,4'-tetrabromo diphenyl ether (BDE47) suggested initially a dioxin-like behavior, however, in that simply purified sample traces of 2,3,7,8-tetrabromo-dibenzofuran (TBDF) could be identified which were most likely responsible for AhR activation. When a multistep-purified BDE47<sup>hg</sup> was used, the dioxin-like action disappeared as observed for the other congeners tested. Additional experiments with primary rat hepatocytes and human hepatoma cells indicated no substantial AhR activation by PBDE. Contrary to the initial findings, BDE47, BDE99 and partially BDE153 exhibited rather inhibitory effects on TBDF- and TCDD-induced Cyp1A1.

Developmental and neurological toxicity are well known adverse effects of PBDEs in vertebrates. In this study BDE47 triggered exclusively morphological malformations in zebrafish larvae, which are clearly different from the abnormalities triggered by the AhR agonists TCDD and TBDF. Similarly, genome-wide microarray analysis in zebrafish larvae exposed to BDE47 yielded an expression signature distinct from those produced by classical AhR activators. In conclusion, PBDEs tested do not induce AhR signalling in higher vertebrates indicating that AhR activation may not be involved in PBDE toxicity. In fact,

PBDEs rather inhibit AhR function and possibly interfere with its role in physiological and detoxification processes. Moreover, transcriptional profiling in zebrafish and hepatoma cells provided novel target genes as potential mediators of BDE47 toxicity.

With the exception of BDE209 (Deca), production and usage of PBDEs were limited in the EU by regulatory sanctions because of bioaccumulation in the environment and a detected human exposure. In the present study it could be verified that PBDEs do not activate the Ah-receptor. Therefore it is not necessary to integrate PBDEs into a dioxin-toxicity-equivalence system. PBDEs rather exhibited AhR-antagonistic effects. Brominated dibenzo-furanes, however, were identified as possible contaminants in technical BFR mixtures with high potentials for dioxine-like impacts. Effects on other regulators of the xenobiotic metabolism could also be identified, i.e. activation of pregnan-X-receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR)-depending gene regulations. An evaluation of those effects as well as of the AhR-antagonism are still lacking, therefore it is not possible at the moment to achieve a final risk assessment for PBDEs.

# 1. Einleitung

Die bromierten Flammschutzmittel (brominated flame retardants - BFR) und deren Zersetzungsprodukte wurden durch umfangreiche Monitoring-Programme weltweit und auch innerhalb von Baden-Württemberg in der Umwelt und in häuslichen Bereichen nachgewiesen. Für Risikobewertungen einer solchen Belastung der Umwelt mit persistenten Xenobiotica ist eine umfangreiche biologisch-toxikologische Datenbasis essentiell und eine wichtige Voraussetzung für eine vorsorgende und nachhaltige Stoffpolitik an Industriestandorten wie Baden-Württemberg.

## 1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Für die Untersuchungen wurde in Form von Reinsubstanzen mit einer Auswahl der wichtigsten weltweit in der Umwelt gefundenen bromierten FSM begonnen. Die Substanzen wurden im Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart (Prof. Metzger, Dr. Kuch) synthetisiert, gereinigt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Wegen der Umweltrelevanz und der Strukturähnlichkeit mit dem TCDD konzentrierten sich die Arbeiten vor allem auf den 2,2',4,4'-Tetrabromdiphenylether (BDE47).

Die *in vitro*-Untersuchungen wurden mit verschiedenen etablierten Zelllinien durchgeführt – sowohl humanen als auch von verschiedenen Wirbeltieren. Wichtige für dieses Projekt zur Verfügung stehende Zelllinien waren Hepatozyten der Ratte (5L und BP8, einem AhR-defizientem Subklon), um so dioxin-ähnliche, d.h. Ah-Rezeptor vermittelte Wirkungen direkt im experimentellen Vergleich sichtbar zu machen. Zur Aufnahme von Gen-Expressionsanalysen mit DNA-Arrays wurden in einer institutsinternen Kooperation auch Embryonen des Zebrafisches eingesetzt.

Bei den Substanzen konnte zunächst von einer hohen Reinheit ausgegangen werden. Überprüfungen der Reinheit mit hochauflösender GC/MS (Strack et al., 2006) zeigten auch, dass die Proben frei von Dioxinen waren, obwohl in den 5L Hepatocyten die Expression der Mono-Oxygenase CYP1A1 nach BDE47 Exposition deutlich auf eine dioxin-ähnliche toxische Wirkung hinwies. Im Laufe der Arbeiten kam jedoch der Verdacht auf, dass die Probe zwar frei von Dioxinen sei aber möglicherweise Spuren von bromierten Dibenzofuranen enthielt. Das Labor Ökometric (Bayreuth) der Eurofin-Gruppe analysierte in unserem Auftrag die verwendete Probe und fand in der Tat ein Kongener eines Tetrabrom-Dibenzofurans sowie zwei Kongenere von Pentabrom-Dibenzofuranen (Tab. 2.1).

Nach der Identifizierung der verschiedenen bromierten Dibenzofurane in unserer BDE47 Probe, musste dringend der Frage nachgegangen werden, ob tatsächlich auf agonistische Weise ausschließlich die Kontaminanten als Liganden für den AhR fungieren und somit für die Expression verschiedener AhR-Zielgene verantwortlich sind. Von verschiedenen Möglichkeiten stellte sich als der gangbarste Weg die Beschaffung von hoch-gereinigtem BDE47hg heraus, das nachweislich frei von bromierten Dibenzofuranen ist. Da solche Substanzen mit einer derartigen Reinheit (> 99,9999 %) kommerziell nicht erhältlich sind, konnte über Kontakte zum EU-Projekt FIRE vom schwedischen Institut für Chemie der Universität Stockholm (Prof. Å. Bergman) eine Probe von hochgereinigtem BDE47hg bezogen und die Experimente entsprechend damit fortgesetzt werden.

Die vorliegende Arbeit resultierte in einer Dissertation, die an der Universität Heidelberg vorgelegt wurde (Wahl, M., [www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/8265/](http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/8265/)) und deren Inhalt auch Hauptbestandteil dieses Berichtes ist.

## 1.2 wissenschaftlicher und technischer Stand (Ausgangspunkt)

Zu Beginn der Arbeiten konnte man die toxikologische Datenbasis über die bromierten Flammschutzmittel durchaus als dürftig und sehr lückenhaft bezeichnen. Die Fachliteratur war von der Kontroverse bestimmt, ob die PBDEs sich tatsächlich wie Dioxine verhalten können oder ob sie - als streng genommen nicht-planare Verbindungen - keine Verbindung mit dem Dioxin-Rezeptor eingehen können. Einerseits wurde in Veröffentlichungen durchaus von dioxinartigen Wirkungen in Bioassays bei PBDE-Mischungen und einzelnen BDE-Kongeneren berichtet, während sich in vielen anderen experimentellen Arbeiten keine agonistischen Wirkungen zeigten. Solche Untersuchungen bezogen sich in der Regel auf das klassische Zielgen des Ah-Rezeptors, der CYP1A1. Diese Monooxygenase selbst ist für die Toxizität der PBDEs allerdings nicht oder allenfalls nur von geringer Bedeutung.

Ein Hauptgrund dafür, dass in der EU 2004 die Mischungen „Penta-BDE“ und Octa-BDE“ gebannt wurden, und in den USA einige Hersteller freiwillig auf deren Herstellung verzichteten, waren Tierversuche an Ratten und Mäusen, bei denen sich toxische Wirkungen zeigten: Neurotoxizität (neuronale Entwicklung, Verhalten) und Einfluss auf den Hormonhaushalt (z.B. Schilddrüsenhormon).

Parallel zu den eigenen Arbeiten wurden in einem größeren EU-Projekt weitere Untersuchungen zur Bewertung des endokrinen Potentials von bromierten Flammschutzmitteln durchgeführt: FIRE (Flame retardants Integrated Risk assessment for Endocrine effects). Durch direkte Kontakte und auf Tagungen wurde ein intensiver Informationsaustausch zu den Teilnehmern gepflegt.

## 1.3 Bromierte Flammschutzmittel – ein Überblick

Zur Gruppe der bromierten Flammschutzmittel zählt eine Vielzahl von Verbindungen mit struktureller Diversität, deren generelle Gemeinsamkeit die Substitution mit Brom-Atomen ist, welche als funktionelle Gruppe dienen. Durch Erhitzen der relativ labilen Brom-Kohlenstoff-Verbindungen formieren sich Bromradikale, die durch eine Unterbrechung der radikalischen Kettenmechanismen während der Oxidation einer Flammentstehung entgegenwirken. In der Gasphase des entstehenden Brandherdes können diese BFR so die Flammentwicklung verzögern. Strukturell bestehen Polybromierte Diphenylether (PBDE) aus zwei aromatischen Benzolringen, welche durch eine Etherbrücke verbunden sind. Sie können unterschiedlich viele Bromsubstituenten (1-10 Bromatome) haben, die generelle Summenformel lautet  $C_{12}H_{(9-0)}Br_{(1-10)}O$ . Dadurch ergeben sich theoretisch 209 Möglichkeiten (Kongeneren) der Brom-Substitution. Die Nomenklatur der entsprechenden Verbindungen ist anhand einer festgelegten Nummerierung nach Anzahl und Position der Substituenten durch die *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) bestimmt. Die Zuordnung der Nummern zu den Konfigurationen ist identisch mit dem für PCB eingeführten System, das in einem Bericht der LFU (1995) dargestellt ist. Z.B. wird 2,2',4,4'-Tetrabrom-Diphenylether demzufolge als Kongener BDE47 bezeichnet (Abb. 1.1).

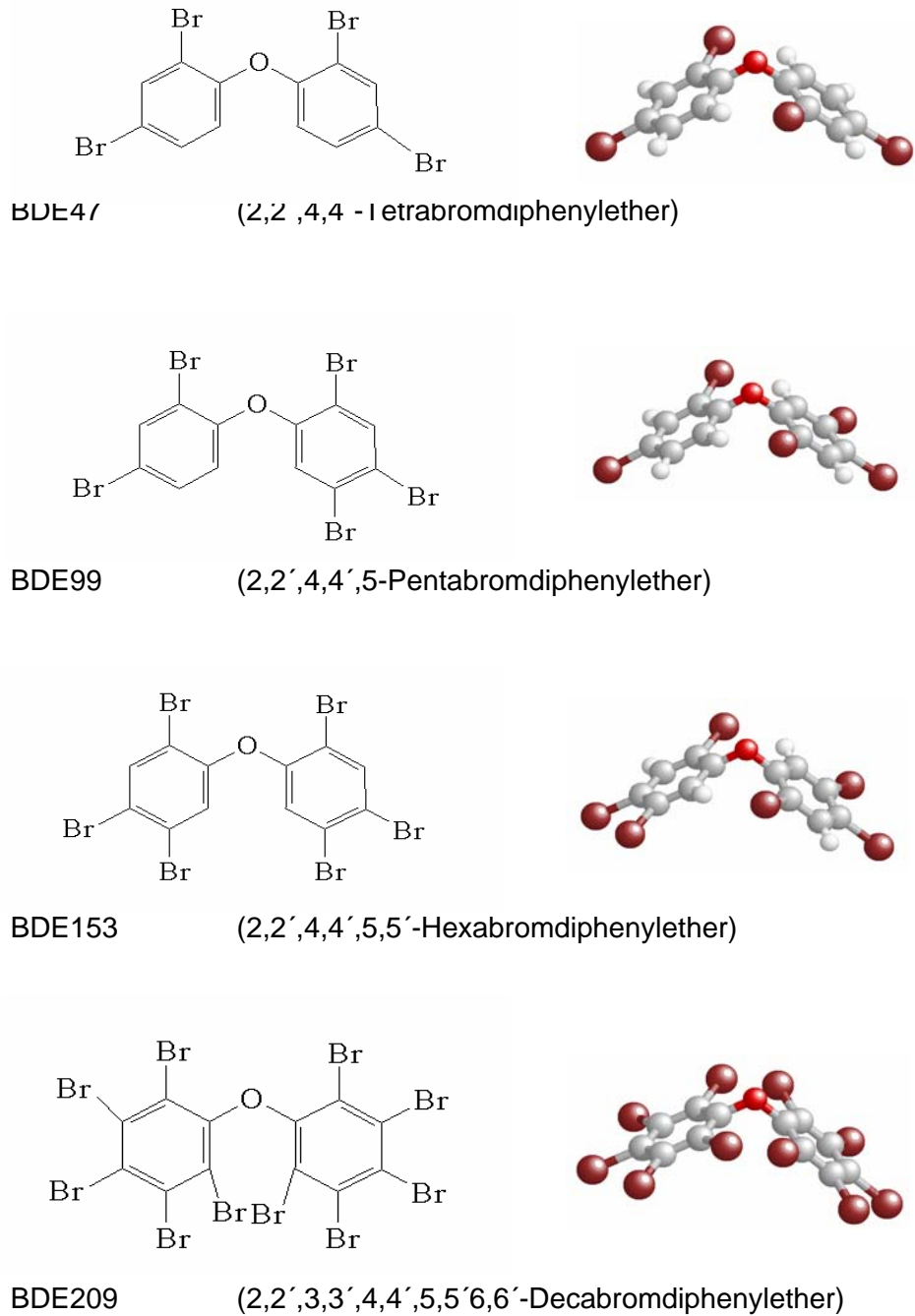
PBDE finden in kommerziellen Mixturen Verwendung als additive Polymer-Komponenten (z.B. in Polystyrolen, Polyurethan-Schäumen, Epoxydharzen), welche in Verbrauchsgütern wie Computern, elektronischen Bauteilen, Fernsehern, Textilien, Autos, Polstern und Baustoffen zu finden sind. Diese kommerziellen PBDE-Mixturen bestehen aus Mischungen von unterschiedlich bromierten PBDE-Kongeneren. So besteht der PentaBDE-Mix typischerweise aus tetra- und penta-bromierten Kongeneren (Produktion in 2001: 7.500 t,



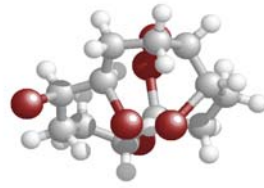
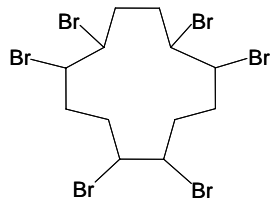
4 % Anteil an der gesamten BFR-Produktion) und der OctaBDE Mix überwiegend aus hepta- und octabromierten BDE-Kongeneren (Produktion in 2001: 3.790 t, 2 % Anteil). Der DecaBDE Mix (Produktion in 2001: 56.100 t, 27% Anteil) ist weiterhin in Gebrauch, er besteht überwiegend aus nona- und decabromierten BDE-Kongeneren. Der Anteil an BFR in Produkten kann 5-30 % des Gewichtes betragen, in Einzelfällen sogar mehr. Kommerzielle PBDE-Produkte bestehen bevorzugt aus Penta-, Octa- und Decabromdiphenylether Formulierungen. Die globale Produktion für PBDE-Produkte alleine betrug im Jahr 2001 noch 40.000 t (Darnerud et al. 2001).

Seit dem Jahr 1970 stieg die gesamte Herstellung von BFR kontinuierlich an und erreichte eine jährliche Produktion von 210.000 t im Jahr 1999 („Bromine Science and Environmental Forum“, BSEF, 2000). In Europa verzichtet man seit Juli 2003 auf den Gebrauch der kommerziellen PBDE-Mixturen Penta- und OctaBDE, was durch eine restriktive EU-Direktive zum Gebrauch dieser Mixturen in Elektronik-Bauteilen bestätigt wurde (*European Union, Restriction of Hazardous Substances Directive; Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment, OJ L37, page 19, 13. February 2003*). In den USA folgte der größte Hersteller, Great Lakes Chemical Corporation, mit einem freiwilligen Verzicht seit Ende 2004 (Birnbäum und Cohen Hubal 2006). In Kalifornien ist das Verbot der PentaBDE und OctaBDE für 2008 beschlossen. Trotz der Limitierung im Gebrauch ist aufgrund des persistenten Charakters der PBDE eventuell erst in einigen Jahrzehnten mit einer Abnahme der Konzentrationen in den analysierten Matrices zu rechnen, zumal ein weiterer Eintrag durch ältere flammgeschützte Produkte kontinuierlich stattfindet. Die Strukturen und dreidimensionalen Projektionen der wichtigsten in dieser Arbeit untersuchten PBDE-Kongeneren (BDE47, BDE99, BDE153 und BDE209) sind in Abb. 1.1 dargestellt. Die Größe der Bromsubstituenten führt meist zu einer nicht-planaren Konformation der PBDEs durch sterische Behinderung, wie die nach der niedrigsten energetischen Konformation berechneten 3D-Projektionen der Substanzen zeigen (Sanders et al. 2005).

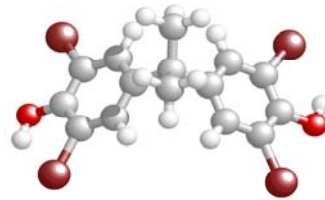
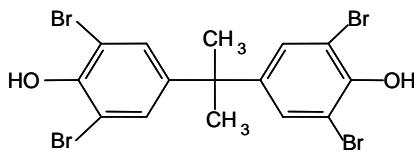
Ein weiteres bromiertes FSM, das Tetrabrombisphenol A (TBBPA), nimmt mit einem Anteil von 59 % an der gesamten BFR Produktion (*Bromine Science and Environmental Forum; BSEF, 2000*) eine bedeutende Stellung ein. TBBPA ist ein bereits bekannter endokriner Disruptor, der das Schilddrüsenhormon-System betrifft und auch in humanen Schilddrüsenzellen *in vitro*-Effekte auf die Regulation des Zellzyklus und intrinsischer Signalwege zeigte (Meerts et al. 2000; Strack et al. 2007). TBBPA (Abb. 1.2) ist interessanterweise das einzige BFR, das als reaktive Komponente in die Polymerstruktur flammgeschützter Produkte eingebunden wird. Hexabrom-cyclododecan (HBCD) ist das heutzutage am meisten hergestellte bromhaltige FSM. Man unterscheidet drei Diastereomere (Alpha, Beta und Gamma), wobei das Alpha-Diastereomer mit 80 % in den verwendeten kommerziellen Mixturen dominiert. HBCD (Abb. 1.2) hatte in einer Studie in Ratten eine induktive Wirkung auf den Fremdstoffmetabolismus gezeigt (Germer et al. 2006).



**Abb. 1.1: Strukturformeln und 3D-Projektionen der PBDE-Kongenerne BDE47, BDE99, BDE153 und BDE209 (errechnet nach der niedrigsten energetischen Konformation)**



HBCD (Hexabromocyclododecan)



TBBPA (Tetrabrombisphenol A)

**Abb. 1.2: Struktur von Hexabromocyclododecan (HBCD) und Tetrabrom-bisphenol A (TBBPA)**  
(3D-Projektionen zeigen die Planarität der Verbindungen errechnet nach der niedrigsten energetischen Konformation)

## 1.4 PBDE-Exposition von Umwelt und Mensch

PBDE und BFR allgemein haben einen nicht zu bestreitenden Vorteil in der Prävention und Reduzierung von Bränden, wodurch Leben gerettet werden können. Die Verwendung aber wurde vor allem ihrer Präsenz in der Umwelt wegen und aufgrund der Exposition von Mensch und Wildtieren gegenüber diesen Substanzen limitiert (Birnbaum und Staskal 2004). PBDE werden bereits als PCB der Zukunft bezeichnet. Die ermittelten PBDE-Konzentrationen in humanen Proben liegen im ng/g Lipid Bereich, während PCB mit Konzentrationen im µg/g Lipid Bereich noch dominieren. Trotz der limitierten Verwendungen und des Verzichts auf niederbromierte PBDE werden diese immer noch in der Umwelt detektiert und zeigen z.B. in den USA einen weiteren Anstieg der Konzentrationen auch im Menschen (Sjodin et al. 2003; Watanabe und Sakai 2003; Birnbaum und Cohen Hubal 2006). Geringer bromierte PBDE-Kongenerere zeigen eine höhere Bioakkumulation und Persistenz als die höher bromierten Verbindungen, sie haben einen Biokonzentrationsfaktor von > 5000 (de Wit 2002). So findet man insbesondere die PBDE-Kongenerere der PentaBDE-Mixtur allen voran in der Umwelt (Zusammensetzung: BDE99 und BDE100 [50-60 %], BDE47 [24-38 %], BDE153 [4-8 %]). Interessanterweise dominieren die Kongenerere BDE47, BDE99, BDE100 und BDE153 in dieser Reihenfolge, obwohl dies nicht den Mengen-Anteilen in der kommerziellen PentaBDE-Mixturen entspricht, welche zweimal soviel BDE99 wie BDE47 enthielt (Darnerud 2003). Es ist derzeit noch unklar, ob dieses Paradoxon der BDE47-Dominanz eine toxikokinetische Komponente aufweist, d.h. die Exkretion der PBDE-Kongenerere aus dem Körper mit

steigendem Grad an Bromsubstitution zunimmt, oder ob die höhere Umwelt-Exposition gegenüber BDE47 hierfür verantwortlich ist (Staskal et al. 2006 A, B und C).

PBDE zeigen wie die meisten BFR eine abnehmende Wasserlöslichkeit mit zunehmender Bromsubstitution. Aufgrund dieser lipophilen Eigenschaften konzentrieren sich diese Verbindungen in der aquatischen Umwelt vor allem in Sedimenten. Die Verteilung und der Langstreckentransport von PBDE in der Umwelt erfolgt über Partikel und Sedimente, die Exposition von Tieren erfolgt hauptsächlich über die Nahrungskette. Die Belastung von Tieren gliedert sich hierarchisch in der Nahrungskette, so sind Beutetiere geringer belastet als Raubtiere. Ein genereller Trend der Belastung sieht wie folgt aus: Invertebraten < Fische < marine Säugetiere (Birnbauer und Staskal 2004). Auch hier ergibt sich wie zuvor ein ähnliches Muster an PBDE-Kongeneren, die in den Proben ermittelt werden, der Reihe nach wird mengenmäßig mehr BDE47 > BDE99 > BDE100 > BDE153 detektiert.

Der Hauptweg der Humanexposition führt über die Nahrung und den Gastro-Intestinaltrakt. Hohe Konzentrationen an PBDE konnten in fetthaltigen Lebensmitteln nachgewiesen werden, z.B. Fisch, Fleisch und Milchprodukten. Dieser Aufnahmeweg überschneidet sich mit der Aufnahmemöglichkeit für andere Schadstoffe, wie etwa für PCB und Dioxine (Darnerud et al. 2001). Auch die Raumluft wurde als ein denkbarer Expositionsweg für PBDE diskutiert (Sjodin et al. 2003). Die Aufnahme von PBDE orientiert sich auch am Grad der Bromsubstitution der Verbindungen. So wird BDE99 sehr gut absorbiert (> 50 % Resorption der aufgenommenen Menge) und das höher bromierte DecaBDE (> 10 % Resorption) weniger (Birnbauer und Staskal 2004).

Die Toxikokinetik ist in Mäusen und Ratten bereits gut untersucht, es gibt Evidenzen für die Aufnahme der PBDE-Kongeneren, Enzym-Induktion, Ausscheidung und Metabolismus (Hakk und Letcher 2003). Als besonders kritisch wird die Möglichkeit der Exposition gegenüber PBDE-Kongeneren von Säuglingen durch die Muttermilch betrachtet. Untersuchungen der Muttermilch schwedischer Frauen über einen Zeitraum von 25 Jahren (1972 bis 1997) haben gezeigt, dass sich die PBDE-Konzentrationen exponentiell erhöhten, mit einer Verdopplungszeit von 5 Jahren im Beobachtungszeitraum (Noren und Meironyte 2000; Meironyte et al. 2001). Die Werte stiegen von 0,07 ng/g Lipid auf 4,02 ng/g Lipid. Derzeit ist der Trend der Konzentrationen eher abnehmend, die Werte der Konzentrationen zeigten einen Rückgang zwischen 1998 und 2000 (Noren und Meironyte 2000). Interessanterweise sind die Konzentrationen im gleichen Betrachtungszeitraum in Proben aus den USA und Kanada um einen Faktor 10-100 höher als die in schwedischer oder japanischer Muttermilch (Proben in Schweden und Japan: Median 3,2 ng/g Lipid und 1,4 ng/g Lipid; Kanada und USA Median 25 ng/g Lipid und 41 ng/g Lipid) und zeigen einen weiter steigenden Trend (Watanabe und Sakai 2003). Auch in diesen Studien erwies sich das PBDE-Kongener BDE47 als das dominierende Kongener (Birnbauer und Staskal 2004).

Interessanterweise werden höher bromierte PBDE-Kongeneren nach Aufnahme relativ schnell wieder ausgeschieden, während für BDE47 in einer Studie mit schwedischen Arbeitern keine klare Halbwertszeit der Ausscheidung ermittelt werden konnte (Sjodin et al. 1999). Versuche an Ratten konnten zeigen, dass BDE47 in männlichen bzw. weiblichen Ratten eine Halbwertszeit von 19 bzw. 30 Tagen hatte, während das DecaBDE in einer Teststudie bereits nach 3 Tagen zu 99 % mit dem Fäzes ausgeschieden war. Die Eliminierung *via* Urin betrug lediglich Bruchteile im Vergleich zur Eliminierung durch Fäzes. BDE47 akkumulierte in den Tierversuchen hauptsächlich im Fettgewebe von Ratten und auch von Mäusen.

## 1.5 PBDE und der Fremdstoffmetabolismus

Viele BFR sind nach Aufnahme in den Organismus metabolischen Prozessen zugänglich. So konnten oxidative und reduktive Debromierungen für PBDE-Kongenerenachgewiesen werden, sowie eine durch oxidative Cytochrom P450 Enzyme vermittelte Biotransformation (Hakk und Letcher 2003). Cytochrom P450 Enzyme sind Monooxygenasen, deren funktionelle Gruppe ein Häm-Molekül ist. In einem von NADPH (reduziertes Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat, Reduktionsäquivalent) abhängigen Reaktionszyklus wird enzymatisch ein Sauerstoffatom auf ein Substrat übertragen. Diese Reaktion wird als Phase I der Detoxifizierung durch Funktionalisierung des Substrates bezeichnet. Oftmals erfolgt im Anschluss daran eine Phase II-Konjugationsreaktion, bei der das zuvor oxygenierte Substrat an eine weitere funktionelle Gruppe gekoppelt wird, z.B. Glukuronsäure oder Schwefelsäure, wodurch die Wasserlöslichkeit des lipophilen Substrates zusätzlich erhöht wird. Als sogenannte Phase III-Reaktion oder Eliminierung erfolgt dann die Ausscheidung aus den Zellen durch Transportproteine und letztlich *via* Urin und/ oder Fäzes aus dem Organismus. Die Cytochrom P450 Enzyme (Cyp) zählen zu einer Multigenfamilie fremdstoffmetabolisierender Phase I-Enzyme, welche neben der Detoxifizierung des Substrates durch Oxygenierung auch zur Entstehung toxischer Metabolite beitragen können. Alle Säugetiere besitzen 18 unterschiedliche Cyp-Familien, wovon die ersten drei Familien für die vorliegende Arbeit und den Fremdstoffwechsel von Bedeutung sind. Diese drei Familien, die Cyp1-, Cyp2- und Cyp3-Familie spielen zudem eine bedeutende Rolle im endogenen Metabolismus von Hormonen, z.B. im Stoffwechsel von Geschlechtshormonen wie dem Östrogen (Nebert und Dalton 2006).

Tatsächlich konnte in einigen Studien die Induktion des AhR-abhängigen Fremdstoffwechsels durch DE-71, die kommerzielle PentaBDE-Mixtur, in Form gesteigerter EROD-Aktivität beobachtet werden (Brouwer et al. 1998). Die Aktivität der Cytochrom P450 Monooxygenase 1A1 (Cyp1A1) kann mit dem Ethoxyresorufin-O-Deethylase Assay (Ethoxyresorufin ist ein spezifisches Cyp1A1-Substrat) detektiert werden. Des Weiteren waren die Aktivitäten der Penthoxyresorufin-O-Deethylase (PROD), welche die Aktivität der Cyp2B1 reflektiert, sowie die der UDP-Glucuronosyltransferase (UDPGT), einem konjugierenden Phase II-Enzym, erhöht. Diese Effekte traten bei einer Konzentration der PBDE-Mixtur von bei 30-60 mg/kg Gewicht der Versuchstiere auf (Darnerud et al. 2001; Zhou et al. 2001 und 2002). In einer weiteren Studie hatte das Kongener BDE47 schwache, aber signifikante Effekte auf die Cyp1A1-Induktion (Hallgren und Darnerud 2002). Die Entstehung von hydroxylierten PBDE-Metaboliten *in vitro* und *in vivo* ist vielfach in der Literatur beschrieben (Hakk und Letcher 2003). Experimentelle Studien von Meerts und Mitarbeitern (2000 und 2001) belegten die Entstehung von solchen hydroxylierten PBDE-Metaboliten nach Inkubation der PBDE-Kongeneren in induzierten Leber-Mikrosomen.

Die Existenz hydroxylierter PBDE-Metabolite konnten experimentell in Fäzes und Urin von Ratten und Mäusen nachgewiesen werden (Hakk und Letcher 2003). Neben der Induktion von Enzymen des Fremdstoffwechsels werden PBDE-Kongeneren tatsächlich in der Ratte *in vivo* metabolisiert; so konnte die Bildung von geringen Mengen an hydroxylierten BDE47 und BDE99 gezeigt werden (Orn und Klasson-Wehler 1998). Verschiedene Toxizitäts-Studien belegen die Wirkung einiger Verbindungen aus der Klasse der BFR auf das endokrine System. So konnte gezeigt werden, dass hydroxylierte Metabolite des BDE47 mit dem Schilddrüsenhormon *in vitro* um die Bindung an das Schilddrüsenhormon-Transport-Protein konkurrieren können und potentiell die Exkretion des Hormons durch Induktion an der Biotransformation beteiligter Enzym beschleunigen könnten (Vos et al. 2003; Meerts et al. 2000). PBDE-Kongeneren und die kommerzielle Mixtur DE-71 führten in bisherigen

Untersuchungen zur Induktion des Fremdstoffwechsels *in vitro* und *in vivo* und wurden metabolisiert.

## 1.6 PBDE und Toxizität

Die Verwendung von PBDE-Produkten rief aufgrund des lipophilen und inerten Charakters der Verbindungen die Bedenken hervor, es bestehe die Gefahr der Akkumulation in der Umwelt (Birnbaum und Staskal 2004; Birnbaum und Cohen Hubal 2006). So tragen die BFR selbst und ungewollte Nebenprodukte ihrer Herstellung, die bromierten Dibenzodioxine (PBDD) und -furane (PBDF), zu der bereits bestehenden Belastung von Umwelt (Darnerud et al. 2001; de Wit et al. 2002; Darnerud 2003; Law et al. 2003) und Mensch (Noren and Meironyte 2000; Covaci et al. 2002 und 2003) durch Schadstoffe bei. Für PBDE-Mixturen und einzelne Kongenere konnten toxische Effekte (z.B. endokrine Disruption) im Tierversuch nachgewiesen werden. Zudem entstehen, wie im Kapitel zuvor geschildert, neben den eigentlichen PBDE-Kongeneren hydroxylierte Metabolite, die wiederum toxische Effekte zur Folge haben können. Über die zugrunde liegenden Mechanismen der PBDE-Toxizität ist noch sehr wenig bekannt (Darnerud et al. 2001). Eine Reihe von Studien zeigt sehr deutlich, dass BFR das endokrine System in Säugetieren beeinflussen können (Vos et al. 2003). Durch dieses Kommunikationssystem des Körpers werden Stoffwechselprozesse wie Wasser- und Energiehaushalt und auch die Entwicklung des Organismus beeinflusst. Störungen dieser empfindlichen Homöostase können schwere pathologische Konsequenzen haben.

Die BFR-Verbindungen TBBPA, PBDEs und HBCD hatten bereits in Studien *in vitro* Potential gezeigt, mit dem Thyroid- und Steroidhormonsystem zu interferieren. Das PBDE-Kongener BDE47 bzw. sein hydroxylierter Metabolit (6HO-BDE47) hatten eine stark anti-östrogene Wirkung (Meerts et al. 2001; Hamers et al. 2006). Auch antagonistische Wirkungen auf den Androgen- und den Progesteron-Rezeptor wurden in der Literatur beschrieben (Hamers et al. 2006). Neben der toxischen Wirkung der eigentlichen PBDE konnten auch hydroxylierte PBDE-Metabolite die Aktivität der Aromatase (Cyp19), einem Schlüsselenzym im Steroidhormonsynthese, negativ beeinflussen (Canton et al. 2005). Die Aromatase katalysiert die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen. Auch *in vivo* kam es durch DE-71, die kommerzielle PentaBDE-Mixtur, zu Effekten auf die Entwicklung des reproduktiven Systems, z.B. zur Verzögerung der Pubertät, Abnahme des Prostatagewichts und der Testes. Weiterhin führte DE-71, wie auch für einzelne PBDE-Kongenere beobachtet (z.B. BDE47), zu einer Beeinträchtigung des Thyroid-Hormonsystems (Stoker et al. 2004).

Das Schilddrüsenhormon-System beeinflusst die Entwicklung, die Reifung und den Stoffwechsel des Organismus. Hydroxylierte PBDE-Metabolite könnten mit dem Thyroidhormonsystem interferieren (Meerts et al. 2000; Darnerud et al. 2001). So hatten *In vitro*-Studien belegt, dass Produkte der Inkubation von PBDE-Kongeneren mit  $\beta$ -Naphthoflavon ( $\beta$ NF)-induzierten Mikrosomen, einem klassischen AhR-Agonisten und Cyp1A1-Induktor, zur Kompetition des Schilddrüsenhormons mit seinem Transportprotein (TTR) führten, die PBDE-Kongenere selbst jedoch nicht (Meerts et al. 2000). Auch *in vivo* hatten hydroxylierte PBDE-Metabolite Effekte und interferierten mit dem Schilddrüsenhormon-System, indem sie zu einer Verminderung des im Blut zirkulierenden Schilddrüsenhormons Thyroxin ( $T_4$ ) führten (Hallgren et al. 2001; Zhou et al. 2001).

Als zugrunde liegender Mechanismus dieser Disruption wurden folgende zwei Szenarien diskutiert: zum Einen die gesteigerte  $T_4$ -Exkretion durch Induktion von an der Biotransformation beteiligten Enzyme und zum Anderen die Kompetition von PBDE-Metaboliten mit  $T_4$  um die Bindung an das Thyroidhormon-Transport-Protein (TTR). Das

Schilddrüsenhormon Thyroxin (T<sub>4</sub>) und seine Wirkform Triiodthyronin (T<sub>3</sub>) waren in Versuchen mit Ratten nach Gabe der PBDE-Mixtur erniedrigt, während die Plasmaspiegel des Thyroid-stimulierenden Hormons (TSH) erhöht waren. Dieselbe Studie berichtet weiterhin von Effekten auf die Leber, sichtbar an einer Zunahme des Organgewichtes und hepatische Enzyminduktion, u.a. Cyp1A1, Cyp2B1 und UDPGT waren erhöht. Diese Effekte traten bei einer Konzentration der PBDE-Mixtur von bei 30-60 mg/kg Gewicht der Versuchstiere auf. Auch in Wildtieren, wie dem amerikanischen Falken (*Falco sparverius*), konnte eine Reduktion des T<sub>4</sub> Levels durch PBDE beobachtet werden (Ferne et al. 2005).

Des Weiteren zeigten PBDE-Kongenere in Tierversuchen toxisches Potential auf die Entwicklung des neuronalen Systems (Literaturübersicht in Costa und Giordano 2007). So konnten in Experimenten mit Ratten, die während einer extrem sensitiven Phase der Gehirnentwicklung (*Brain growth spurt*, BGS) neonatal PBDE-Kongeneren ausgesetzt waren, neurologische Defekte im adulten Tier festgestellt werden (Eriksson et al. 2001; Eriksson et al. 2002). Nach BDE99-Exposition kam es zu einer Beeinträchtigung der spontanen mototrischen Aktivität, einer Veränderung der cholinergen Transmitter-Suszeptibilität und einer Disruption der Habituations-Fähigkeit (Viberg et al. 2002). Die PBDE-Kongenere BDE47, BDE99, BDE153 und BDE209 führten in Mäusen generell zu einer Beeinträchtigung des Lernens und des Gedächtnisses (Eriksson et al., 2001, 2002 and 2006; Viberg et al. 2003 A und B, 2004, 2006 und 2007). Auch im Killifisch (*Fundulus heteroclitus*), konnten Störungen in Entwicklung und Verhalten nach PBDE-Exposition beobachtet werden (Timme-Laragy et al. 2006). Die molekularen Mechanismen der toxischen Wirkung von PBDE Kongeneren auf das kognitive System und das Verhalten sind unklar. Auf zellulärer Ebene wurden *in vitro* akute und subakute PBDE-Effekte berichtet, z.B. Interferenzen von PBDE-Kongeneren mit intrazellulären Signalkaskaden im Gehirn (Kodavanti et al. 2005) sowie die Freisetzung von <sup>3</sup>H-Arachidonsäure durch DE-71 in granulären Zellen des Zerebellums von Ratten (Kodavanti und Derr-Yellin 2002). Weitere toxische Effekte, welche im Zusammenhang mit der Gehirnentwicklung stehen könnten, sind die berichteten Wirkungen auf das Thyroidhormonsystem.

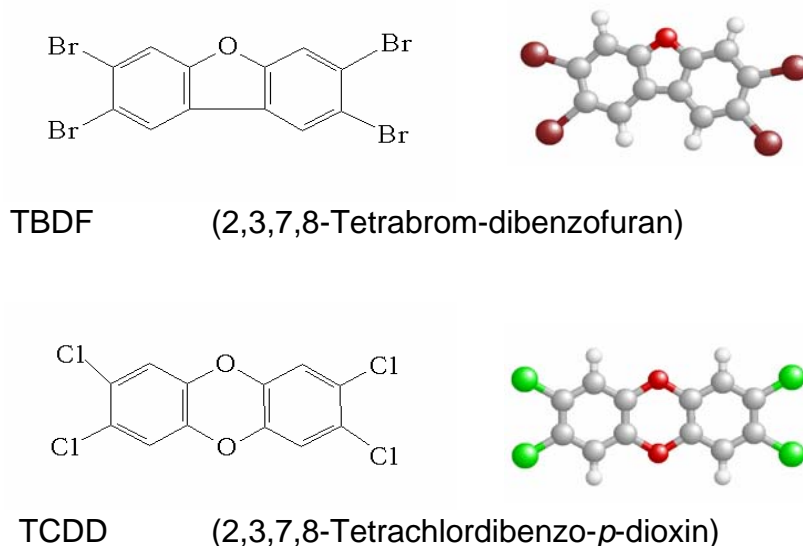
Über mögliche kanzerogene Effekte der PBDE ist derzeit wenig bekannt. Kanzerogenes Potential zeigte das DecaBDE in einer zweijährigen Langzeit-Fütterungsstudie mit Ratten, durchgeführt vom nationalen Toxikologie Programm der USA (NTP 1986). Bei hohen Dosen (50.000 ppm) wurden neoplastischen Knoten in der Leber von männlichen und weiblichen Tieren festgestellt. Ein ähnliches karzinogenes Potential für DecaBDE konnte in männlichen Mäusen verifiziert werden. Die Autoren einer epidemiologischen Studie mit schwedischen Männern und Frauen hatte gezeigt, dass die Konzentration im Fettgewebe von Patienten mit „Non-Hodgkin's“ Lymphomen (NHL) mit 13,1 ng/g Lipid (BDE47 im Mittel) höher lag als in gesunden Patienten mit 5,1 ng/g Lipid (BDE47 im Mittel) und schlossen eine positive Korrelation nicht aus (Hardell et al. 1998). „Non-Hodgkin's Lymphome“ sind maligne Neoplasmen, ausgehend von Mandeln (Tonsillen) oder Lymphknoten.

## **1.7 Der Xenosensor Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) und Cyp1A1**

Die Strukturverwandtschaft der PBDE mit Polychlorierten Biphenylen (PCB) und anderen Dioxin-ähnlichen Verbindungen führte wie bereits geschildert zu Bedenken, dass eine Wirkung auf den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) bzw. Dioxin-Rezeptor möglich wäre. Der Begriff Dioxin umfasst polyhalogenierte Dibenzodioxine (P<sub>x</sub>DD) und -furane (P<sub>x</sub>DF), wobei sich der Begriff zumeist auf den bekanntesten und potentesten Vertreter, das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) bezieht. TCDD (Abb. 1.3) wurde durch die IARC

(*International Agency for Research on Cancer*) als humanes Karzinogen der Gruppe I klassifiziert (1997). Dioxine sind Kontaminanten anthropogenen Ursprungs, die z.B. bei der auf Chlorphenol basierenden Herbizid oder Holzschutzmittel-Herstellung, sowie bei Verbrennungs-Prozessen anfallen. Ihre Bekanntheit in der Öffentlichkeit erreichten Dioxine nach dem Vietnam-Krieg Ende der 1960er Jahre, wo mit Dioxin verunreinigte Entlaubungsmittel (*Agent Orange*) zum Einsatz kamen und sowohl Bevölkerung als auch Soldaten gesundheitlich belasteten. Eine erhöhte Zahl von Missbildungen unter Neugeborenen damals Dioxin-Exponierter wird diskutiert (Steenland et al. 2004; Warner et al. 2007).

Nach einem Unfall in einer Chemiefabrik im italienischen Seveso im Jahr 1976 gelangten erhebliche Mengen Dioxin in die Umwelt, eine erhöhte Krebsrate unter der exponierten Bevölkerung war auffällig. Aufsehen erregend war eine Dioxin-Vergiftung von Viktor Juschtschenko im Jahr 2004, des ukrainischen Präsidenten, als Folge eines kriminellen Gift-Anschlags. Die Konsequenz war eine erhebliche Chlorakne, d.h. eine Hyperproliferation der Keratinozyten, die jedoch nicht letal war.



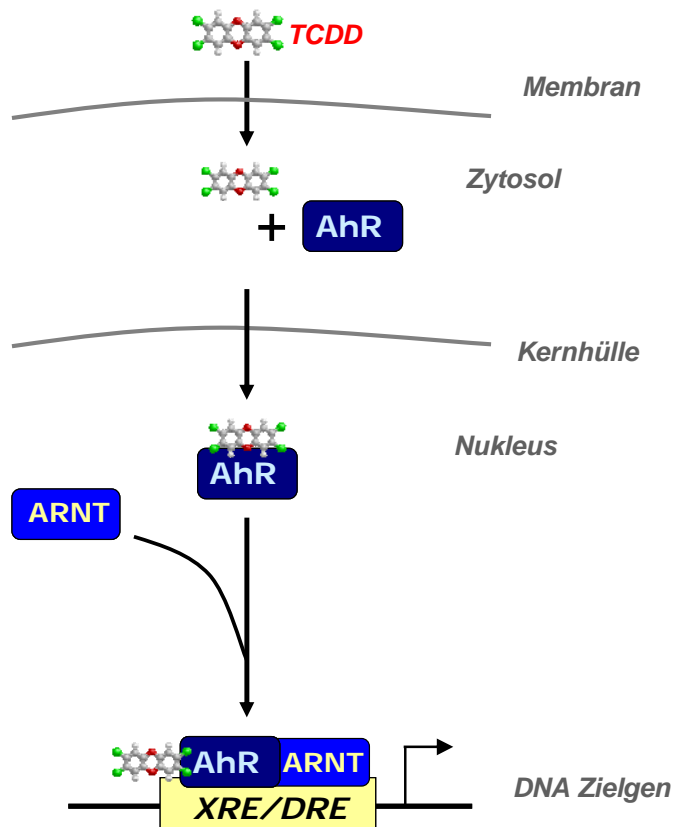
**Abb. 1.3: Strukturformeln von 2,3,7,8-Tetrabromdibenzofuran (TBDF) und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-Dioxin (TCDD) (3D-Projektionen zeigen die Planarität der Verbindungen errechnet nach der niedrigsten energetischen Konformation)**

Der AhR wird typischerweise durch diese Dioxine und Dioxin-ähnliche Substanzen aktiviert und vermittelt deren Toxizität. Der AhR ist ein Mitglied der Familie basischer helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim (bHLH/PAS) Transkriptionsfaktoren. Weitere Mitglieder dieser Transkriptionsfaktoren-Familie sind Per (*Period*), ARNT (*AhR nuclear translocator*) und SIM (*Single minded*), deren Funktionen ebenfalls in der Regulation physiologischer Prozesse liegen, z.B. der zirkadianen Rhythmik, der Hypoxie und in der Entwicklung. In der Zelle besitzt der AhR die Funktion eines Liganden-aktivierten Xenosensors und zudem erfüllt er eine physiologische Rolle als Regulator zellulärer Prozesse wie z.B. im Zellzyklus (Nebert et al. 2000; Puga et al. 2002). Die physiologische Aktivierung des AhR und ein endogener Ligand hierfür sind bis heute nicht identifiziert. Verschiedene Mechanismen, wie etwa die Aktivierung durch zyklisches AMP (cAMP), einem *second messenger*) verschiedenster intrinsischer Signalwege, werden diskutiert (Oesch-Bartlomowicz et al. 2005). Nach Bindung eines



exogenen Liganden (z.B. TCDD, Abb. 1.3) an den AhR, kommt es zu dessen Aktivierung und infolgedessen zur Translokation in den Zellkern (Abb. 1.4). Dort erfolgt die Bindung des Heterodimerisierungs-Partners ARNT, dem nukleären AhR Translokator, und es kommt zur Formierung des aktiven AhR/ARNT Transkriptionsfaktor-Komplexes. Dieser Komplex bindet an AhR-responsive Elemente (AhRE) in Promotorbereichen von Zielgenen und führt zur Induktion der Transkription derselben, ein bekanntes Beispiel ist die TCDD-induzierte Expression der Cyp1A1 (Hankinson 1995). Cyp1A1 ist das am besten charakterisierte AhR-Zielgen für Dioxin-ähnliche Verbindungen.

Die Induktion der Cyp1A1 bzw. deren enzymatische Aktivität wird als Bioassay zur Bewertung der Exposition gegenüber Dioxin-ähnlichen Verbindungen genutzt. Die Interaktionen von PBDE-Mixturen und einzelnen Kongeneren mit dem AhR Signalweg sind bereits Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. Hierbei zeigten einige PBDE-Kongeneren tatsächlich Potential, den AhR zu aktivieren, im Vergleich mit TCDD fiel dieses Potential jedoch sehr schwach aus (ca. 4-6 Potenzen niedriger als TCDD). In primären Ratten-Hepatozyten induzierten die Kongenere BDE77 und BDE119 Cyp1A1-mRNA und -Protein (Chen und Bunce 2003). In ähnlicher Weise zeigten diese beiden Kongeneren BDE77 und 119 ein AhR agonistisches Potential in einem Reporter-gen-Assay in Ratten Hepatomzellen, und die PBDE-Kongenere BDE47 und BDE99 in humanen HepG2 Zellen (Behnisch et al. 2003; Pacyniak et al. 2007).



**Abb. 1.4: AhR Signalweg nach TCDD-Aktivierung.** Verwendete Abkürzungen: AhR, Aryl Hydrocarbon Rezeptor; ARNT, AhR Nukleärer Translokator; TCDD, 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin; XRE/DRE, Xenobiotisch/Dioxin-responsives Element.

Auch *In vivo*-Daten belegen die Induktion hepatischer Cyp1A1-Aktivität durch die kommerzielle PBDE-Mixtur DE-71 in Versuchen mit Ratte nach oraler Verabreichung (Zhou et al. 2002). DE-71 besteht nach BDE99 zum größten Teil aus BDE47 (ca. 40 %), welches in der Umwelt das dominierende Kongener ist. Hohe Dosen der einzelnen PBDE-Kongeneren BDE47, BDE99 und BDE153 erhöhten die Cyp1A1-mRNA-Level in der Leber der Ratten

(Sanders et al. 2005). Im Gegensatz hierzu gibt es eine Reihe von Berichten über PBDE-Kongenere, ein AhR-antagonistisches Potential zu besitzen. Untersuchungen in verschiedenen etablierten Säuger-zellkulturen und darüber hinaus in primären Hepatozyten des Karpfens, der Ratte und von Langschwanzmakaken belegten für einige PBDE-Kongenere (BDE47, BDE99 und BDE153) eine Inhibierung der TCDD-induzierten EROD-Aktivität und entsprechend verminderte CYP1A1-Proteinmengen (Chen und Bunce 2003; Kuiper et al. 2004; Peters et al. 2004; Peters et al. 2006 A und B). Zusammenfassend betrachtet zeigen einige PBDE-Kongenere und die kommerzielle Mixtur DE-71 AhR-agonistische Effekte und Cyp1A1-Induktion, während andere Studien eher einen AhR-Antagonismus und eine Unterdrückung der Cyp1A1 berichteten.

Der AhR vermittelt zudem die toxischen Effekte von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), dem stärksten bekannten AhR-Aktivator, sowie die der polyaromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen (PAH). PAH aktivieren den AhR und induzieren ihren eigenen Cyp1A1-vermittelten Metabolismus, der in der Regel zur Entgiftung führt. Hohe PAH-Konzentrationen können jedoch auch zur Bildung toxischer Metabolite und zur Giftung führen (Nebert und Dalton 2006). Dahingegen werden permanente AhR-Liganden (TCDD) kaum metabolisiert, sondern aktivieren den AhR chronisch. Die Folgen dieser permanenten Aktivierung sind Teratogenität (Gaumenspalte in Mäuseembryonen), Chlorakne (Hyperkeratose), Rückbildung des Thymus (Involution) und auch Tumorpromotion (Bock und Köhle 2006). TCDD ist einer der stärksten bekannten Tumorpromotoren (Pitot et al. 1980). Eine chronische Aktivierung des AhRs durch Umweltkontaminanten, z.B. durch PBDE-Kongenere, könnten demzufolge pathophysiologische Konsequenzen wie etwa Kanzerogenese zur Folge haben (Moennikes et al. 2004; Andersson et al. 2002). Paradoxe Weise scheint die Cyp1A1 eher eine protektive Wirkung zu besitzen, als zur metabolischen Potenzierung toxischer AhR Liganden beizutragen, wie in Versuchen mit Cyp1A1 Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte (Nebert et al. 2004). Die genetischen Programme nach Aktivierung des AhRs und deren Relevanz für die molekularen Mechanismen der Toxizität sind weitestgehend undefiniert. Mögliche Einflüsse von PBDE auf indirekte, nicht-genomische Effekte einer AhR Aktivierung sind unbekannt, etwa die Aktivierung von Mitogen-aktivierte Protein- bzw. Stress-Kinasen (z.B. p38) durch den Rezeptor und deren Substrate, z.B. Transkriptionsfaktoren wie c-Jun (Weiss et al. 2005). Vor kurzem wurde eine Funktion des aktivierten AhR als Ubiquitin-Ligase für den Estrogen-Rezeptor berichtet, eine weitere nicht-genomische Regulation (Ohtake et al. 2007). Die Suche nach neuen Zielgenen des AhRs brachte das Zellzyklus-inhibierende Protein p27<sup>Kip1</sup> hervor, welches am TCDD-induzierten Zellzyklus-Arrest in 5L-Zellen beteiligt ist (Weiss et al. 1996; Kolluri et al. 1999).

## 1.8 AhR und die Proliferation

Der AhR vermittelt die toxischen und karzinogenen Effekte von TCDD (Nebert et al. 2004), seine Rolle in der Promotion der Zellzyklus-Progression ist bekannt (Marlowe und Puga 2005). So ist beschrieben, dass TCDD in ruhenden und konfluenten WB-344 Leberepithel-Zellen der Maus zur Steigerung der Proliferation führt (Dietrich et al. 2002; Weiss et al. 2007). Allerdings ist die Rolle des AhR in den Zellzyklus-Regulationen in verschiedenen Organismen und Modellsystemen scheinbar widersprüchlich. Denn im Gegensatz zu einer Steigerung der Proliferation zeigten Studien in proliferierenden 5L-Hepatoma-Zellen der Ratte und in Maus-Thymozyten, dass TCDD die Progression des Zellzyklus AhR-abhängig hemmt (Weiss et al. 1996; Kolluri et al. 1999). Auch *in vivo* führte die Behandlung mit TCDD zu einer

verminderten Proliferation in der regenerierenden Leber von Mäusen, die zuvor einer partiellen Hepatektomie unterzogen wurden (Mitchell et al. 2006).

Die Regulation der Zellzyklusphasen erfolgt durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (*Cyclin dependent Kinase*, CDK). Die CDK katalysieren die Phosphorylierung von Zielproteinen spezifisch an Serin- und Threonin-Resten um die Regulation des Zellzyklus zu dirigieren (Sherr 2000). Die Aktivität der CDK wiederum hängt strikt von den Cyclinen (Cyclin A-I) ab, deren Expression während der Zellzyklus-Progression oszilliert. Die Expression verschiedener Cycline zum richtigen Zeitpunkt stellt die korrekte Aktivierung von spezifischen CDK sicher. Während der G1-Phase phosphorylieren z.B. der CyclinD/CDK4-Komplex und der CyclinE/CDK2-Komplex das Retinoblastoma-Protein (pRb), wodurch dieses inaktiviert wird und so die Transition von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus eingeleitet wird. Der Tumorsuppressor pRb kontrolliert negativ den Transkriptionsfaktor E2F, welcher für die Expression S-Phase relevanter Cycline verantwortlich ist (Marlowe und Puga 2005). In der frühen S-Phase kommt es dann zur Bindung von Cyclin A an die CDK2 und zum Ablauf der S-Phase. Die Aktivität der CDK2 kann durch kleine inhibitorische Proteine wie p27<sup>Kip1</sup> und p21<sup>Cip1</sup> reguliert werden. Beide gehören zur Familie der Kinase-interagierenden Proteine (*CDK interacting protein*, CIP). Eine Aktivierung solcher CDK-Inhibitoren (CKI), z.B. p27<sup>Kip1</sup>, führt so zur Inaktivierung der CDK, was wiederum eine Inaktivierung von pRb zur Folge hat (Bock und Köhle 2006). Kolluri und Kollegen (1999) konnten demonstrieren, dass TCDD die AhR-abhängige Expression von p27<sup>Kip1</sup> induziert, einem CDK Inhibitor, und in Konsequenz dessen ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase eintritt. Auch die AhR-abhängige, gesteigerte Expression des CDK2-Inhibitors p21<sup>Cip1</sup> durch TCDD wurde berichtet (Bock und Köhle 2006). Ein Aspekt der Toxizität von dioxin-artigen Substanzen ist die Deregulation der Zellzykluskontrolle. Daher ist in dieser Arbeit auch die Auswirkung von PBDE-Kongeneren auf die Regulation des Zellzyklus als ein relevanter Endpunkt zellulärer Toxizität von Interesse. Die Untersuchung des AhR-Signalwegs und die AhR-abhängigen Zellzyklusregulation soll in den 5L Ratten-Hepatomzellen und einem AhR-defizienten Subklon, den BP8 Zellen, untersucht werden.

## **1.9 Weitere Xenosensoren: der konst. Androstan-Rezeptor (CAR) und der Pregnan-X-Rezeptor (PXR)**

Einige Hinweise aus der Literatur deuten bereits auf eine Wirkung von PBDE-Kongeneren auch über andere Wege des Fremdstoffwechsels außer einer potentiellen Aktivierung des AhR-Signalweges hin, u.a. die Induktion der Cytochrom-P450-Monooxygenase 2B (Cyp2B)-Aktivität in der Ratte durch DE-71 (Zhou et al. 2002). Neben dem AhR besitzt die Zelle noch andere Liganden-gesteuerte, Fremdstoff-Rezeptoren sowie eine Vielzahl an zugehörigen und metabolisierenden Cyp-Enzym Familien (z.B. die Cyp2B- und Cyp3A-Familien). Die Induktion der Cyp1A wird durch den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR), die der Cyp2B durch den konstitutiven Androstan-Rezeptor (CAR) und die der Cyp3A durch den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) reguliert, wobei es überlappende Substratspektren und erhebliche Unterschiede zwischen den Spezies gibt (Whitlock 1999; Willson und Kliever 2002). Auch CAR und PXR unterscheiden sich wie der AhR von der Gruppe der nukleären Hormon-Rezeptoren, zu denen z.B. der Glukokortikoid-Rezeptor (GR) und der Estrogen-Rezeptor (ER) zählen. Die Rezeptoren CAR und PXR sind neben dem AhR die bedeutendsten Regulatoren des Fremdstoffwechsels und der Biotransformation (Timsit und Negishi 2007). Sie werden allerdings durch unterschiedliche Induktoren aktiviert und haben verglichen mit dem AhR ein unterschiedliches Substratspektrum. Auch für CAR und PXR sind bisher keine physiologischen Liganden bekannt. Aber eine physiologische Rolle der beiden Rezeptoren liegt

in der Regulation von metabolischen Signalwegen, z.B. der Eliminierung von Cholesterin aus dem Körper.

Ein typischer Aktivator der CAR-abhängigen Expression ist Phenobarbital, ein Anti-Epileptikum, das zu einer gesteigerten Expression einer Reihe von Phase I-Enzymen (Cyp2B), Phase II-Enzymen (GST2, UDPGT, etc.) und Transport-Proteinen bzw. Phase III-Enzymen (MRP und OATP) führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des CAR zu einer Absenkung des Schilddrüsenhormon-Spiegels (T4) durch die erhöhte Induktion von biotransformierenden Enzymen und gesteigerter Konjugation des T4 mit Glukuron und Sulfat führte (Quantanani et al. 2005; Quantanani und Moore 2005). Zu einer gesteigerten Cyp3A Expression kommt es nach einer PXR-Aktivierung durch Glukokortikoide (Dexamethason, Dex), Pregnan (z.B. Pregnenolon-16 $\alpha$ -Carbonitril, PCN) und Makrolid-Antibiotika (z.B. Rifampicin, Rif). Das Spektrum durch CAR induzierter Phase I-, II- und III-Enzyme überschneidet sich mit dem Spektrum der durch PXR induzierter Zielgene. Ebenso aktivieren viele CAR-Liganden auch PXR, nicht jedoch umgekehrt. Beide Rezeptoren, CAR und PXR, weisen hinsichtlich ihrer Liganden eine enorme strukturellen Diversität auf. Darüber hinaus zeigen sie große Speziesunterschiede hinsichtlich der Liganden, so führen Rifampizin und Dexamethason im Menschen zur Induktion der Cyp3A4, während dies in der Ratte keine Wirkung zeigt (LeCluyse 2001). Umgekehrt bewirkt PCN nur in der Ratte die Induktion der Cyp3A-Familie, nicht aber im Menschen (Kocarek et al. 1995). Die Relevanz der humane Cyp3A4 liegt im Medikamentenstoffwechsel, der zu 50-60 % von diesem Enzym vermittelt wird, die Cyp2B trägt immerhin mit 25 % bei (Hewitt et al. 2007). Bekannte Arzneimittelinteraktionen bzw. -interferenzen gehen auf dieses CYP-Isoenzym zurück. Die Einnahme von Rifampizin und auch Johanniskraut-extrakten (Hyperforin) führte in Transplantations-Patienten zu einem starken Anstieg der Cyp3A4, wodurch die Plasmaspiegel eines verabreichten Immunsuppressivums (Cyclosporin A) aufgrund einer beschleunigten Biotransformation und Eliminierung unterhalb des therapeutischen Bereiches absanken (Moore et al. 2000 A und B; Willson und Kliever 2002). Solche Kontraindikationen wurden ebenso für eine Reihe weiterer Medikamente berichtet, z.B. für humane Kontrazeptiva. PBDE-Kongenere könnten so durch eine Cyp3A-Induktion zu einer Arzneimittel-Stoffwechsel-Interferenz führen, und zum anderen zu einer Interferenz mit endogenen Funktionen. Kürzlich konnte eine Funktion der humanen Cyp3A4 im Metabolismus und Homöostase des wichtigsten weiblichen Geschlechts-Hormons, dem Östradiol, belegt werden (Yu et al. 2005).

Die Wirkung der PBDE-Kongenere auf die Expression der Cyp2B und Cyp3A wurde in primären Ratten-Hepatozyten untersucht. Der Vorteil des Modellsystems isolierter Hepatozyten wird als besonders relevant angesehen, da diese ein komplettes Spektrum Fremdstoff-metabolisierender Enzyme und deren übergeordnete Rezeptoren in einem geordneten physiologischen Kontext aufweisen (Hewitt et al. 2007).

## 2. Ergebnisse

Wie bereits oben erwähnt, wurde am Beginn der Studie für die Experimente die Substanz BDE47 verwendet, die mit Spuren von einem bromierten Dibenzofuran kontaminiert war. Diese Experimente sind ausführlich in der Dissertation beschrieben (Markus Wahl, 2008, [www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/8265/](http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/8265/)) und auf eine Beschreibung wird an dieser Stelle verzichtet. Es werden stattdessen die mit den kontaminationsfreien Substanzen erzielten Ergebnisse dargestellt.

### 2.1 Detektion der Furan-Kontamination in der BDE47 Probe

Die anfänglich durchgeführten Experimente hatten gezeigt, dass BDE47 AhR-agonistisch und damit dioxin-artig wirkt. Allerdings wurde in der Literatur über mögliche Verunreinigungen mit bromierten Furanen und Dioxinen in technischen PBDE-Mixturen berichtet (Peters et al. 2006 B). Um die Präsenz solcher Kontaminationen in dem verwendeten BDE47 zu untersuchen, die eine dioxin-artige Wirkung erklären könnten, wurde eine zusätzliche Analyse in Auftrag gegeben. Geringste Spuren einer bromierten Furan-bzw. Dioxin-Verunreinigung können durch hochauflösende Gas-Chromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie (HRGC/HRMS) detektiert werden. Allerdings können hier bromierte Furane mit den PBDE-Kongeneren aufgrund der ähnlichen Struktur interferieren, so dass eine mehrstufige chromatographische Abtrennung und Elution potentieller bromierter Furan-Kontaminationen für deren getrennte Bestimmung nötig ist (Choi et al. 2003). Die Ergebnisse der Analyse sind in Tab. 2.1 dargestellt. Eine Verunreinigung durch bromierte Dioxine konnte ausgeschlossen werden, allerdings konnte eine geringe Kontamination mit dem bereits in den Versuchen zuvor verwendeten 2,3,7,8-Tetrabromdibenzofuran (TBDF) festgestellt werden.

Die Verunreinigung lag im Bereich 441.000 µg/kg analysiertem BDE47, bei einem nahezu identischen Molekulargewicht von 2,2',4,4'-Tetrabromdiphenylether (BDE47) entspricht die Kontamination mit TBDF ca. 0,04 % [m/m]. In einem geringeren Umfang konnte auch eine Kontamination mit 1,2,3,7,8-Pentabromdibenzofuran (0,03 % [m/m]) und mit 2,3,4,7,8-Pentabromdibenzofuran (0,03 % [m/m]) festgestellt werden. 2,3,7,8-TBDF ist ein hochpotenter AhR-Agonist und Cyp1A1-Induktor. In einer Studie wurde die Potenz der bromierten Furane *in vitro* auf die Induktion der CYP1A1-Aktivität gemessen am Umsatz des CYP1A1-Substrates EROD getestet. Die Potenz wurde mit 0,53 REP (REP basierte in diesen Studien auf dem EC<sub>50</sub> der CYP1A1-Aktivität (EROD) verglichen mit TCDD) angegeben, 1,2,3,7,8-PeBDF mit 0,17 REP und 2,3,4,7,8-PeBDF mit 0,094 REP (Behnisch et al. 2003). Die detektierten bromierten Furane sind hochpotente AhR-Agonisten und könnten die beobachteten dioxin-artigen Effekte des bisher verwendeten BDE47 erklären. Zum Vergleich wurde in den folgenden Experimenten die mehrfach hochgereinigte Substanz BDE47<sup>hg</sup> („hg“ steht für hochgereinigt) zum Vergleich verwendet, die keine solchen Kontaminationen aufwies (Korrespondenz mit Prof. Å. Bergman, Universität Stockholm, Schweden). So sollte nun im folgenden Verlauf der Arbeit geklärt werden, ob es ein residuales dioxin-artiges Potential für BDE47 *per se* bzw. im weiteren Verlauf als BDE47<sup>hg</sup> bezeichnet, gibt.

**Tab. 2.1: Detektion einer Kontamination des anfänglich verwendeten BDE47 mit TBDF durch HRGC/HRMS-Analyse.** Die Substanz wurde einer HRGC/HRMS mit vorheriger chromatographischer Abtrennung der potentiellen Kontaminanten (bromierte Furane und -dioxine) unterzogen (Eurofins Oekometric GmbH, Bayreuth). Der Gehalt an Kontaminanten der untersuchten Matrix ist in [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] der Originalsubstanz (OS) BDE47 angegeben. Ein zweites, hoch gereinigtes (hg) BDE47<sup>hg</sup> (Prof. Å. Bergman, Universität Stockholm, Schweden), in dem in Analysen (Prof. Å. Bergman, Universität Stockholm, Schweden) keine solchen Verunreinigungen festgestellt werden konnten. TBDD, Tetrabromdibenzodioxin; PBDD, Pentabromdibenzodioxin; HxBDD, Hexabromdibenzodioxin; TBDF, Tetrabromdibenzofuran; PBDF, Pentabromdibenzofuran. („nd“ = nicht detektiert)

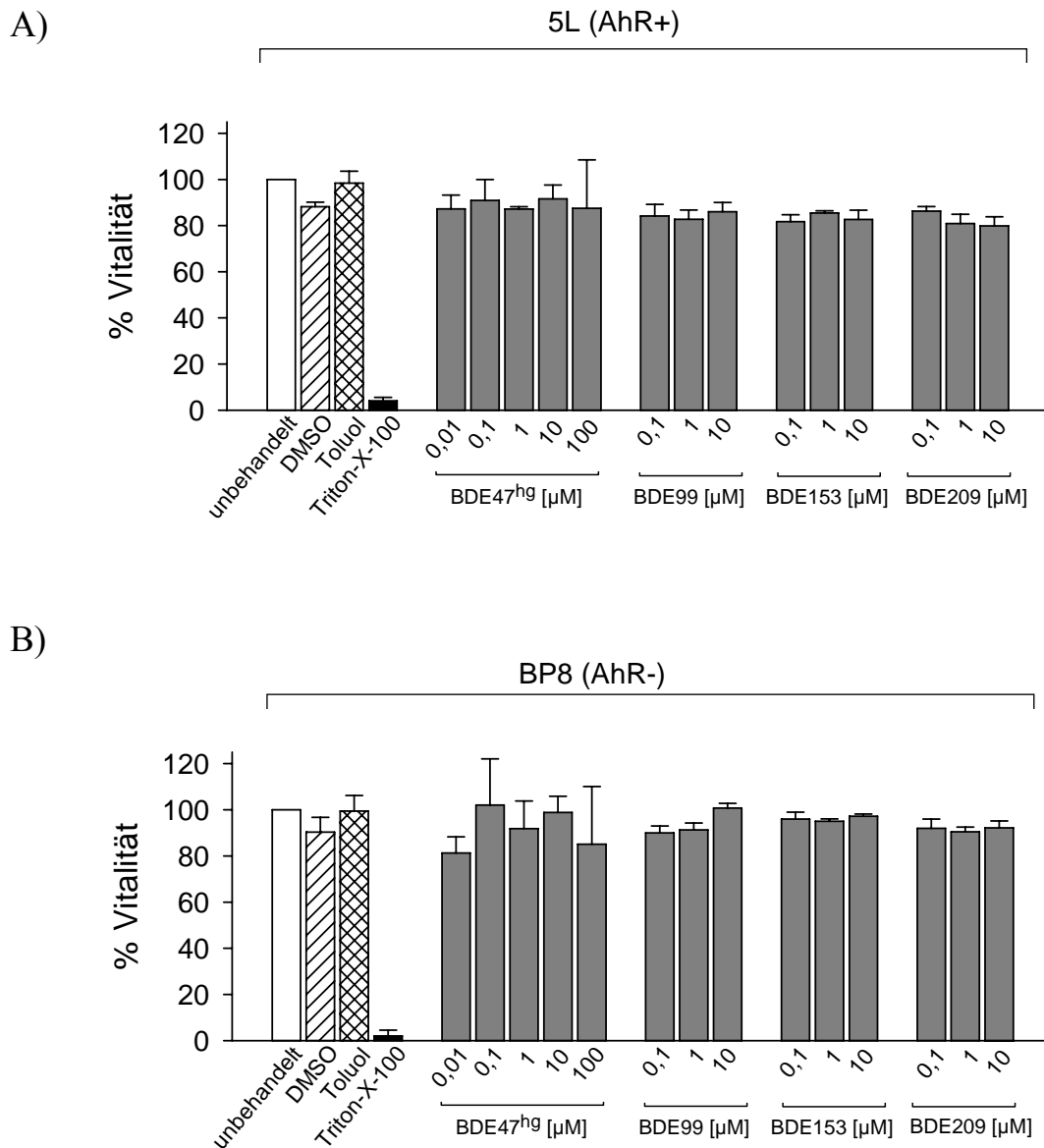
Substanz	$\mu\text{g}/\text{kg}$ OS	
	BDE47	BDE47 <sup>hg</sup>
2,3,7,8 – TBDD	89,6	nd
1,2,3,7,8 – PeBDD	< 55,7	nd
1,2,3,4,7,8 – HxBDD	< 370	nd
1,2,3,6,7,8 – HxBDD	< 370	nd
1,2,3,7,8,9 – HxBDD	< 10	nd
2,3,7,8 – TBDF	441000	nd
1,2,3,7,8 – PeBDF	300000	nd
2,3,4,7,8 – PeBDF	16800	nd

## 2.2 Zytotoxizität des BDE47<sup>hg</sup> sowie der PBDE-Kongener BDE99, BDE153 und BDE209

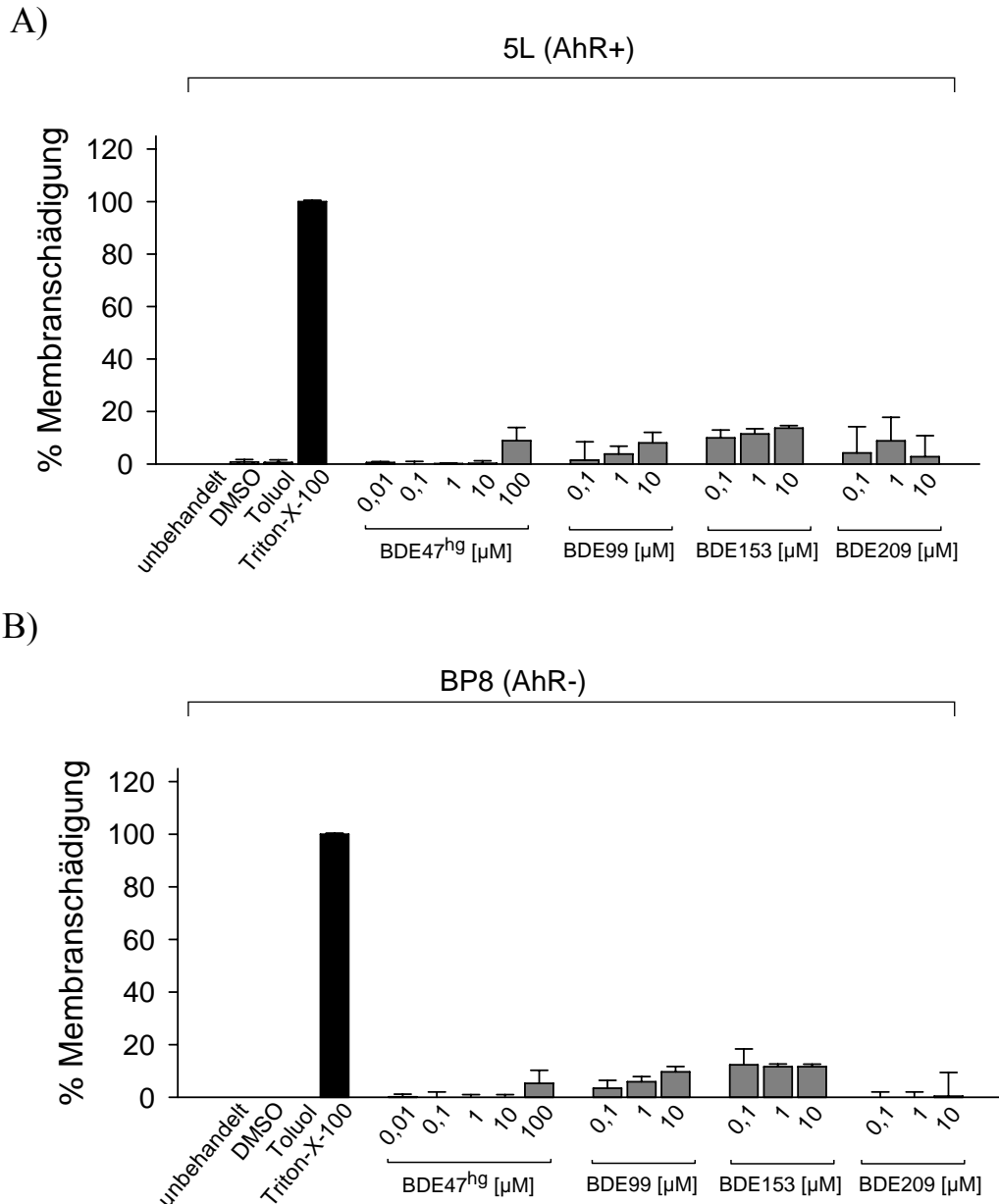
Nach der Feststellung, dass die anfänglich beobachteten dioxin-artigen Effekte des PBDE-Kongeners BDE47 möglicherweise durch eine Verunreinigung verursacht sein könnten, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit eine hochgradig, durch spezielle Säulen-Chromatographie mehrfach gereinigte BDE47<sup>hg</sup> Probe verwendet, welche freundlicherweise von Prof. Åke Bergmann (Universität Stockholm, Schweden) zur Verfügung gestellt wurde. Diese Substanzprobe wurde zunächst auf mögliche zytotoxische Effekte auf das Zellkulturmodell untersucht. Außerdem wurden drei weitere, Umwelt-relevante PBDE-Kongener, der 2,2',4,4',5-Pentabromdiphenylether (BDE99), 2,2',4,4',5,5'-Hexabromdiphenylether (BDE153) und der vollbromierte Decabromdiphenylether (BDE209) mit untersucht.

Die Untersuchung der Zytotoxizität umfasste die Vitalität, gemessen an deren mitochondrialer Stoffwechselaktivität und die Messung der Membranintegrität in 5L (AhR+)- und BP8 (AhR-)-Zellen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 2.1 und 2.2 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass unbehandelte und Lösungsmittel (DMSO und Toluol, jeweils 0,05 % [v/v])-behandelte 5L- (Abb. 2.1 A) und den AhR-defizienten BP8-Zellen (Abb. 2.1 B) keinen Rückgang des mitochondrialen Stoffwechsels zeigten. BDE47<sup>hg</sup> und die PBDE-Kongener BDE99, BDE153 und BDE209 hatten in den getesteten Konzentrationen keine Effekte auf die Vitalität der beiden Zelllinien. Es zeigte sich aber eine gesteigerte Schädigung der Zellmembran durch steigende Konzentrationen BDE47<sup>hg</sup>, BDE99 und BDE209. So wiesen nach 24 h Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  BDE47<sup>hg</sup> 9 ( $\pm 5$ ) % der 5L-Zellen eine Membran-schädigung

auf, und 5 ( $\pm$ 5) % der BP8-Zellen. Ebenso die PBDE-Kongener BDE99 (10  $\mu$ M), mit 8 ( $\pm$ 4) % der 5L-Zellen und 10 ( $\pm$ 2) % der BP8-Zellen, und BDE153, mit 14 ( $\pm$ 1) % der 5L-Zellen und 12 ( $\pm$ 1) % der BP8-Zellen. Interessanterweise nahm dieser Anstieg bei dem Decabromierten BD209 mit 3 ( $\pm$ 8) % der 5L-Zellen und 1 ( $\pm$ 9) % der BP8-Zellen wieder ab.



**Abb. 2.1: Einfluss des hochgereinigten BDE47<sup>hg</sup> und der Kongenere BDE99, BDE153 und BDE209 auf die Vitalität der Zellkultur.** Nach 24 h Inkubation mit den dem hochgereinigten PBDE-Kongener BDE47<sup>hg</sup> sowie den weiteren PBDE-Kongeneren BDE99, BDE153 und BDE209 wurde die Vitalität in (A) 5L (AhR+)-Zellen und (B) dem AhR-defizienten Subklon BP8 (AhR-) mit dem MTT-Assay ermittelt. Die Vitalität ist in % der Vitalität der Kontrollen (links nach rechts: unbehandelte Kontrollen, Lösungsmittel-Kontrollen und Positivkontrolle mit Triton-X-100 1 % [v/v]) dargestellt. Die Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen getestet, BDE47<sup>hg</sup> 10 nM bis 100  $\mu$ M, und die weiteren PBDE-Kongenere (BDE99, BDE153 und BDE209) mit jeweils 100 nM bis 10  $\mu$ M. Die Mediane und Standardabweichungen resultieren aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten.



**Abb. 2.2: Einfluss des hochgereinigten BDE47<sup>hg</sup> und BDE99, BDE153 und BDE209 auf die Membranintegrität der Zellkultur.** Nach 24 h Inkubation mit den dem hochgereinigten PBDE-Kongener BDE47<sup>hg</sup>, sowie den weiteren PBDE-Kongeneren BDE99, BDE153 und BDE209 wurde die Membranintegrität in (A) 5L (AhR+)-Zellen und (B) dem AhR-defizienten Subklon BP8 (AhR-) mit dem LDH-Assay ermittelt. Die Zytotoxizität ist als % der Membranschädigung im Vergleich zu den Kontrollen (links nach rechts: unbehandelte, Lösungsmittel-behandelte Kontrollen und Positivkontrolle mit Triton-X-100 1 % [v/v]) dargestellt. Die Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen getestet, BDE47<sup>hg</sup> 10 nM bis 100 µM, und die weiteren PBDE-Kongeneren (BDE99, BDE153 und BDE209) mit jeweils 100 nM bis 10 µM. Die Mediane und Standardabweichungen resultieren aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten.

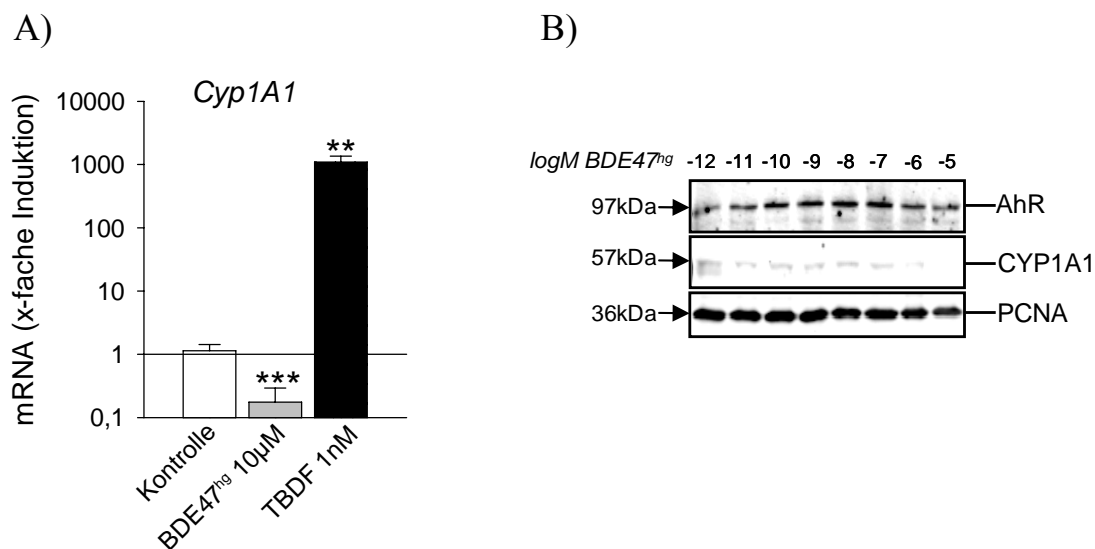
Die Ergebnisse der Zytotoxizität durch die PBDE-Kongeneren BDE47<sup>hg</sup>, BDE99, BDE153 und BDE209 zeigten keine signifikanten Effekte auf den mitochondrialen Stoffwechsel in 5L (AhR+)- und BP8 (AhR-)-Zellen. Allerdings führten steigende Mengen dieser PBDE-Kongeneren zu einem Verlust der Membranintegrität. Dieser Anstieg war AhR-



unabhängig, da er in beiden Zelllinien auftrat. Der Grad der Membranschädigung war in Bezug auf die Kontrolle Triton-X 100 relativ gering, scheint aber mit steigender Zahl der Bromsubstitution des PBDE-Kongeners zuzunehmen. BDE47<sup>hg</sup> hatte erst bei 100 µM Effekte, während die höher bromierten Kongenere (BDE99 und BDE153) schon bei 0,1-1 µM Wirkung zeigten. Das vollbromierte Kongener BDE209 scheint allerdings wieder geringer toxisch. Nach Untersuchung der Zytotoxizität sollte nun im Folgenden das AhR-agonistische Potential des hochgereinigten BDE47<sup>hg</sup> und das der weiteren PBDE-Kongenere analysiert und mit TBDF verglichen werden.

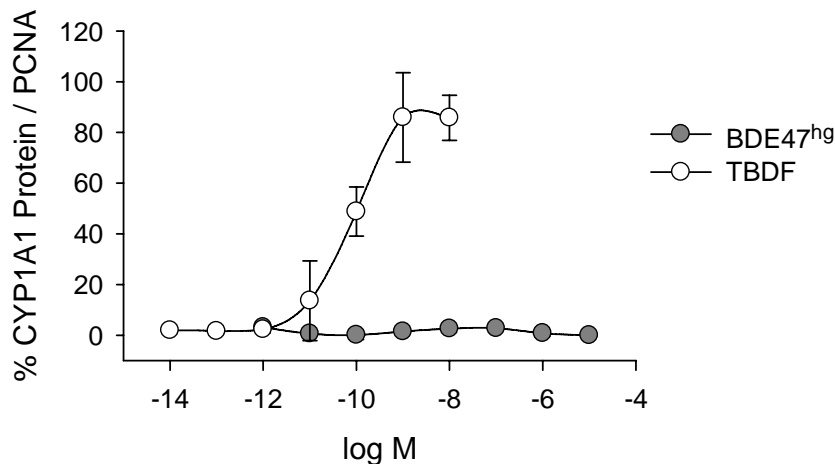
### 2.3 BDE47<sup>hg</sup> und PBDE-Kongenere: keine Induktion der Cyp1A1-Expression sondern Unterdrückung

Das verunreinigte BDE47 hatte ebenso wie die Kontaminante TBDF, die bereits in den Versuchen zuvor als Positivkontrolle mit untersucht worden war, zur Induktion des AhR-Zielgens CYP1A1 geführt. Um die Wirkung dieser mit TBDF verunreinigten Mischung BDE47 besser zu verstehen, wurde ein mögliches AhR-aktivierendes Potential des hochgereinigten BDE47<sup>hg</sup> im weiteren Verlauf analysiert. Hierzu wurde die mRNA des Zielgens Cyp1A1 nach 24 h Inkubation mit BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) detektiert, das Ergebnis ist in Abb. 2.3 A dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Cyp1A1 im Vergleich zur Kontrolle in den 5L (AhR+)-Zellen nicht induziert wird, ebenso in den AhR-defizienten BP8 (Daten nicht gezeigt). Das „saubere“ BDE47<sup>hg</sup> scheint somit kein AhR-agonistisches Potential zu besitzen. Interessanterweise tritt das Gegenteil ein, nach Inkubation mit BDE47<sup>hg</sup> ist eine signifikante Verringerung der basal vorhandenen Cyp1A1-Expression im BDE47<sup>hg</sup> Vergleich zur Kontrolle detektierbar.

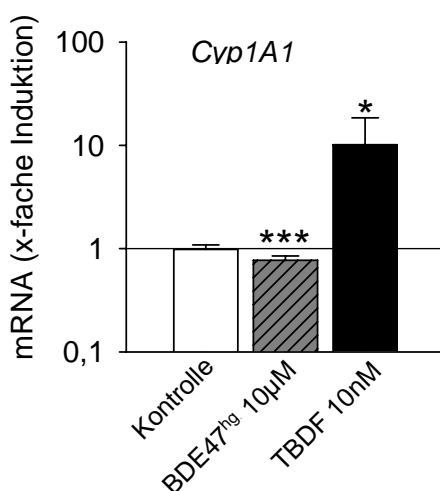


**Abb. 2.3: BDE47<sup>hg</sup> unterdrückt die basale Cyp1A1-mRNA und CYP1A1-Proteinmenge in 5L (AhR+)-Zellen.** (A) Detektion der Cyp1A1-Transkriptmengen nach 24 h Inkubation mit TBDF (1 nM) und BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) in 5L (AhR+)-Zellen. Die ermittelten Werte wurden auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle und auf die Expression des Haushaltsgens β-Aktin bezogen. Die x-fachen Induktionen sind Mediane und Standardabweichungen repräsentieren drei bis fünf unabhängige Experimente. Statistisch signifikante Änderungen der Expression sind durch Sterne gekennzeichnet (T-Test, \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,005$ ). In (B) wurden die Total-Zellextrakte (20 µg) mittels SDS-PAGE und Westernblot aufgetrennt und die Proteine AhR, CYP1A1 und PCNA mit spezifischen Antikörpern immunodetektiert. Die Proben waren zuvor mit steigenden Mengen BDE47<sup>hg</sup> (1 pM-10 µM) für 24 behandelt worden PCNA diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Westernblots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

BDE47<sup>hg</sup> führte zu einer Reprimierung der in den Zellen basal vorhandenen Cyp1A1-mRNA-Menge um ca. 82 %, die Expression betrug das 0,18 (±0,12) fache der Kontrolle. Zytotoxische Effekte können hier als Ursache weitestgehend ausgeschlossen werden, BDE47<sup>hg</sup> hatte keinen Einfluss auf die mitochondriale Stoffwechsel-Aktivität und nur geringen Einfluss auf die Membranintegrität der 5L-Zellen (Abb. 2.1 und 2.2). Diese Ergebnisse konnten auf Proteinebene verifiziert werden, auch hier hatte das BDE47<sup>hg</sup> keinen induktiven Effekt verglichen mit TBDF (Abb. 2.3 A und 2.5). Auch hier war ein leichter Rückgang der geringen basal vorhandenen CYP1A1-Proteinmengen mit steigenden BDE47<sup>hg</sup>-Konzentrationen erkennbar (Abb. 2.3 B). Weiterhin bleibt hier die AhR-Proteinmenge konstant, es kommt nicht Abnahme der AhR-Proteinmenge, die für eine Aktivierung sprechen würde.



**Abb. 2.4: Vergleich der CYP1A1-Proteinmengen nach Inkubation mit BDE47<sup>hg</sup> und TBDF in 5L (AhR+)-Zellen.** 5L-Zellen wurden 24 h mit logarithmisch steigenden Konzentrationen (log M = Molarität) an TBDF und BDE47<sup>hg</sup> inkubiert. Das Diagramm zeigt die densitometrische Analyse der CYP1A1-Proteinbanden nach Analyse der Total-Zellextrakte durch Westernblot und CYP1A1-Immudetektion. Die Werte der Konzentrationsabhängigkeit sind auf die Expression von PCNA innerhalb jeder Probe normalisiert. Die dargestellten Mediane und Standardabweichungen resultieren aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten.

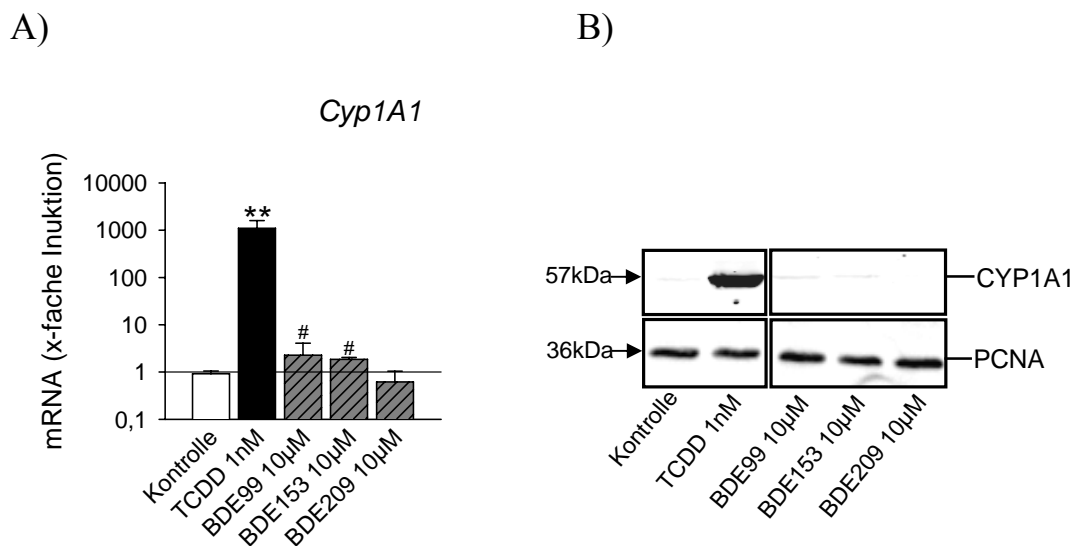


**Abb. 2.5: BDE47<sup>hg</sup> reprimiert die basale Cyp1A1-mRNA-Expression auch in primären Ratten-Hepatozyten.** BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) und als Positivkontrolle TBDF (1 nM) wurden für 72 h in primären Ratten-Hepatozyten inkubiert. Anschließend wurde die gesamte RNA isoliert und darauf basierend cDNA synthetisiert, welche für die qPCR eingesetzt wurde. Die Expression der Cyp1A1-mRNA wurde mit spezifischen Primern detektiert und ist als x-fache Steigerung der Expression gegenüber der Kontrolle dargestellt. Statistisch signifikante Änderungen der Expression sind durch Sterne indiziert (T-Test, \* p ≤ 0,05; \*\*\* p ≤ 0,001).

Eine signifikante Unterdrückung der basalen Expression der Cyp1A1 konnte auch in primären Ratten-Hepatozyten beobachtet werden (Abb. 2.5). Hier führte BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) nach 72 h zu einer signifikanten Reduktion der basalen Cyp1A1 um ca. 23 %, die Cyp1A1-Transkriptmenge betrug gegenüber der Kontrolle nur noch das 0,77 (±0,08) fache der Kontrolle. Das hochgereinigte PBDE-Kongener BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) hatte auch in den humanen HepG2-Zellen keine Induktion der Cyp1A1 zur Folge (Daten nicht gezeigt). Vielmehr führte BDE47<sup>hg</sup> zur Unterdrückung der basal vorhandenen Cyp1A1-Transkript- und -Proteinmenge in 5L- und primären Hepatozyten der Ratte. BDE47 ist das in der Umwelt dominierende PBDE-Kongener, und es konnte bislang in den Versuchen gezeigt werden, dass es keine AhR-agonistische, sondern eine AhR-abhängige Unterdrückung der basalen Cyp1A1-Induktion verursachte. Im weiteren Verlauf sollten nun die ebenfalls Umwelt-relevanten PBDE-Kongener BDE99, BDE153 und BDE209 auf ein AhR-agonistisches oder Cyp1A1-unterdrückendes Potential untersucht werden.

## 2.4 Die PBDE-Kongener BDE99, BDE153 und BDE209 induzieren nicht die Cyp1A1-Expression

Zur Untersuchung eines induzierenden oder unterdrückenden Potentials der PBDE-Kongener BDE99, BDE153 und BDE209 wurden diese in 5L (AhR+)-Zellen für 24 h inkubiert und anschließend die Expression von Cyp1A1-mRNA und -Protein detektiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.6 dargestellt und belegen eindeutig, dass die PBDE-Kongener BDE99, BDE153 und BDE209 ebenso wie das hochgereinigte BDE47<sup>hg</sup> (Abb. 2.5) nicht zur

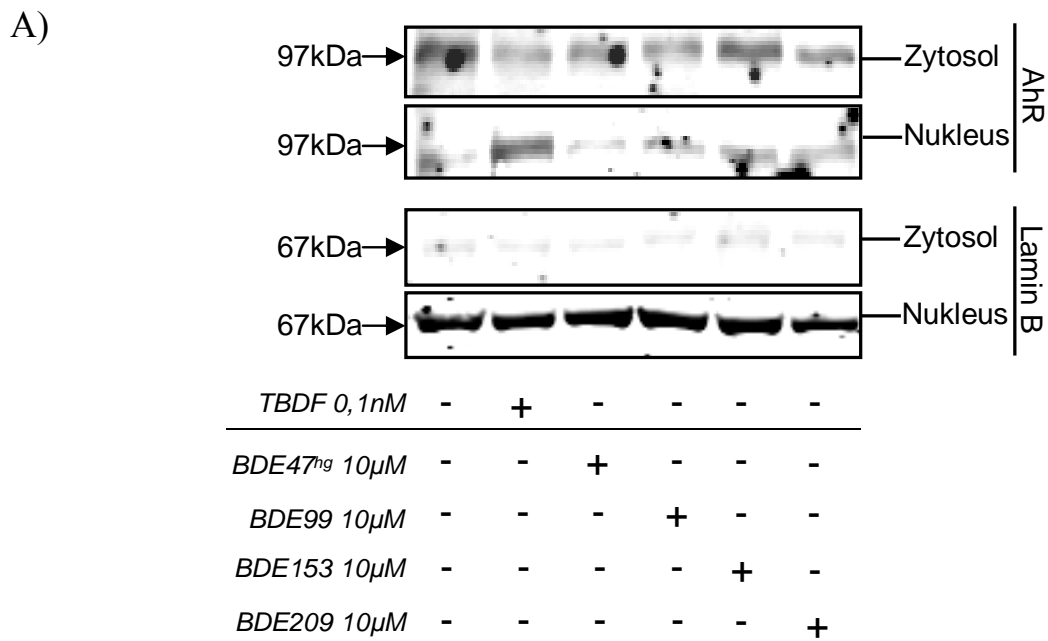


**Abb. 2.6: BDE99, BDE153 und BDE209 induzieren keine Cyp1A1 Expression in 5L (AhR+)-Zellen.** (A) BDE99, BDE153 und BDE209 (10 µM) und TCDD als Vergleich (1 nM) wurden für 24 h in 5L-Zellen inkubiert. Die Expression der Cyp1A1-mRNA wurde mit spezifischen Primern detektiert und ist als x-fache Steigerung der Expression gegenüber der Kontrolle dargestellt. Statistisch signifikante Änderungen der Expression sind durch Sterne indiziert (T-Test, \*\*  $p \leq 0,01$ ). Nicht signifikante Änderungen der Expression sind durch eine Raute indiziert. (B) zeigt einen repräsentativen Westernblot aus drei unabhängigen Experimenten. Die Inkubation der 5L-Zellen erfolgte wie unter (A) beschrieben, die Gesamt-Proteinextrakte (20 µg) wurden nach SDS-PAGE und Westernblot mit einem spezifischen Antikörper auf die Expression der CYP1A1 untersucht, PCNA dient als Ladekontrolle.

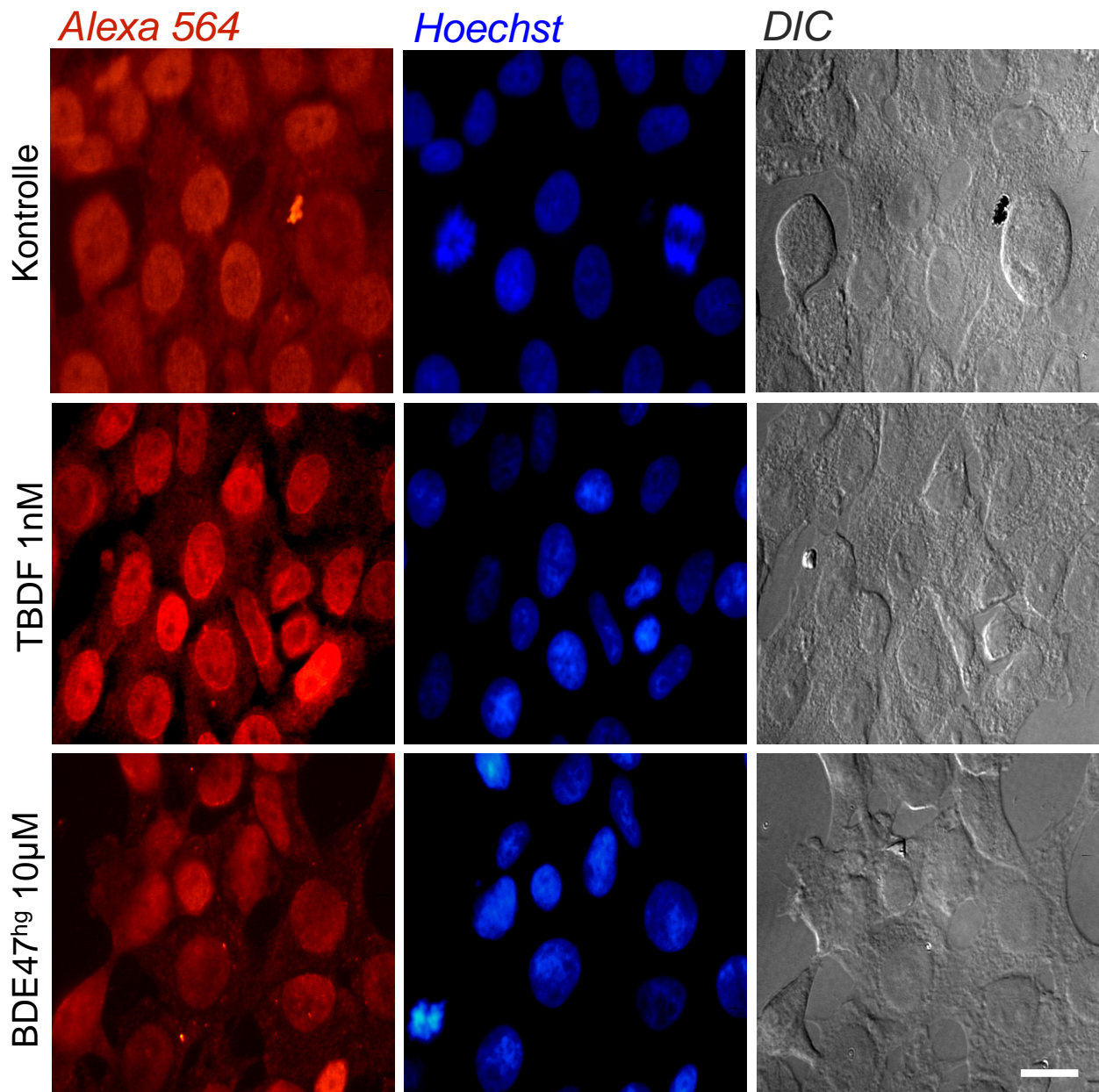
Induktion von Cyp1A1-mRNA und CYP1A1-Protein führen (Abb. 2.6 A und B). Die zuvor für das BDE47<sup>hg</sup> beobachtete Reprimierung der basalen Cyp1A1 Expression konnte für die PBDE-Kongeneren nicht beobachtet werden. Die Induktion des AhR-Zielgens Cyp1A1 durch die getesteten PBDE-Kongeneren konnte ausgeschlossen werden, wie bereits durch Peters und Kollegen in der Literatur beschrieben, die ein Cyp1A1-antagonistisches Potential für BDE47 und BDE99 beobachtet hatten (Peters et al. 2006 A). In dieser Arbeit war der AhR nach Behandlung mit BDE99 im Zellkern detektierbar. Anhand der Detektion des endogenen AhRs sollte nun festgestellt werden, ob PBDE-Kongeneren zur Translokation des AhRs führen.

## 2.5 BDE47<sup>hg</sup>, BDE99, BDE153 und BDE209 führen nicht zur Translokation des AhRs

Das verunreinigte BDE47 und die Kontaminante TBDF hatten nach 1 h Inkubation zur Translokation des endogenen AhRs in 5L-Zellen geführt. Dies konnte durch Immunfärbung und Immundetektion des AhRs in den getrennten Zytosol- und Zellkernfraktionen nachgewiesen werden. Anhand dieser Methodik sollte nun eine mögliche Translokation des endogenen AhRs nach Behandlung mit PBDE-Kongeneren untersucht werden. Abb. 2.7 A zeigt die separierten Zellfraktionen Zytosol und Zellkern (Nukleus). Die Kontrolle zeigt den inaktiven AhR, der wie erwartet im Zytosol lokalisiert war, und kaum im Nukleus detektierbar. Bereits geringe Konzentrationen an TBDF (0,1 nM) führten aber schon zur Translokation und Detektion des AhRs im Nukleus. Die PBDE-Kongeneren BDE47<sup>hg</sup>, BDE99, BDE153 und BDE209 führten nicht zur Translokation des endogenen AhRs in 5L (AhR+)-Zellen, es war keine signifikant gesteigerte Lokalisation des AhRs im Nukleus festzustellen.



B)



**Abb. 2.7: Die PBDE-Kongenere führen nicht zur Translokation des endogenen AhRs in 5L (AhR+)-Zellen.** (A) 5L-Zellen wurden mit BDE47<sup>hg</sup>, BDE99, BDE153 und BDE209 (10 µM) für 1 h inkubiert und anschließend die Zytosol- und Kern (Nukleus)-Fraktion separat aufgearbeitet. Die Zytosol- und Kern-Lysate wurden mit SDS-PAGE und Westerblot aufgetrennt (20 µg Protein) und die Lokalisation des AhRs und Lamin B (Ladekontrolle und Erfolgskontrolle der Fraktionierung) mit spezifischen Antikörpern detektiert. (B) Die Zellen waren zuvor für 1 h mit TBDF (1 nM) und BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) behandelt worden. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt, zusätzlich sind die Hellfeld-Aufnahmen mit differentiellem Interferenz-Kontrast (DIC) der ganzen Zellen gezeigt. Die Bilder wurden mit 630 x Vergrößerung aufgenommen und sind repräsentativ für drei unabhängige Immunfärbungen. Die Bilder entstanden im Axiovert-100 von Zeiss und der Maßstab im rechten Bild (DIC) markiert 10 µm. Die Darstellungen repräsentieren jeweils drei unabhängige Experimente.

Peters und Kollegen (2006 A) hatten die Translokation des AhRs nach Behandlung mit BDE99 (10  $\mu$ M) gezeigt, das BDE99 zur Bindung des AhRs an seine spezifische Promotor-Region in der DNA führen kann. Dies würde eine Translokation des Rezeptors voraussetzen, die in den vorliegenden Versuchen nicht festgestellt werden konnte. Interessanterweise führten die PBDE-Kongenere zu einer scheinbar geringeren detektierbaren AhR-Proteinmenge im Zytosol, nicht aber zu einem Anstieg des AhRs im Nukleus (Abb. 2.7 A und B). Die Behandlung mit BDE47<sup>hg</sup> (10  $\mu$ M) führte zu einer Unterdrückung des basalen Cyp1A1-Expressions-Niveaus (Abb. 2.3), trotzdem konnte auch anhand der Immunfärbung keine Translokation des AhRs, wie von Peters und Kollegen für BDE99 beobachtet (Peters et al. 2006 A) festgestellt werden. Die Immunfärbung des AhRs zeigte nur nach TBDF Behandlung (1 nM) die Translokation des AhRs in den Zellkern (dargestellt durch blaue DAPI-Färbung) verglichen mit der Kontrolle, erkennbar an einer Zunahme der Helligkeit der Färbung im Zellkern und einer leichten Abnahme der Detektion im Zytosol.

BDE47<sup>hg</sup>, BDE99, BDE153 und BDE209 führten nicht zur Aktivierung des AhRs und zur Induktion des Zielgens Cyp1A1. Allerdings konnte eine Verminderung der basal exprimierten Cyp1A1-mRNA und -Proteins nach Behandlung mit BDE47<sup>hg</sup> festgestellt werden. Die durch BDE47<sup>hg</sup> verursachte Cyp1A1 Unterrückung kann aber nicht durch eine transkriptionelle Verminderung der Expression bedingt sein, da es nicht zur Translokation des AhRs in den Zellkern kommt. Aufgrund dieses für BDE47<sup>hg</sup> speziell beobachteten Effektes und seiner Relevanz als dominierende Kontaminante in Umwelt und Mensch wurden die genomweite Gen-Expression nach Inkubation für 24 h analysiert.

## 2.6 Genomweite Genexpressions-Analyse nach BDE47<sup>hg</sup>-Inkubation

Das mit TBDF verunreinigte BDE47 und die Kontaminante TBDF selbst hatten nach Inkubation in 5L (AhR+)-Zellen für 24 h ein dioxin-artiges Genexpressions-Muster induziert. Hier wurde die hochgereinigte Substanz BDE47<sup>hg</sup> allein analysiert und mit TBDF verglichen. Die Tab. 2.2 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. Das hochgereinigte BDE47<sup>hg</sup> zeigte ein von TBDF unterschiedliches, eindeutig nicht dioxin-artiges Genexpressions-Profil. BDE47<sup>hg</sup> führt nicht zur Induktion, sondern zur Reprimierung der basalen Cyp1A1-Transkriptmenge, auf das 0,2-0,1 fache der Kontrolle und ebenso zu einer signifikanten Verminderung der Gst2A Expression (0,3-0,9 fach). Weiterhin ist zu erkennen, dass keines der AhR-typischen Zielgene in der für TBDF bzw. für das verunreinigte BDE47 beobachteten Höhe induziert wurde. Es waren keine gesteigerten Transkriptmengen der mit dem Fremdstoffmetabolismus assoziierten Gene Cyp1B1, Adh3, Nqo1 detektierbar. Die Expression der Ugt1A6 war nicht detektierbar. Interessanterweise waren die Expression der Cyp3A13 und die Expression der Cyp4B1 durch BDE47<sup>hg</sup> jeweils 2,5 fach und 3,5-4 fach gegenüber der Kontrolle erhöht, was nicht für das verunreinigte BDE47 und TBDF zu beobachten war. Diese Gene könnten somit spezifische durch BDE47<sup>hg</sup> verursachte differentielle Regulation sein.

**Tab. 2.2:** Globale Genexpressions-Analysen in 5L (AhR+)-Zellen nach BDE47<sup>hg</sup> Inkubation. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 24 h mit BDE47<sup>hg</sup> (100 µM) und DMSO (0,05 %) als Lösungsmittel-Kontrolle. Nach der Inkubation wurden die gesamte RNA isoliert, prozessiert und mit einem Affymetrix-Microarray-Chip hybridisiert (GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array) und ausgewertet. Die Regulation der Genexpressionen ist als x-fache Änderung der Expression in der behandelten Probe über die Expression der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle dargestellt. Jede CHIP-Analyse repräsentiert einen Pool aus vier unabhängigen Experimenten. Zur Darstellung wurden nur signifikant regulierte Gene ausgewählt. Die Abkürzung nd steht für „nicht detektiert“.

Affymetrix ID	Gen Symbol	Gen Name	BDE47 <sup>hg</sup>		TBDF	
			Chip1	Chip2	Chip1	Chip2
<i>Metabolismus (Xenobiotika)</i>						
1370269_at	<i>Cyp1a1</i>	Cytochrom-P450-Monooxygenase 1A1	0.2	0.1	12.1	27.9
1368990_at	<i>Cyp1b1</i>	Cytochrom-P450-Monooxygenase 1B1	1.6	0.9	29.9	39.4
1368608_at	<i>Cyp2f2</i>	Cytochrom-P450-Monooxygenase 2F2	1.0	0.8	13.0	21.1
1370387_at	<i>Cyp3a13</i>	Cytochrom-P450-Monooxygenase 3A13	2.5	2.5	0.9	0.7
1370399_at	<i>Cyp4b1</i>	Cytochrom-P450-Monooxygenase 4B1	4.0	3.7	1.4	nd
1368180_s_at	<i>Gsta2</i>	Glutathion-S-Transferase A2	1.5	2.8	147.0	97.0
1368130_at	<i>Aldh3a1</i>	Aldehyd-Dehydrogenase 3A1	0.3	0.9	16.0	27.9
1368365_at	<i>Aldh3a2</i>	Aldehyd-Dehydrogenase 3A2	1.0	0.9	2.3	2.1
1369072_at	<i>Adh7</i>	Alkohol-Dehydrogenase 7	1.5	0.8	6.1	4.3
1387759_s_at	<i>Ugt1a6</i>	UDP-Glykosyltransferase 1A6	nd	nd	2.6	3.2
1387599_a_at	<i>Nqo1</i>	NAD(P)H-Chinon-Dehydrogenase 1	1.0	1.5	2.5	2.8
<i>Entzündung</i>						
1368128_at	<i>Pla2g2a</i>	Phospholipase A2, Gruppe IIA	1.1	0.8	588.1	362.0
1368527_at	<i>Cox2</i>	Cyclooxygenase 2	1.1	0.6	34.3	39.4
1368014_at	<i>Ptges</i>	Prostaglandin-E-Synthase	0.8	0.4	16.0	16.0
1369814_at	<i>Ccl20</i>	Chemokin-(CC-Motif)-Ligand 20	1.6	2.1	16.0	17.1
1367940_at	<i>Cmkor1</i>	Chemokin-Orphan-Rezeptor 1	1.0	2.8	11.3	12.1
<i>AhR Signalweg</i>						
1380746_at	<i>AhRR</i>	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Repressor	0.9	1.0	16.0	21.1
1368885_at	<i>Entpd1</i>	Ectonukleoside-Triphosphat-Diphosphohydrolase 1	7.5	2.1	13.0	13.9
1385407_at	<i>Tiparp</i>	TCDD-induzierbare Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase	nd	nd	6.1	7.5
1369788_s_at	<i>Jun</i>	Jun-Onkogen	0.9	0.9	2.1	2.0
1368519_at	<i>Serpine1</i>	Serin-Peptidase-Inhibitor E1	0.8	0.4	9.8	12.1
<i>Zellzyklus und DNA-Synthese</i>						
1387391_at	<i>Cdkn1a</i>	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1A (p21, Cip1)	1.3	1.4	2.6	2.8
1369192_at	<i>Cdkn1b</i>	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1B (p27, Kip1)	nd	nd	1.1	2.0
1368947_at	<i>Gadd45a</i>	"Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha"	2.6	2.6	0.8	0.8
1372186_a_at	<i>Top2a</i>	Topoisomerase-(DNA) 2 alpha	0.4	0.5	0.2	0.2
1370346_at	<i>Ccnb1</i>	Cyclin B1	0.6	0.5	0.2	0.2
1379582_a_at	<i>Ccna2</i>	Cyclin A2	0.6	0.4	0.2	0.2
1368260_at	<i>Aurkb</i>	Aurora-Kinase B	0.6	0.4	0.3	0.3
<i>DNA Reparatur</i>						
1387540_at	<i>Brca1</i>	"Breast cancer 1"	0.5	0.7	0.5	0.5
1368324_at	<i>Brca2</i>	"Breast cancer 2"	0.7	0.9	0.4	0.4
1368777_at	<i>Bard1</i>	BRCA1-assoziierte RING Domäne 1	0.5	0.5	0.4	0.3
1383578_at	<i>Rad51</i>	Rad51-Homolog	0.3	0.4	0.3	0.2
<i>Verschiedene</i>						
1385722_at	<i>Sim2</i>	Single-minded 2 Homolog	1.4	nd	22.6	42.2
1370540_at	<i>Nr1d2</i>	nukleärer Rezeptor 1D2	nd	nd	nd	1.9
1376362_at	<i>Nptxr</i>	neuronaler Pentraxin-Rezeptor	0.8	0.8	4.6	5.7
1367782_at	<i>Cox6a2</i>	Cytochrom-C-Oxidase 6A2	73.5	97.0	nd	nd
1368648_at	<i>Cox4i2</i>	Cytochrom-C-Oxidase 4 Isoform 2	0.1	0.3	0.4	nd
1371762_at	<i>Rbp4</i>	Retinol-Binde-Protein 4	0.8	1.1	16.0	16.0
1369909_s_at	<i>Tm6p1</i>	Fasten-induzierbares integrales Membran-Protein	4.0	2.5	6.1	7.0

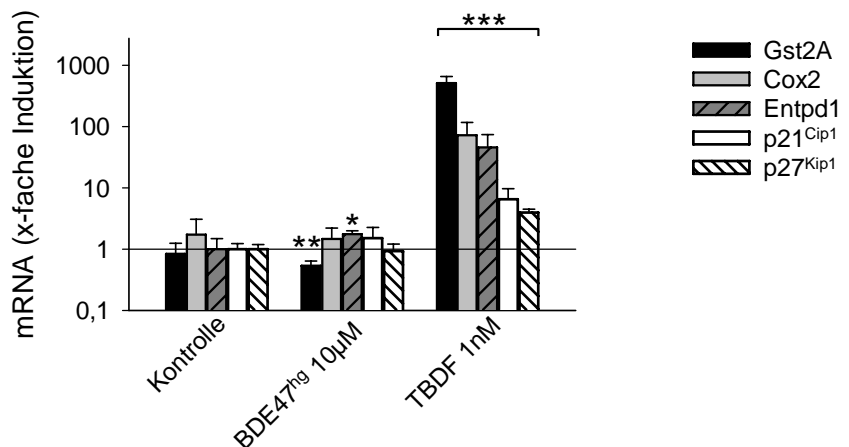
BDE47<sup>hg</sup> hatte auch keinen Einfluss auf die für TBDF beobachtete Steigerung der Expression Entzündungs-relevanter Gene, etwa der Cox2 oder der Pla2g2a. Interessanterweise war ein AhR-Zielgen, Entpd1, 2,1-7,5 fach gegenüber der Kontrolle erhöht exprimiert. Die stärkste Regulation zeigte eine Komponente der Atmungskette, die Cytochrome C-Oxidase Untereinheit 6A1 (Cox6A1), welche exklusiv durch BDE47<sup>hg</sup> stark hochreguliert wurde (73,5-97 fach gegenüber der Kontrolle). Die transkriptionelle Regulation der Cox6A1 konnte im Gehirn und der Leber von Ratten detektiert werden und änderte sich mit dem Energieverbrauch der Zellen (Ongwijitwat und Wong-Riley 2004). Weiterhin war die Expression des Fasten-induzierbaren integralen Membranproteins Tmp6 erhöht (2,5-4 fach gegenüber der Kontrolle). Eine ebenfalls erhöhte Expression des Tmp6 konnte nach Fasten in der Rattenleber beobachtet werden, die Rolle liegt vermutlich im Fasten-induzierten Katabolismus (Zhang et al. 2000). Die Cytochrome C-Oxidase Unter-einheit 4-2 (Cox4i2) wurde, wie für TBDF und BDE47 beobachtet, vermindert exprimiert. Die Expression des nukleären Orphan-Rezeptors RevErb $\beta$  und des Sim2-Homologs waren nicht detektierbar. Für die Proliferation und den Zellzyklus relevante Gene waren im Vergleich zur Kontrolle leicht vermindert exprimiert, ebenso wie für TBDF beobachtet. Ob diese Regulation zu einer Beeinflussung des Wachstums in 5L-Zellen führt, sollte im weiteren Verlauf untersucht werden. Im Folgenden wurde die Expression der Gene Gst2A, Cox2, Pla2g2A, p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> in einem unabhängigen Ansatz mittels qPCR und teilweise auf Proteinebene verifiziert.

BDE47<sup>hg</sup> steigerte exklusiv die Expression der Enzyme Cytochrom-P450-Monooxygenasen 3A13 (Cyp3A13) und 4B1 (Cyp4B1), TBDF hatte hier keine Effekte. Besonders interessant ist hier die Regulation der Cyp3A13, welche zusammen mit Cyp3A1 und Cyp3A3 zur Cyp3A-Familie zählen und Homologe der humanen Cyp3A4 sind. Die Bedeutung der humanen Cyp3A4 liegt in der Funktion im Metabolismus von Pharmaka. Sie vermittelt die Biotransformation von ca. 50 % aller Arzneimittel (Willson und Kliewer 2002). Die Induktion der Cyp3A-Familie als ein potentielles Ziel des hochgereinigten BDE47<sup>hg</sup> und eventuell weiterer PBDE-Kongener wurde im Folgenden untersucht und verifiziert.

## 2.7 Verifizierung der Regulation von AhR-Zielgenen durch BDE47<sup>hg</sup>

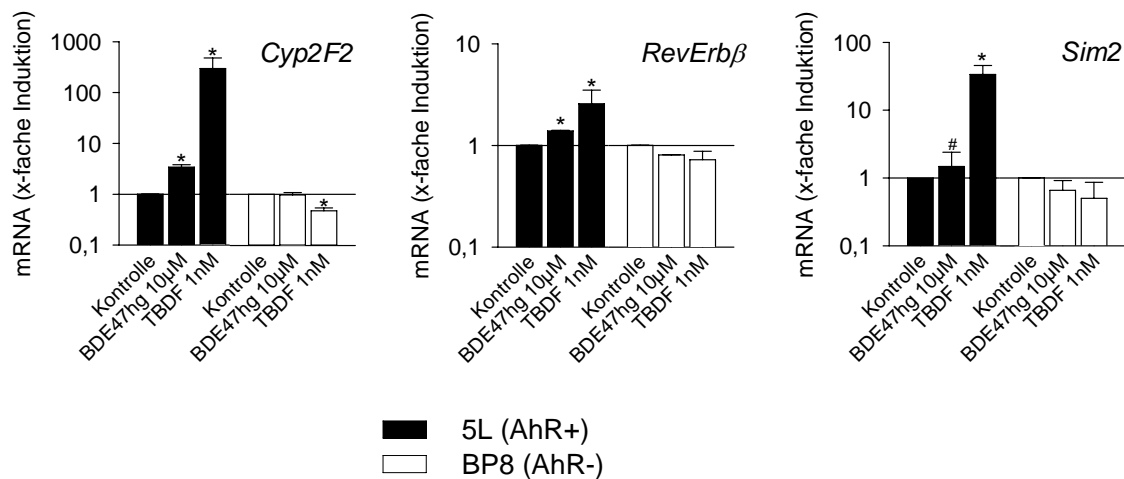
Die Ergebnisse der Microarray-Analysen wurden mit einer unabhängige Methode, der qPCR, verifiziert. BDE47<sup>hg</sup> hatte zu keiner Regulation der AhR-Zielgene Cox2, p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> geführt (Tab. 2.2), was bestätigt werden konnte (Abb. 2.8). TBDF wurde hier als Positivkontrolle dargestellt.

**Abb. 2.8: BDE47<sup>hg</sup> führt zu Expressions-Änderungen der AhR-Zielgene Gst2A und Entpd1.** BDE47<sup>hg</sup> (10  $\mu$ M) wurde für 24 h in 5L (AhR+)-Zellen inkubiert. Die dargestellten Ergebnisse sind auf die Kontrolle bezogen und auf die Expression von  $\beta$ -Aktin innerhalb jeder Probe normalisiert, welches keine Schwankungen aufwies. Die Lösungsmittel (DMSO und Toluol, jeweils 0,05 % [v/v]) hatten keinen Einfluss auf die Expressionen. Die Mediane und Standardabweichungen resultieren aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Änderungen der Expression sind durch Sterne gekennzeichnet (T-Test, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,005$ ).





Wie zuvor für das AhR-Zielgen Cyp1A1 beobachtet, führt die Inkubation mit BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) nach 24 h zu einer signifikant verminderten Expression der Gsta2A in 5L (AhR+)-Zellen um das 0,57 (±0,1) fache der Kontrolle, was einer Reduktion um 43 % entspricht. Interessanterweise war die Expression des AhR-Zielgens Entpd1 um das 1,8 (±0,2) fache der Kontrolle gering, aber signifikant erhöht, TBDF führte aber im Vergleich zu einer 46 (±28) fachen Induktion.

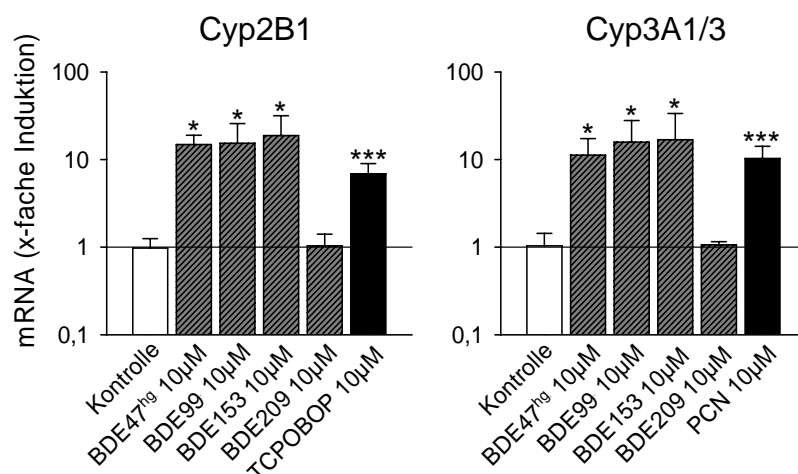


**Abb. 2.9: BDE47<sup>hg</sup> führt zu einer geringen mRNA-Induktion der Cyp2F2 und von RevErbβ in 5L (AhR+)-Zellen.** BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) wurde für 24 h in 5L (AhR+)-Zellen inkubiert. Die dargestellten Ergebnisse sind auf die Kontrolle bezogen und auf die Expression von β-Aktin innerhalb jeder Probe normalisiert, welches keine Schwankungen aufwies. Die Lösungsmittel (DMSO und Toluol, jeweils 0,05 % [v/v]) hatten keinen Einfluss auf die Expressionen. Die Mediane und Standardabweichungen repräsentieren drei bis fünf unabhängige Experimente. Statistisch signifikante Änderungen der Expression sind durch Sterne gekennzeichnet (T-Test, \*  $p \leq 0,05$ , # nicht-signifikant).

BDE47<sup>hg</sup> führte bislang nur zur Regulation von zwei AhR-Zielgenen, zur Reprimierung der basalen Gsta2A-Expression und zur Induktion der Entpd1-Expression. Nun wurde auch untersucht, inwiefern die PBDE-Kongenerere BDE99, BDE153 und BDE209 im Vergleich zur Referenzsubstanz TCDD Effekte auf die Expression der AhR-Zielgene haben. Die Ergebnisse (nicht gezeigt) machten deutlich, dass Gsta2A, Pla2g2a, Cox2, p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und CcnA2 eindeutig durch TCDD differentiell reguliert wurden, die PBDE-Kongenerere BDE99, BDE153 und BDE209 (alle 10 µM) hatten jedoch keinen signifikanten Einfluss. Auch auf Proteinebene konnte kein Einfluss von PBDE-Kongeneren auf die getesteten Proteinnengen von COX2 und p27<sup>Kip1</sup> festgestellt werden. BDE47<sup>hg</sup> führte dahingegen zu einer geringen, aber signifikanten Steigerung der Expression der Cyp2F2 und des Transkriptionsfaktors RevErbβ, sowie eine nicht-signifikante Erhöhung der Sim2 Transkriptmenge (Abb. 2.9), obwohl diese Regulationen in den Microarray-Analysen nicht angezeigt waren. Bei den Regulationen von Entpd1, Cyp2F2 und RevErbβ könnte es sich um für die verunreinigte Mischung BDE47, die Reinsubstanz BDE47<sup>hg</sup> und TBDF gemeinsame Effekte handeln, wenn auch die Expression durch die Reinsubstanz BDE47<sup>hg</sup> erheblich schwächer ausfällt als durch TBDF alleine. In weiteren Experimenten sollte nun die Expression von Genen, der Cyp2B- und Cyp3A-Familie untersucht werden, die aufgrund einer generell schlechteren Induzierbarkeit in etablierten Zellkulturen in primären Hepatozyten untersucht wurden (Hewitt et al. 2007).

## 2.8 Regulation der Cyp2B1 und Cyp3A1/3 Gene durch PBDEs in primären Ratten-Hepatozyten

Die verwendete Zellkultur der 5L (AhR+)-Hepatomzellen hatte in der genomweiten Genexpressions-Analyse eine starke Induzierbarkeit der AhR-Genbatterie gezeigt, wohingegen die Expression weiterer für den Fremdstoffmetabolismus relevanter Enzyme ausblieb, die beobachtete Expression der Cyp3A13 konnte nicht verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Für primäre humane Hepatozyten ist bekannt, dass diese eine Vielzahl von Leberfunktionen aufweisen, welche in etablierten Zellkulturen, z.B. HepG2, nicht mehr gegeben sind (Guillouzo et al. 2007). Aus diesem Grund wurde eine mögliche Induktion von Vertretern der Cyp2B und Cyp3A Familie durch PBDE-Kongenere in primären Hepatozyten der Ratte untersucht. Eine CAR- und PXR-abhängige Induktion der Cyp2- und Cyp3A-Familie *in vivo* wurde in der Literatur bereits berichtet (Sanders et al. 2005; Pacyniak et al. 2007). Die Induktion der Cyp2B und Cyp3A konnte in eigenen Experimenten mit primären Ratten-Hepatozyten bestätigt werden (Abb. 2.10).



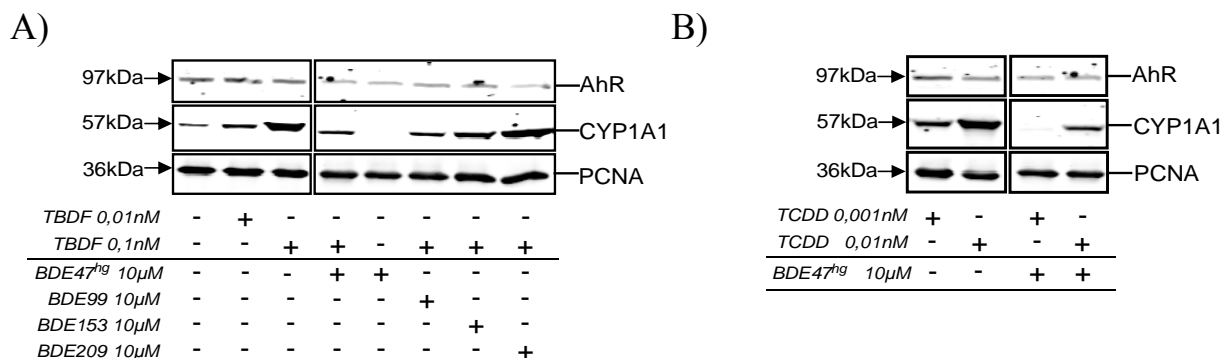
**Abb. 2.10: BDE47<sup>hg</sup> sowie BDE99 und BDE153 induzieren Cyp2B1- und Cyp3A1/3-mRNA in primären Ratten-Hepatozyten.** Nach 72 h Inkubation mit TCPOBOP (10 µM) als Positiv-Kontrolle der Cyp2B1-Induktion, und PCN (10 µM) für die Cyp3A1/3-Induktion wurde die gesamte RNA extrahiert. Die Transkriptmengen wurden mittels quantitativer real-time PCR (qPCR). Die ermittelten Werte wurden auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle und auf die Expression des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin bezogen (x-fache Induktion), das keine Regulation durch die Substanzen zeigte. Statistisch signifikante Änderung und Standardabweichungen resultieren aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten und sind durch Sterne gekennzeichnet (T-Test, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,005$ ).

In Abb. 2.10 ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit der Positivkontrolle TCPOBOP (10 µM) zu einer signifikanten Induktion der Cyp2B1 nach 72 h führt (Abb. 2.10, linke Bildhälfte), gleichermaßen wird durch Behandlung mit der Positivkontrolle PCN (10 µM) die Expression der Cyp3A1/3 induziert. Auch die PBDE-Kongener BDE47, BDE99 und BDE153 führten zu einer signifikanten Expression der Cyp2B1 und Cyp3A1/3 in primären Ratten-Hepatozyten, das vollständig bromierte BDE209 führt dahingegen zu keiner Induktion. In diesem Versuch wurde die Expression der Cyp3A1 und Cyp3A3 gemeinsam untersucht, beide wurden durch das verwendete Primerpaar erkannt und sind auf Nukleotidebene zu 97 % identisch. Zusammen mit der Cyp3A13, welche auf dem Microarray repräsentiert ist, gehören

sie zur Cyp3A-Familie und sind Homologe der humanen Cyp3A4 (Germer et al. 2006). BDE47, BDE99 und BDE153 sind auch *in vivo* Induktoren der Cyp2- und Cyp3A-Familie (Sanders et al. 2005). Auch in den primären Ratten-Hepatozyten hatten die PBDE-Kongeneren nicht zu einer signifikanten Induktion der Cyp1A1 geführt, sondern vielmehr zu einer Verminderung der basal vorhandenen Transkriptmengen (Abb. 2.5), dieser Antagonismus sollte nun im Folgenden weiter untersucht werden.

## 2.9 BDE47<sup>hg</sup> und BDE99 unterdrücken die TBDF- und TCDD-induzierte CYP1A1-Proteinmenge

Die bisherigen Ergebnisse hatten gezeigt, dass die basal vorhandene Expression der Cyp1A1 und auch der Gst2A durch BDE47<sup>hg</sup> unterdrückt wird. Die Relevanz dieser Beobachtung liegt in der physiologischen Funktion des AhRs in der Proliferation und Differenzierung sowie bei der Entwicklung der Leber, die auch durch eine antagonistische Interaktion beeinträchtigt sein könnte (Barouki et al. 2007). Nach Inkubation mit BDE47<sup>hg</sup> war es nicht zur Translokation des AhRs in den Zellkern gekommen (Abb. 2.7), was auf eine Interaktion des BDE47<sup>hg</sup> mit dem AhR-Signalweg bereits auf Rezeptorebene hindeutet. In diesem Kapitel sollte untersucht werden, ob es neben der Inhibierung der basalen CYP1A1-Expression auch zur Inhibierung der durch TCDD oder TBDF induzierten CYP1A1-Proteinmenge bei gleichzeitiger Inkubation mit PBDE-Kongeneren kommt (Abb. 2.11).



**Abb. 2.11: BDE47<sup>hg</sup> vermindert die TBDF- und TCDD-induzierte CYP1A1-Proteinmenge.** (A) 5L (AhR<sup>+</sup>)-Zellen wurden mit TBDF (0,01 und 0,1 nM) und BDE47<sup>hg</sup>, BDE99, BDE153 und BDE209 (alle 10 µM) zeitgleich für 24 h inkubiert, und dann Total-Zellextrakte hergestellt. (B) Diesmal wurde TCDD (0,001 und 0,01 nM) mit BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) ko-inkubiert. Die Extrakte (20 µg) beider Versuche wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot aufgetrennt und die Expression von AhR, CYP1A1 und PCNA (letzteres als Ladekontrolle) mit spezifischen Antikörpern immunodetektiert. Die Abb. zeigt exemplarische Westernblots aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten mit ausgewählten Konzentrationen.

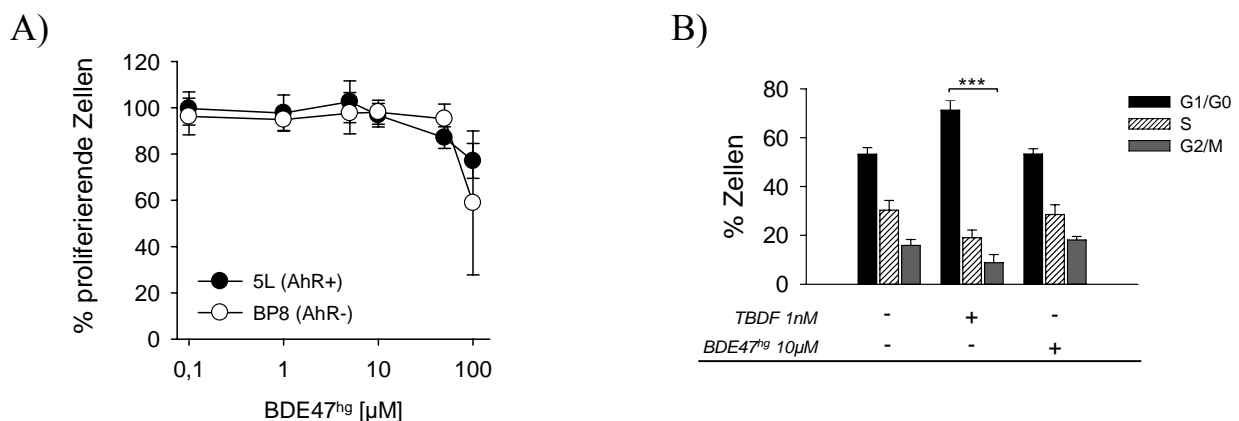
5L-Zellen wurden für 24 h mit geringen Konzentrationen TBDF (0,01 und 0,1 nM) und TCDD (0,001 und 0,01 nM) sowie den PBDE-Kongeneren BDE47<sup>hg</sup>, BDE99, BDE153 und BDE209 (alle 10 µM) zeitgleich ko-inkubiert. Diese TBDF- und TCDD-Konzentrationen wurden ausgewählt, weil die Induktion der CYP1A1 durch diese Konzentrationen noch nicht die Sättigungsphase erreicht hatte, sondern die Expression noch weiter anstieg. In Vorversuchen war keine Verminderung der TCDD-induzierten CYP1A1 festzustellen, wenn mit hohen Konzentrationen (1 nM) inkubiert wurde (Daten nicht gezeigt). Exemplarische Westernblots dieser Analyse sind in Abb. 2.11 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass

bereits 0,01 nM TBDF zu einer hohen CYP1A1 führen und das BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) alleine eher die basale Expression unterdrückt, wie bereits zuvor beobachtet (Abb. 2.3 B). Die Ko-Inkubation der von TBDF und BDE47<sup>hg</sup> führt zu einer eindeutigen Reduktion der TBDF induzierten CYP1A1-Proteinmenge (Abb. 2.11 A). Von den weiteren PBDE-Kongeneren hatte BDE99 dem BDE47<sup>hg</sup> ähnlich starke Effekte, BDE153 hatte keine signifikanten und BDE209 gar keine Effekte mehr auf die CYP1A1-Proteinmenge. BDE47<sup>hg</sup> antagonisierte auch die durch TCDD-induzierte CYP1A1-Proteinmenge.

Diese Experimente zeigen, dass PBDE-Kongeneren, in Abhängigkeit vom Grad ihrer Brom-Substitution, zu einer AhR-abhängigen Verminderung der basalen und TBDF- bzw. TCDD-induzierten CYP1A1-Proteinmenge führten. Es ergab sich die folgende Reihenfolge der Potenz von PBDE-Kongeneren, die TBDF- bzw. TCDD-induzierte CYP1A1-Proteinmenge zu antagonisieren bzw. zu vermindern: BDE47<sup>hg</sup> (BDE47 *per se*) > BDE99 > BDE153; BDE209 war ohne Effekt. Ähnliche Ergebnisse konnten auf Ebene der Cyp1A1-mRNA durch Ko-Inkubation mit PBDE-Kongeneren erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

## 2.10 BDE47<sup>hg</sup> und PBDE-Kongeneren haben keine Effekte auf die Proliferation in 5L (AhR+)-Zellen

Im Kapitel zuvor konnte eine antagonistische Wirkung von PBDE-Kongeneren auf die durch TBDF- und TCDD-induzierte CYP1A1-Proteinmenge eindeutig nachgewiesen werden. Dieser Effekt tritt wie die CYP1A1-Induktion nur in 5L (AhR+)-Zellen auf und geschieht höchstwahrscheinlich am Rezeptor selbst, d.h. dass die Inkubation mit PBDE-Kongeneren *per se* nicht zu einer Translokation des AhRs in den Zellkern führen würde (Abb. 2.7). Das verunreinigte BDE47 und TBDF hatten in den Experimente zuvor zu einer AhR-abhängigen Inhibierung der Proliferation und des Wachstums nach 24 h durch einen Arrest der 5L (AhR+)-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und zu einer Verminderung der Zellen in der S-Phase geführt. Die Folgen eines solchen Antagonismus der PBDE-Kongeneren auf die zuvor beobachtete AhR-abhängige Regulation der Proliferation sollen in diesem Kapitel untersucht werden.



**Abb. 2.12: BDE47<sup>hg</sup> führt zu keiner Inhibierung der Proliferation.** (A) 5L (AhR+)- und BP8 (AhR-)-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Mengen BDE47<sup>hg</sup> (0,1-100 µM) inkubiert und anschließend der Anteil proliferierender Zellen ermittelt. (B) zeigt 5L (AhR+) Zellen, die für 24 h mit TBDF (1 nM) oder BDE47<sup>hg</sup> (10 µM) behandelt, anschließend fixiert und die DNA-DAPI gefärbt wurde. Statistisch signifikante Änderungen sind durch Sterne indiziert (\*\*\*)  $p \leq 0,005$ , es wurden drei bis fünf unabhängige Experimente ausgewertet.

Das hochreine BDE47<sup>hg</sup> führte nicht - wie für das verunreinigte BDE47 und TBDF beobachtet - zu einem Rückgang des Wachstums und hatte auch in hohen Konzentration kaum

einen Rückgang (80 ( $\pm$ 8) % der Kontrolle) der Proliferation, gemessen an der DNA-Neusynthese in 5L (AhR+)-Zellen zur Folge (Abb. 2.12 A). Lediglich die BP8 (AhR-)-Zellen zeigen bei 100  $\mu$ M BDE47<sup>hg</sup> einen Rückgang der S-Phase auf 45 ( $\pm$ 33) % der Kontrolle. Dies könnte auf einen fehlenden AhR-abhängigen Fremdstoff-metabolismus der AhR-defizienten BP8-Zellen und somit einer gesteigerten Toxizität einhergehen, allerdings hatten die Untersuchung der Zytotoxizität hierfür keine Indizien geliefert. BDE47<sup>hg</sup> verursacht auch keinen Arrest der 5L-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Abb. 2.12 B), verglichen mit TBDF (1 nM). Die PBDE-Kongenere BDE99, BDE153 und BDE209 hatten ebenso keinen Effekt auf die Proliferation und die Zellzyklusverteilung in 5L- oder BP8-Zellen (Daten nicht gezeigt). Somit kam es zu keiner Beeinträchtigung der Zellzyklusregulation oder der DNA-Neusynthese obwohl diese durch den AhR reguliert werden und zuvor endogene Prozesse durch einige PBDE-Kongenere und BDE47<sup>hg</sup> im Speziellen beeinträchtigt waren, wie die Unterdrückung der basalen CYP1A1-Expression.

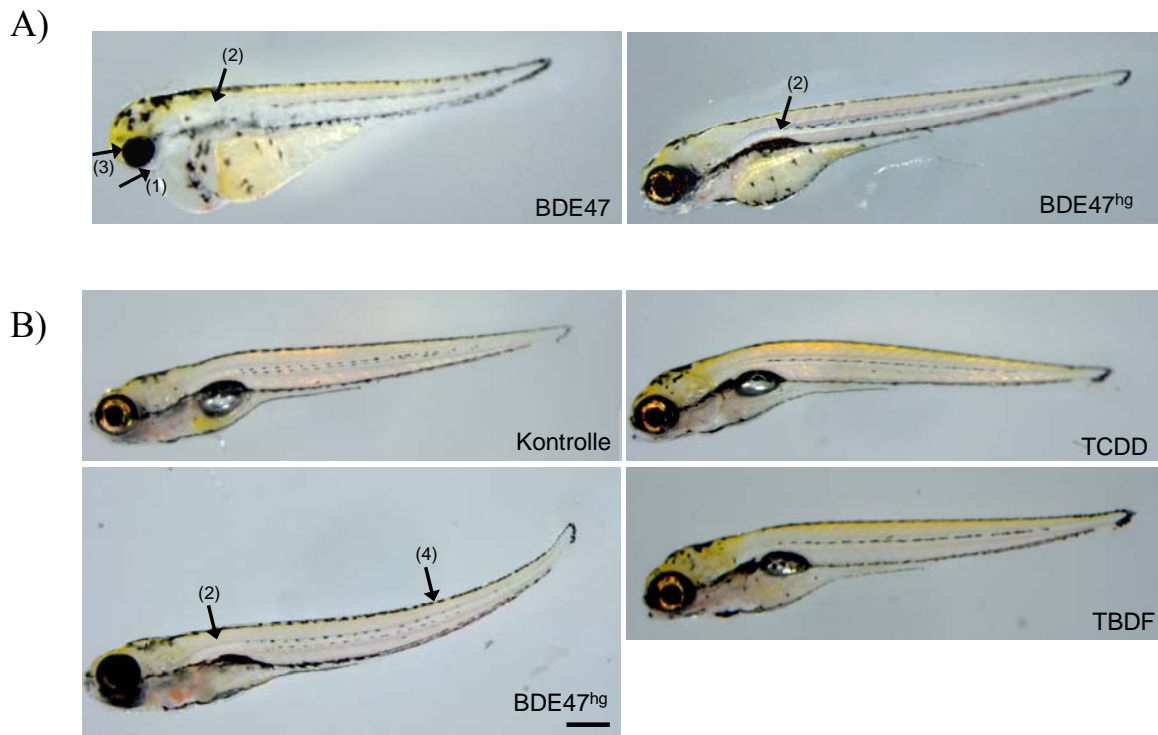
In den bisherigen Kapiteln dieser Arbeit konnte eine dioxin-artige Wirkung des hochreinen BDE47<sup>hg</sup> und der PBDE-Kongenere BDE99, BDE153 und BDE209 ausgeschlossen werden. Die zuvor beobachtete AhR-Aktivierung und Zielgen-Induktion durch das mit TBDF verunreinigte BDE47 konnte nicht festgestellt werden, es hatte sich um Effekte der Kontaminante TBDF gehandelt. Im Gegensatz zu der ursprünglichen Annahme kam es nicht zu einem AhR-Agonismus, sondern zu einem AhR-Antagonismus des PBDE-Kongeners BDE47 *per se* (BDE47<sup>hg</sup>), sichtbar an einer verminderten basalen Expression von Cyp1A1-mRNA und -Protein, und ebenso einer Verminderung der CYP1A1-Proteinmenge nach TBDF- und TCDD-Inkubation. Dies war auch für das Kongener BDE99, nicht aber für die anderen getesteten PBDE-Kongenere BDE153 und BDE209 zu beobachten. Das verunreinigte BDE47 und die Kontaminante TBDF hatten in Embryonen des Zebrafisches zu typischen Endpunkten TCDD-induzierter Toxizität geführt. Im Folgenden sollte daher der Einfluss der Reinsubstanz BDE47<sup>hg</sup> auf diese Endpunkte und die Konsequenz eines AhR-Antagonismus im Zusammenhang mit der Entwicklung der Zebrafisch-Embryonen untersucht werden.

## **2.11 BDE47<sup>hg</sup> verursacht morphologischen Defekt in Embryonen des Zebrafisches**

Das verunreinigte BDE47, die Kontaminante TBDF und die Referenzsubstanz TCDD induzierten bei Inkubation zwischen 4-24 hpf Ödeme des Dottersacks und Perikards, sowie eine Fehlbildung des Kiefers und eine mangelnde Inflation der Schwimmblase, die nach 72-96 hpf sichtbar werden. Eine solche Wirkung, wie für TBDF beobachtet, konnte für BDE47<sup>hg</sup> (Abb. 2.13 A) und die Kongenere BDE99, BDE153 und BDE209 zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings führte auch BDE47<sup>hg</sup> zu einer mangelhaften Inflation der Schwimmblase bei ca. 20 % der Embryonen. Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung zeigten allerdings einen markanten morphologischen Defekt der Embryonen, wenn die Inkubation von 96-120 hpf erfolgte (Abb. 2.13 B). Ein solcher Effekt war nicht für TBDF und TCDD (Abb. 2.13 B), aber ebenso für das verunreinigte BDE47 (Daten nicht gezeigt) zu beobachten.

BDE47<sup>hg</sup> und auch das verunreinigte BDE47 verursachen bei Inkubation von 96-120 hpf eine starke dorsale Krümmung, die nach 120 hpf sichtbar wurde. Die PBDE-Kongenere BDE99, BDE153 und BDE209 hatten hier wenig bis keine Effekte bei denselben Konzentrationen (jeweils 10  $\mu$ M), während die Penetranz des BDE47<sup>hg</sup> induzierten morphologischen Defekts ca. 60 % der analysierten Embryonen (n > 600) betrug. Hierbei ist zu

erwähnen, dass die dorsale Krümmung stets mit der mangelhaften Schwimmblasen-Inflation einherging. Der molekulare Mechanismus dieses Defektes ist zunächst unklar, eine Beteiligung des *Danio rerio*-AhR-Homologs AhR2 wäre denkbar. BDE47<sup>hg</sup> induzierte die CAR- und PXR-regulierte Expression der Cyp2B1 und Cyp3A1/3 in primären Ratten-Hepatozyten (Abb. 2.10). Auch eine mögliche Beteiligung des PXR-Homologs kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings zeigte die Inkubation mit PCN, einem auch im Zebraabärbling bekannten Aktivator des PXR und Induktor des Homologs Cyp3A (Bresolin et al 2005), keine Effekte auf die Entwicklung der Embryonen in den getesteten Konzentrationen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 2.13: BDE47<sup>hg</sup> induziert morphologische Deformationen in *Danio rerio*-Embryonen.**

(A) Inkubation zu einem frühen Zeitpunkt (4-24 hpf, Bilder 96 hpf) diesmal mit BDE47<sup>hg</sup>. Die Pfeile markieren (1) die Ödembildung des Dottersacks und des Perikards, (2) fehlerhafte Inflation der Schwimmblase und (3) Deformation des Kiefers. (B) Embryonen des Zebraabärblings wurden mit TBDF, der Referenzsubstanz TCDD und BDE47<sup>hg</sup> inkubiert. Diesmal erfolgte die Inkubation zu einem späten Zeitpunkt der Entwicklung zwischen 96-120 hpf, die Bilder entstanden nach 120 hpf. Die Pfeile markieren morphologische Defekte, (2) fehlerhafte Inflation der Schwimmblase und (4) dorsale Krümmung. Verwendete Konzentrationen: BDE47<sup>hg</sup> 10  $\mu$ M (5 mg/l), TBDF 20 nM (10  $\mu$ g/l) und TCDD 3 nM (1  $\mu$ g/l). Die Lösungsmittel-Kontrollen DMSO und Toluol (0,05 % [v/v]) zeigten keinen Einfluss im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der Größen-Maßstab (schwarzer Balken, links unten) misst 0,4 mm. Die dargestellten Bilder sind repräsentative für drei bis fünf unabhängige Experimente.

Die beobachtete morphologische Deformation wurde vor kurzem in der Literatur beschrieben (Lema et al. 2007). Die Autoren hatten einen verminderten Durchfluss der zerebrospinalen Flüssigkeit als Ursache vorgeschlagen; die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch nach wie vor unklar. Aus diesem Grund wurden im letzten Kapitel der vorliegenden Arbeit genomweite Genexpressions-Profile von *Danio rerio*-Embryonen nach BDE47<sup>hg</sup> Exposition aufgenommen.

## 2.12 BDE47<sup>hg</sup> führt zur Regulation von potentiellen Gen-Kandidaten in einer genom-weiten Genexpressions-Analyse

In Tab. 3.3 sind die genomweiten Analysen der Genexpressions-Profile nach Inkubation mit BDE47<sup>hg</sup> und zur Verdeutlichung eines dioxin-artigen Expressionsmusters zusätzlich nach Inkubation mit TCDD dargestellt. Es sind deutliche Unterschiede zwischen beiden Inkubationen zu erkennen. TCDD, das eine dioxin-ähnlichen Ödem-Bildung im frühen Stadium der Inkubation verursacht hatte, induzierte hier deutlich die Expression der Cyp1A1 (37,7 fach) und Cyp1B1 (14 fach) in *Danio rerio*-Embryonen.

**Tab. 2.3:** Globale Genexpressions-Analysen in Embryonen des Zebrafisches nach BDE47<sup>hg</sup>- und BDE47-Inkubation. Die Inkubation der Embryonen erfolgte zwischen 96-120 hpf mit (25 mg/L bzw. 50 µM) BDE47<sup>hg</sup>, BDE47 und zum Vergleich TCDD (1 µg/L bzw. 3 nM), sowie jeweils DMSO und Toluol als Lösungsmittel-Kontrollen (Endkonzentration jeweils 0,05 % [v/v]) nach der Inkubation wurde die gesamte RNA isoliert, prozessiert und mit einem selbst hergestellten Microarray-Chip hybridisiert und ausgewertet. Die Regulation der Genexpressionen sind als x-fache Änderung der Expression in der behandelten Probe über die Expression der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle dargestellt. Der „Fold Change“ wurde für BDE47<sup>hg</sup> von  $|F_c| > 2$  für auf  $|F_c| > 1,5$  herabgesetzt, die statistische Signifikanz der Regulation von  $p_{adj} < 0,025$  auf  $p_{adj} < 0,05$ . Abkürzungen nd = nicht detektiert, (a) = adaptiert von Yang 2007.

Gen ID	Gen Symbol	Gen Name	BDE47 <sup>hg</sup>	BDE47	TCDD <sup>(a)</sup>
<i>Detoxifizierung</i>					
AF057713	<i>Cyp1A1</i>	Cytochrom P450 Monooxygenase 1A1	1,3	64,5	37,7
BG738243	<i>Cyp1B1</i>	Cytochrom P450 Monooxygenase 1B1	nd	32,9	14
AF221128	<i>Cyp2J2</i>	Cytochrom P450 Monooxygenase 2J2	1,6	nd	nd
AF285098	<i>Gstp1</i>	Glutathion-S-Transferase pi	0,5	2,4	1,5
AI959735	<i>Sult6B1</i>	Sulfotransferase 6B1	nd	6,1	3,3
verschiedene					
AF301264	<i>her9</i>	"Hairy-related 9", bHLH-Transkriptionsfaktor	0,4	1,0	nd
AF307010	<i>Hoxa2</i>	Transkriptionsfaktor Hoxa2	1,6	1,2	nd
BI429216	<i>Krt13</i>	Zytokeratin 13	nd	0,1	0,3
AI397347	<i>Krt15</i>	Zytokeratin 15	1,6	0,3	0,4
AF121796	<i>NaPill</i>	Typ II Na/Pi Kotransportsystem Protein	1,1	0,2	0,3
AF342941	<i>Reverb1</i>	Nukleärer Rezeptor 1D2	1,7	1,1	nd
AF277097	<i>sox9b</i>	"SRY-box containing gene" 9b	1	0,2	0,2

Es ist eindeutig zu erkennen, dass BDE47<sup>hg</sup> nicht wie TCDD zur Induktion eines dioxin-artigen Genexpressions-Profiles führt. Es kam nicht zur Induktion der Cyp1A1 (1,3 fach) oder Cyp1B1 (nicht detektiert). Der in 5L-Ratten-Hepatomzellen beobachtete AhR-Antagonismus und die Unterdrückung der basalen Cyp1A1-Expression durch BDE47<sup>hg</sup> konnten hier nicht beobachtet werden. BDE47<sup>hg</sup> führt zu einer vollkommen von TCDD unterschiedlichen Gen-Expressionsmuster, so verminderte BDE47<sup>hg</sup> die Expression der Glutathion-S-Transferase (Gstp1) 0,5 fach im Vergleich zur Kontrolle. TCDD dahingegen induzierte dieselbe Gstp1 1,5 fach. Das Genexpressions-Profil brachte eine Reihe von Gen-Kandidaten hervor, deren

Deregulation zu dem beobachteten Defekt und der Toxizität beitragen können. BDE47<sup>hg</sup> regulierte die Gst-Expression gemeinsam differentiell in Ratten Hepatomzellen (Abb. 2.8) und im Zebrabärbling, was auf eine Interferenz mit möglichen endogenen Funktionen des AhRs und Unterdrückung der basalen Expression von Zielgenen zurückzuführen sein könnte. Allerdings wurde wie bereits erwähnt die Expression der Cyp1A1 im Zebrabärbling nicht vermindert.

Im Allgemeinen schützen GST die Zellen vor oxidativem Stress und sind an neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Parkinson-Syndrom, beteiligt (Hayes et al. 2005; Smeyne et al. 2007). Höchst interessant war die Induktion der Cytochrom-P450-Monooxygenase Cyp2J2 (1,6 fach), welche Arachidonsäure zu Epoxy-Eikosatriensäure (EET) konvertiert. Diese EET ist an einer Reihe physiologischer Prozesse wie der Angiogenese, Entzündungs-Reaktionen und der Zellproliferation beteiligt (Spector and Norris, 2007). Weiterhin führte BDE47<sup>hg</sup> zur Deregulation der Expression der Transkriptionsfaktoren RevErb $\beta$  (1,7 fache Induktion), Hoxa2 (1,6 fache Induktion) und Her9 (0,4 fache Repression) gegenüber der Kontrolle. RevErb $\beta$  gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren und Her9 zur Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren und fungiert als transkriptioneller Repressor. Beide sind wichtig für die neuronale Entwicklung in der Maus und im Zebrabärbling (Chomez et al. 2000; Bae et al. 2005, Ramakrishnan and Muscat 2006). Die Störung ihrer Expression könnte zur beobachteten neuronalen Toxizität und Entwicklungsstörung beitragen. Weitere Studien sind notwendig, um die beobachtete Störung der Entwicklung und mögliche molekulare Mechanismen auf die beobachteten neurotoxischen Effekte von PBDE-Kongeneren in höheren Vertebraten zu übertragen.

### 3. Schlussfolgerungen

Polybromierte Diphenylether (PBDE) sind Umwelt-Kontaminanten und akkumulieren in Tier und Mensch. Sie haben toxische Wirkung auf die Entwicklung und das Nervensystem, stören endokrine Funktionen und verursachen z.T. Tumore in Nagern (Birnbaum und Cohen Hubal 2006). Jedoch ist immer noch sehr wenig über die zugrunde liegenden Mechanismen der Toxizität bekannt. Aufgrund ihrer Struktur gerieten PBDE unter Verdacht, den AhR Signalweg zu aktivieren, welcher für die toxische Wirkung des TCDD und weiterer AhR-Agonisten, z.B. von polyaromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen (PAH), verantwortlich ist. Die überwiegende Zahl der Untersuchungen konzentrierte sich bisher auf die Induktion des AhR-Zielgens Cyp1A1 als Marker für eine AhR-Aktivierung. Allerdings erklärt die Induktion der Cyp1A1 nicht ausreichend die bekannte Toxizität des TCDD. Weitere AhR-Zielgene müssen in die Betrachtung der PBDE-Wirkung einbezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von PBDE-Kongeneren auf den AhR auf verschiedenen Ebenen untersucht. Folgende Einsichten in potentielle, der molekularen Toxizität von PBDE-Kongeneren zugrunde liegende Mechanismen und der Beteiligung des AhRs hierzu konnten in dieser Arbeit gewonnen werden:

- Die reinen PBDE-Kongeneren BDE47<sup>hg</sup>, BDE99, BDE153 und BDE209 aktivieren den AhR-Signalweg nicht und führen nicht zur differentiellen Regulation klassischer Zielgene.



- PBDE-Kongenere führen nicht zu einer dioxinartigen Deregulation des Zellzyklus als toxischer Endpunkt.
- Durch Verwendung verschiedener *In vitro*-Modellsysteme und Spezies konnte eine dioxinartige Wirkung der PBDE-Kongenere generell ausgeschlossen werden.
- TBDF, eine potentielle Kontaminante kommerzieller PBDE-Mixturen, kann den AhR aktivieren und zur AhR-abhängigen Expression von Zielgenen führen.
- Erstaunlicherweise führten BDE47, BDE99 und z.T. auch BDE153 zu einer „antagonistischen“ Wirkung auf den TCDD-aktivierten AhR und die Induktion des Zielgens Cyp1A1.
- PBDE-Kongenere induzieren ein von TCDD und TBDF distinktes Gen-expressions-Muster. Es konnten mögliche neue Zielgene entdeckt und verifiziert werden, darunter die Induktion der Cyp2B- bzw. Cyp3A-Expression in primären Ratten-Hepatozyten.
- Das reine BDE47 führte in Embryonen des Zebrafisches zu morphologischen Defekten und Änderungen der Genexpressions-Muster, welche sich ebenfalls von der bekannten TCDD-Toxizität unterscheiden. Auch hier konnten potentielle neue Zielgene der PBDE-Toxizität entdeckt werden.

### **3.1 Neue potentielle Zielgene der PBDEs in Hepatomzellen und primären Hepatozyten der Ratten**

Die Induktion des Fremdstoff-metabolisierenden Enzyms Cyp1A1 kann die durch TCDD verursachte Toxizität auch im Modell-Organismus Maus nicht zufriedenstellend erklären (Fernandez-Salguero et al. 1996; Schmidt und Bradfield 1996). Vielmehr scheint die Cyp1A1 sogar eine protektive Wirkung zu besitzen, denn Cyp1A1(-/-) Knockout-Mäuse weisen eine erhöhte Letalität gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen (PAH) auf, verglichen mit dem nahezu unbetroffenen Wildtyp (Nebert et al. 2004). PBDE-Kongenere führten in den Experimenten dieser Arbeit nicht zu einer gesteigerten Cyp1A1-Expression. Im Zusammenhang mit der bestehenden toxischen Wirkung von PBDE-Kongeneren und der Entstehung toxischer Metabolite sollte weiterhin untersucht werden, ob PBDE möglicherweise andere Zielgene differentiell regulieren. Zum Auffinden solcher potentieller toxizitätsrelevanter und regulierter Gene wurden Analysen der genomweiten Genexpressions-Profile nach BDE47<sup>hg</sup>-Inkubation in 5L-Zellen und in Embryonen des Zebrafisches durchgeführt. In der Tat unterschieden diese sich deutlich von den Expressions-Profilen der klassischen AhR-Agonisten TBDF und TCDD.

BDE47<sup>hg</sup> hatte keine Induktion der Expression klassischer AhR-Zielgene zur Folge, wie bereits zuvor für das AhR-Markerenzym Cyp1A1 beobachtet. Es hatte im Gegenteil zu einer Reduktion des basal vorhandenen Expressions-Niveaus der Cyp1A1 in der 5L-Hepatom-Zellkultur und in primären Hepatozyten geführt. In den 5L-Hepatomzellen konnte zudem eine Verminderung der basalen Gst2A-Expression beobachtet werden. Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass BDE47<sup>hg</sup> nicht zur Translokation des AhRs geführt hatte, könnte dies auf eine inhibitorische Wirkung am Rezeptor selbst hindeuten. Der Nachweis der direkten Bindung des BDE47 an den AhR, etwa durch Kompetitions-Studien mit dem bekannten Liganden TCDD, steht noch aus. Die Analysen der genomweiten Genexpression in 5L-Hepatomzellen brachten

sehr unterschiedliche Genexpressions-Muster und neue potentielle Zielgene für BDE47<sup>hg</sup> hervor. So induzierte BDE47<sup>hg</sup> zunächst schwach die Expression der Cytochrom-P450-Monooxygenase 3A13 (Cyp3A13). Dieses Enzym gehört zur Cyp3A-Familie und wird durch den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) transkriptionell reguliert (LeCluyse 2001). Aufgrund der geringen chemischen Induzierbarkeit dieses Fremdstoff-metabolisierenden Cyp-Enzymes in 5L-Hepatomzellen bei der Verifizierung der Daten mittels qPCR und Westernblot (Daten nicht gezeigt) wurde die zuvor beobachtete Cyp3A-induktion in primären Ratten-Hepatozyten weiter verfolgt. Diese weisen nach der Isolation eine breite Palette von für den Fremdstoffmetabolismus relevanten Enzymen auf, die durch zelluläre Prozesse und Rezeptoren ähnlich wie in der Leber *in vivo* reguliert werden (Hewitt et al. 2007). In den Vorversuchen war keine Expression des CAR-Markerenzyms Cyp2B1 in 5L-Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene detektierbar gewesen, diese wurde im Folgenden aber dennoch mit untersucht, da die Substratspektren der Xenosensoren CAR und PXR oftmals Überschneidungen aufweisen und so beide Rezeptoren eine Rolle spielen könnten (Handschin et al. 2002). In der Tat führte der Gebrauch des bekannten CAR-Aktivators TCPOBOP (1,4-bis(2-(3,5-dichlor-pyridyloxy))-benzene) zu einer Induktion der Cyp2B1-Expression in primären Ratten-Hepatozyten. Ebenso konnte durch die Aktivierung des PXR die Expression der Cyp3A1/3 nach Inkubation mit der Positivkontrolle PCN (Pregnenolon-16 $\alpha$ -Carbonitril) erhöht werden (LeCluyse 2001). Die Expression der Cyp3A13-entsprechenden Isoenzyme Cyp3A1 und Cyp3A3 (Cyp3A1/3) wurden gemeinsam untersucht, da diese ebenfalls zur Cyp3A-Familie zählen und über 97 % Sequenzhomologie in der Ratte aufweisen, sowie ca. 80 % Sequenzhomologie zum humanen Cyp3A4-Homolog. In der Tat induzierten die PBDE-Kongenere BDE47, BDE99 und BDE153 die Expression der Cyp2B1 und Cyp3A1/3 in primären Ratten-Hepatozyten nach 72 h Inkubation signifikant, das vollbromierte BDE209 war inaktiv.

### **3.2 Bewertung der Toxizität von PBDEs und TBDF im Hepatozyten-Kulturmodell und Zebrafährblings-Embryonen**

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse sollen zur Bewertung der PBDE als Umweltschadstoffe und einer Einschätzung ihrer Relevanz für Tier und Mensch beitragen. Mit den erarbeiteten Ergebnissen und dem Gebrauch von Ratten-Hepatomzellen und primären Ratten-Hepatozyten lassen sich Effekte auf den endogenen und den Fremdstoff-induzierten Metabolismus einschätzen. Die Leber ist einer Vielzahl von Umweltschadstoffen, wie z.B. PBDE und Dioxin, ausgesetzt und trägt zu deren Biotransformation und Entgiftung bei. So konnten in dieser Arbeit durch Analyse der toxikogenomischen Gen-Expressionsprofile ein Einfluss von PBDE-Kongeneren (BDE47, BDE99, BDE153) auf die Expression der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme Cyp1A1 (unterdrückend) sowie der Cyp2B1 und Cyp3A1/3 (induzierend) festgestellt werden. Eine Induktion der Cyp1A1 wurde nur durch die Kontaminante TBDF festgestellt. Zwar konnte eindeutig gezeigt werden, dass PBDE-Kongenere keine AhR-Agonisten sind, folglich nicht dioxin-ähnlich wirken und es somit keiner Einordnung in ein Dioxin-Äquivalenz-System bedarf, wie auch durch Experten-Gremien der Welt-Gesundheits-Organisation WHO vorgeschlagen wurde (van den Berg et al. 2005), doch AhR-unterdrückende bzw. antagonistische Effekte und deren Konsequenzen für die Zelle bzw. den Organismus bleiben offen. Die WHO-Experten empfehlen in diesem Zusammenhang, polybromierte Furane und Dioxin (PBDF und PBDD) weiter zu untersuchen und diese in das Dioxin-Äquivalenz-System einzubeziehen.

Die physiologische Rolle des AhRs ist bislang nicht vollkommen aufgeklärt, eine antagonistische AhR-Wirkung und die Entwicklungs-toxischen Konsequenzen der PBDE in Embryonen des Zebrafisch, möglicherweise erklärbar durch Interferenzen mit noch unbekanntem physiologischen Mechanismen und AhR-Funktionen bleibt offen (Oesch-Bartlomowicz et al. 2005). Darüber hinaus sind PBDF und in geringerem Ausmaß auch PBDD Begleiter der PBDE (Sanders et al. 2005, Peters et al. 2006 B), so dass eine Exposition gegenüber PBDE bei ähnlichem Eintrag in die Umwelt und Nahrungskette auch eine Exposition gegenüber z.B. TBDF bedeuten könnte. Die Konzentration der bromierten dioxinähnlichen Substanz TBDF in der verunreinigten BDE47-Mischung war zwar gering, dafür ist TBDF aber ein hochpotenter AhR-Agonist im Vergleich zu TCDD (der Unterschied in der Potenz von TBDF betrug in vorliegenden Versuchen ca. 0,05-0,1 % der TCDD-Wirkung).

Des Weiteren stellt die Induktion der Cyp2B1 und Cyp3A1/3 im Falle einer Übertragbarkeit auf den Menschen ein potentielles Risiko dar. In der Tat zeigt eine Studie die Aktivierung des humanen PXR-Homologs des Menschen, dem xenobiotischen Rezeptor und transkriptionellen Regulators des humanen Cyp3A4-Homologs, durch die PBDE-Kongeneren BDE47 und BDE99 (Pacyniak et al. 2007). Die Relevanz für den Menschen liegt in der physiologischen Funktion der Cyp3A4 im Stoffwechsel z.B. von Geschlechts-Hormonen, mögliche Interferenzen könnten bei gegebener Exposition schädliche Wirkung für den Menschen haben. Weiterhin könnte die Aktivierung dieses xenobiotischen Rezeptors und der Induktion von Cyp2B und Cyp3A die im Tierversuch beobachtete Metabolisierung von PBDE-Kongeneren erklären. Diese Entstehung hydroxylierter PBDE-Metabolite und ihre Wirkung auf das endokrine System (Schilddrüsenhormon-System, Östrogen-System) ist beschrieben. PBDE-Kongeneren würden somit ihren eigenen Metabolismus induzieren und zu der in Experimenten mit Ratten und Mäusen beobachteten endokrinen Disruption und Toxizität beitragen. Durch den parallelen Gebrauch der etablierten Hepatom-Zellkultur und der primären Ratten-Hepatozyten konnte die Regulation der Cyp2B1 und Cyp3A1/3 durch PBDE identifiziert werden. Die anfängliche Entdeckung der Cyp3A-Induktion durch BDE47<sup>hg</sup> in toxikogenomischen Analysen in den 5L-Hepatomzellen spricht für den Gebrauch dieser Zellen als „Hepatozyten *in vitro*-Modell“, da solche komplexen metabolischen und xenobiotischen Stoffwechselprozesse ansonsten in der Zellkultur verglichen mit Primärzellen nicht detektierbar sind (Hewitt et al. 2007). Des Weiteren konnten die gefundenen differentiellen Gen-Regulationen bereits auch in der Maus *in vivo* zu großen Teilen beobachtet werden (Tijet et al. 2006). Dagegen konnten die humanen HepG2-Hepatomzellen aufgrund geringer chemischer Induzierbarkeit der beschriebenen Fremdstoff-relevanten Cyp2B- und Cyp3A-Stoffwechselwege (Wilkening et al. 2003) nicht zur Extrapolation der gewonnenen Daten auf den Menschen herangezogen werden. Weitere Experimente für diese Übertragung stehen noch aus.

Die Experimente mit Embryonen des Zebrafisch (*Danio rerio*) ermöglichten zudem die Untersuchung von Entwicklungs- und Embryotoxizität zu frühen Stadien der Entwicklung. In Zebrafisch-Embryonen konnten für diverse toxische Stoffe hoch-spezifische toxikogenomische Gen-Expressionsmuster und -Profile zugeordnet werden, die sogar in Toxin-Mischungen und bei sehr geringen Konzentrationen detektierbar sind (Yang et al. 2007). Toxische Effekte von Chemikalien auf die embryonale Entwicklung können so in Embryonen des Zebrafisch abgeschätzt werden, und anhand der Analyse toxikogenomischer Profile mögliche molekulare Mechanismen vorhergesagt werden. Dieser Ansatz der Toxikogenomik ergänzt die traditionelle Vorgehensweise der Chemikalien-Bewertung im so genannten „*Danio rerio Embryo Toxicity Test*“ (DarT)-Verfahren, bei dem die Embryo-Toxizität nach 48 h Inkubation anhand morphologischer Parameter beurteilt wird (Nagel 2002).

### 3.3 Beitrag der Ergebnisse zu den Zielen des Förderprogramms BWPLUS

Der Beitrag dieser Arbeit zu den Zielen des Förderprogramms und die während der Durchführung des Projektes von anderen Stellen bekannt gewordenen Fortschritte lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen.

- Erkenntnisgewinn zur Bewertung der Umweltgefahren, da der AhR und eine Dioxinwirkung auch Fische und andere wildlebende Spezies betreffen könnte, zumal von einem ubiquitären Vorkommen des AhR in Wirbeltieren ausgegangen werden kann.
- Auf der Basis der erzielten Ergebnisse ist die Entwicklung neuer Alternativmethoden möglich, wie die Verwendung von Zebrafisch-Embryonen als Tierersatz-Modelle.
- Hinsichtlich dioxinartiger Wirkungen konnten für Risiko-Einschätzungen der Umweltkontaminanten PBDE eine Klärung erzielt werden. Es konnten keine dioxinartigen Wirkungen festgestellt werden, somit tragen PBDEs nicht zur Dioxin-Körperbelastung bei. Allerdings wurden im Rahmen der Untersuchung Verunreinigungen der untersuchten PBDE-Kongener mit dioxinartigen Verbindungen, bromierte Furane und Dioxine (PBDF und PBDD) festgestellt. Diese wurden interessanterweise auch in den kommerziellen und technischen Mischungen (z.B. DE-71) detektiert. Daraus folgt ein möglicher zusätzlicher Eintrag von PBDF und PBDD durch Begleitung der PBDE in die Umwelt und den Menschen.
- PBDEs bedürfen keiner Eingruppierung in ein Toxizitäts-Äquivalenzsystem für Dioxine. Dies ist ebenfalls eine Einschätzung der WHO (van den Berg et al., 2005)
- Das Problem einer Unterschätzung bei der Bestimmung der Dioxin-Belastung mit Bioassays, wie dem EROD-Assay (Messung der CYP1A1-Aktivität) wurde erkannt. Es kann zu Fehleinschätzungen der Dioxin-Belastung führen, wenn gleichzeitig Agonisten und Antagonisten des AhR in Proben vorhanden sind.
- Es konnte eine Wirkung auf weitere Regulatoren des Fremdstoffwechsels festgestellt werden: eine Aktivierung der Genregulation durch den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und den konstitutiven Androstan Rezeptor (CAR), eine Wirkung die ebenfalls für einzelne PCB zutrifft.
- Auch andere Arbeiten unterstützen die Befunde. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen, die in das EU-Netzwerk FIRE eingebunden waren, in ergänzenden Versuchen zeigen, dass PBDE keine Aktivatoren des AhR sind und somit nicht AhR-agonistisch. Zudem konnten auch in anderen Modellsystemen AhR-antagonistische Effekte gezeigt werden (Peters et al. 2006B, Kuiper et al. 2006). Des Weiteren wurde vor kurzem auch die im Rahmen dieser Arbeit entdeckte Wirkung der PBDE auf den PXR-Rezeptor (Pacyniak et al. 2007) und eine Entwicklungsstörung im Zebrafish berichtet (Lema et al., 2007).

## 4. Veröffentlichung der Ergebnisse

### 4.1 Publikationen in Fachzeitschriften

- Wahl, M. (2008) Molekular-toxikologische Wirkmechanismen polybromierter Diphenylether (PBDE), Dissertation, Universität Heidelberg, [www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/8265/](http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/8265/)
- Wahl M, Guenther R, Yang L, Bergmann A, Strähle U, Strack S und Weiss C., Polybrominated diphenyl ethers and aryl hydrocarbon receptor agonists: different toxicity and target gene expression. (in Vorbereitung zur Publikation in 2009)
- Wahl M, Lahni B, Guenther R, Kuch B, Yang L, Strachle U, Strack S und Weiss C. (2008) A technical mixture of 2,2',4,4'-tetrabromo diphenyl ether (BDE47) and brominated furans triggers Aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated gene expression and toxicity. *Chemosphere* 73, 209-215
- Strack, S., Detzel, T., Wahl, M., Kuch, B., Krug, H.F. (2007) Cytotoxicity of TBBPA and effects on proliferation, cell cycle and MAPK pathways in mammalian cells, *Chemosphere* 67, S405-S411
- Strack, S., Wahl, M., Weiss, C., Jay, K., Kuch, B., Krug, H.F. (2006) AhR signalling pathway in rat hepatoma cells induced by traces of brominated dibenzofurans in BDE47 samples? *Organohal. Compounds*, Vol. 68, 1557-1560
- Strack, S., Wahl, M., Krug, H.F. (2006) Brominated diphenyl ethers (BDE 47) induces gene expressions by AhR involvement in 5L rat hepatoma cells, *Naunyn-Schm. Arch. Pharmacol.* 372, Suppl.1, 106 (Abstract)
- Wahl, M., Strack, S., Kuch, B., Krug, H.F. (2005) Influence of polybrominated diphenyl ethers (BDE47) on cytochrom P450 1A1 protein level in 5L rat hepatoma cells, *Signal Transduction* 6 -1, S77 (Abstract)
- Strack, S., Wahl, M., Krug, H.F. (2005) Impact of brominated diphenyl ethers on Ah-receptor activation in 5L rat hepatoma cells, *Toxicology Letters* 158, Suppl.1, S84-S85 (Abstract)
- Strack, S., Benz, R., Wahl, M., Krug, H.F. (2005) Toxic effects of polybrominated diphenyl ether (BDE47) on cell cycle regulation of 5L hepatoma cells, *Naunyn-Schm. Arch. Pharmacol.* 371, Suppl.1, 116-117 (Abstract)

## 4.2 Vorträge

49. Frühjahrstagung der DGPT

Mainz, 11. - 13. März 2008

„Polybromierte Diphenylether und 'Aryl Hydrocarbon' Rezeptor Agonisten:  
unterschiedliche Toxizität und Expression von Zielgenen“

BFR Amsterdam 2007

4<sup>th</sup> international workshop on brominated flame retardants, 24. - 27. April 2007

„BDE47 batch containing traces of brominated dibenzofurans alters cell cycle regulation *in vitro*“

BW ToxNet 2007

Baden Württemberger Toxikologen-Treffen ,10. Juli 2007

Forschungszentrum Karlsruhe in der Helmholtz-Gemeinschaft

„Interactions of polybrominated diphenylethers with AhR signalling“

## 4.3 Seminare und Tagungen mit Posterbeiträgen

Bregenz Summer School on Endocrinology

Nuclear Receptors in Health and Disease

Bregenz, 22. - 26. Juli 2007

48. Frühjahrstagung der DGPT

Mainz, 13. - 15. März 2007

SETAC GLB

Umweltwissenschaften: Umweltchemie & Ökotoxikologie im Kontext

Landau (Pfalz), 3. - 5. September 2006

DIOXIN 2006- 26th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants -  
Oslo (Norwegen) 21. – 25. August 2006

47. Frühjahrstagung der DGPT

Mainz, 4. - 6. April 2006

STS Tagung

9<sup>th</sup> Joint meeting of the Signal Transduction Society (STS)

Signal Transduction. Receptors, Mediators and Genes

Weimar, 10. - 12. November 2005

6<sup>th</sup> Duesseldorf Symposium on Immunotoxicology

Biochemistry and Function of the Arylhydrocarbon Receptor and other PAS-bHLH Proteins

Düsseldorf, 28. - 30. September 2005

EUROTOX 2005,

Krakow (Poland), 11. – 14. September 2005

46. Frühjahrstagung der DGPT  
Mainz, 15. -17. März 2005

DIOXIN 2004 - 24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic  
Pollutants and Persistent Organic Pollutants -  
Berlin, 6.-10. September 2004

## 5. Referenzen (für das Gesamt-Projekt)

Abbott BD, Lau C, Buckalew AR, Logsdon TR, Setzer W, Zucker RM, Elstein KH, Kavlock RJ. 1993. Effects of 5-fluorouracil on embryonic rat palate in vitro: fusion in the absence of proliferation. *Teratology* 47:541-554.

Andersson P, McGuire J, Rubio C, Gradin K, Whitelaw ML, Pettersson S, Hanberg A, Poellinger L. 2002. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9990-9995.

Andreasen EA, Spitsbergen JM, Tanguay RL, Stegeman JJ, Heideman W, Peterson RE. 2002. Tissue-Specific Expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in Zebrafish Embryos and Larvae: Effects of Developmental Stage and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Exposure. *Toxicol Sci* 68:403-419.

Antkiewicz DS, Peterson RE, Heideman W. 2006. Blocking expression of AHR2 and ARNT1 in zebrafish larvae protects against cardiac toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci* 94:175-182.

Bae YK, Shimizu T, Hibi M. 2005. Patterning of proneuronal and inter-proneuronal domains by hairy- and enhancer of split-related genes in zebrafish neuroectoderm. *Development* 132:1375-1385.

Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. 2007. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett* 581:3608-3615.

Barrow JR, Capocchi MR. 1999. Compensatory defects associated with mutations in Hoxa1 restore normal palatogenesis to Hoxa2 mutants. *Development* 126:5011-5026.

Behnisch PA, Hosoe K, Sakai S. 2003. Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environ Int* 29:861-877.

Birnbaum LS, Staskal DF, Diliberto JJ. 2003. Health effects of polybrominated dibenzo-p-dioxins (PBDDs) and dibenzofurans (PBDFs). *Environ Int* 29:855-860.

Birnbaum LS, Staskal DF. 2004. Brominated flame retardants: cause for concern? *Environ Health Perspect* 112:9-17.

Birnbaum LS, Cohen Hubal EA. 2006. Polybrominated diphenyl ethers: a case study for using biomonitoring data to address risk assessment questions. *Environ Health Perspect* 114:1770-1775.

Bock KW, Kohle C. 2006. Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol* 72:393-404.

Bohonowych JE, Denison MS. 2007. Persistent binding of ligands to the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci* 98:99-109.

Boverhof DR, Burgoon LD, Tashiro C, Sharratt B, Chittim B, Harkema JR, Mendrick DL, Zacharewski TR. 2006. Comparative toxicogenomic analysis of the hepatotoxic effects of TCDD in Sprague Dawley rats and C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 94:398-416.

Bresolin T, de Freitas RM, Celso Dias BA. 2005. Expression of PXR, CYP3A and MDR1 genes in liver of zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 140:403-407.

Bromine Science and Environmental Forum (BSEF). Homepage. <http://www.BSEF.com>

Brouwer A, Morse DC, Lans MC, Schuur AG, Murk AJ, Klasson-Wehler E, Bergman A, Visser TJ. 1998. Interactions of persistent environmental organohalogens with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol Ind Health* 14:59-84.

Canton RF, Sanderson JT, Letcher RJ, Bergman A, van den Berg M. 2005. Inhibition and Induction of Aromatase (CYP19) Activity by Brominated Flame Retardants in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicol Sci* 88:447-455.

Canton RF, Sanderson JT, Nijmeijer S, Bergman A, Letcher RJ, van den BM. 2006. In vitro effects of brominated flame retardants and metabolites on CYP17 catalytic activity: a novel mechanism of action? *Toxicol Appl Pharmacol* 216:274-281.

Carney SA, Prasch AL, Heideman W, Peterson RE. 2006. Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76:7-18.

Chen N, Whitehead SE, Caillat AW, Gavit K, Isphording DR, Kovacevic D, McCreary MB, Hoffman SM. 2002. Identification and cross-species comparisons of CYP2F subfamily genes in mammals. *Mutat Res* 499:155-161.

Chen G, Bunce NJ. 2003. Polybrominated Diphenyl Ethers as Ah Receptor Agonists and Antagonists. *Toxicol Sci* 76:310-320.

Choi JW, Fujimaki TS, Kitamura K, Hashimoto S, Ito H, Suzuki N, Sakai S, Morita M. 2003. Polybrominated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and diphenyl ethers in Japanese human adipose tissue. *Environ Sci Technol* 37:817-821.

Chomez P, Neveu I, Mansen A, Kiesler E, Larsson L, Vennstrom B, Arenas E. 2000. Increased cell death and delayed development in the cerebellum of mice lacking the rev-erbA(alpha) orphan receptor. *Development* 127:1489-1498.

Costa LG, Giordano G. 2007. Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Neurotoxicology* 28:1047-1067.

Covaci A, de Boer J, Ryan JJ, Voorspoels S, Schepens P. 2002. Distribution of organobrominated and organochlorinated contaminants in Belgian human adipose tissue. *Environ Res* 88:210-218.

Covaci A, Voorspoels S, de Boer J. 2003. Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples--a review. *Environ Int* 29:735-756.

Darnerud PO, Eriksen GS, Johannesson T, Larsen PB, Viluksela M. 2001. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 1:49-68.

Darnerud PO. 2003. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ Int* 29:841-853.

de Wit CA. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46:583-624.

Dietrich C, Faust D, Budt S, Moskwa M, Kunz A, Bock KW, Oesch F. 2002. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent release from contact inhibition in WB-F344 cells: involvement of cyclin A. *Toxicol Appl Pharmacol* 183:117-126.

Elferink CJ. 2003. Aryl hydrocarbon receptor-mediated cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 5:261-267.

Ellies DL, Krumlauf R. 2006. Bone formation: The nuclear matrix reloaded. *Cell* 125:840-842.

Eriksson P, Ankarberg E, Viberg H, Fredriksson A. 2001. The developing cholinergic system as target for environmental toxicants, nicotine and polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for neurotoxicological processes in mice. *Neurotox Res* 3:37-51.

Eriksson P, Viberg H, Jakobsson E, Orn U, Fredriksson A. 2002. A Brominated Flame Retardant, 2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl Ether: Uptake, Retention, and Induction of Neurobehavioral Alterations in Mice during a Critical Phase of Neonatal Brain Development. *Toxicol Sci* 67:98-103.

Eriksson P, Fischer C, Fredriksson A. 2006. Polybrominated Diphenyl Ethers, A Group of Brominated Flame Retardants, Can Interact with Polychlorinated Biphenyls in Enhancing Developmental Neurobehavioral Defects. *Toxicol Sci* 94:302-309.

Eskenazi B, Warner M, Samuels S, Young J, Gerthoux PM, Needham L, Patterson D, Olive D, Gavoni N, Vercellini P, Mocarelli P. 2007. Serum dioxin concentrations and risk of uterine leiomyoma in the Seveso Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 166:79-87.



European Union, Restriction of Hazardous Substances Directive; Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment, OJ L37, page 19, 13. February 2003

Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. 1996. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 140:173-179.

Fernie KJ, Mayne G, Shutt JL, Pekarik C, Grasman KA, Letcher RJ, Drouillard K. 2005. Evidence of immunomodulation in nestling American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to environmentally relevant PBDEs. *Environ Pollut* 138:485-493.

Fletcher N, Wahlstrom D, Lundberg R, Nilsson CB, Nilsson KC, Stockling K, Hellmold H, Hakansson H. 2005. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in rat liver: a microarray study. *Toxicol Appl Pharmacol* 207:1-24.

Gao L, Dong L, Whitlock JP, Jr. 1998. A novel response to dioxin. Induction of ecto-ATPase gene expression. *J Biol Chem* 273:15358-15365.

Germer S, Piersma AH, van d, V, Kamyschnikow A, Fery Y, Schmitz HJ, Schrenk D. 2006. Subacute effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A on hepatic cytochrome P450 levels in rats. *Toxicology* 218:229-236.

Gilroy DW, Newson J, Sawmynaden P, Willoughby DA, Croxtall JD. 2004. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *FASEB J* 18:489-498.

Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. 2007. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 168:66-73.

Hahn ME. 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141:131-160.

Hakk H, Letcher RJ. 2003. Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants--a review. *Environment International* 29:801-828.

Hallgren S, Sinjari T, Hakansson H, Darnerud PO. 2001. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Arch Toxicol* 75:200-208.

Hallgren S, Darnerud PO. 2002. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats-testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. *Toxicology* 177:227-243.

Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Kester MH, Andersson PL, Legler J, Brouwer A. 2006. In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol Sci* 92:157-173.

Hanari N, Kannan K, Miyake Y., Okazawa T, Kodavanti PRS, Aldous KM, Yamashita N. 2006. Occurrence of Polybrominated Biphenyls, Polybrominated Dibenzo-*p*-dioxins, and Polybrominated Dibenzofurans as Impurities in Commercial Polybrominated Diphenyl Ether Mixtures. *Environ Sci Technol* 40:4400-4405.

Handschin C, Podvinec M, Amherd R, Looser R, Ourlin JC, Meyer UA. 2002. Cholesterol and bile acids regulate xenosensor signaling in drug-mediated induction of cytochromes P450. *J Biol Chem* 277:29561-29567.

Hankinson O. 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:307-340.

Hardell L, Lindstrom G, van Bavel B, Wingfors H, Sundelin E, Liljegren G. 1998. Concentrations of the flame retardant 2,2',4,4'-tetrabrominated diphenyl ether in human adipose tissue in Swedish persons and the risk for non-Hodgkin's lymphoma. *Oncol Res* 10:429-432.

Hayakawa K, Takatsuki H, Watanabe I, Sakai S. 2004. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polybrominated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans (PBDD/Fs) and monobromo-polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans (MoBPXDD/Fs) in the atmosphere and bulk deposition in Kyoto, Japan. *Chemosphere* 57:343-356.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. 2005. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88.

Hewitt NJ, Lechon MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, Kenna JG, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C, Guillouzo A, Tuschl G, Li AP, LeCluyse E, Groothuis GM, Hengstler JG. 2007. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39:159-234.

- Hill A, Howard CV, Strahle U, Cossins A. 2003. Neurodevelopmental defects in zebrafish (*Danio rerio*) at environmentally relevant dioxin (TCDD) concentrations. *Toxicol Sci* 76:392-399.
- Hill AJ, Bello SM, Prash AL, Peterson RE, Heideman W. 2004. Water Permeability and TCDD-Induced Edema in Zebrafish Early-Life Stages. *Toxicol Sci* 78:78-87.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. 2005. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicol Sci* 86:6-19.
- Hockings JK, Thorne PA, Kemp MQ, Morgan SS, Selmin O, Romagnolo DF. 2006. The ligand status of the aromatic hydrocarbon receptor modulates transcriptional activation of BRCA-1 promoter by estrogen. *Cancer Res* 66:2224-2232.
- Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X, Moore DD. 2006. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 312:233-236.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1997. Polychlorinated Dibenzo-*para*-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. Summary of Data Reported and Evaluation. Volume 69
- Jiang JG, Ning YG, Chen C, Ma D, Liu ZJ, Yang S, Zhou J, Xiao X, Zhang XA, Edin ML, Card JW, Wang J, Zeldin DC, Wang DW. 2005. Cytochrome p450 epoxigenase promotes human cancer metastasis. *Cancer Res* 67:6665-6674.
- Klinke R und Silbernagl S. 2005. Lehrbuch der Physiologie. 4. korrigierte Auflage. Thieme Verlag.
- Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA, Guzelian PS. 1995. Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 23:415-421.
- Kodavanti PR, Ward TR, Ludewig G, Robertson LW, Birnbaum LS. 2005. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) effects in rat neuronal cultures: 14C-PBDE accumulation, biological effects, and structure-activity relationships. *Toxicol Sci* 88:181-192.
- Kodavanti PR, Derr-Yellin EC. 2002. Differential Effects of Polybrominated Diphenyl Ethers and Polychlorinated Biphenyls on [3H]Arachidonic Acid Release in Rat Cerebellar Granule Neurons. *Toxicol Sci* 68:451-457.
- Kolluri SK, Weiss C, Koff A, Gottlicher M. 1999. p27Kip1 induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev* 13:1742-1753.
- Kuiper RV, Bergman A, Vos JG, van den BM. 2004. Some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants with wide environmental distribution inhibit TCDD-induced EROD activity in primary cultured carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes. *Aquat Toxicol* 68:129-139.
- Kuiper RV, Murk AJ, Leonards PE, Grinwis GC, van den BM, Vos JG. 2006. In vivo and in vitro Ah-receptor activation by commercial and fractionated pentabromodiphenylether using zebrafish (*Danio rerio*) and the DR-CALUX assay. *Aquat Toxicol* 79:366-375.
- Kwak HI, Gustafson T, Metz RP, Laffin B, Schedin P, Porter WW. 2007. Inhibition of breast cancer growth and invasion by single-minded 2s. *Carcinogenesis* 28:259-266.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Law RJ, Alaee M, Allchin CR, Boon JP, Lebeuf M, Lepom P, Stern GA. 2003. Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife. *Environ Int* 29:757-770.
- LeCluyse EL. 2001. Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 134:283-289.
- Lema SC, Schultz IR, Scholz NL, Incardona JP, Swanson P. 2007. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquat Toxicol* 82:296-307.
- LfU B-W 1995. Stoffbericht Polychlorierte Biphenyle (PCB). Red.: K.T. v.d. Trenck, in: "Texte und Berichte zur Altlastenbearbeitung, Band 16, 1995" von H. Fiedler, Ch. Lau, S. Schulz, C. Wagner, O. Hutzinger & K.T. v.d. Trenck, im Auftrag der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, Mai 95
- Lilienthal H, Hack A, Roth-Harer A, Grande SW, Talsness CE. 2006. Effects of developmental exposure to 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environ Health Perspect* 114:194-201.

- Lindros KO, Oinonen T, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. 1997. Selective Centrilobular Expression of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Rat Liver. *J Pharmacol Exp Ther* 280:506-511.
- Malmvarn A, Zebuhr Y, Jensen S, Kautsky L, Greyerz E, Nakano T, Asplund L. 2005 A. Identification of polybrominated dibenzo-p-dioxins in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the Baltic Sea. *Environ Sci Technol* 39:8235-8242.
- Malmvarn A, Marsh G, Kautsky L, Athanasiadou M, Bergman A, Asplund L. 2005 B. Hydroxylated and methoxylated brominated diphenyl ethers in the red algae *Ceramium tenuicorne* and blue mussels from the Baltic Sea. *Environ Sci Technol* 39:2990-2997.
- Marlowe JL, Puga A. 2005. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J Cell Biochem* 96:1174-1184.
- Mason G, Zacharewski T, Denomme MA, Safe L, Safe S. 1987. Polybrominated dibenzo-p-dioxins and related compounds: quantitative in vivo and in vitro structure-activity relationships. *Toxicology* 44:245-255.
- McKinney MA, De Guise S, Martineau D, Beland P, Arukwe A, Letcher RJ. 2005. Biotransformation of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and rat mammalian model using an in vitro hepatic microsomal assay. *Aquatic Toxicology* In Press, Corrected Proof.
- Meerts IA, van Zanden JJ, Luijckx EA, Leeuwen-Bol I, Marsh G, Jakobsson E, Bergman A, Brouwer A. 2000. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicol Sci* 56:95-104.
- Meerts IA, Letcher RJ, Hoving S, Marsh G, Bergman A, Lemmen JG, van der BB, Brouwer A. 2001. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ Health Perspect* 109:399-407.
- Meier V, Tron K, Batusic D, Elmaouhoub A, Ramadori G. 2006. Expression of AFP and Rev-Erb A/Rev-Erb B and N-CoR in fetal rat liver, liver injury and liver regeneration. *Comp Hepatol* 5:2/doi:10.1186/1476-5926-5-2.
- Meironyte GD, Bergman A, Noren K. 2001. Polybrominated diphenyl ethers in Swedish human liver and adipose tissue. *Arch Environ Contam Toxicol* 40:564-570.
- Meng X, Peng B, Shi J, Zheng Y, Chen H, Zhang J, Li L, Zhang C. 2006. Effects of overexpression of Sim2 on spatial memory and expression of synapsin I in rat hippocampus. *Cell Biol Int* 30:841-847.
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ. 2007. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15735-15740.
- Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13:20-25.
- Mitchell KA, Lockhart CA, Huang G, Elferink CJ. 2006. Sustained aryl hydrocarbon receptor activity attenuates liver regeneration. *Mol Pharmacol* 70:163-170.
- Miyan J, Zendah M, Mashayekhi F, Owen-Lynch PJ. 2006. Cerebrospinal fluid supports viability and proliferation of cortical cells in vitro, mirroring in vivo development. *Cerebrospinal Fluid Research* 3:2/ doi:10.1186/1743-8454-3-2.
- Moennikes O, Loeppen S, Buchmann A, Andersson P, Ittrich C, Poellinger L, Schwarz M. 2004. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res* 64:4707-4710.
- Moir RD, Spann TP, Goldman RD. 1995. The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. *Int Rev Cytol* 162B:141-182.
- Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA. 2000 A. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7500-7502.
- Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Liddle C, Blanchard SG, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA. 2000 B. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem* 275:15122-15127.

- Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, Lambert MH, Moore JT. 2002. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 16:977-986.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.
- Nagel R. 2002. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19 Suppl 1:38-48.
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 59:65-85.
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* 279:23847-23850.
- Nebert DW, Dalton TP. 2006. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 6:947-960.
- Nelson DR. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* 369:1-10.
- Nishio SI, Kakizawa T, Chatelain G, Triqueneaux G, Brunet F, Rambaud J, Lamonerie T, Laudet V. 2007. Otx5 regulates pineal expression of the zebrafish REV-ERB $\alpha$  through a new DNA binding site. *Mol Endocrinol*. Online publication. doi:10.1210/me.2007-0170
- Noren K, Meironyte D. 2000. Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years. *Chemosphere* 40:1111-1123.
- NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Decabromodiphenyl Oxide (CAS No. 1163-19-5) In F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). 1986. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 309:1-242.
- Oesch-Bartlomowicz B, Huelster A, Wiss O, ntoniou-Lipfert P, Dietrich C, Arand M, Weiss C, Bockamp E, Oesch F. 2005. Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: Divergent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9218-9223.
- Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446[7135], 562-566. 29-3-2007.
- Ongwijitwat S, Wong-Riley MT. 2004. Functional analysis of the rat cytochrome c oxidase subunit 6A1 promoter in primary neurons. *Gene* 337:163-171.
- Orn U, Klasson-Wehler E. 1998. Metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in rat and mouse. *Xenobiotica* 28:199-211.
- Pacyniak EK, Cheng X, Cunningham ML, Crofton K, Klaassen CD, Guo GL. 2007. The flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, are pregnane X receptor activators. *Toxicol Sci* 97:94-102.
- Peters AK, van Londen K, Bergman A, Bohonowych J, Denison MS, van den BM, Sanderson JT. 2004. Effects of polybrominated diphenyl ethers on basal and TCDD-induced ethoxyresorufin activity and cytochrome P450-1A1 expression in MCF-7, HepG2, and H4IIE cells. *Toxicol Sci* 82:488-496.
- Peters AK, Nijmeijer S, Gradin K, Backlund M, Bergman A, Poellinger L, Denison MS, van den BM. 2006 A. Interactions of polybrominated diphenyl ethers with the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Toxicol Sci* 92:133-142.
- Peters AK, Sanderson JT, Bergman A, van den BM. 2006 B. Antagonism of TCDD-induced ethoxyresorufin-O-deethylation activity by polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in primary cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) hepatocytes. *Toxicol Lett* 164:123-132.
- Pitot HC, Goldsworthy T, Campbell HA, Poland A. 1980. Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res* 40:3616-3620.
- Pollenz RS. 2002. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chemico-Biological Interactions* 141:41-61.

- Prasch AL, Teraoka H, Carney SA, Dong W, Hiraga T, Stegeman JJ, Heideman W, Peterson RE. 2003. Aryl Hydrocarbon Receptor 2 Mediates 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Developmental Toxicity in Zebrafish. *Toxicol Sci* 76:138-150.
- Prasch AL, Andreasen EA, Peterson RE, Heideman W. 2004. Interactions between 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and Hypoxia Signaling Pathways in Zebrafish: Hypoxia Decreases Responses to TCDD in Zebrafish Embryos. *Toxicol Sci* 78:68-77.
- Puga A, Marlowe J, Barnes S, Chang CY, Maier A, Tan Z, Kerzee JK, Chang X, Strobeck M, Knudsen ES. 2002. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology* 181-182:171-177.
- Puga A, Tomlinson CR, Xia Y. 2005. Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem Pharmacol* 69:199-207.
- Puga A, Maier A, Medvedovic M. 2000. The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochemical Pharmacology* 60:1129-1142.
- Qatanani M, Moore DD. 2005. CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease. *Curr Drug Metab* 6:329-339.
- Qatanani M, Zhang J, Moore DD. 2005. Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* 146:995-1002.
- Ramakrishnan SN, Muscat GE. 2006. The orphan Rev-erb nuclear receptors: a link between metabolism, circadian rhythm and inflammation? *Nucl Recept Signal* 4:e009/ doi: 10.1621/nrs.04009.
- Rubie C, Frick VO, Wagner M, Rau B, Weber C, Kruse B, Kempf K, Tilton B, Konig J, Schilling M. 2006 A. Enhanced expression and clinical significance of CC-chemokine MIP-3 alpha in hepatocellular carcinoma. *Scand J Immunol* 63:468-477.
- Rubie C, Frick VO, Wagner M, Weber C, Kruse B, Kempf K, Konig J, Rau B, Schilling M. 2006 B. Chemokine expression in hepatocellular carcinoma versus colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 12:6627-6633.
- Sanders JM, Burka LT, Smith CS, Black W, James R, Cunningham ML. 2005. Differential Expression of CYP1A, 2B, and 3A Genes in the F344 Rat following Exposure to a Polybrominated Diphenyl Ether Mixture or Individual Components. *Toxicol Sci* 88:127-133.
- Santagati F, Minoux M, Ren SY, Rijli FM. 2005. Temporal requirement of Hoxa2 in cranial neural crest skeletal morphogenesis. *Development* 132:4927-4936.
- Schmidt JV, Bradfield CA. 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:55-89.
- Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. 1996. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6731-6736.
- Seglen PO. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13:29-83.
- Seglen PO. 1979. Hepatocyte suspensions and cultures as tools in experimental carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health* 5:551-560.
- Sherr CJ. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60:3689-3695.
- Schier AF, Neuhauss SC, Harvey M, Malicki J, Solnica-Krezel L, Stainier DY, Zwartkruis F, Abdelilah S, Stemple DL, Rangini Z, Yang H, Driever W. 1996. Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development* 123:165-178.
- Shivji MK, Davies OR, Savill JM, Bates DL, Pellegrini L, Venkitaraman AR. 2006. A region of human BRCA2 containing multiple BRC repeats promotes RAD51-mediated strand exchange. *Nucleic Acids Res* 34:4000-4011.
- Sjodin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Kronholm-Diab K, Jakobsson E, Bergman A. 1999. Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. *Environ Health Perspect* 107:643-648.
- Sjodin A, Patterson DG, Jr., Bergman A. 2003. A review on human exposure to brominated flame retardants--particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environ Int* 29:829-839.

- Smeyne M, Boyd J, Raviie SK, Jiao Y, Pond BB, Hatler M, Wolf R, Henderson C, Smeyne RJ. 2007. GSTpi expression mediates dopaminergic neuron sensitivity in experimental parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1977-1982.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Spector AA, Norris AW. 2007. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C996-1012.
- Staskal DF, Diliberto JJ, Birnbaum LS. 2006 A. Disposition of BDE 47 in developing mice. *Toxicol Sci* 90:309-316.
- Staskal DF, Diliberto JJ, Birnbaum LS. 2006 B. Impact of repeated exposure on the toxicokinetics of BDE 47 in mice. *Toxicol Sci* 89:380-385.
- Staskal DF, Hakk H, Bauer D, Diliberto JJ, Birnbaum LS. 2006 C. Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in mice. *Toxicol Sci* 94:28-37.
- Steenland K, Bertazzi P, Baccarelli A, Kogevinas M. 2004. Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environ Health Perspect* 112:1265-1268.
- Stoker TE, Laws SC, Crofton KM, Hedge JM, Ferrell JM, Cooper RL. 2004. Assessment of DE-71, a Commercial Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Mixture, in the EDSP Male and Female Pubertal Protocols. *Toxicol Sci* 78:144-155.
- Strack S, Detzel T, Wahl M, Kuch B, Krug HF. 2007. Cytotoxicity of TBBPA and effects on proliferation, cell cycle and MAPK pathways in mammalian cells. *Chemosphere* 67:S405-S411.
- Takigami H, Sakai S, Brouwer A. 2005. Bio/chemical analysis of dioxin-like compounds in sediment samples from Osaka Bay, Japan. *Environ Technol* 26:459-469.
- Tijet N, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB, Tuomisto J, Pohjanvirta R. 2006. Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Mol Pharmacol* 69:140-153.
- Timme-Laragy AR, Levin ED, Di Giulio RT. 2006. Developmental and behavioral effects of embryonic exposure to the polybrominated diphenylether mixture DE-71 in the killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Chemosphere* 62:1097-1104.
- Timsit YE, Negishi M. 2007. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* 72:231-246.
- Ton C, Lin Y, Willett C. 2006. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76:553-567.
- Tseng HP, Hseu TH, Buhler DR, Wang WD, Hu CH. 2005. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. *Toxicol Appl Pharmacol* 205:247-258.
- Tuomisto J. 2005. Does mechanistic understanding help in risk assessment-the example of dioxins. *Toxicol Appl Pharmacol* 207:2-10.
- Vezina CM, Walker NJ, Olson JR. 2004. Subchronic exposure to TCDD, PeCDF, PCB126, and PCB153: effect on hepatic gene expression. *Environ Health Perspect* 112:1636-1644.
- Viberg H, Fredriksson A, Eriksson P. 2002. Neonatal exposure to the brominated flame retardant 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether causes altered susceptibility in the cholinergic transmitter system in the adult mouse. *Toxicol Sci* 67:104-107.
- Viberg H, Fredriksson A, Eriksson P. 2003 A. Neonatal exposure to polybrominated diphenyl ether (PBDE 153) disrupts spontaneous behaviour, impairs learning and memory, and decreases hippocampal cholinergic receptors in adult mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 192:95-106.
- Viberg H, Fredriksson A, Jakobsson E, Orn U, Eriksson P. 2003 B. Neurobehavioral derangements in adult mice receiving decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) during a defined period of neonatal brain development. *Toxicol Sci* 76:112-120.
- Viberg H, Fredriksson A, Eriksson P. 2004. Investigations of strain and/or gender differences in developmental neurotoxic effects of polybrominated diphenyl ethers in mice. *Toxicol Sci* 81:344-353.

- Viberg H, Johansson N, Fredriksson A, Eriksson J, Marsh G, Eriksson P. 2006. Neonatal exposure to higher brominated diphenyl ethers, hepta-, octa-, or nonabromodiphenyl ether, impairs spontaneous behavior and learning and memory functions of adult mice. *Toxicol Sci* 92:211-218.
- Viberg H, Fredriksson A, Eriksson P. 2007. Changes in spontaneous behaviour and altered response to nicotine in the adult rat, after neonatal exposure to the brominated flame retardant, decabrominated diphenyl ether (PBDE 209). *Neurotoxicology* 28:136-142.
- Vos JG, Becher G, van den Berg M, de Boer J, Leonards PEG. 2003. Brominated flame retardants and endocrine disruption. *Pure Appl Chem* 75(11-12): 2039-2046.
- Wang L, Yao J, Chen L, Chen J, Xue J, Jia W. 2007. Expression and possible functional roles of cytochromes P450 2J1 (zfCyp 2J1) in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 352:850-855.
- Warner M, Eskenazi B, Olive DL, Samuels S, Quick-Miles S, Vercellini P, Gerthoux PM, Needham L, Patterson DG, Mocarelli P. 2007. Serum dioxin concentrations and quality of ovarian function in women of Seveso. *Environ Health Perspect* 115:336-340.
- Watanabe I, Sakai S. 2003. Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environ Int* 29:665-682.
- Watanabe K, Senthilkumar K, Masunaga S, Takasuga T, Iseki N, Morita M. 2004. Brominated organic contaminants in the liver and egg of the common cormorants (*Phalacrocorax carbo*) from Japan. *Environ Sci Technol* 38:4071-4077.
- Weber R, Kuch B. 2003. Relevance of BFRs and thermal conditions on the formation pathways of brominated and brominated-chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans. *Environ Int* 29:699-710.
- Weiss C, Kolluri SK, Kiefer F, Gottlicher M. 1996. Complementation of Ah Receptor Deficiency in Hepatoma Cells: Negative Feedback Regulation and Cell Cycle Control by the Ah Receptor. *Experimental Cell Research* 226:154-163.
- Weiss C, Faust D, Durk H, Kolluri SK, Pelzer A, Schneider S, Dietrich C, Oesch F, Gottlicher M. 2005. TCDD induces c-jun expression via a novel Ah (dioxin) receptor-mediated p38-MAPK-dependent pathway. *Oncogene* 24:4975-4983.
- Weiss C, Faust D, Schreck I, Ruff A, Farwerck T, Melenberg A, Schneider S, Oesch-Bartlomowicz B, Zatloukalova J, Vondracek J, Oesch F, Dietrich C. 2007. TCDD deregulates contact inhibition in rat liver oval cells via Ah receptor, JunD and cyclin A. *Oncogene*/ doi: 10.1038/sj.onc.1210859.
- Wentworth JN, Buzzeo R, Pollenz RS. 2004. Functional characterization of aryl hydrocarbon receptor (zfAHR2) localization and degradation in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochemical Pharmacology* 67:1363-1372.
- Westerfield M. 2003. *The Zebrafish book*. University of Oregon Press.
- Whitlock JP, Jr. 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:103-125.
- Wilkening S, Stahl F, Bader A. 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* 31:1035-1042.
- Willson TM, Kliewer SA. 2002. PXR, CAR and drug metabolism. *Nat Rev Drug Discov* 1:259-266.
- Wolfe D, Marotzki S, Dartsch D, Schafer W, Marquardt H. 2000. Induction of cyclooxygenase expression and enhancement of malignant cell transformation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin. *Carcinogenesis* 21:15-21.
- Yang F, Bleich D. 2004. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 gene in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 279:35403-35411.
- Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362.
- Yang L. 2007. Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo. PhD thesis. University of Heidelberg.
- Yang L, Kemadjou JR, Zinsmeister C, Legradi J, Bauer M, Muller F, Pankratz M, Jakel J, Straehle U. 2007. Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo. *Genome Biol* 8:R227/doi:10.1186/gb-2007-8-10-r227.

- Yu AM, Fukamachi K, Krausz KW, Cheung C, Gonzalez FJ. 2005. Potential role for human cytochrome P450 3A4 in estradiol homeostasis. *Endocrinology* 146:2911-2919.
- Zeldin DC. 2001. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* 276:36059-36062.
- Zhang J, D'Ercole AJ, Underwood LE. 2000. Identification of a new gene (rat TM6P1) encoding a fasting-inducible, integral membrane protein with six transmembrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1492:280-284.
- Zhou T, Ross DG, DeVito MJ, Crofton KM. 2001. Effects of Short-Term in Vivo Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers on Thyroid Hormones and Hepatic Enzyme Activities in Weanling Rats. *Toxicol Sci* 61:76-82.
- Zhou T, Taylor MM, DeVito MJ, Crofton KM. 2002. Developmental Exposure to Brominated Diphenyl Ethers Results in Thyroid Hormone Disruption. *Toxicol Sci* 66:105-116.
- Zinsmeister C. 2007. Development of a microarray-based toxicogenomic Biosensor. Diploma thesis. Fachhochschule Weihenstephan.
- Zodrow JM, Tanguay RL. 2003. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Inhibits Zebrafish Caudal Fin Regeneration. *Toxicol Sci* 76:151-161.
- Zon LI, Peterson RT. 2005. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 4:35-44.



# Anhänge

## Abkürzungen

AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AhRR	AhR-Repressor
Aldh	Aldehyd-Dehydrogenase
ARNT	AhR-Nukleärer-Translokator
BDE47	2,2',4,4'-Tetrabromdiphenylether
BDE47 <sup>hg</sup>	2,2',4,4'-Tetrabromdiphenylether <i>hochgereinigt (hg)</i>
BDE99	2,2',4,4',5-Pentabromdiphenylether
BDE153	2,2',4,4',5,5'-Hexabromdiphenylether
BDE209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-Decabromdiphenylether
BFR	bromierte Flammschutzmittel ( <i>Brominated Flame Retardants</i> )
bHLH	<i>basic helix/loop/helix</i> -Motiv
βNF	beta-Naphtoflavon
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
CAR	konstitutiver Androstan-Rezeptor
Ccl20	Chemokin-(CC-Motiv)-Ligand 20
Ccna2	Cyclin A2
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CKI	CDK-Inhibitor
Cox2	Cyclooxygenase 2
Cox6A	Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit 6A1
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
CYP1A1	Cyp1A1-Protein
Cyp1A1	Cytochrom-P450-Monooxygenase 1A1
Cyp2B1	Cytochrom-P450-Monooxygenase 2B1
Cyp2F2	Cytochrom-P450-Monooxygenase 2F2
Cyp2J2	Cytochrom-P450-Monooxygenase 2J2
Cyp3A1/3	Cytochrom-P450-Monooxygenase 3A1/3
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
DIC	differentieller Interferenz-Kontrast
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i> -Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	effektive Konzentration mit 50 % der max. Wirkung
FCS	fötales Kälberserum
FSM	Flammschutzmittel
Gst2A	Glutathion-S-Transferase 2A
HBCD	Hexabromcyclododecan
hpf	Stunden nach Befruchtung ( <i>hours post fertilization</i> )
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
p21 <sup>Cip1</sup>	CDK-Inhibitor 1A
p27 <sup>Kip1</sup>	CDK-Inhibitor 1B
PBDD	polybromierte Dibenzodioxine
PBDE	polybromierte Diphenylether
PBDF	polybromierte Dibenzofurane
PCB	polychlorierte(s) Biphenyl(e)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PI	Propidiumiodid
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
qPCR	quantitative PCR ( <i>real-time</i> )
siRNA	<i>short interference</i> -RNA
TBBPA	Tetrabrombisphenol A

TBDF	2,3,7,8-Tetrabromdibenzofuran
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TCPOBOP	1,4-Bis[2-(3,5-dichlorpyridoloxyl)]benzen

## Material und Methoden

### *Chemikalien*

Für die Untersuchungen wurde mit einer Auswahl der wichtigsten weltweit in der Umwelt gefundenen PBDE-Kongenere in Form von Reinsubstanzen begonnen. Die PBDE-Kongenere BDE47, BDE99, BDE153 und BDE209 wurden von Dr. Bertram Kuch im Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart (Leitung durch Prof. Metzger) synthetisiert, gereinigt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Eine weitere Probe BDE47<sup>hg</sup> (hg steht für hochgereinigt) wurde freundlicherweise von Prof. Åke Bergman, Institut für Umweltchemie, Wallenberg Labor, Universität Stockholm, Schweden, zur Verfügung gestellt.

### *Zellkultur*

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärent wachsenden Zellkulturen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) kultiviert, unter Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (*Fetal calf serum*, FCS). Die Kulturmedien und deren Zusätze wurden stets steril filtriert (Bottle Top Filter, 0,22 µm Porenweite, Millipore, Bedford, USA) und die Zellen bei 37 °C und 8 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem Brutschrank (Typ B5061 EK/CO<sub>2</sub>) der Firma Heraeus Christ (Fellbach) kultiviert. Die Zellkulturgefäße wurden von der Firma Nunc (Wiesbaden), Medien sowie alle Medienzusätze von der Firma Gibco Life Technologies (Karlsruhe) bezogen. Die Kultivierung adhärenter Zellen erfordert ein kontinuierliches Wachstum im subkonfluenten Bereich, weshalb die Zellen wöchentlich passagiert wurden. Dabei wurde altes Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit 1 x PBS (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) gewaschen und anschließend mit Trypsin (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) vom Zellkultur-Flaschenboden abzulösen. Nach Abstoppen dieser Prozedur mit Medium nach 2-10 min im Brutschrank bei 37 °C wurden die Zellen dann bei 350 x g (Heraeus Chrst, Fellbach) sedimentiert, in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl ermittelt (Casy, Schärfe Systems, Reutlingen).

### *Ratten-Hepatom-Zelllinien 5L (AhR+) und BP8 (AhR-)*

Die Ratten-Hepatom Zelllinie 5L wurde bereits in der Literatur als ein ideales System zum Studium molekular-toxikologische Mechanismen des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR) beschrieben (Weiss et al. 1996). Eine AhR-vermittelte Induktion des Fremdstoffmetabolismus und eine Störung der Zellzyklusregulation konnten in dieser Zelllinie nach Exposition gegenüber Dioxin (TCDD) demonstriert werden. Eine Variante der 5L-Zellen, die BP8-Zellen, exprimieren keinen AhR mehr. Durch Experimente in 5L und den AhR-defizienten BP8 kann auf die AhR-Abhängigkeit beobachteter Effekte geschlossen werden. Beide Zelllinien sind eine freundliche Gabe von Dr. Carsten Weiss (ITG, FZK) und Dr. Martin Göttlicher (GSF, München).

### *Die humane Hepatozyten-Zelllinie HepG2*

Die humane Zelllinie HepG2 entstammt der Amerikanischen Zellkulturen-Sammlung (ATCC, HepG2 HB-8065). Diese Zelllinie wurde aus einem Hepatozellulären Karzinom eines männlichen Kaukasiers isoliert. Die Kultivierung erfolgte unter denselben Bedingungen wie 5L- und BP8-Zellen in DMEM ergänzt mit 10 % FCS (v/v). Hier wurden Antibiotika (1 % Penicillin und Streptomycin (v/v); Gibco Life Technologies, Karlsruhe) zugegeben.

### *Bestimmung der Zellzahl*

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einem Casy®1 Cell Counter (Schärfe Systems, Reutlingen). Hierzu wurden die adhären Zellen abgelöst und vereinzelt. Die Zellen wurden für die Messung entsprechend 1:100 mit Casyton® verdünnt. Die Methode der Zellzahlerfassung basiert auf einer Widerstandsmessung über die Membran der Zellen, wobei sich geschädigte Zellen von vitalen unterscheiden lassen. Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben.

### *Langzeitkonservierung und Auftauen von Zellen*

Die Langzeitlagerung der verwendeten Ratten-Zelllinien 5L und BP8, sowie der humanen Zelllinie HepG2 erfolgte durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Ein weiterer Vorteil dieser Art der Aufbewahrung ist Schutz vor durch Kontamination bedingtem Verlust der Zellkultur sowie vor genetischen Veränderungen. Proliferation und Stoffwechselaktivität kommen durch die extrem niedrige Temperatur des Stickstoffs zum Erliegen. Das Einfrieren von Zellen ist ein langsamer

Prozess, die Einfriergeschwindigkeit beträgt 1°C pro Minute. Der Zellkultur werden hierbei 10 % DMSO oder Glycerin beigemischt, um so die Problematik der Kristallbildung zu unterbinden, welche zur Schädigung der Zelle führen würde. Dieser Vorgang ist reversibel und die Zellen können nach Bedarf wieder aufgetaut werden. Hierzu wurden die Zellen ein bis zwei Wochen kultiviert, bevor sie für Versuche eingesetzt wurden. Der Einfrier-Prozess wurde in dem Gefriergefäß Cryo1°C-Freezing Container (Nalgene™, Labware, USA) durchgeführt. Dieses wird mit Isopropanol gefüllt und bei 4°C bis zu seiner Verwendung vorgekühlt. Die Zelllinien wurden mit einer von Zellzahl  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml eiskaltem Medium (inkl. 10% DMSO) eingefroren. Zunächst für zwei Stunden bei -20°C und dann bei -80°C über Nacht gelagert. Die Langzeitkonservierung (Monate bis Jahre) erfolgte dann in den Kryogefäßen in flüssigem Stickstoff.

### *Isolation und Kultivierung primärer Hepatozyten der Ratte*

Die Isolation primärer Hepatozyten der Ratte erfolgte nach einer von Seglen (1976 und 1979) beschriebenen Methode. Die Tiere stammen aus eigener Zucht der Tierställe des ITG (FZK). Es wurden männliche Tiere des Rattenstamms BDX verwendet, die zum Zeitpunkt der Isolation 6-8 Wochen alt und ca. 190-220 g schwer waren. Die Isolation der Hepatozyten geschah in Kooperation mit dem Institut für Biologische Grenzflächen (IBG, FZK) mit freundlicher Unterstützung von Brigitte Lahni.

Einstellen des pH-Wertes auf 7,36-7,4 mit NaOH, ad 500 ml L15-Medium: Nach erfolgreicher Isolation und einer Vitalität der primären Hepatozyten von mindestens 85 % wurden die Zellen über Nacht auf zuvor mit 10 µg/cm<sup>2</sup> Collagen (Typ I aus dem Rattenschwanz; Roche Diagnostics, Penzberg) beschichteten Kulturschalen (Nunc, Wiesbaden) ausgebracht und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 8 % CO<sub>2</sub> anwachsen gelassen. Die Inkubation der Hepatozyten erfolgte mit wiederholter Gabe verschiedener Toxine für 72 h bis zur Ernte. Die Zusammensetzung des Mediums ist komplexer als bei der Kultivierung etablierter Zelllinien.

### *Gewinnung und Kultur von Embryonen des Zebrafischlings (Danio rerio)*

Wildtyp-Stämme des Zebrafischlings *Danio rerio* wurden nach der von Westerfield (2003) beschriebenen Methode in der Institutsinternen Einrichtung der Fischzucht (FZK) kultiviert. Die Wildtyp-Stämme „AB“, „AB0“ und „Tübingen“ des Zebrafischlings wurden für die Experimente verwendet. Embryonen wurden in Embryo-Medium (60 µg/ml Instant Ocean, Red Sea Ltd., TX, USA) kultiviert. Die Aufzucht und Gewinnung der Embryonen erfolgte freundlicherweise unter Hilfestellung von Dr. Lixin Yang (ITG, FZK).

### *Morphologische Studien und Microarrays*

Der experimentelle Ansatz mit Embryonen erfolgte wie von Yang und Kollegen beschrieben (2007). Für morphologische Studien wurden je 20 Embryonen in 6-well Kulturschalen (Nunc, Wiesbaden) in 4 ml Embryo-Medium angesetzt. Die Exposition gegenüber verschiedenen Toxinen erfolgte im Embryo-Medium zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation. Bei einer frühen Exposition wurden die Embryonen 4-24 hpf (*hours post fertilization*) exponiert, eine einem späteren Zeitpunkt von 96-144 hpf. Die photographische Dokumentation der morphologischen Studien erfolgte in einem LEICA MZ16F Stereomikroskop und Kamerasystem (Leica Microsystems, Wetzlar), die frühe Exposition nach 72 hpf, die späte Exposition nach 144 hpf. Die Kultivierung von Embryonen für Microarray-Experimente erfolgt in 15 cm-Petrischalen (Nunc, Wiesbaden) in einem Volumen von 50 ml. Diese Experimente wurden für die verunreinigte BDE47-Mischung und das hochreine Kongener BDE47<sup>hg</sup> durchgeführt. Die Konzentrationen wurden so eingestellt, dass möglichst wenig Embryonen starben. Die wenigen Toten der Inkubationen wurden verworfen und nicht in die Auswertung einbezogen.

### *MTT-Vitalitäts-Assay:*

Dieser Vitalitätstest beruht methodisch auf der Bestimmung der enzymatischen Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen anhand des Farbstoffs MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol 2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid), wie von Mosmann beschrieben (Mosmann 1983). Die indirekte Messung der Stoffwechsel-aktivität ergibt ein Maß für die Vitalität der Zellen. Der Ansatz der Zellen für die MTT-Vitalitätsbestimmung erfolgte in 96well Platten (Nunc, Wiesbaden) mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen pro well und einem Volumen von 100 µl Zellkulturmedium. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte nach 24 h Inkubation mit den verschiedenen Chemikalien. Die Zellen wurden dann mit 20 µl Triton X-100 10 % (Endkonzentration 1 %) für 1 h inkubiert und die 96well Platten anschließend bei 350 x g und RT zentrifugiert. Dann wurden je 200 µl MTT-Inkubationspuffer (10 %) aus HBSS-Puffer (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) und MTT-Stocklösung (5 mg/ml) zugegeben und für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Lyse der Zellen wurde durch Zugaben von 60 µl 20 %ige SDS-Lösung in 0,02 M HCl über Nacht durchgeführt, dann wurden die Proben erneut bei 350 x g zentrifugiert und die Überstände bei 550 nm im Absorptionsreader gemessen. LDH-Zytotoxizitäts-Assay Dieser Vitalitäts- bzw. Zytotoxizitäts-Assay misst die Aktivität der zytoplasmatischen Laktat-Dehydrogenase (LDH) als Maß für die Integrität der Zellmembran. In dieser Arbeit wurde das LDH-Zytotoxizitäts Kit (Roche Diagnostics, Penzberg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Maß geschädigter Zellen wurde hier zum Einen auf die unbehandelten Kontrollen und zum Anderen auf eine mit 1 % Triton X-100 total lysierte Positivkontrolle bezogen. Die Proben wurden aus dem Überstand der Zellen nach 24 h Inkubation entnommen und nach Analyse mit dem LDH-Zytotoxizitäts Kit bei 500 nm im Absorptionsreader gemessen.

## *BrdU-Poliferations-Assay*

Der BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) Assay dient der quantitativen Erfassung der Zellproliferation. Die Messung des BrdU-Einbaus während der DNA-Synthese wird mit einem spezifischen Antikörper in einem Enzym-gekoppelten Immunodetektions-Assay (ELISA) Kit durchgeführt (Roche Diagnostics, Penzberg). Der Ansatz der Zellen erfolgte wie für den MTT-Assay beschrieben. Nach 24 h Inkubation mit verschiedenen toxischen Substanzen erfolgte nach Herstellerangaben eine Inkubation mit BrdU für ca. 2 h. Danach erfolgte die Fixierung und Denaturierung der Zellen, die Messung erfolgte bei 370 nm und die Referenz bei 492 nm Wellenlänge.

## *Bestimmung von Proteinkonzentrationen*

Die Proteinmengen von Zellextrakten wurden nach der Methode von Smith und Kollegen (1985) quantifiziert. Bei dieser Methode werden zu der Probenlösung eine frisch angesetzte Bicinchoninsäure (BCA)/Kupfersulfatlösung (Verhältnis 50:1 BCA (Pierce, Illinois, USA) und 4 %ige CuSO<sub>4</sub> Lösung) zugegeben. Die Methode beruht auf der Komplexbildung von Proteinen mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen in alkalischer Lösung unter Bildung eines violetten Farbkomplex bilden, der bei 562 nm im Absorptionsreader messbar ist. Die zu messenden Protein-Proben werden in BCA-Reagenz gegeben (Verhältnis 20:1 BCA Reagenz zur Probe) Die Konzentrationen wurden nach Messung mithilfe der SOFTmax®PRO Software (Molecular Devices, USA) ausgewertet.

## *Herstellung von Ganzzellextrakten*

Nach Beendigung einer Inkubation wurden die Zellen mit Trypsin und anschließendem Waschen geerntet. Nach wiederholtem Waschen der Zellen und Sedimentieren, wurden diese direkt in Lysis-puffer aufgenommen. Der Lysispuffer wurde stets frisch mit Protease-Inhibitoren versetzt. Die Lyse erfolgt für 1-2 h auf Eis mit anschließender Sedimentierung der Zelldebris bei 20.800 x g (4 °C) in einer Tischzentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg). Nach Überführen des Überstandes, welcher den Zellextrakt beinhaltet, erfolgt eine Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay. Für nachfolgende Versuche wurden die Proteinmengen eingestellt und mit 2 x Laemmli- Puffer 1:1 (v/v) versetzt und mit einer Mischung von 1:1 (v/v) 2 x Laemmli-Puffer und Lysispuffer auf das endgültige Volumen eingestellt. Die Proteinproben wurden dann vor der Weiterverarbeitung für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt oder kurzfristig bei -20 °C bzw. längerfristig bei -80 °C gelagert.

## *Trennung von Zytosol- und Kernextrakten*

Zum Nachweis der Translokation des Transkriptionsfaktors AhR vom Zytosol in den Nukleus wurden 2x10<sup>6</sup> Zellen in 10 cm Petrischalen (Nunc, Wiesbaden) in 5 ml Zellkultur-Medium mit toxischen Substanzen inkubiert. Nach 1-3 h wurden die Zellen durch Abschaben mit einem sterilen Zellschaber (Nunc, Wiesbaden) geerntet und durch Zentrifugation sedimentiert (350 x g). Anschließend wurde das Pellet mehrmals gewaschen und nach Absaugen des Überstandes in einem hypotonen Kernlysis-Puffer (100 µl) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 3 µl von 10 %igem NP-40 (Endkonzentration 0,3 %) und kräftigem Mischen mit einem Laborvortex (Vortex Genie 2, Scientific Industries, NY, USA) wurden die Zellen aufgebrochen. Nach Zentrifugation bei 9000 x g (4 °C) für 5 min wurden die noch intakten Kerne als glasiges Pellet sichtbar und konnten vom zytosolischen Überstand abgetrennt werden. Eine Überprüfung der Integrität der Kerne wurde im Lichtmikroskop vorgenommen. Die Lyse der Kerne erfolgt wie die Herstellung eines gesamten Zellextraktes durch Zugabe von Lysis-Puffer.

## *SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)*

Die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurde zur Auftrennung der Gesamt-Proteinextrakte eingesetzt (Laemmli 1970). Die Auftrennung der Gesamt-Proteinextrakte erfolgte in einem 5 %igen Sammelgel und je nach erwarteter Größe der zu untersuchenden Proteine in unterschiedlich konzentrierten Trenngelen (10 % und 12,5 % Acrylamid) bei einer angelegten Spannung von 170 V. Für die Herstellung der Gele wurde eine 30 %ige Acrylamid-Fertiglösung verwendet, welche bereits mit 0,8 % Bisacrylamid versetzt war (Rotiphorese® Gel 30, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe). Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammonium-persulfat (APS) wurden zum Start der Polymerisation zugegeben. Die Polymerisation der SDS-Gele sowie die Elektrophorese erfolgten in einem vertikalen Gel-Kammersystem (Bio-Rad, München). Als Größenstandard für die Auswertung und Beurteilung des Molekulargewichts anhand der Laufstrecke dient ein Protein-Marker mit verschiedenen Molekulargrößen (PageRuler Prestained Protein Marker 250-10 kDa; Peqlab, Erlangen).

## *Westernblot*

Die Trivialbezeichnung Westernblot bezeichnet das Protein-Blotting, d.h. den Transfer von Proteinen auf eine Membran und die anschließende Immundetektion mit spezifischen Antikörpern. In den vorliegenden Experimenten wurde ein nasses Elektro-Blotting Verfahren angewendet, bei dem zu blottende Proteingel komplett im Blot-Puffer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran für Fluoreszenz-Applikationen Immobilion-FL (Millipore, MA, USA) übertragen wird. Hierzu wird die Membran zuvor in reinstem Methanol aktiviert und H<sub>2</sub>O dest. gespült. Die Membran wurde zusammen

mit dem zu blottenden Protein-Gel mit je zwei Lagen Whatman-Papier (Bio-Rad, München) in eine Protein-Blotting-Apparatur (Bio-Rad, München) eingebaut und ca. 1-2 h (100 V) geblotet. Dieser Vorgang läuft unter ständiger Kühlung als Schutz vor Erwärmung der Proteine ab.

### *Immunologischer Nachweis von Proteinen*

Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran für Fluoreszenz-Applikationen (Millipore, NY, USA) wurde diese einige Minuten mit 1 x PBS Puffer ohne Detergenz gewaschen. Danach wurden durch 1 h Inkubation in originalem Odyssey-Blockierungspuffer (Li-Cor Bioscience, Bad Homburg) unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper erfolgte in einer Mixtur aus 1:1 Teilen Odyssey Puffer und 1 x PBS/T (PBS und 0,1 % Tween20 [v/v]) über Nacht bei 4 °C auf einem Schütteltisch und mehrmals wiederholtem Waschen in 1 x PBS/T. Die Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte dann für max.1 h bei RT im Dunkeln. Anschließendes Waschen in 1x PBS/T und die Lagerung in 1 x PBS erfolgten ebenfalls im Dunkeln. Die Auswertung der Signale wurde mit dem Odyssey® Infrarot Imaging Scanner durchgeführt (Li-Cor Bioscience, Bad Homburg).

### *DNA-Färbung*

Die Zellzyklusverteilung wurden in den Ratten-Hepatomzelllinien 5L und BP8 sowie in der humane Zelllinie HepG2 untersucht. Nach der Inkubation und Vereinzeln der Zellen erfolgte die Fixierung in 1 ml eiskaltem 1 x PBS Puffer aufgenommen durch langsames und tropfenweises Zugeben von eiskaltem Ethanol (-20 °C) für 1 h auf Eis. Nach dem Sedimentieren der Zellen bei 350 x g (4 °C) für 5 min und Entfernen aller Ethanol Spuren wurde das Pellet in wässriger DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindol)-Lösung (Partec CyStain® „DNA one Step“, Münster“) rehydratisiert und resuspendiert. Die Anfärbung der DNA erfolgte min. 30 min bis über Nacht bei 4 °C im Dunkeln.

### *Bestimmung der Zellzyklus-Phasenverteilung*

Die Proben wurden in einem BD LSR II-Durchflusszytometer mit UV-Laser (Becton Dickenson, CA, USA) analysiert und die gewonnenen Daten mit der CellQuest® Software (Becton Dickenson) prozessiert und statistisch mit Modfit® ausgewertet (Verity Software House Inc., Maine, USA). Jeder Messpunkt repräsentiert die Fluoreszenz von 30.000 gemessenen Ereignissen. Die Messung erfolgte bei einer Die Anregung erfolgte im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 358 nm, die Messung der Emission bei 461 nm.

### *Immunhistochemische Färbung fixierter Zellen*

Für den Nachweis der Translokation des AhRs nach Aktivierung in den Kern wurden 5L und BP8 Zellen so angesetzt, dass sie zum Zeitpunkt des Inkubationsstarts 80-90 % Konfluenz erreicht hatten. Das Ansetzen der Proben erfolgte in 24-well Platten (Nunc, Wiesbaden) mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro 1 ml auf sterilen Deckgläschen (Carl Roth, Karlsruhe). Nach Absaugen des Inkubationsmediums wurde die Probe mit kaltem 1 x PBS gewaschen und dann für 30 min in 4 %igem Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) auf Eis fixiert. Die Zellmembran wurde zur Detektion von intrazellulären Proteinen mit PBS/T (0,1 % Triton-X100) permeabilisiert und anschließend mit 1 x PBS ohne Triton-X100 gewaschen. Des Weiteren erfolgte ein zusätzliche Behandlung mit Methanol (vorgekühlt -20 °C) für 10 min auf Eis. Nach Abdampfen des Methanols und wiederholtem Waschen in 1 x PBS/T Puffer wurde die Probe mit BSA-haltigem PBS (5 % [m/v]) für 1 h bei RT geblockt. Die Inkubation des primären Antikörpers Anti-AhR (Biomol, Hamburg) erfolgte in BSA-haltigem 1 x PBS/T (0,1 % Triton-X100 [v/v], 5 % BSA [m/v]) in einer 1:200 Verdünnung über Nacht bei 4 °C. Nach Waschen in 1 x PBS/T und BSA-haltigem 1 x PBS/T (diesmal 0,1 % BSA [m/v]) wurde der sekundäre Antikörper, ein Anti-Rabbit Alexa®-546-Konjugat, ebenfalls 1:200 verdünnt und abgedunkelt 1 h bei RT inkubiert. Nach Waschen in 1 x PBS/T wurden die Proben-Deckgläschen auf Objektträger nach Hersteller-Angaben mit ImmuMount (Thermo Shandon, USA) aufgebracht und über Nacht bei 4 °C aushärten gelassen. Die Analyse der Proben erfolgt in einem Axiovert S-100 Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss. Mit Hilfe einer CCD Kamera (Hamamatsu, Japan) können die Bilder digital gespeichert und anschließend im Computer mittels der Software Openlab (V3.0.3) weiterverarbeitet werden.

### *DNA-Färbung mit Hoechst H 33342*

Die Zellkerne der Proben für die Immunhistochemischen Färbung wurde mit 10 µM Hoechst H 33342 (Bisbenzimid, Sigma-Aldrich) für 30 min bei 37 °C im Brutschrank gefärbt. Die Betrachtung der Proben erfolgt in einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S-100, Zeiss) bei einer maximalen Anregung von 360 nm) und einer Emission von 460 nm, parallel zur Betrachtung der immunhistochemischen Färbung als Kontrollfärbung für die Zellkerne.

### *Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturen*

Die Isolierung der gesamten RNA aus 5L- und BP8-Zellen erfolgte direkt nach der Exposition der Zellen nach 24 h Inkubation. Zur Extraktion wurde das Nucleospin® RNA-Isolations-Kit (Macherey & Nagel, Dueren) verwendet, der Prozess erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Eventuelle Kontamination durch genomische DNA wurde durch einen RNase-freien DNase-

Verdau während der Extraktion beseitigt. Die so gewonnene gesamte RNA wurde sofort bei -80 °C bis zur Weiterverwendung gelagert, um einen möglichen Abbau durch die ubiquitär vorhandenen RNasen zu verhindern. Die Bestimmung der RNA-Gesamt-Konzentration erfolgte durch Messung im Nanodrop-Spektralphotometer ND-1000 (Peqlab, Erlangen).

### *Synthese der cDNA*

Vor der quantitativen real-time PCR erfolgte eine Umschreibung der mRNA aus der gesamten RNA in copyDNA (cDNA). Hierzu wurde 1 µg gesamte RNA eingesetzt und mittels der Reversen Transkriptase M-MLV1 (Promega, Mannheim) umgeschrieben. Hierzu wurden Zufalls-Hexamere Primer eingesetzt (Metabion, Planegg-Martinsried). Die RNA und Zufalls-Hexamere wurden zunächst 5 min bei 70 °C im Thermoblock inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Danach wurde PeqGold® dNTP-Mix (Peqlab, Erlangen) und die Reverse Transkriptase zugegeben, 10 min bei RT und anschließend bei 50 °C für 1 h inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgt durch Inkubation bei 70 °C für 15 min. Die erhaltene cDNA wurde für die jeweiligen Versuche entsprechend verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### *Affymetrix Microarray-Analysen*

Zur Untersuchung genomweiter Änderungen des Expressionsprofils nach Inkubation mit Toxin (BDE47, BDE47<sup>hg</sup> und TBDF) wurden Microarray-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden Affymetrix-Microarrays („GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array“, Affymetrix, UK) verwendet. Die gesamte RNA wurde nach der Isolation auf Trockeneis verpackt und an das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin) verschickt. In einer „Full Service“ Dienstleistung wurden dort die RNA-Integrität überprüft, das cDNA-Labeling und die Hybridisierung mit dem Affymetrix-Microarray vorgenommen. Zur Verifizierung der Daten wurde die Experimente mit quantitativer real-time PCR überprüft.

### *Quantitative real-time PCR*

Die aus den genomweiten Expressionsanalysen gewonnenen Ergebnisse wurden mittels quantitativer real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR) verifiziert und mit BP8-Zellen verglichen. Die cDNA wurde pro Ansatz (5 µl ausgehend einer 1:10 Verdünnung der cDNA-Synthese) zusammen mit gen-spezifischen Primerpaaren (2 µl Forward und Reverse Primer Mix, je 0,5 µM Endkonzentration) für die qRT-PCR eingesetzt. Hierfür wurde der 2x PCR-Master-Mix „Quantitect SYBR Green Mix®“ (Qiagen, Hilden) verwendet (10 µl pro Ansatz). Der Ansatz (inklusive H<sub>2</sub>O ad 20 µl) wurde in für die qRT-PCR geeigneten 96-well PCR-Platten (ABgene, Epsom, UK) mit einer speziellen optischen Folie (ABgene, Epsom, UK) in Duplikaten durchgeführt. Die Analyse erfolgte in einem ABIprism 7000® (Applied Biosystems AB, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Nach jedem Amplifikationszyklus wird bei einer Wellenlänge von 300 nm SYBR-Green, einem strikt doppelsträngigen DNA Interkalanz, detektiert. Nach einer exponentiellen Phase ergibt sich im Amplifikationsplot (SYBR-Green-Detektion versus PCR-Zyklus) eine Phase linearen Anstiegs bis hin zu einer Plateau-Phase der Reaktion. Man setzt einen Schwellenwert der Messung (*Threshold*) in diesem linearen Bereich und bestimmt dann den Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit der Zyklenzahl, den so genannten *Threshold-Cycle* bzw. C<sub>T</sub>-Wert. Als Normalisierung dient hier die Expression eines Haushalts-Gens, in den vorliegenden Experimenten β-Aktin, dessen C<sub>T</sub>-Wert von dem des Zielgens (z.B. Cyp1A1) abgezogen wird. Dann wird der gewonnene Wert mit der Expression des jeweiligen Zielgens mit der dem gemessenen Wert, z.B. der unbehandelten Kontrolle verrechnet.

#### **Berechnung der Expressionsänderung:**

- (1) *Expression relativ zur Expression des Haushaltsgens*  
 $\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Haushaltsgen})$
- (2) *Expression relativ zur Kontrolle*  
 $\Delta \Delta C_T = \Delta C_T(\text{Kontrolle}) - \Delta C_T(\text{Behandlung})$
- (3) *Berechnung der Expressions-Änderung*  
 $2^{(-\Delta \Delta C_T)} = \text{Differenzielle Expression}$

Das Primer-Design für die qRT-PCR erfolgte, wenn möglich, über Exon/Intron-Grenzen hinweg. Die Größe der PCR-Produkte lag bei 150-250 bp (Basenpaaren) und die Schmelztemperatur einheitlich bei 60 °C hat. Eine Liste der verwendeten Primer findet sich weiter unten. Die Primerpaare für β-Aktin in Lindros et al. (1997), die von Cyp2B1 und Cyp3A1/3 sind in der Arbeit von Germer et al. (2006) beschrieben.

### *Isolierung der Gesamt-RNA aus Danio rerio-Embryonen*

Die Embryonen des Zebrafischs wurden im Anschluss an die Experimente über einem Sieb gesammelt und direkt in flüssigen Stickstoff mit Mörser und Pistill aufgearbeitet. Das gefrorene Material wurde ohne Auftauen in Lysis-Puffer aufgenommen. Die anschließende Prozedur der RNA-Extraktion wurde mit dem Nucleospin® RNA L-Kit für große RNA-Mengen durchgeführt (Macherey & Nagel, Dueren). Im Anschluss daran erfolgte eine Fällung der RNA in reinem Ethanol

(2,5 [v/v] RNA-Menge) und Natrium-Acetat (3 M, 0,1 [v/v]) und eine Inkubation bei -20 °C über Nacht. Die RNA wurde durch Zentrifugation der RNA für 20 min (4°C) bei 20.800 x g und mehrmaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol pelletiert und in 250 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

### *Extraktion der mRNA*

Die Extraktion der mRNA aus der gesamten RNA erfolgte mit Hilfe des MicroPoly(A) Purist® Kit (Ambion Inc, Texas, USA). Nach Durchführung der Prozedur und Fällung der mRNA entsprechend den Hersteller-Angaben wurde die mRNA mit RNase-freiem Wasser auf eine finale Konzentration von 500 ng/µl eingestellt.

### *Microarray-Analysen*

Die Microarrays wurden in der Microarray-Facility des ITG (FZK) in Eigenproduktion hergestellt. Die *Danio rerio*-Oligonukleotid-Bibliothek enthielt 16.399 Gen-spezifische 65er-Mere (Sigma-Genosys/Compugen, The Woodlands, Texas, USA). Die Print-Prozedur erfolgte wie von Yang (2007) beschrieben. Die Proben (40 µM) wurden auf CodeLink aktivierten Slides (G & E Healthcare, München) in doppelter Ausführung mit einem „Gene machines Omnigrad 100“-Roboter (San Carlos, CA) und „TeleChem SMP3 Pins“ (Sunnyvale, CA) geprintet. Es muss erwähnt werden, dass die Platten 29-43 der Bibliothek defekte Aminolinker aufwiesen, was ein Fehlen dieser Gen-spezifischen 65er-Mere zur Folge hat.

### *Fluoreszenz-Markierung der mRNA-Proben*

Die mRNA (1,0-1,5 µg) wurde mit dem CyScribe® First Strand cDNA Kit (G & E Healthcare, München) zu cDNA umgeschrieben und mit Cy3- und Cy5-markierten dUTP markiert. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Die mRNA (1,0-1,5 µg) wurde zusammen mit *anchored Oligo*(dT)-Primer (1 µl) und Zufalls-Nonameren (1 µl) auf ein Endvolumen von 11 µl pro Ansatz eingestellt. Nach 5 min bei 70 °C Denaturierung und der Primer-Anlagerung für die cDNA-Synthese erfolgte ein Abkühlen bei RT für 10 min. Die Markierungs-Reaktion erfolgt in 5 x CyScript-Puffer (4 µl), 0,1 M DTT (1 µl), dUTP-Nukleotid-Mix (1 µl), Cy-dUTP (1 µl Cy3 oder Cy5) sowie CyScript Reverse Transkriptase (1 µl) in einem Volumen von 20 µl. Die Reaktion erfolgte bei 42 °C für 1,5 h. Die RNA-Degradierung erfolgte durch Inkubation mit 1 M NaOH (1 µl pro Ansatz) für 15 min bei 37 °C und anschließenden Neutralisierung durch 2 M HEPES freie Säure (10 µl).

### *Aufreinigung von Fluoreszenz-markierten cDNA-Proben*

Zum Entfernen von überschüssigem Cy3- bzw. Cy5-Farbstoff wurden die Proben in 1 x TE-Puffer (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) aufgenommen und auf Microcon Säulen (Millipore, Bedford, USA) geladen. Nach wiederholtem Zentrifugieren bei 9000 x g bei RT und Waschen in TE-Puffer wurden die Proben vereinigt und die Effizienz der Markierung mit dem Nanodrop Spektralphotometer Nanodrop® ND-1000 (Peqlab, Erlangen) bestimmt.

### *Hybridisierung mit dem Microarray*

Nach erfolgreicher Markierung der Proben werden diese für 2 min bei 95 °C inkubiert und dann sofort auf Eis für 2 min abgekühlt. Nach Erwärmung auf RT werden zu den Proben 15 µl auf 42 °C vorgewärmter 1 x DIG Easy-hyb-Puffer (Roche Diagnostics, Penzberg). Die markierten Proben wurden über Nacht bei 42 °C mit dem Microarray hybridisiert. Die hierfür verwendeten Deckgläschen wurden mit auf 42 °C vorgewärmten 4 x SSC Puffer von den Microarrays entfernt und diese in Waschpuffer 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS) bei 42 °C für 5 min gewaschen, dann in Waschpuffer 2 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS) für 10 min bei RT. Zum Schluss wurden die Microarrays in Waschpuffer 3 (0,1 x SSC) viermal für 1 min bei RT gewaschen. Diese wurden dann noch einmal kurz in Waschpuffer 4 (0,01 % SSC) gehalten und bei 800 rpm für 7 min bei RT in einer Eppendorf 5810R Zentrifuge durch Zentrifugation getrocknet.

### *Auswertung der Microarrays*

Das Auslesen der Microarrays erfolgte in einem Axon „Model 4000B dual-laser Scanner“ (Molecular Devices) und unter Verwendung der GenePix V6-Software (Union City, CA). Die Fluoreszenzkanäle für Cy3 (532 nm) und Cy5 (635 nm) wurden simultan gescannt und als 16 Bit-TIFF Dateien gespeichert. Jeder Array wurde dreifach mit verschiedenen Intensitäten („low“, „medium“ und „high“ Scan), wobei verschiedene Verstärkungs-Faktoren angewandt wurden, aber die Laser-Intensität nicht verändert wurde. Die beiden Fluoreszenzkanäle wurden so eingestellt, dass sich das Fluoreszenz-Verhältnis (Cy3/Cy5) balancierte und einen Faktor von eins ergab. Die Auflösung der Scans betrug 10 µM, von jedem Spot mit einem gemittelten Durchmesser von 100 µM wurden 70-80 Pixel aufgenommen. Die Spot-Intensität ergibt sich aus dem Median der vordergründigen Signalstärke abzüglich dem Median der Hintergrund-Intensität. Das Prozessieren der gewonnen Daten, die Vorgehensweise bei der Qualitätskontrolle, die Transformation und die Normalisierung der Ergebnisse sind bereits beschrieben (Yang et al. 2007; Yang 2007; Zinsmeister 2007). In diesen Arbeiten wurden auch die zuvor beschriebenen Vorgehensweisen bei den Versuchen mit *Danio rerio*-Embryonen detailliert dargestellt und zum Teil für diese Arbeit adaptiert. Die Signale bzw. Rohdaten der Microarrays wurden mit der GenePix Software prozessiert. Jedes individuelle Gen wurde auf die Signifikanz einer veränderten Genexpression nach Behandlung mit dem T-Test getestet, wobei ein p-value kleiner als 0,025 als signifikant

differentiell exprimiert gilt. Als Kriterium für die Auswahl der dargestellten Gene wurde weiterhin die x-fache Expressionsänderung, der so genannte *Fold-Change* (FC) angesetzt (Minimum  $|FC| > 2$ ). Für die Inkubation mit BDE47<sup>hg</sup> mussten die Kriterien p-value und  $|FC| > 2$  allerdings herabgesetzt werden, der p-value  $< 0,08$  und  $|FC| > 1,5$ , da keine höheren differentiellen Regulationen detektierbar waren.

### *Gensilencing mit short interference-RNA (siRNA)*

Durch die Methode des Gensilencing mit siRNA kann die Expression von Genen vermindert werden. Die 20-22 Nukleotide langen, doppelsträngigen siRNA-Oligos aktivieren zelluläre Strukturen, die zum Abbau der komplementären, zellulären Ziel-mRNA führen. Die Methode und die hierfür verwendeten siRNA-Oligos sind in der Literatur beschrieben (Weiss et al. 2005). Für die Experimente wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Well in 6-well Zellkulturschalen (Nunc, Wiesbaden) angesetzt und bis zum nächsten Tag in Zellkulturmedium (DMEM + 10% FCS) anwachsen gelassen. Dann erfolgte die Transfektion der siRNA Oligos (50 pmol) mit dem kationischen Lipid Lipofectamin 2000® (Invitrogen, Karlsruhe) in Optimem-Medium (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) ohne Mediumszusätze für 48 h im Brutschrank bei 37°C und 8 % CO<sub>2</sub>. Nach der Transfektion wurden die Zellen dann mit den Substanzen für 6 h inkubiert und Zellextrakte für Westernblot-Analysen hergestellt. In dieser Arbeit wurde eine siRNA gegen den AhR der Ratte (*Rattus norvegicus*) verwendet sowie eine Kontroll-siRNA gegen ein rot fluoreszierendes Protein (DsRed) der Qualle *Discosoma*. Die siRNA wurde von der Firma Ambion synthetisiert.

#### AhR-siRNA

(gerichtet gegen Ratte AhR-mRNA Sequenz [gi: 6978474] Position 825 bis 845):

CGUUAGAUGUCCUCUGUGtt („sense“ Sequenz)

CACAGAGGAACAUCUAACGtt („antisense“ Sequenz)

#### Kontroll siRNA

(gerichtet gegen die mRNA für das Rot-fluoreszierende Protein DsRed der Koralle *Discosoma*):

AGUCCAGUACGGCUCCAAtt („sense“ Sequenz)

UUGGAGCCGUACUGGAACUtt („antisense“ Sequenz)