

Einfluss der endokrinen Disruptoren DEHP und PCB auf Fertilität und Adipositasentwicklung weiblicher Mäuse

Dissertation

**zur Erlangung des
Doktorgrades der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)**

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
Juliane-Susanne Schmidt
Geboren am 10. September 1980 in Wernigerode

Gutachter/ in

1. Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer
2. Prof. Dr. Gabriele Stangl
3. Prof. Dr. Hubertus Jarry

Halle (Saale), den 27. Oktober 2014

Für meine Familie!

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| EINLEITUNG | 1 |
| 1.1. Zielstellung | 1 |
| 1.2. Adipositas – ein globales Gesundheitsproblem | 2 |
| 1.3. Endokrine Disruptoren (ED) | 3 |
| 1.3.1. Der Weichmacher Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP)..... | 4 |
| 1.3.2. Polychlorierte Biphenyle (PCB) | 6 |
| 1.4. Das Fettgewebe – ein wichtiger Parameter für die adipogene Wirkung endokriner Disruptoren...8 | |
| 1.5. <i>In vivo</i> -Modelle zur Untersuchung der Wirkung endokriner Disruptoren auf Gesundheits- und Adipositasparameter und die frühe Embryonalentwicklung | 9 |
| 1.6. Untersuchte molekulare Marker im C3H/N-Mausmodell..... | 13 |
| 1.6.1. Peroxisom-Proliferator aktivierbare Rezeptoren (PPAR), ihre Zielgene und Koaktivatoren.. | 13 |
| 1.7.2. Die Adipokine Leptin und Adiponektin | 15 |
| MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 2.1. Versuchstiere und deren Haltung | 17 |
| 2.2. Diätkomposition | 17 |
| 2.2.1. Pilotstudie zur Bestimmung des Futterbedarfs und der täglichen DEHP- und PCB-Dosis pro Maus | 17 |
| 2.2.2. Herstellung und Zusammensetzung der DEHP-Diät und/ oder PCB-Diät | 17 |
| 2.3. Versuchsaufbau..... | 18 |
| 2.3.1. Studie I - Untersuchung der Wirkung von DEHP, PCB und DEHP/PCB auf die Fertilität und die Adipositasentwicklung direkt exponierter Weibchen | 18 |
| 2.3.2. Studie II - Untersuchung der Wirkung von DEHP, PCB und DEHP/PCB auf die Fertilität und die Adipositasentwicklung direkt exponierter direkt exponierter Muttertiere und deren <i>in utero</i> + laktational exponierten F1- Nachkommen | 19 |
| 2.4. Gewinnung und Aufarbeitung des Probenmaterials..... | 21 |
| 2.4.1. Gewinnung der Präimplantationsembryonen | 21 |
| 2.4.2. Organgewinnung und Blutentnahme | 22 |
| 2.4.3. Bestimmung der Triglyzeridkonzentration in Lebergewebe | 22 |
| 2.4.4. Leptin und Adiponektin ELISA..... | 23 |

| | |
|---|----|
| 2.5. Histologische Untersuchungen des Fettgewebes | 24 |
| 2.5.1. Hämalaun/Eosin Färbung an Paraffinschnitten | 24 |
| 2.6. Molekulare Methoden | 25 |
| 2.6.1. Messenger RNA-Isolation aus Präimplantationsembryonen..... | 25 |
| 2.6.2. RNA-Isolation aus Gewebe | 26 |
| 2.6.3. RNA-Konzentrationsbestimmung | 26 |
| 2.6.4. Verdau der DNA | 27 |
| 2.6.5. cDNA-Synthese | 27 |
| 2.6.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 28 |
| 2.6.7. Primer für PCR..... | 29 |
| 2.6.8. RNA- und DNA-Gelelektrophorese | 29 |
| 2.6.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 30 |
| 2.6.10. Herstellung von Plasmid-Standards für die quantitative <i>real time</i> PCR | 30 |
| 2.6.10.1. Ligation der PCR-Fragmente..... | 30 |
| 2.6.10.2. Transformation der Plasmid-Standards in kompetente <i>E. coli XL1-Blue</i> | 31 |
| 2.6.10.3. Plasmid-Isolation aus <i>E.coli XL1-Blue</i> | 32 |
| 2.6.10.4. Restriktion von Plasmiden..... | 32 |
| 2.6.10.5. Glycerinkultur | 32 |
| 2.6.11. Quantitative <i>Real Time</i> PCR (qRT-PCR)..... | 33 |
| 2.7. Statistische Auswertung..... | 34 |
| ERGEBNISSE | 35 |
| 3.1. Untersuchungen zur Wirkung von DEHP auf die Fertilität und Adipositasentwicklung weiblicher C3H/N-Mäuse..... | 35 |
| 3.1.1. Studie I - direkte DEHP-Exposition weiblicher Mäuse | 35 |
| 3.1.1.1. Wöchentliche Futteraufnahme, Körpergewichtsentwicklung und Gesundheit bei DEHP-exponierten Mäusen | 35 |
| 3.1.1.2. Anlage und Morphologie des Fettgewebes bei DEHP-exponierten Mäusen | 37 |
| 3.1.1.3. Organgewichte von DEHP-exponierten F0-Mäusen..... | 39 |
| 3.1.1.4. Triglyzeridkonzentration in Leber und Plasma von DEHP-exponierten F0-Mäusen | 39 |
| 3.1.1.5. Konzentration von ASAT, ALAT und Albumin im Plasma und die mRNA-Expression der FsS in der Leber nach DEHP-Exposition | 40 |
| 3.1.1.6. mRNA-Expression von PPARalpha und -gamma in Leber und Fettgewebe nach DEHP-Exposition | 41 |
| 3.1.1.7. mRNA-Expression von PPAR-Zielgenen und dem Coaktivator Med1 in Leber und Fettgewebe nach DEHP-Exposition | 43 |
| 3.1.1.8. Plasmakonzentration und mRNA-Menge von Adipokinen im Fettgewebe | 44 |
| 3.1.1.9. Schwangerschaftsrate F1-Nachkommen und Anzahl F1-Präimplantationsembryonen . | 46 |
| 3.1.1.10. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F1-Präimplantationsembryonen | 46 |

| | |
|--|----|
| 3.1.2. Studie II – maternal DEHP-exponierte F1-Nachkommen | 48 |
| 3.1.2.1. Gesundheits- und Fertilitätsparameter der DEHP-exponierten F0-Muttertiere..... | 48 |
| 3.1.2.2. Menge viszerales Fettgewebe von F0-Muttertieren und deren F1-Nachkommen nach DEHP-Exposition | 49 |
| 3.1.2.3. Organgewichte der F0-Muttertiere und deren F1-Nachkommen nach DEHP-Exposition | 51 |
| 3.1.2.4. Mittleres Körpergewicht F1-Nachkommen (PNT 21 und PNT 84) nach DEHP-Exposition | 52 |
| 3.1.2.5. Schwangerschaftsrate der F1-Nachkommen und Anzahl von F2-Präimplantationsembryonen..... | 53 |
| 3.1.2.6. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F2-Präimplantationsembryonen | 54 |
| 3.2. Untersuchung der Wirkung von PCB auf Fertilität und Adipositasentwicklung weiblicher C3H/N-Mäuse..... | 56 |
| 3.2.1. Studie I - direkte PCB-Exposition weiblicher Mäuse | 56 |
| 3.2.1.1. Wöchentliche Futteraufnahme und Körpergewichtsentwicklung bei PCB-exponierten Mäusen | 56 |
| 3.2.1.2. Organgewichte von PCB-exponierten F0-Mäusen | 57 |
| 3.2.1.3. mRNA-Menge von PPARalpha und -gamma in Leber und Fettgewebe nach PCB-Exposition | 58 |
| 3.2.1.5. mRNA-Menge von Adipokinen im Fettgewebe nach PCB-Exposition..... | 59 |
| 3.2.1.6. Schwangerschaftsrate und Anzahl F1-Präimplantationsembryonen | 60 |
| 3.2.1.7. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F1-Präimplantationsembryonen | 61 |
| 3.2.2. Studie II - maternal PCB-exponierte F1-Nachkommen..... | 62 |
| 3.2.2.1. Gesundheits- und Fertilitätsparameter der PCB-exponierten F0-Muttertiere | 62 |
| 3.2.2.2. Organgewichte der F0-Muttertiere und deren F1-Nachkommen nach PCB-Exposition. | 63 |
| 3.2.2.3. Körpergewichtsentwicklung der F1-Nachkommen nach PCB-Exposition | 64 |
| 3.2.2.4. Schwangerschaftsrate der F1-Nachkommen und Anzahl F2-Präimplantationsembryonen | 65 |
| 3.2.2.5. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F2-Präimplantationsembryonen | 66 |
| 3.3. Untersuchung der Wirkung eines DEHP/PCB-Gemisches auf Fertilität und Adipositasentwicklung weiblicher C3H/N-Mäuse | 67 |
| 3.3.1. Studie I - direkte DEHP/PCB-Exposition weiblicher Mäuse | 67 |
| 3.3.1.1. Wöchentliche Futteraufnahme und Körpergewichtsentwicklung bei DEHP/PCB-exponierten Mäusen | 67 |
| 3.3.1.2. Organgewichte von DEHP/PCB-exponierten Mäusen..... | 68 |
| 3.3.1.3. mRNA-Menge von PPARalpha und -gamma in Leber und Fettgewebe nach DEHP/PCB-Exposition | 69 |
| 3.3.1.4. mRNA-Menge von PPAR-Zielgenen und dem Coaktivator Med1 in Leber und Fettgewebe nach DEHP/PCB-Exposition | 70 |
| 3.3.1.6. mRNA-Menge von Adipokinen im Fettgewebe nach DEHP/PCB-Exposition | 72 |
| 3.3.1.7. Schwangerschaftsrate und Anzahl F1-Präimplantationsembryonen | 73 |
| 3.3.2.8. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F1-Präimplantationsembryonen | 73 |
| 3.3.2. Studie II - maternal DEHP/PCB-exponierte F1-Nachkommen | 75 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.2.1. Gesundheits- und Fertilitätsparameter der F0-Muttertiere nach DEHP/PCB-Exposition | 75 |
| 3.3.2.2. Menge viszerales Fettgewebe der F0-Muttertiere und deren F1-Nachkommen nach DEHP/PCB-Exposition | 76 |
| 3.3.2.3. Organgewichte der F0-Muttertiere und deren F1-Nachkommen nach DEHP/PCB-Exposition | 77 |
| 3.3.2.4. Körpergewichtsentwicklung der F1-Nachkommen nach DEHP/PCB-Exposition..... | 78 |
| 3.3.2.5. Schwangerschaftsrate der F1-Nachkommen und Anzahl der F2-Präimplantationsembryonen..... | 79 |
| 3.3.2.6. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F2-Präimplantationsembryonen | 80 |
| DISKUSSION | 82 |
| 4.1. Aufbau der Studien | 83 |
| 4.2. Gewählte Konzentrationen an DEHP und PCB | 84 |
| 4.3. DEHP-Effekte auf allgemeine Gesundheits- und Adipositasparameter | 85 |
| 4.3.1. Eine DEHP-Exposition hat bereits in umweltrelevanten Konzentrationen adipogene Effekte in C3H/N-Weibchen und bewirkt eine Änderung der Expression der PPARs und der hepatischen FsS | 85 |
| 4.3.1. Eine DEHP-Exposition bewirkt eine Änderung der Expression und Konzentration der Adipokine Leptin und Adiponektin in weiblichen C3H/N Mäusen | 89 |
| 4.3.3. Adipogene Effekte von DEHP konnten auch in den maternal exponierten F1-Nachkommen festgestellt werden | 90 |
| 4.4. Wirkung von DEHP auf die maternale Reproduktion und die Präimplantationsembryonen | 91 |
| 4.4.1. Eine direkte DEHP-Exposition bewirkt eine Abortrate von 100 % in der 500 mg-Konzentrationsgruppe | 92 |
| 4.4.2. Effekte einer DEHP-Exposition auf die Anzahl und Morphologie von Präimplantationsembryonen | 93 |
| 4.5. Effekte von PCB und DEHP/PCB auf allgemeine Gesundheits- und Adipositasparameter | 96 |
| 4.5.1. Eine DEHP/PCB-Exposition hat adipogene Effekte in C3H/N-Weibchen, eine alleinige PCB-Exposition wirkt nicht adipogen | 96 |
| 4.5.2. Dosis-Wirkungsbeziehungen..... | 98 |
| 4.5. Wirkung von PCB und DEHP/PCB auf die maternale Reproduktion und die Präimplantationsembryonen | 99 |
| 4.5.2. Eine PCB-Exposition und eine PCB/DEHP-Exposition verändert die Expression von Adipokinen und PPARs in Präimplantationsembryonen auf unterschiedliche Weise | 100 |
| ZUSAMMENFASSUNG | 105 |

| | |
|--------------------------------------|------|
| LITERATURVERZEICHNIS | 109 |
| ANHANG | I |
| Abbildungsverzeichnis..... | I |
| Abkürzungsverzeichnis..... | II |
| Chemikalienverzeichnis..... | VI |
| Software- und Geräteverzeichnis..... | VIII |

Einleitung

1.1. Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung der Umweltkontaminanten Di (2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) und zweier Kongenere polychlorierter Biphenyle (PCB) auf die Entstehung von Adipositas, die weibliche Reproduktion und die frühe Embryonalentwicklung bei Säugetieren zu untersuchen. Geklärt werden sollte, ob gegebenenfalls additive Effekte bei gleichzeitiger Exposition auftreten. Im Unterschied zum männlichen Geschlecht sind die beiden endokrinen Disruptoren (ED) im weiblichen Geschlecht noch nicht gut untersucht. Für die *in vivo*-Untersuchung wurde das Versuchstiermodell der Maus vom Stamm C3H/N eingesetzt. Die Untersuchungen wurden im Rahmen des von der EU geförderten Projektes *Reproductive Effects of Environmental chemicals in Females* (REEF, FP/2007-2013, grant agreement no. 212885) durchgeführt.

Es wurden 2 Expositionsversuche durchgeführt. Im ersten Versuch (Studie I) lag der Fokus auf der Analyse von Veränderungen durch eine DEHP- und/oder PCB-Exposition bei den exponierten weiblichen Mäusen vor und während einer Gravidität.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- Welche gesundheitlichen Folgen hat eine Exposition mit DEHP, PCB und DEHP+PCB? Bezüglich der beobachteten Entwicklung von Übergewicht bei den Mäusen: Welche Mechanismen sind dafür verantwortlich?
- Gibt es eine Beeinträchtigung von Fertilität und Embryonalentwicklung? Wenn ja, welche?

Im zweiten Versuch (Studie II) lag der Fokus auf der Analyse von Veränderungen durch eine maternale DEHP- und/oder PCB-Exposition in der Folge-Generation.

Mit der Studie II sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Führt eine maternale Exposition (*in utero* und über die Muttermilch) mit DEHP, PCB und DEHP+PCB auch in der Folgegeneration zu Gesundheitsschäden und zu Änderungen im Fettstoffwechsel?
- Wenn ja, wann treten diese Effekte auf?

Die Fragestellungen in Bezug zur adipogenen Wirkung der Substanzen wurden durch Messungen von Körpergewicht, Futteraufnahme, Adipokinen (Leptin und Adiponektin) und Expressionsdaten von PPARs und deren Zielgene analysiert. Effekte auf die Reproduktion wurden durch die Bestimmung der Schwangerschaftsrate und der Embryonenzahl ermittelt. Expressionsanalysen relevanter Gene (Leptin, LeptinR, CTRP2, AdipoR2, PPARs) bei Embryonen während der Präimplantationsphase wurden an 3,5 Tage alten Blastozysten durchgeführt.

1.2. Adipositas – ein globales Gesundheitsproblem

Übergewicht ist durch eine starke Zunahme von Körperfett und einem Körpermassenindex (BMI) von $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ gekennzeichnet. Bei einem BMI von $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ liegt das Krankheitsbild der Adipositas vor. Dies ist eine Stoffwechselerkrankung, welche mit extremen Übergewicht und erhöhter Körperfettanreicherung einhergeht. Sie wird anhand des BMI in drei Schweregrade unterteilt (Grad I: $30\text{-}34,9 \text{ kg/m}^2$; Grad II: $34\text{-}39,9 \text{ kg/m}^2$; Grad III: $\geq 40 \text{ kg/m}^2$). Laut der *World Health Organization* (WHO) stellt Adipositas aktuell das größte chronische Gesundheitsproblem weltweit dar. Im Jahr 1995 gab es insgesamt 200 Millionen Menschen mit Adipositas. Nur 5 Jahre später stieg diese Zahl auf 300 Millionen. Zurzeit sind in Europa bereits 60 % der Kinder vor dem Eintritt in die Pubertät übergewichtig (WHO 2012). Jeder fünfte Erwachsene und jedes sechzehnte Kind in Deutschland sind adipös (Max Rubner-Institut 2008; Robert Koch-Institut 2007). Übergewicht und Adipositas sind eng mit einem Auftreten von Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II, Fettstoffwechselstörungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (häufig zusammenfallend als Metabolisches Syndrom bezeichnet) verbunden. Die physiologische Grundlage einer Körperfettzunahme liegt in einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Kalorienaufnahme und Energieverbrauch zugunsten der Kalorienaufnahme. Der Lebensstil des 20. und 21. Jahrhunderts begünstigt die Entstehung durch den Überfluss an kalorienreichen Nahrungsmitteln und den Mangel an körperlicher Betätigung. Aber allein durch die Lebensumstände kann diese Zunahme an Adipositas nicht erklärt werden. Genetische, hormonelle und soziale Faktoren sind weitere Komponenten, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Übergewicht und Adipositas diskutiert werden. Genetische Veränderungen sind jedoch aufgrund ihres relativ langsamen Tempos keine ausreichende Erklärung für das rasante Ansteigen der Anzahl adipös erkrankter Personen in den letzten Jahrzehnten.

Der Anstieg an Adipositas und der erhöhte Einsatz von Industriechemikalien fallen zeitnah zusammen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der Kontakt zu Umweltschadstoffen einen weiteren Risikofaktor für die Entstehung einer Adipositas darstellt (Heindel et al. 2003; Newbold et al. 2008). Umweltchemikalien können das hormonelle Gleichgewicht beeinflussen und so an der Entstehung der Krankheit des Metabolischen Syndroms beteiligt sein (Grun und Blumberg 2009; Heindel und vom Saal 2009; Latini et al. 2010).

1.3. Endokrine Disruptoren (ED)

Definiert werden endokrine Disruptoren als synthetische oder natürlich vorkommende Stoffe, die in der Lage sind, das Hormonsystem von Organismen zu beeinflussen. Sie wirken wie Hormone und können über Rezeptor-Interaktionen die Homöostase stören. Durch Kontakt mit diesen Stoffen kann es so zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen bei Mensch und Tier kommen. Endokrin wirksam ist eine große Gruppe von Stoffen, die in unserem täglichen Leben vorkommen. Sie finden sich unter anderem in Lebensmittelverpackungen, kosmetischen Produkten, Kleidung, Kinderspielzeug und medizinischen Produkten.

Bekannte endokrine Disruptoren sind Diethylstilbestrol (DES), Bisphenol A, Tributylzinnhydrid (TBT), Phthalate und die Gruppe der polychlorierten Biphenyle (PCB). Aufgrund ihrer heterogenen Herkunft und Struktur verursachen sie ein unterschiedliches Spektrum an hormonellen Störungen. Das Reproduktionssystem ist besonders empfänglich für die endokrin störende Wirkung dieser Stoffe. TBT ist Bestandteil von Kunststoffen und wird im Druckereiwesen eingesetzt. Bei Fischen und Mollusken verursacht TBT Intersexualität und Unfruchtbarkeit (Horiguchi et al. 1997). PCB sind kanzerogen und teratogen wirkende Chlorverbindungen, welche 2001 durch die Stockholmer Konvention weltweit verboten wurden. Ihren Einsatz fanden sie in Transformatoren und Baumaterialien. Sie sind schwer abbaubar und akkumulieren stark in der Umwelt. Sie sind plazentagängig und kommen in der Muttermilch in messbaren Konzentrationen vor (Correia Carreira et al. 2011). Phthalate werden in der Kunststoffindustrie als Weichmacher eingesetzt. Seit Anfang der 80 er Jahre wird die Wirkung von Phthalaten auf die männliche Fertilität und Reproduktion untersucht. Eine Exposition mit DEHP, einem wichtigen Phthalat (s.u.), führte bei Ratten zur Reduktion der Fertilität, der Spermiedichte und -motilität und zu morphologischen Änderungen der Reproduktionsorgane (Agarwal et al. 1985 und 1989). Eine DEHP-Exposition während der Schwangerschaft führte bei männlichen Nachkommen zu einer gestörten Entwicklung der Geschlechtsorgane und einer verschlechterten Fertilität bei

jungen Männern (Hauser et al. 2007; Pant et al. 2008; Sharpe 2006; Swan 2008). Die Auswirkungen auf die weibliche Reproduktion und die Embryonalentwicklung sind hingegen noch wenig untersucht. Dabei wird aus epidemiologischen Studien deutlich, dass DEHP und dessen Metabolite im Serum und Urin schwangerer Frauen, im Nabelschnurblut (Adibi et al. 2003; Latini et al. 2003) und in der Muttermilch (Frederiksen et al. 2007; Main et al. 2005) messbar vorhanden sind.

1.3.1. Der Weichmacher Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP)

Der industriell am häufigsten eingesetzte Weichmacher ist das DEHP. Weltweit werden pro Jahr 1 bis 4 Millionen Tonnen DEHP hergestellt (McKee et al. 2004). In Westeuropa macht allein DEHP 18% aller verwendeten Phthalate aus (Europäische Union 2008). Phthalate sind Ester der Phthalsäure mit ein- oder mehrwertigen Alkoholen. Es sind schlecht wasserlösliche und schwer flüchtige Flüssigkeiten, die chemisch stabil sind. Da es aber zu keiner kovalenten Bindung kommt können Weichmacher aus dem Kunststoff wieder entweichen und werden somit kontinuierlich in die Umwelt eingetragen.

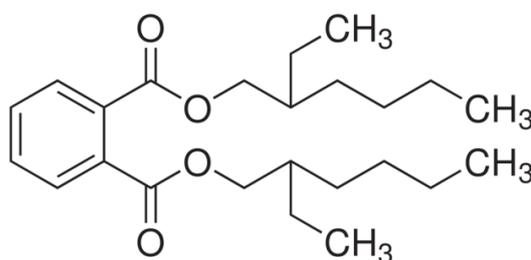


Abbildung 1 - Strukturformel von DEHP (CAS-Nummer: 117-81-7), Quelle: Sigma-Aldrich

Ihren Einsatz finden Phthalate unter anderem als Trägersubstanzen in Medikamenten, medizinischen Produkte, Lebensmittelverpackungen und Kleidungsstücken (David et al. 2001; Hauser und Calafat 2005). Der größte Teil der industriell hergestellten Phthalate werden als Weichmacher in der Kunststoffindustrie (Weich-PVC, Folien, Kunstleder, Beschichtungen) eingesetzt. DEHP als Weichmacher sorgt für mehr Flexibilität und Elastizität der Kunststoffe. Aufgrund ihres breiten Einsatzes kommen Phthalate ubiquitär in der Umwelt vor und weisen eine erhöhte Bioakkumulationstendenz auf. 2008 wurde DEHP in die

Kandidatenliste der Europäischen Chemikalien Agentur (ECHA) aufgenommen. Aufgrund der reproduktionstoxischen Eigenschaften ist in der Europäischen Union der Einsatz von DEHP in Kinderspielzeug und Babyartikeln seit 2004 verboten (Direktive 2005/84/EC). DEHP wird hauptsächlich oral, inhalativ und über die Haut aufgenommen (Frederiksen et al. 2007, Heudorf et al. 2007, Janjua et al. 2008). Lebensmittel und deren Verpackungen stellen den Hauptübertragungsweg für DEHP bei Jugendlichen und Erwachsenen dar (Fromme et al. 2007). Gelangen Phthalate in den Körper, werden sie in mehreren Stufen metabolisiert. Zuerst werden sie mit Hilfe von Lipasen hydrolytisch in Monoester wie das MEHP aufgespalten. Dann kommt es zu oxidativen Modifikationen der Alkylreste. Nach der Konjugation der Sekundärmetabolite kommt es zum Ausscheiden über den Urin. DEHP und seine Metaboliten werden schnell aus dem Körper eliminiert. So beträgt die Halbwertszeit von DEHP und MEHP 13,5 h und 6 h bei Ratten (Koo&Lee 2007). Beim Menschen dauert laut einer Studie des Umweltbundesamts 2012 die vollständige Elimination alle DEHP-Metaboliten bis zu 22 h.

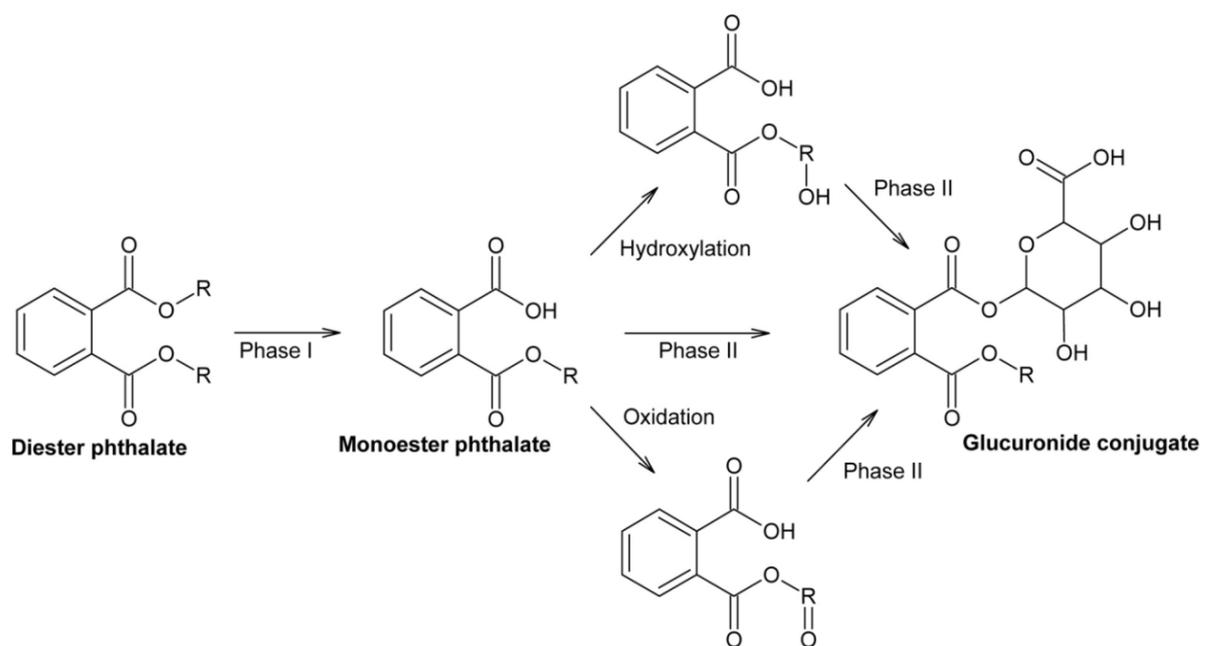


Abbildung 2 - Schema zum metabolischen Abbau der Phthalate (Frederiksen et al. 2007)

Neben der negativen Wirkung auf die Reproduktion haben DEHP und seine Metaboliten auch Effekte auf den Metabolismus. Diese Effekte können u.a. durch die Aktivierung von Peroxisom-Proliferator aktivierbare Rezeptoren (PPARs) alpha und gamma vermittelt werden (Feige et al. 2007; Lapinskas et al. 2005). Viele der PPAR-Zielgene greifen in den Lipid-Metabolismus und in die Energie-Homöostase ein (Desvergne und Wahli 1999; Feige et al. 2007). Dyslipidämie korreliert positiv mit Adipositas und Subfertilität (Carr und Brunzell 2004; Pasquali und Gambineri 2006).

Stahlhut und Kollegen (2007) fanden eine positive Korrelation zwischen der Serumkonzentration von Phthalat-Metaboliten und abdomineller Adipositas bei männlichen U.S. Bürgern. Diese Daten stammen aus dem *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) 1999–2002. Dennoch ist wenig darüber bekannt, inwieweit eine Phthalat-Exposition dauerhaft störend bei der Adipositas-Entstehung mitwirkt und welche weiteren negativen Aspekte auf die Gesundheit damit verbunden sind.

1.3.2. Polychlorierte Biphenyle (PCB)

PCB sind organische Chlorverbindungen und stellen eine Gruppe von 209 Kongeneren dar, die sich durch Anzahl und Stellung der Chloratome um das Biphenylsystem unterscheiden. Aufgrund ihrer räumlichen Struktur und der damit verbundenen chemischen Ähnlichkeit zu Dioxinen unterteilt man sie in zwei Gruppen, die Gruppe der ortho-substituierten PCB (planare PCB) und die Gruppe der nicht-ortho-substituierten und mono-ortho-substituierten PCB (koplanare, dioxinähnliche PCB). Die zweite Gruppe ist in ihrer Wirkungsweise dem des Dioxins 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) aufgrund der ähnlichen Konformität und Stereoisomerie vergleichbar. Die relative Toxizität der dioxinähnlichen PCB zu TCDD wird mit Hilfe des Toxizitätsäquivalenzfaktors (TEF) abgeschätzt. Wobei dem TCDD, als toxischster Vertreter der Dioxine, der Faktor 1 zugeordnet wurde. Zum Abschätzen der Toxizität von Substanzgemischen wird die Toxizitätsäquivalente (TEQ) durch Multiplizieren der einzelnen TEFs und der gemessenen Konzentration bestimmt.

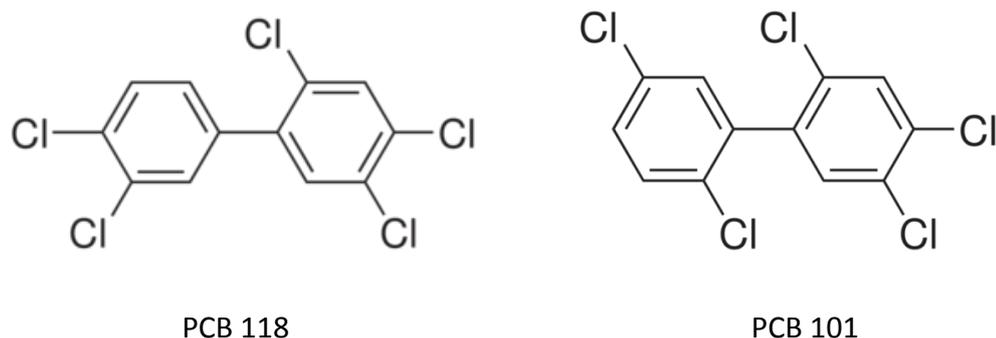


Abbildung 3 - Strukturformel von PCB 118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl- CAS-Nummer: 31508-00-6) und PCB 101 (2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl - CAS-Nummer: 37680-73-2); Quelle: Sigma-Aldrich

Bei den PCB handelt sich um giftige Chemikalien, die durch industrielle Prozesse in hohen Mengen jahrelang hergestellt wurden. Eingesetzt wurden sie hauptsächlich in elektrischen Kondensatoren, als Weichmacher in Kunststoffen oder als Dichtungsmassen. Sie gehören zu den 12 als „Dreckiges Dutzend“ bezeichneten Giftstoffen, die durch die Stockholmer Konvention im Mai 2001 weltweit verboten wurden. Aufgrund ihrer chemischen Stabilität und guten Fettlöslichkeit sind PCB ubiquitär verbreitet, persistieren im Ökosystem und reichern sich in Nahrungsketten an. So gelangen sie über Wasser, Boden und Futtermittel auch in unsere Lebensmittel. PCB konnten im Plasma, Gewebe und Muttermilch bei Mensch und Tier nachgewiesen werden (Agudo et al., 2009; *Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP) 2009*; Kodavanti et al. 1998). Das vermehrte Auftreten der PCB in der Umwelt korreliert mit vielen negativen gesundheitlichen Effekten. Vor allem betrifft dies das Reproduktionssystem von Mensch und Tier (Colborn et al. 1993; Safe et al. 2004; Sager et al. 1991). So ist nachweislich nach PCB-Exposition die Spermienmotilität und Spermienanzahl verringert und der Sexualhormonhaushalt gestört (Hauser et al. 2003; Richthoff et al. 2003). PCB akkumulieren stark im Fettgewebe und in der Muttermilch und können leicht die Plazentaschranke überqueren (Berg et al. 2010). Dies stellt für den sich entwickelnden Embryo/Fetus insoweit ein großes Problem dar, da er während kritischer Entwicklungsstadien diesen Chemikalien ausgesetzt ist. In dieser Periode ist der Embryo hochempfindlich gegenüber äußeren Umwelteinflüssen, sodass es zu langfristig andauernden funktionellen und strukturellen Änderungen kommen kann (Kuriyama et al. 2004; Steinberg et al. 2008).

Neben den reproduktionstoxischen Effekten weisen vor allem epidemiologische Studien darauf hin, dass erhöhte PCB-Konzentrationen mit einem vermehrten Auftreten von Diabetes mellitus Typ II (Carpenter et al. 2008; Lee et al. 2010) und Erkrankungen des Herzkreislaufsystems in Verbindung stehen (Carpenter et al. 2011). Da beide Krankheitsbilder als Folgeerkrankungen von Adipositas gelten, ist es wichtig, eine eventuell bestehende Verbindung näher zu untersuchen. Roos et al. (2013) konnten zeigen, dass erhöhte Plasmawerte der PCB 105 und 118 positiv mit erhöhtem viszeralen Fettgewebe einhergehen. PCB 153 induzierte *in vitro* die Adipogenese (Taxvig et al. 2012) und erhöhte *in vivo* die viszerale Fettmenge, den Hüftumfang und die Leptinkonzentration im Plasma (Wahlang et al. 2013; Lee et al. 2007). Demgegenüber stehen Tierstudien mit dioxinähnlichen PCB, die von einer Abnahme des Körpergewichts und Störungen des hepatischen Glukose- und Glykogenstoffwechsel berichten (Barker et al. 2012; Zhang et al. 2012). Dioxinähnliche PCB und das TCDD binden vorrangig an den Aryl-Hydrokarbon-Rezeptor (AhR), einem nukleären Transkriptionsfaktor. Inwieweit und über welche intrazellulären Rezeptoren auf metabolischer Ebene nicht-dioxinähnliche PCB und auch mono-ortho-substituierte PCB wirken, ist bis jetzt nicht ausreichend untersucht.

Die von uns eingesetzten PCB-Kongenere 101 und 118 wurden zum einen ausgesucht, weil sie zu den am häufigsten in biologischen Proben gemessenen PCB gehören und Teil der ICES 7 sind (Cerna et al. 2008; Connor et al. 1997; *International Council for the Exploration of the Seas* (ICES) 1992). Zum anderen haben Studien an Schafen gezeigt, dass PCB 101 und PCB 118 sich stärker im fetalen Gewebe als in der Mutter anreichern (Rhind et al. 2009) und vor allem deshalb ihre Wirkungen innerhalb wichtiger Zeitfenster der Embryonalentwicklung von Interesse sind.

1.4. Das Fettgewebe – ein wichtiger Parameter für die adipogene Wirkung endokriner Disruptoren

Der Begriff „*obesogen*“ wurde erstmals 2007 von den Wissenschaftlern Grun und Blumberg eingeführt. Er steht für chemische Substanzen, die als metabolische Sensoren agieren, in den Lipidmetabolismus eingreifen oder die Lipidspeicherung im Körper verändern können. Sie können den Energiehaushalt und das Fettgewebe so beeinflussen, dass es zu einer Entstehung von Übergewicht kommen kann. Biochemisch und histologisch unterschieden wird braunes und weißes Fettgewebe. Das braune Fettgewebe hat hauptsächlich die Funktion der Wärmeregulation in der Neonatalperiode. Das weiße Fettgewebe hat neben

einer Schutzfunktion die Aufgabe der Speicherung und Bereitstellung von Energiereserven. Während der Embryonalentwicklung differenzieren sich aus pluripotenten Stammzellen mesenchymalen Vorläuferzellen und daraus Präadipozyten. Die terminale Differenzierung zum reifen Adipozyten wird durch eine Reihe zellulärer Signale vermittelt. PPARgamma als wichtiger Regulator der Adipogenese spielt hier eine entscheidende Rolle (Ntambi&Young-Cheul 2000; Tontonoz&Spiegelman 2008). Der reife Adipozyt schließlich exprimiert eine Vielzahl von spezifischen Molekülen, die als Marker genutzt werden können (u.a., die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene FsS, Leptin, Adiponektin). Im weißen Fettgewebe eines Erwachsenen sind reife Adipozyten die vorherrschende Zellpopulation. Parallel dazu existieren mesenchymale Vorläuferzellen, welche durch Differenzierungssignale aktiviert werden können. Auch im adulten Alter kann so durch äußere Umstände die Adipozytenzahl und die Adipozytengröße verändert werden.

Bei Kindern und Jugendlichen ist die Prävalenz für Übergewicht in den letzten 20 Jahren um 50% gestiegen. Auf Grund der hohen Prävalenz ist das Krankheitsbild der Adipositas bereits zu einem globalen Gesundheitsproblem geworden (Ogden et al. 2007). Die vielfältigen Ursachen dieser Pandemie werden intensiv untersucht, sind bis jetzt jedoch noch nicht im vollen Umfang aufgeklärt.

Bekannt ist, dass eine Exposition mit endokrinen Disruptoren während kritischer Entwicklungsstadien während der Schwangerschaft verschiedene Krankheiten in den Folgegenerationen mit verantwortlich sein kann (Skinner et al. 2013). Der Embryo ist in der Lage, auf Veränderungen des äußeren Milieus zu reagieren und Schwankungen zu kompensieren. Wird dieses Maß jedoch überschritten, kann es zu dauerhaften Änderungen in der weiteren Entwicklung kommen und auch Grundlage für ein erhöhtes Krankheitsrisiko im Jugend- und Erwachsenenalter. Diese Erscheinung wird als metabolische Prägung bezeichnet. Zivilisationskrankheiten wie Adipositas und Diabetes Typ II könnten somit bereits im Mutterleib u.a. durch eine Exposition mit Endokrinen Disruptoren ausgelöst werden (McMillen&Robinson 2005).

1.5. *In vivo*-Modelle zur Untersuchung der Wirkung endokriner Disruptoren auf Gesundheits- und Adipositasparameter und die frühe Embryonalentwicklung

Untersuchungen der Effekte von EDs zur akuten und chronischen Toxizität und zur Metabolisierung wurden voranging am Versuchstiermodell der Ratte und der Maus

durchgeführt. So haben Kluwe et al. (1982) Ratten und Mäuse oral mit DEHP (3000 ppm und 6000 ppm) für 106 Wochen exponiert und eine hepatokanzerogene Wirkung bei Weibchen und Männchen festgestellt. Shiota et al. (1978) haben schwangeren Mäusen Phthalate oral verabreicht und bei den Nachkommen teratogene Effekte in Form von Neuralrohrdefekten und embryotoxische Effekte beobachtet. Da vom Menschen nur epidemiologische Daten zur Verfügung stehen, müssen für Transgenerations- und Langzeiteffekte endokriner Disruptoren geeignete Tiermodelle genutzt werden. So haben Steinberg et al. (2008) generationsübergreifende Effekte einer maternalen PCB-Exposition bei Ratten beobachten können. Ergebnisse solcher Tierstudien sind Grundlage für die Gefährdungsbeurteilung und –Einschätzung für den Menschen. So ist durch die EU Direktive 67/548/EEC vorgeschrieben, dass Chemikalien mit einem Anteil von mehr als 0,5 % DEHP die Gefahrstoffkennzeichen R60 (kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen) und R61 (kann das Kind im Mutterleib schädigen) tragen müssen.

Die Maus ist ein oft gewähltes Tiermodell in Studien, die den Einfluss endogener Disruptoren auf die Entstehung einer Adipositas untersuchen (Grun et al. 2006; Hao et al. 2012; Li et al. 2012). Die Endpunkte Futteraufnahme, Körpergewichtsentwicklung, Gewicht von viszeralem Fett und Leber sowie der Triglyzeridkonzentration in Leber und Plasma sind gebräuchliche Parameter, um eine adipogene Wirkung im Mausmodell studieren zu können.

In unserer Studie I wurde mit der DEHP/PCB-Exposition über das Futter 7 Wochen vor der Verpaarung begonnen und am dem Tag 3,5 *post coitum* (*p.c.*) wurde die Exposition beendet. Der gewählte Versuchsaufbau erlaubt Untersuchungen zu direkten Änderungen (1) von Adipositasparametern der Weibchen und (2) von Präimplantationsembryonen (Abbildung 4).

Die Embryonalentwicklung der Maus beginnt mit der Befruchtung der Oozyte. Im Eileiter durchläuft sie die ersten Furchungsteilungen. 1,5 Tage nach der Verpaarung haben die Embryonen das 2-Zellstadium erreicht. Der Übergang zum 4-Zellstadium ist geprägt durch eine Vielzahl von Prozessen, die die Entwicklung des Embryos vorantreiben. Dazu gehören die Aktivierung des embryonalen Genoms und die Ausbildung enger Zellkontakte (Sutherland&Calarco-Gillam 1983; Latham et al. 1999). 2,5 Tage nach der Verpaarung hat der Embryo das Stadium der Morula erreicht. Die ersten Differenzierungsprozesse in die zwei pluripotenten Zelllinien, der inneren Zellmasse (Embryoblast) und dem Trophoblasten, finden nun statt. Durch Flüssigkeitsansammlungen entsteht eine innere Höhle (Blastozystenöhle) und nach 3,5 Tagen *p.c.* hat sich die Blastozyste ausgebildet. Im Weiteren „schlüpft“ (*Hatching*) die späte Blastozyste aus der Zona pellucida und implantiert

in die Uterusschleimhaut. Mit der Implantation ist die Präimplantationsphase beendet und der Embryo wird kurze Zeit später über die Plazenta mit Nährstoffen aus dem mütterlichen Kreislauf versorgt.

In der frühen Entwicklung werden die Embryonen über endometriale Substrate ernährt. In diesem Stadium der Entwicklung sind Embryonen empfindlich gegenüber Störungen aus dem Umgebungsmilieu. *In vitro*-Kulturversuche an Säugetieroozyten und Embryonen zeigen, dass MEHP, Hauptmetabolit des DEHP, und PCB negative Effekte auf die Entwicklung von Präimplantationsembryonen haben (Dalman et al. 2008; Chu et al. 2013; Lindenau und Fischer al. 1996). So induziert MEHP einen 2-Zellblock bei *in vitro*-kultivierten Mausembryonen (Chu et al. 2013). Berichte über Wirkungen von Phthalaten und PCB auf die *in vivo*-Entwicklung von Präimplantationsembryonen existieren nicht. Auch ist bis jetzt ungenügend untersucht, inwieweit sich Störungen einer Phthalat- und PCB-Exposition vor, während und nach der Implantation auf das spätere Gesundheitsprofil im Kindheits- und Erwachsenenalter auswirken.

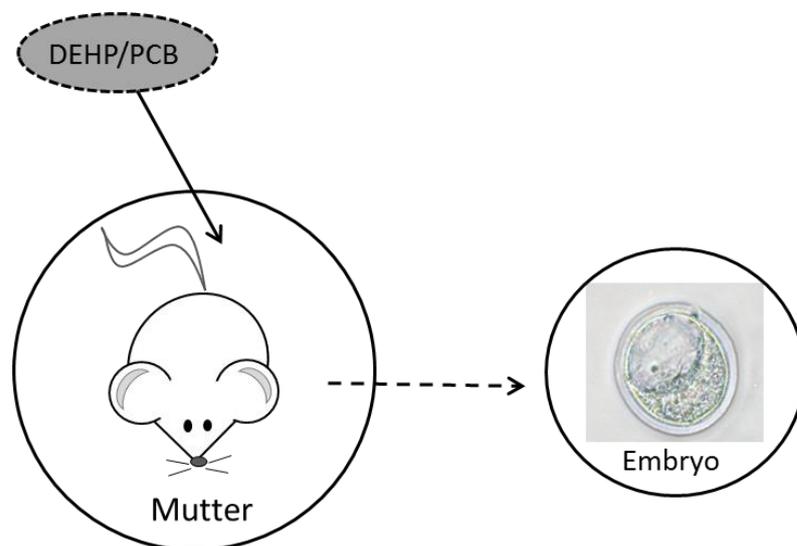


Abbildung 4 - Schema zur Studie I – Das Schema zeigt im Überblick mögliche Effekte einer Exposition von DEHP und/oder PCB direkt auf die Mutter und die damit verbundene mögliche Auswirkung der maternalen Exposition auf den Präimplantationsembryonen.

Um zu Langzeiteffekten Aussagen treffen zu können, wurde eine weitere Studie mit einem erweiterten Modellansatz durchgeführt.

Die Studie II ist so aufgebaut, dass die ED-Exposition der Muttertiere über 8-9 Wochen stattfindet und zum Zeitpunkt des Absetzens der Jungtiere (F1) endet. Dieser Versuchsablauf ermöglicht Untersuchungen der F1-Generation, welche *in utero* und während der Laktationsperiode maternal exponiert worden waren, wie Wurfgröße, Geschlechterverteilung und reproduktionstoxische Effekte. F2-Embryonen hatten in der Studie II nur als Keimzellen Kontakt mit den endokrinen Disruptoren (Abbildung 5). Dies ermöglicht Analysen von prologierenden, generationsübergreifenden Effekten.

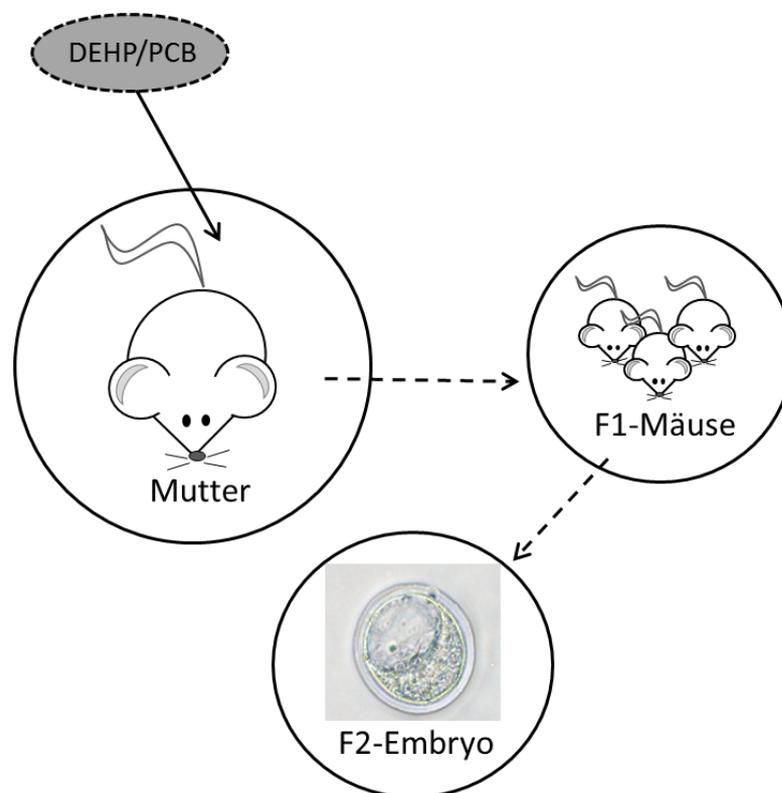


Abbildung 5 - Schema zur Studie II -Das Schema zeigt im Überblick mögliche Effekte einer Exposition von DEHP und/oder PCB direkt auf die Mutter und die damit verbundene mögliche Auswirkung der maternalen Exposition auf F1-Mäuse (Exposition *in utero* und während der Laktation) und F2-Präimplantationsmbryonen. Die F2-Embryonen waren nur als Keimzellen den Substanzen ausgesetzt.

1.6. Untersuchte molekulare Marker im C3H/N-Mausmodell

1.6.1. Peroxisom-Proliferator aktivierbare Rezeptoren (PPAR), ihre Zielgene und Koaktivatoren

PPARs sind Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren und gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren. Als PPAR-Liganden fungieren eine Reihe von endogenen Substanzen wie Fettsäuren, Eicosanoide, Fibrate und synthetische Chemikalien. Nach Liganden-Bindung wandern sie in den Zellkern, bilden dort mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) einen Heterodimer und binden an PPAR response elements (PPREs) im Promotorbereich ihrer Zielgene. PPREs sind in vielen Genen zu finden, die in den Lipidmetabolismus und die Energiehomöostase involviert sind. Bislang sind drei PPAR-Subtypen (alpha, gamma1-3 und delta (auch als PPARbeta bekannt)) in einer Vielzahl von Spezies wie Maus, Ratte, Meerschwein, Schwein und Mensch identifiziert worden. Sie besitzen eine hohe Sequenzhomologie, haben jedoch verschiedene Zielgene und Ligandenbindungsmuster und dementsprechend unterschiedliche regulatorische Funktionen mit speziesspezifischen Besonderheiten.

PPARGamma wird ubiquitär exprimiert und übernimmt eine Vielzahl biologischer Funktionen. PPARgamma reguliert Gene, die die Insulinsensitivität, den Fettstoffwechsel, die Adipozytendifferenzierung, Inflammation und Atherosklerose modulieren. Durch alternatives Splicen entstehen die Isoformen PPARgamma2 und PPARgamma3 (Fajas et al. 1998; Tontonoz et al. 1994). PPARgamma2 besitzt am N-Terminus 28 zusätzliche Aminosäuren und wird ausschließlich im Fettgewebe exprimiert. Im Fettgewebe fördert PPARgamma die Adipozytendifferenzierung und die Lipidspeicherung.

Durch Expositionsstudien an 3T3-L1-Adipozyten konnte auch dem MEHP, als Hauptmetabolit des DEHP, eine adipogene Wirkung zugeschrieben werden (Hurst&Waxman 2003; Feige et al. 2007). MEHP aktiviert PPARgamma und fördert so die Lipidakkumulation und Adipozytendifferenzierung. Arsenescu et al. 2008 konnten zeigen, das PCB 77, ein koplanares Kongener, die Adipozytendifferenzierung von 3T3-L1-Zellen fördert und auch *in vivo* verabreicht das Körpergewicht von Mäusen erhöht.

Das *Fatty acid binding protein 4* (FABP4), auch bekannt als aP2, ist ein Zielgen von PPARgamma. Adipozyten exprimieren FABP4; hier fungiert das Protein als Carrier für den intrazellulären Fettsäure-Transport von der Plasmamembran zum Zellkern.

Zusätzlich ist FABP4 in weiteren metabolischen Prozessen von Bedeutung. Bei diätinduzierter und genetisch bedingter Adipositas schützt eine defiziente FABP4-Expression bei Mäusen vor einer Insulinresistenz und verbessert deren Lipid- und Glukosestoffwechsel (Hotamisligil et al. 1996; Uysal et al. 2000). Comerford et al. 2013 konnten zeigen, dass die FABP4-Plasmakonzentration negativ mit dem BMI korreliert. So führte in dieser Studie ein Gewichtsverlust adipöser Frauen zu einem Anstieg des Plasma-FABP4.

Die transkriptionelle Regulation PPAR-induzierbarer Gene kann durch Koaktivatoren weiterhin verstärkt werden. Ein PPARgamma-spezifischer Koaktivator ist der Mediator 1 (Med1), eine Untereinheit des Mediator-Komplexes. Koaktivatoren schaffen eine Verbindung zwischen nukleare Rezeptoren und der RNA Polymerase II. Bekannt ist, dass Med1 für die PPARgamma-abhängige Induktion der Adipogenese embryonaler Fibroblasten verantwortlich ist (Ge et al. 2008). In der Maus konnten Bai et al. 2011 zeigen, dass Med1 für die Entstehung einer diätinduzierten und PPARgamma-vermittelten Fettleber verantwortlich ist.

PPARalpha-Expression findet hauptsächlich in Leber, Dünndarm, Herz und Skelettmuskulatur statt. In der Leber reguliert PPARalpha Gene des Lipidkatabolismus. PPARalpha-Aktivatoren werden oft eingesetzt, um eine Dyslipidämie zu behandeln und die Plasma-Triglyzeride zu reduzieren. Die Acyl-CoA-Oxidase ist das Schlüsselenzym der peroxisomalen beta-Oxidation. Dieses Enzym wurde als erstes Zielgen des PPARalpha entdeckt und belegte so den Zusammenhang zwischen PPARalpha und dem Lipidstoffwechsel (Dreyer et al. 1992).

PPARdelta ist zurzeit noch der am wenigsten untersuchte PPAR-Subtyp. Er wird ubiquitär exprimiert und moduliert hauptsächlich Gene der Wundheilung, der Keratinozytendifferenzierung und Metabolismus, vor allem des Lipidkatabolismus. In Versuchen an adipösen Mäusen wurde eine Suppression des PPARdelta beobachtet (Berry et al. 2009).

Die metabolischen Signalwege bezüglich der PPARs sind gut untersucht und dementsprechend finden PPAR-Liganden therapeutisch ihren Einsatz. Wenige Untersuchungen über mögliche PPAR-Signalwege existieren hingegen auf dem Gebiet der Reproduktion und Embryonalentwicklung. Bekannt ist, dass murine und bovine Embryonen PPARgamma und delta ab dem 2-Zellstadium exprimieren (Huang et al. 2007; Mohan et al. 2002). Aus diesen Studien ist bekannt, dass PPARgamma und -delta essentiell für die Entwicklung von Präimplantationsembryonen sind. PPARdelta trägt darüber hinaus zu einer erfolgreichen Implantation des Embryos in die Uterusschleimhaut bei.

In der vorliegenden Arbeit wird die Transkriptmenge von PPARalpha, -gamma und delta nach DEHP- und/oder PCB-Exposition in adulten Geweben (Leber und viszerales Fett) und Embryonen untersucht. Eine Aktivierung der PPARs könnte durch direkte und/oder indirekte Mechanismen erfolgen. Die mögliche Aktivierung der PPARs durch DEHP/PCB müsste sich in der Expressionsregulation ihrer Ziel-Gene FABP4 und AOX und dem Koaktivator Med1 widerspiegeln.

1.7.2. Die Adipokine Leptin und Adiponektin

Das Fettgewebe ist ein hoch aktives endokrines Organ und kommuniziert über Hormonproduktion und -sekretion mit peripheren und zentralen Organen (Halberg et al. 2008). Die Fettgewebshormone werden unter dem Begriff „Adipokine“ zusammengefasst. Ihnen gemein ist ihr regulatorischer Einfluss auf Energiehaushalt, Metabolismus und die weibliche Fertilität (Mitchell et al. 2005).

Das Leptin, als prominentester Vertreter der Adipokine, ist ein 16 kDa großes Peptidhormon und Produkt des *obese (ob)* Gens. Die Leptin-Plasmakonzentration korreliert positiv mit dem Körperfettanteil. Die Expression des Leptins erfolgt hauptsächlich im weißen Fettgewebe. Daneben findet auch in anderen Organen wie Leber, Plazenta (Senaris et al. 1997), Ovarien und Testes (Hoggard et al. 1997) eine Leptin-Synthese statt. Leptin nimmt eine Vielzahl von regulatorischen Aufgaben im Körper wahr. Die bekannteste Funktion des Leptins ist die Gewichtsregulation und Körperfetthomöostase. Die zentrale Steuerung erfolgt im Hypothalamus in den Kerngebieten des Nucleus arcuatus und Nucleus paraventricularis. Hier bindet Leptin an den Leptin-Rezeptor und aktiviert so die JAK/STAT Signalkaskade. Es kommt zu einer verminderten Ausschüttung orexigener Neuropeptide, wie dem Neuropeptid Y (NPY) und dem *Agouti-Related Peptid (AgRP)*, und zu einer erhöhten Ausschüttung von anorexigenen Neurotransmittern wie dem Proopiomelanocortin (POMC) und Kokain- und Amphetamin-reguliertem Transkript (CART) (Morley et al. 1999). In der Peripherie kann Leptin im weißen Fettgewebe die Enzyme der beta-Oxidation und den Lipidgehalt der Adipozyten regulieren (Fruhbeck et al. 1997; Zhou et al. 1997). Wahlang et al. 2013 konnten zeigen, dass das PCB 153 zu erhöhten Leptin-Plasmawerten führt.

Adiponektin, ein 26 kDa großes Adipokin spielt wie Leptin eine wichtige Rolle in der Regulation der Energiehomöostase. Bekannt ist, dass die Adiponektin-Konzentration im Plasma negativ mit Adipositas und damit verbundene Folgeerkrankungen korreliert

(Méndez-Sánchez et al. 2006; Stefan&Stumvoll 2002). Hauptsyntheseort des Adiponektins sind adulte Adipozyten. Adiponektin bindet an spezifische Rezeptoren und vermittelt hauptsächlich über die *adenosine monophosphate-activated protein kinase alpha 1/2* (PRKAA1/2) seine metabolischen Effekte (Yamauchi et al. 2002). Zurzeit sind 2 Isoformen (ADIPOR1/2) des Adiponektin-Rezeptors bekannt (Yamauchi et al. 2003).

Neben der Energiehomöostase wirken Adipokine regulatorisch in reproduktionsbiologischen Prozessen mit. Leptin-Null-Mäuse weisen sehr kleine Ovarien und eine verminderte Hormonproduktion auf. Leptin-Effekte können zentral über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse vermittelt werden (Welt et al. 2004). In Mausembryonen fördert Leptin die Produktion von Adhäsionsmolekülen und das Blastozystenwachstum (Cervero et al. 2004). Wenige Studien jedoch existieren über entwicklungsbiologische Effekte des Adiponektins. Beide Adiponektin-Rezeptoren werden von der Plazenta (Chen et al. 2006) und dem Endometrium (Takemura et al. 2006) exprimiert. In Embryonen der Maus sind beide Rezeptor-Isotypen und das Adiponektin-Paralog *c1q tumor necrosis factor alpha related protein 2* (CTRP2) nachweisbar (Schmidt et al. 2008). Fischer et al. 2012 konnten erstmalig einen Einfluss des Adiponektins auf den Glukosestoffwechsel im Kaninchenembryo und damit eine metabolische Funktion des Adiponektins während der Embryonalentwicklung nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit werden die Transkriptmengen und die Plasmakonzentration von Leptin und Adiponektin sowie deren Rezeptoren nach DEHP- und/oder PCB-Exposition in adulten Geweben und Embryonen untersucht. Eine veränderte Expression der Adipokine kann auf eine mögliche Aktivierung der PPARs zurückgeführt werden (Tsuchida et al. 2005, Wong et al. 2004).

Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und deren Haltung

Im Rahmen der tierexperimentellen Fütterungsstudien wurden Mäuse vom Stamm C3H/N eingesetzt. Diese wurden zum Aufbau einer eigenen Zucht zu Beginn von der Firma Charles River (Wiga) (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen der Größe 5 mit Metallgitterabdeckung. Die Käfige der Behandlungsgruppen waren, um Luftkontaminationen zu vermeiden, mit Belüftungshauben und einem Filtersystem versehen. In allen Expositionsversuchen wurden die Mäuse einzeln gehalten. Vor Beginn der Expositionsversuche wurden alle Mäuse mit einer Diät der Firma Altromin, Lage (Haltungsdiät 1320®; Inhaltsstoffe: 19% Rohprotein, 5% Rohfett, 6% Rohfaser, 7,5% Rohasche, 11,9MJ/kg umsetzbare Energie), in Pellet-Form versorgt. Alle Tiere hatten während des gesamten Versuchszeitraumes freien Zugang zu Wasser und Futter und wurden unter kontrollierten Licht- und Temperaturbedingungen (12 h Tag- und Nachtrhythmus; 22±1 °C) gehalten.

2.2. Diätkomposition

2.2.1. Pilotstudie zur Bestimmung des Futterbedarfs und der täglichen DEHP- und PCB-Dosis pro Maus

Im Vorfeld wurde eine Pilotstudie mit 10 Mäusen für 8 Wochen durchgeführt. Hier wurde die tägliche Futtermenge analysiert. Anhand der mittleren täglichen Futterraufnahme der Mäuse konnten der DEHP und PCB-Gehalt für die Diäten in den Hauptversuchen festgelegt werden. Die tägliche DEHP-Aufnahme pro Maus war 0,00102 mg, 0,108 mg und 10,60 mg in den 0,05, 5 und 500 mg/kg KG/Tag DEHP-Behandlungsgruppen. Die tägliche PCB-Aufnahme pro Maus war 0,023 µg, 0,23 µg und 2,3 µg in den 1, 10 und 100 µg/kg KG/Tag PCB-Behandlungsgruppen. Im Folgenden wird die allgemein übliche Dosis-Angabe [mg/kg KG/Tag] oder [µg/kg KG/Tag] verwendet (Kavlock et al. 2002; Moore et al. 2001).

2.2.2. Herstellung und Zusammensetzung der DEHP-Diät und/ oder PCB-Diät

Die mit DEHP-versetzten Diäten wurden von der Firma Altromin (Lage, Deutschland) hergestellt. Reines DEHP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde mit

handelsüblichen THOMY®-Sonnenblumenöl (Maggi GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland) verdünnt. Diese Verdünnungen wurden von der Firma Altromin zur Herstellung der DEHP-Diäten eingesetzt. Alle DEHP-Diäten wurden mit dem gleichen Endvolumen von 50 g Öl/1 kg Diät komponiert. Die Kontrolldiät enthielt die gleiche Menge an Sonnenblumenöl als Vehikel. Da alle eingesetzten Diäten gleich komponiert wurden, besaßen Kontrolldiät und DEHP-Diäten den gleichen Energiewert. Alle weiteren Diätkomponenten entsprachen der Haltungsdiät 1320® in Pellet-Form. Vor Beginn der Fütterungsversuche wurden sowohl das angemischte DEHP-haltige Öl als auch die hergestellten DEHP-Diäten durch das akkreditierte Labor SGS GmbH Germany (Hamburg, Deutschland) gemessen und verifiziert.

Für die PCB-Diäten verdünnten wir im Vorfeld 99,8% reines PCB 101 und PCB 118 zu gleichen Teilen (LGC Standards, Wesel, Deutschland) mit handelsüblichen THOMY®-Sonnenblumenöl. Diese Verdünnungen wurden von der Firma Altromin zur Herstellung der PCB-Diäten eingesetzt. Alle PCB-Diäten wurden mit dem gleichen Endvolumen von 50 g Öl/1 kg Diät komponiert. Die Kontrolldiät enthielt die gleiche Menge an Sonnenblumenöl als Vehikel. Da alle eingesetzten Diäten gleich komponiert wurden, besaßen Kontrolldiät und PCB-Diäten den gleichen Energiewert. Alle weiteren Diätkomponenten entsprachen der Haltungsdiät 1320® in Pellet-Form. Auch hier wurden das PCB-haltige Öl und die hergestellten Diäten vor Beginn der Fütterung durch die Firma SGS GmbH Germany analysiert und verifiziert.

Die DEHP/PCB-Diät wurde entsprechend Punkt 2.2.2. und 2.2.3. komponiert, hergestellt und verifiziert. Die Mengen an DEHP und PCB 101 und 118 wurden kombiniert und in den beschriebenen Mengen eingesetzt.

2.3. Versuchsaufbau

2.3.1. Studie I - Untersuchung der Wirkung von DEHP, PCB und DEHP/PCB auf die Fertilität und die Adipositasentwicklung direkt exponierter Weibchen

Im Rahmen der Studie I wurde untersucht, inwieweit die Nahrungsmittelkontaminanten DEHP, PCB und deren Kombination einen Effekt auf Gesundheit und Fertilität und Adipositasentstehung bei direkt exponierten Weibchen haben. Dazu teilten wir geschlechtsreife C3H/N-Weibchen mit einem Körpergewicht von 18–23 g zufällig verteilt in 4 Gruppen auf. Diese wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an (I) DEHP (0; 0,05; 5 und 500 mg/kg KG/Tag), (II) PCB101+118 (0; 1; 10; 100 µg/kg KG/Tag) und (III) eine Kombination aus DEHP und PCB101+118 (0+0; 0,05+0,1; 5+10; 500+100 mg DEHP+µg PCB/kg

KG/Tag) für einen Zeitraum von 8 Wochen gefüttert. Futterraufnahme und Gewichtsverlauf wurden an 2 festen Tagen in der Woche bestimmt. In der letzten Versuchswoche wurden die F0-Weibchen zur Präimplantationsembryonengewinnung einer Superovulation unterzogen, verpaart und zur Entnahme von Embryonen, Organen und Blut durch eine zervikale Dislokation getötet. Alle Fütterungsexperimente der Studie I wurden einzeln und zeitlich nacheinander durchgeführt. Im DEHP-Fütterungsversuch wurden 3 unabhängige Versuche (2 Versuche mit 10 Tieren/Gruppe und 1 Versuch mit 5 Tieren/Gruppe) durchgeführt. In den PCB- und DEHP/PCB-Fütterungsversuchen wurden 2 unabhängige Versuche durchgeführt mit jeweils 10 Tieren/Gruppe.

Studie I

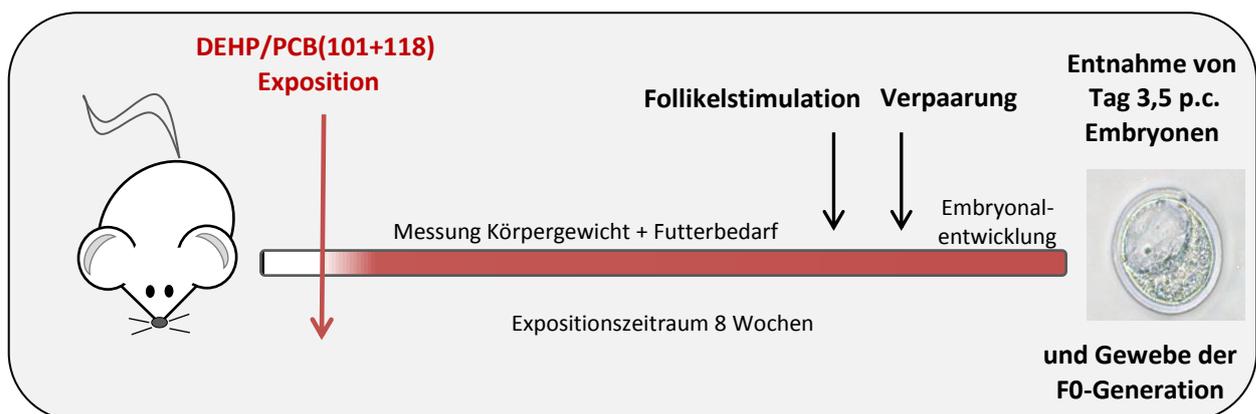


Abbildung 6 - Methodische Darstellung der Studie I.

2.3.2. Studie II - Untersuchung der Wirkung von DEHP, PCB und DEHP/PCB auf die Fertilität und die Adipositasentwicklung direkt exponierter direkt exponierter Muttertiere und deren *in utero* + laktational exponierten F1- Nachkommen

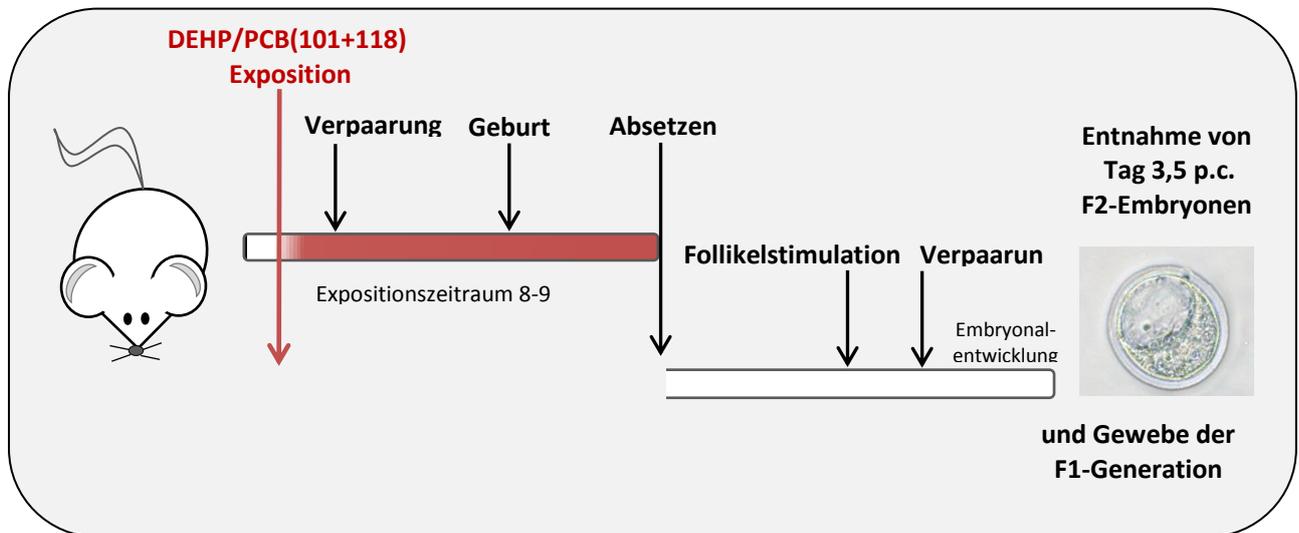
Das Ziel der Studie II war es zu untersuchen, welche Einflüsse eine maternale Exposition von DEHP, PCB und DEHP/PCB-Gemisch auf die Nachkommenschaft hat. Hierbei waren die F1-Nachkommen diesen Stoffen im Mutterleib über den mütterlichen Blutkreislauf während der gesamten Entwicklung und postnatal über die Muttermilch diesen Stoffen ausgesetzt.

Es wurden Körpergewichte, Plasma, Gewebe und Embryonen der F1-Generation untersucht. Dazu teilten wir geschlechtsreife C3H/N-Weibchen mit einem Körpergewicht von 18–23 g

zufällig verteilt in 4 Gruppen auf. Diese wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an (I) DEHP [0; 0,05; 5 und 500 mg/kg kg/Tag], (II) PCB [0; 1; 10; 100 µg/kg KG/Tag] und (III) eine Kombination aus DEHP und PCB101+118 (0+0; 0,05+0,1; 5+10; 500+100 mg DEHP+µg PCB/kg KG/Tag) für einen Zeitraum von insgesamt 8-9 Wochen gefüttert.

Am Ende der ersten Fütterungswoche wurden die Weibchen über Nacht mit nicht-exponierten Männchen verpaart. Am folgenden Morgen wurde das Vorhandensein eines vaginalen Plugs als Zeichen einer erfolgten Verpaarung untersucht. Die Zeitspanne bis zu einer Schwangerschaft war zwischen Behandlungstieren und Kontrolltieren ausgeglichen und lag bei 2-7 Tagen. Futteraufnahme und Gewichtsverlauf wurde an 2 festen Tagen in der Woche bestimmt. Aborte wurden durch blutige Rückstände im Käfig zusammen mit einem drastischen Gewichtsverlust der schwangeren Tiere bestimmt. Die brachten ihre Nachkommen zur Welt und haben sie 3 Wochen gesäugt. Nach dem Absetzen (Tag 21 postnatal (PNT 21)) der Jungtiere wurden die Mütter durch eine zervikale Dislokation getötet und Gewebe entnommen. Gleichzeitig wurden die Nachkommen gewogen und geschlechterspezifisch getrennt. Im DEHP-Versuch wurde das mittlere Körpergewicht von insgesamt 12 Würfen/Gruppe, im PCB- bzw. im DEHP/PCB-Versuch von jeweils 10±3 Würfen/Gruppe berechnet.

Zum Zeitpunkt des Absetzens wurden für den weiteren Versuchsablauf zufällig F1-Männchen und F1-Weibchen ausgewählt (DEHP-Versuche: 12♀+12♂ je Gruppe; PCB-Versuche: 15♀+15♂ je Gruppe; DEHP/PCB-Versuche: 15♀+15♂ je Gruppe). Diese F1-Tiere bekamen die Haltungsdiät 1320® ohne Zusatz von DEHP und/oder PCB. Am Tag 84 postnatal (PNT 84) wurde ihr mittleres Körpergewicht bestimmt. Geschlechtsreife F1-Weibchen (PNT 84) wurden superovuliert, verpaart und 3,5 Tage später für die Entnahme von F2-Präimplantationsembryonen, Organen und Blut durch eine zervikale Dislokation getötet (siehe Punkt 2.4.1. und 2.4.2.). Alle Fütterungsexperimente der Studie II wurden einzeln und zeitlich nacheinander durchgeführt. Im DEHP-Fütterungsversuch wurden 2 unabhängige Versuche (1 Versuch mit 10 Tieren/Gruppe und 1 Versuch mit 5 Tieren/Gruppe) durchgeführt. In den PCB- und DEHP/PCB-Fütterungsversuchen wurden 2 unabhängige Versuche durchgeführt mit jeweils 5 Tieren/Gruppe.

Studie II**Abbildung 7** - Methodische Darstellung der Studie II.

2.4.1. Gewinnung der Präimplantationsembryonen

Zur Steigerung der Embryonenanzahl wurden die weiblichen Mäuse mit 7,0 IE intraperitoneal injiziertem Pferdeserum-Gonadotropin (PMSG) (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) stimuliert. Um die Auslösung der Ovulation zu unterstützen wurden nach 48 h 7,5 IE humanes Choriongonadotropin (hCG) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Im direkten Anschluss wurden die stimulierten Weibchen über Nacht mit nicht-exponierten, geschlechtsreifen Männchen verpaart. Am folgenden Morgen wurde die erfolgreiche Verpaarung durch das Vorhandensein eines vaginalen Plugs überprüft. 92 h nach der hCG-Injektion wurden die erfolgreich verpaarten Weibchen mittels zervikaler Dislokation getötet. Der Uterus wurde anschließend entnommen und die Tag 3,5 p.c. Embryonen mit 0,2 ml steril filtriertem PBS (versetzt mit 4 % Polyvinylalkohol) unter einer halbsterilen Werkbank aus dem Uterus ausgespült.

PBS (phosphate buffered saline) (pH 7,4)

| | |
|----------------------------|--------|
| Natriumchlorid (NaCl) | 8,00 g |
| Kaliumchlorid (KCl) | 0,20 g |
| Di-Natriumhydrogenphosphat | 1,44 g |

Kalium-di-hydrogenphosphat 0,24 g

Aqua dest. ad 1L

Um die Präimplantationsembryonen von Gewebe und Sekretresten zu befreien, wurden sie zweimal in PBS gewaschen. 10 Embryonen von mindestens 3 Weibchen wurden für eine Probe gesammelt. Die Morphologie der gesammelten Embryonen wurde unter einem Lichtmikroskop (KL 1500 LCD; Carl Zeiss, Deutschland) bestimmt. Embryonen mit fragmentierten und disaggregierten Blastomeren wurden als degenerierte Embryonen eingestuft. Die gesammelten Embryonen wurden sofort in Flüssigstickstoff getan und bei -80°C gelagert.

2.4.2. Organgewinnung und Blutentnahme

Das Blut der Tiere wurde durch eine terminale Herzpunktion mit heparinisierten Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen. Zur Gewinnung des Plasmas wurden die Proben bei 6500 *rpm* für 5 min und 4°C zentrifugiert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Organe und Gewebe der Tiere (viszerales Fett, Leber, Herz, Schilddrüse, Hirn, Uterus und Ovarien, Testis und Glandulae vesiculosa) wurden entnommen, gewogen und sofort in Flüssigstickstoff getan und bis zur ihrer Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.4.3. Bestimmung der Triglyzeridkonzentration in Lebergewebe

Die Extraktion der Gesamtlipide aus der Leber zur Bestimmung der Konzentration erfolgte nach der Methode von Hara und Raddin (1978). Dazu wurden 0,2 g homogenisierte Leber mit 4 ml eines Hexan-Isopropanol-Gemisches (3:2; v/v) versetzt und für 20 h im Schüttelinkubator bei RT geschüttelt. Das gewonnene Extrakt wurde bis zur Messung bei -20°C gelagert. Die Messung der Konzentration der Triglyzeride erfolgte mittels Triglyceride FS-Kit (DiaSys, Holzheim, Deutschland).

Prinzip:

Triglyzeride werden durch das Enzym Lipoproteinlipase zu freien Fettsäuren und Glycerin abgebaut. Bei der Umsetzung des Glycerins entsteht Wasserstoffperoxid, was zusammen mit 4-Aminoantipyrin und Chlorphenol zu einem farbigen Chinonimin umgesetzt wird. Diese Substanz kann bei 550 nm spektralphotometrisch bestimmt werden.

Durchführung:

Hexan-Isopropanol verdampfte und die Proben wurden mit 20 µl TritonX 100-Chloroform-Gemisch (1:1; v/v) versetzt. Das Chloroform verdampfte und die Proben wurden bei 550 nm photometrisch gemessen. Bei der Berechnung der Konzentration der Triglyzeride wurde die Einwaage der Proben berücksichtigt.

Berechnung: $c \text{ [mg/dl]} = E_p \times C_{st} / E_{st}$

c - Konzentration Triglyzeride

E_p - Extinktion Probe

C_{st} - Konzentration Standard

E_{st} - Extinktion Standard

2.4.4. Leptin und Adiponektin ELISA

Für die Bestimmung der Plasmakonzentration von Leptin und Adiponektin wurden die mausspezifischen ELISA-Kits von CrystalChem (Downers Grove, IL, USA) eingesetzt.

Prinzip Sandwich-ELISA:

Zum Einsatz kommen 2 monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope des Leptins bzw. Adiponektins. Voraussetzung ist die Markierung eines Reaktionspartners mit Enzymen, die ein chromogenes Substrat umsetzen. Es kommt zu einer Farbreaktion, die optisch gemessen wird.

Durchführung:

Zu den festgebundenen spezifischen Antikörpern wurden 5 µl Plasmaprobe oder Standard mit der zu bestimmenden Konzentration gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Entfernung des Überschusses werden nun enzymmarkierte spezifische Antikörper zugegeben. Nach mehreren Waschschritten (5x) mit PBS wurden die Wells mit einer Stopp-Lösung versetzt und im Mikrotiterplattenreader gemessen. Das gemessene Signal der Farbreaktion der enzymmarkierten Antikörper ist direkt proportional zur Leptin- und Adiponektinkonzentration in der Probe.

Ansatz:

| | |
|--------------------|----------------|
| Plasmaprobe | 5 µl |
| Enzymkonjugat | 100 µl |
| I. Inkubationszeit | üN (16 h-20 h) |
| Waschschrritte | 5 x 300 µl |
| Substrat | 100 µl |

| | |
|--------------------------------|----------------------------|
| II. Inkubationszeit | 30 min |
| Stopplösung | 100 µl 1,8 N Schwefelsäure |
| Kreuzreaktionen lt. Hersteller | human, Ratte |

2.5. Histologische Untersuchungen des Fettgewebes

Um das Fettgewebe auf morphologische Änderungen hin zu beurteilen, wurden Fettgewebsschnitte angefertigt. Im Vorfeld wurden dafür Objektträger silanisiert (2 min in APES). Die Gewebe wurden für 24 h in PBS und 4% Paraformaldehyd (pH 7,5) fixiert und in Paraffin eingebettet.

Einbettungsprotokoll:

Ethanol von 70 % über 80 % und 90 % bis 96 %; 2x Isopropanol; 2x Xylol; je 1 h pro Lösungsmittel. Die Einbettung erfolgte in einem automatischen Einbeter.

Anfertigung der Paraffinschnitte:

Vom Fettgewebe wurden am Mikrotom in 5 µm dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und für 2-4 h bei 40°C getrocknet.

2.5.1. Hämalaun/Eosin Färbung an Paraffinschnitten

Die Fettgewebsschnitte wurden für 2-24 h bei 60 °C erhitzt und anschließend mit 2x Xylol, in einer absteigenden Ethanol-Reihe (95 % bis 25 %) und *Aqua dest.* (je 5 min) rehydriert.

Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gefärbt. Dafür wurden die Schnitte für 5min in Hämalaun (nach Mayer) inkubiert, anschließend 20-30 min mit Leitungswasser fließend gewässert und 1 min in *Aqua dest.* gespült. Im Anschluss erfolgte die Zytoplasmafärbung mit einer wässrigen Lösung aus Eosin für 3 min.

Zur Entfernung des Wassers aus den gefärbten Schnitten erfolgten wieder Waschschrte in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 25 % bis 95 %.

Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit einem Eindeckmedium und Deckglas versehen. Die Bewertung der Schnitte und die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop (BZ-8100; Keyence Germany, Frankfurt). Dazu wurden pro Tier 3 Schnitte und in jedem Schnitt 3 unterschiedliche Sektionen ausgewertet.

Hämalaun nach Mayer (saurer Hämalaun)

1 g Hämatoxylin wurde in 10 ml absolutem Ethanol gelöst und auf 1 l mit *Aqua dest.* aufgefüllt. Anschließend wurden 0,17 g Natriumiodat und 50 g Kalium-Aluminium-Sulfat

zugegeben und gemischt. Nach vollständiger Lösung wurden 50 g Chloralhydrat und 0,1 g Zitronensäure zugefügt.

2.6. Molekulare Methoden

2.6.1. Messenger RNA-Isolation aus Präimplantationsembryonen

Aus 3,5 Tage alten Präimplantationsembryonen wurde mRNA mit dem Dynabeads® mRNA Direct™ Kit gewonnen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Dynabeads® sind magnetische Polysterol-Perlen. Die bei -80°C in PBS gelagerten Embryonen wurden langsam auf Eis aufgetaut, bei 13000 *rpm* für 10 min zentrifugiert und der überschüssige PBS-Puffer abgenommen. Die Embryonen wurden in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und bei RT für 10 min auf einem Schüttler inkubiert. Parallel dazu wurden die Dynabeads® mit Hilfe eines *Magnetic Particle Concentrator* (DynaL MPC®) in Lysepuffer gewaschen. Pro Embryo wurden 10 µl gewaschene Dynabeads® zum Lysat gegeben. Das Lysat wurde zweimal mit Waschpuffer A und zweimal mit Waschpuffer B (je 30 µl) gewaschen. Die mRNA wurde in 11 µl DEPC-*Aqua dest.* durch Erhitzen auf 65°C in einem Thermocycler von den Oligo(dT)25 der Dynabeads® gelöst. Um ein erneutes Verbinden der mRNA mit den Dynabeads® zu verhindern, wurden die Proben umgehend in den MPC auf Eis gestellt und der Überstand mit mRNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

| <u>Reagenzien</u> | <u>Lysepuffer</u> | <u>Bindepuffer</u> |
|-----------------------|-------------------|--------------------|
| LiCl (8 M) | 6,25 ml | 12,5 ml |
| EDTA (0,5 M) | 186,1 mg | 400 µl |
| Tris/HCl (1 M, pH7,5) | 10 ml | 2 ml |
| SDS (10 %) | 500 mg | — |
| DTT (0,1 M) | 38,56 mg | — |

| <u>Reagenzien</u> | <u>Waschpuffer A</u> | <u>Waschpuffer B</u> |
|-----------------------|----------------------|----------------------|
| LiCl (8 M) | 1,875 ml | 1,875 ml |
| EDTA (0,5 M) | 200 µl | 200 µl |
| Tris/HCl (1 M, pH7,5) | 1 ml | 1 ml |
| SDS (10 %) | 1 ml | — |

2.6.2. RNA-Isolation aus Gewebe

Das Mausgewebe wurde in Flüssigstickstoff gemörsernt, in 700 µl GTC-Lösung aufgenommen und mit einem Ultraturax homogenisiert. Anschließend wurden 70 µl 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 700 µl Phenol und 140 µl Chloroform zu jeder homogenisierten Gewebeprobe gegeben, geschüttelt und bei -20 °C für 60 min inkubiert. Danach wurden die Proben 25 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen kaltem Isopropanol, 120 minütiger Inkubation bei -20 °C und darauf folgender 30 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl – 100 µl DEPC-Aqua dest. aufgenommen.

GTC-Lösung

Guanidiniumthiocyanathydrochlorid 4 M

Natriumcitrat 25 mM

Natriumlaurosylsarcosinat 17 mM

β-Mercaptoethanol 100 mM (erst unmittelbar vor Gebrauch der Lösung hinzugegeben)

DEPC-Aqua dest.

1 ml Diethylpyrocarbonat (0,1 % DEPC) wurde in einen Liter Aqua dest. gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung autoklaviert. Alle wässrigen Lösungen für die RNA-Isolierung wurden mit DEPC-Aqua dest. hergestellt.

2.6.3. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels Absorptionsmessung bei $\lambda=260$ nm am UV/VIS-Spektrometer NanoVu (GE Healthcare). Dafür wurde 1 µl der RNA direkt in die Messeinrichtung pipettiert und die Konzentration gemessen. Eine Absorption von 1,0 OD bei 260 nm entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Eine auftretende Proteinverunreinigung wurde durch gleichzeitige Messung bei $\lambda=280$ nm festgestellt. Der Quotient aus gemessener optischer Dichte bei 260 nm und 280 nm sollte unter 1,8 liegen. Zur Kontrolle der intakten RNA wurde anschließend 1 µg RNA auf ein Agarosegel (1,2 %) aufgetragen.

2.6.4. Verdau der DNA

Um Rückstände genomischer DNA in der präparierten RNA auszuschließen, wurde die isolierte RNA aus Gewebe für 1 h mit DNase bei 37 °C behandelt. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung der DNase (37 °C für 30 min) und anschließender Inkubation mit einem Stoppreagenz (2 µl/Ansatz) bei 5 °C für 10 min abgeschlossen.

Ansatz pro 3 µg RNA-Probe:

| | |
|--------------------------------|--------|
| DNase/RNase frei (10 U/µg RNA) | 2 µl |
| RNase Inhibitor (40 U/µg RNA) | 0,5 µl |
| 10x Puffer | 2 µl |
| DEPC-Aqua dest. ad 30 µl | |

2.6.5. cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mittels Reverser Transkriptase (RT) in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese von Geweben wurden 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit 1 µl *Random Primer* (50 pM) versetzt und mit DEPC-Aqua dest. auf 12,5 µl aufgefüllt. Nach 5 min Inkubation zur Primeranlagerung bei 65 °C im Thermocycler, wurden auf Eis hinzupipettiert:

| | |
|----------------------------------|--------|
| 5x Puffer | 4,0 µl |
| RNase-Inhibitor | 0,5 µl |
| dNTP (10mM) | 2,0 µl |
| Reverse Transkriptase (200 U/µl) | 1,0 µl |

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

- 1.) 25°C 10 min
- 2.) 42°C 60 min
- 3.) 70°C 10 min

Nach der Reaktion mit DEPC-Aqua dest. ad 90 µl, Lagerung bei -20 °C

Für die cDNA-Synthese aus Embryonen wurde die gesamte Menge isolierter mRNA eingesetzt.

Reaktionsansatz:

| | |
|---------------------------|------|
| 10x PCR-Puffer | 2 µl |
| MgCl ₂ (50 mM) | 2 µl |
| dNTP (10 mM) | 2 µl |

| | |
|-------------------------------|--------|
| <i>Random Primer</i> (50 pM) | 1 µl |
| Superscript II (200 U/µl) | 0,5 µl |
| RNase-Inhibitor (40 U/µg RNA) | 0,2 µl |
| DEPC- <i>Aqua dest.</i> | 1,3 µl |

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

- 1.) 25°C 10 min
- 2.) 42°C 60 min
- 3.) 99°C 5 min

Nach der cDNA-Synthese wurden die Proben von Embryonen mit 80 µl DEPC-*Aqua dest.* auf 100 µl aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.6.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die erfolgreiche cDNA-Synthese zu kontrollieren, wurde eine Kontroll-PCR mit den *housekeeping*-Genen 18S-rRNA (für Gewebeproben) und GAPDH (für Embryonenproben) durchgeführt. Bei erfolgreicher cDNA-Synthese wurden die Transkripte der zu untersuchenden Gene mittels spezifischer Primer amplifiziert. Die Bezeichnung und Sequenzen der Primer, mit den entsprechenden *Annealing*-Temperaturen und Größen der resultierenden PCR-Produkte sind in Tabelle 1 gelistet. In die PCR wurden 1 µl cDNA und 24 µl Reaktionsmix eingesetzt.

Standard-Reaktionsansatz:

| | |
|-------------------------------|---------|
| 10x PCR-Puffer | 2,5 µl |
| MgCl ₂ (50 mM) | 1,0 µl |
| Primer <i>forward</i> (10 pM) | 0,5 µl |
| Primer <i>reverse</i> (10 pM) | 0,5 µl |
| dNTP (10 mM) | 0,5 µl |
| Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) | 0,2 µl |
| <i>Aqua dest.</i> | 18,8 µl |

Die PCR wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 1.) 95°C 4 min
- 2.) 95°C 1 min Denaturierung
- 3.) 60°C 1 min Primer-*Annealing*
- 4.) 72°C 1 min Kettenverlängerung
- 5.) 29-fache *Wiederholung ab Schritt 2.*)

6.) 72°C 5 min

7.) 4°C ∞

Denaturierung, Primer-*Annealing* und Kettenverlängerung wurden in 30 Zyklen wiederholt. Die *Annealing*-Temperatur wurde den optimalen Bedingungen der einzelnen Primer angepasst (Tabelle 1). Nach erfolgter PCR wurden die Produkte, je nach zu erwartender Fragmentlänge, auf ein Agarosegel (1,8 % bis 2,2 %) aufgetragen (siehe Punkt 2.5.8.).

2.6.7. Primer für PCR

Die Primer der Sequenzen der zu untersuchenden Gene der wurden mit dem online verfügbaren Programm Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) erstellt, und in der NCBI-Datenbank BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf ihre Spezifität getestet. Die Produktgröße lag zwischen 100-280 Basenpaaren (Bp).

Tabelle 1 Verwendete Primer für die *Real Time* RT-PCR und die Standard-PCR

| Gen | Sequenz 5'–3' | Sequenz 3'–5' | Bp |
|--------------------|-------------------------|------------------------------|-----|
| <i>ppara</i> | TCTCCCCATTTCTCATCCTG | GCCAGGACTGAAGTTCAAGG | 170 |
| <i>ppary</i> | GATGGAAGACCACTCGCATT | AACCATTGGGTGAGCTCTTG | 115 |
| <i>pparδ</i> | TGGAGCTCGATGACAGTGAC | GTAAGGCTGTGAGGGTGGT | 161 |
| <i>leptin</i> | ATCTATGTGCACCTGAGGGTAGA | TCCTTTTCACAAAGCCACTAT | 151 |
| <i>adiponectin</i> | TGTTGGAATGACAGGAGCTG | CGAATGGGTACATTGGGAAC | 147 |
| <i>fabp4</i> | TCGACTTTCATCCCCTTC | TGGAAGCTTGTCTCCAGTGA | 282 |
| <i>fsS</i> | TGCTCCCAGCTGCAGGC | GCCCGGTAGCTCTGGGTGTA | 109 |
| <i>med1</i> | TCCAGCCAGTCCAAAAATTC | TCATAAGGGAGGATGGCTTG | 130 |
| <i>leptin</i> | TGACACAAAACCTCATCA | TGAAGCCCAGGAATGAAGTC | 114 |
| <i>leptinR1</i> | GATTTCTGGGACAGCCAAA | CTCTTGCTCCTCACCTGGAC | 171 |
| <i>ctpr2</i> | CTCAGGAGTGGTGGGAAGGAA | CCTTTGGTCCTGTTTTCCA | 129 |
| <i>adipoR2</i> | AAGCTCTGGGTGAACAGCAT | TGAACCAGAGTCTCCCTGCT | 258 |
| <i>gapdh</i> | ACCCAGAAGACTGTGGATGG | ACACAT TGG GGG TAG GAA CA | 137 |
| <i>18S</i> | AGAAACGGCTACCACATCCAA | CCTGTATTGTTATTTTTCGTCACTACCT | 91 |

2.6.8. RNA- und DNA-Gelelektrophorese

RNA-, DNA- und Plasmid-Fragmente wurden nach Zugabe von 3 µl 10x Ladepuffer auf 1,0 % bis 2,2 % igen Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA bzw. DNA wurde durch

Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels Videokamera und computerunterstützter Bildbearbeitung (BioCaptMW, LTF Labortechnik, Wasserburg) dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software Bio 1D der Firma LTF Labortechnik.

Agarosegel

| | |
|---------------------------|-----------|
| Agarose | 1,0-2,2 g |
| 1x TAE-Puffer | 100 ml |
| Ethidiumbromid (50 µg/ml) | 3 µl |

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid zugegeben.

10x TAE-Puffer (pH 8,0)

| | |
|--------------|---------|
| Tris | 48,4 g |
| Essigsäure | 11,4 g |
| EDTA (0,5 M) | 20,0 ml |

6x Ladepuffer (100 ml)

| | |
|----------------|--------|
| Glycerol | 30 ml |
| Bromphenolblau | 0,25 g |
| 1xTAE Puffer | 70 ml |

Die Komponenten wurden in 1 l Wasser gelöst.

2.6.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um PCR-Produkte zu sequenzieren bzw. klonieren zu können, wurde das DNA-Fragment unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mittels des *Qia Quick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden).

2.6.10. Herstellung von Plasmid-Standards für die quantitative *real time* PCR

2.6.10.1. Ligation der PCR-Fragmente

Das pGEMT-Vektor System der Firma Promega (Mannheim) wurde für die Herstellung der Plasmid-Standards genutzt. Pro Reaktion wurden 8 µl aufgereinigtes PCR-Produkt eingesetzt.

Ligationsansatz:

| | |
|---------------------------------|-------|
| pGEMT-Vektor | 1 µl |
| 2x <i>Rapid Ligation Buffer</i> | 10 µl |
| T4 DNA-Ligase (1U) | 1 µl |
| PCR-Produkt | 8 µl |

Die Reaktion wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt und direkt am nächsten Tag zur Transformation eingesetzt oder bei 20°C gelagert.

2.6.10.2. Transformation der Plasmid-Standards in kompetente *E. coli* XL1-Blue

Die kompetenten Zellen wurden 20 min auf Eis aufgetaut, der gesamte Ligationsansatz hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Es erfolgte eine Inkubation für 20 min auf Eis. Im Wasserbad erfolgten der Hitzeschock bei 42 °C und 45 s und darauf eine Abkühlung auf Eis für 2 min. Nun wurden sie mit 400 µl LB-Medium (ohne Ampecillin) für 1 Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde ein Teil des Ansatzes in 50-200 µl auf LB-Selektionsagar (Ampicillin: 100 µg/ml; IPTG (Isopropylthio-β-D-galactosid): 80 µg/ml; X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid): 50 mg/ml) ausgestrichen und über Nacht im Inkubator bei 37°C wachsen gelassen. Anschließend wurden die weißen Klone gepickt, auf einer Masterplatte (LB-Agar+Ampicillin [100 µg/ml]) ausplattiert und in 4 ml LB-Medium überimpft. Die Masterplatten und die Flüssigkultur (schüttelnd – 240 rpm) wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Selektion der positiven Klone (Blau-Weiß-Selektion):

Transformierte Bakterien, welche den pGEMT-Vektor enthalten, sind ampecillinresistent und besitzen dazu eine funktionsfähige β-Galaktosidase, welche die Umsetzung von X-Gal in Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol (Kolonien erscheinen blau) vermittelt. Sie ist im Wirtstamm XL1-Blue deletiert, aber auf dem pGEM-T Vector codiert. Der Einbau des DNA-Fragmentes in die *multiple cloning site* (liegt innerhalb eines 5'Abschnitts des lacZ-Gens) zerstört das Leseraster des lacZ-Gens. Dadurch kann keine funktionsfähige β-Galaktosidase mehr gebildet werden, so dass die betreffenden Bakterienkolonien in Gegenwart von X-Gal farblos (weiß) bleiben. IPTG dient als Induktor für die β-Galaktosidase. Es kann durch die β-Galaktosidase nicht umgesetzt werden, wird somit nicht verstoffwechselt und liegt dauerhaft als Induktor vor.

LB-Medium (Luria-Bertani, pH 6,4-7,5)

Pepton 10 g

Hefe-Extrakt 5 g

Natriumchlorid 10 g

Aqua dest. ad 1l

Stocklösungen:

Ampecillin: 50 mg/ml

X-Gal: 20 mg/ml in Dimethylformamid

IPTG: 200 mg/ml in *Aqua dest.*

Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren noch 15g/l Agar hinzugefügt. Das feste LB-Medium wurde bis zum Flüssigwerden erwärmt. Kurz vor dem Ausgießen in bakteriologische Petrischalen wurde zu 200 ml LB-Agar folgendes hinzugegeben: 2 ml Ampecillin, 400 µl X-Gal und 40 µl IPTG. Bei RT kühlten die Platten aus und wurden bei 4°C gelagert.

2.6.10.3. Plasmid-Isolation aus *E.coli XL1-Blue*

Die Plasmid-Isolierung wurde mit dem GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare, München) durchgeführt. 2 ml einer Übernachtskultur wurden in einem 2ml Reaktionsgefäß für 1 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA eluiert.

2.6.10.4. Restriktion von Plasmiden

Um den Klonierungserfolg zu kontrollieren, wurden die rekombinanten Plasmide durch Restriktion mit zwei Endonukleasen geschnitten.

Restriktionsansatz:

| | |
|--------------------------|-------|
| Apal (5 U) | 1 µl |
| SacI (5 U) | 1 µl |
| Puffer B | 1 µl |
| Plasmid bzw. PCR Produkt | 5 µl |
| <i>Aqua dest. ad</i> | 10 µl |

Es wurden die Enzyme Apal und SacI eingesetzt, für die es je eine spezifische Schnittstelle in der *multiple cloning site* des pGEMT-Vektors gibt. Der Restriktionsverdau der Plasmide erfolgte 60 min bei 37 °C in einem vom Hersteller definierten Puffer. Der gesamte Ansatz wurde auf ein 1,8 % Agarosegel aufgetragen (siehe Punkt 2.5.8.) und ausgewertet. Die erhaltenen Fragmente sind ca. 80 bp länger als das eigentliche PCR-Produkt, da mit dem Restriktionsverdau auch ein Teil des Vektors mit ausgeschnitten wird.

2.6.10.5. Glyzerinkultur

Positive Klone können für unbestimmte Zeit als Glyzerinkultur gelagert werden. Man gibt in ein 2 ml Reaktionsgefäß 0,6 ml der Übernachtskultur und fügt 0,4 ml Glycerin hinzu. Dieses wird gut gemischt, für 15 min auf Eis inkubiert und dann bei –80 °C eingefroren.

2.6.11. Quantitative *Real Time* PCR (qRT-PCR)

Die *real time* PCR ist eine Methode, die eine quantitative Echtzeitanalyse der amplifizierten cDNA-Fragmente über eine Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen ermöglicht. Der fluoreszierende Farbstoff SYBR®-Green lagert sich interkalierend in doppelsträngige-DNA ein. Wobei die Zunahme der Fluoreszenz parallel mit der Zunahme der cDNA korreliert. Der Vorteil der *real time* PCR liegt in der Quantifizierung von cDNA-Fragmenten bei sehr geringem Ausgangsmaterial. Die Amplifikation von cDNA wurde im DNA Engine Opticon® 2 System (MJ Research, München, Deutschland) durchgeführt. Die cDNA-Menge von Geweben betrug pro Reaktion 2 µl, die von Embryonen 4 µl. Zur cDNA wurden je 10 µl SYBR®-Green Reaktionsmix, je 1 µl *Primer forward* (10 pM) und *reverse* (10 pM) zugegeben und der Ansatz mit *Aqua dest.* bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Innerhalb eines Versuchs wurde jede Probe als Doppelbestimmung untersucht. Zur Überprüfung des Reaktionsmixes wurde eine Wasserkontrolle (*NTC*) mitgeführt.

Tabelle 2 Standard-3-Step-Protokoll für qRT-PCR

| Temperatur (°C) | Dauer | Zyklus | Step |
|-----------------|-------|---------|---------|
| 95 | 5 min | 1 | 1 |
| 95 | 20 s | 2 (40x) | 1 |
| 60* | 30s | | 2 |
| 72 | 40s | | 3 |
| 95 | 1 min | 3 | 1 |
| 60 | 1 min | 4 | 1 |
| 55 | 10 s | 5 | 1 (81x) |

*Die *Annealing* Temperatur wurde jeweils den optimalen Bedingungen der zu amplifizierenden PCR-Produkte angepasst.

Als Bemessungsstandard wurde eine Plasmid-DNA (siehe Punkt 2.6.10.) mitgeführt. Für die Quantifizierung wurde die absolute Molekülzahl mit Hilfe des jeweiligen Plasmidstandards berechnet. Die Plasmide wurden in einer Verdünnungsreihe von 10^2 – 10^8 Molekülen mit einer Menge von 2 µl eingesetzt und bei jedem Lauf zum Erstellen einer Standardgeraden mitgeführt. Die Software des Bio-Rad iQ5 Gerätes berechnete anhand dieser Geraden die Molekülzahlen der gemessenen cDNA. Zur Normalisierung der cDNA wurde jeweils 1 Lauf

mit dem *housekeeping* Gen 18S (Gewebeproben) und GAPDH (Embryonenproben) durchgeführt, und die Molekülzahl der verschiedenen Gene in Bezug auf die Anzahl der 18S/GAPDH Moleküle umgerechnet.

2.7. Statistische Auswertung

Für die Statistische Analyse aller erhaltenen Daten wurde das Programm SigmaPlot 11.0 verwendet. Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen in Studie I und II wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und einem anschließenden Duncan's *post hoc test* berechnet. Die Gewichtsdaten in Studie I wurden in drei unabhängigen Versuchen wiederholt, sodass zur Unterstützung der Aussagekraft die Daten zusätzlich mit einem hochsensiblen Test ausgewertet werden konnten. Mit dem Programm SPSS Statistics 17 wurde ein dreifaktorieller Mittelwertvergleich mit den Faktoren Zeit, Fütterung und Experiment durchgeführt, das heißt die Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe in den zeitlichen Veränderungen wurden adjustiert nach dem Einfluss des Experiments. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt ($p < 0,05$). Die Daten in den Abbildungen werden als Mittelwerte und Standardfehler der Einzelwerte dargestellt. Signifikante Unterschiede sind mit einem „*“ gekennzeichnet.

Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur Wirkung von DEHP auf die Fertilität und Adipositasentwicklung weiblicher C3H/N-Mäuse

3.1.1. Studie I - direkte DEHP-Exposition weiblicher Mäuse

3.1.1.1. Wöchentliche Futteraufnahme, Körpergewichtsentwicklung und Gesundheit bei DEHP-exponierten Mäusen

Die tägliche DEHP-Aufnahme über einen Zeitraum von 8 Wochen führte zu keiner negativen Beeinflussung des Gesundheitszustandes der Tiere. Die F0-Mäuse zeigten keine toxisch-klinischen Anzeichen.

Die wöchentliche Futteraufnahme der Tiere erhöhte sich signifikant um 20 % in allen DEHP-Konzentrationsgruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kontrolle: $17,5 \pm 1,0$ g; 0,05 mg DEHP: $21,0 \pm 1,0$ g; 5 mg DEHP: $20,9 \pm 1,7$ g; 500 mg DEHP: $20,6 \pm 1,3$ g; $p < 0,05$; Abb.8A). Das mittlere Körpergewicht der Tiere aller 3 DEHP-Konzentrationsgruppen war nach 8 Wochen Fütterung signifikant höher als das mittlere Körpergewicht der Kontrolltiere: 0,05 mg DEHP: 2,15 g [95 % Konfidenzintervall (KI): 1,47; 2,82]; 5 mg DEHP: 2,77 g (95 % KI: 2,09; 3,44); 500 mg DEHP: 2,36 g (95 % KI: 1,68; 3,03); $p < 0,001$; Abb.8B). Die DEHP-Behandlung führte in jedem der 3 Einzelexperimente zu einer hoch signifikanten Gewichtszunahme (Abb.8C-E). Das Ausmaß der Körpergewichtszunahme zwischen den 3 Einzelexperimenten war signifikant unterschiedlich.

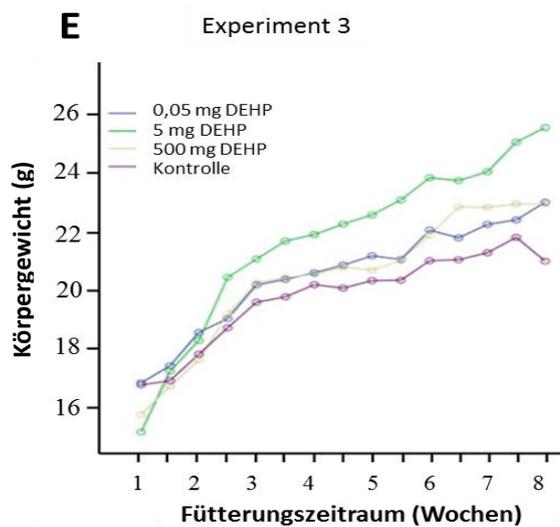
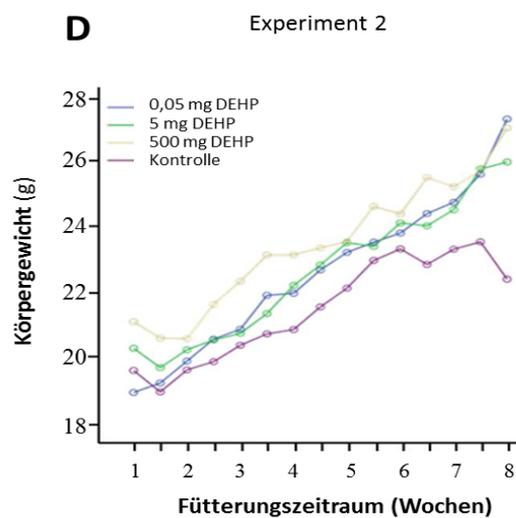
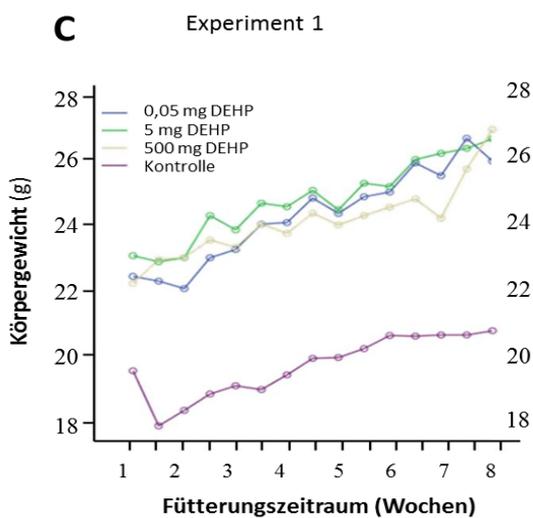
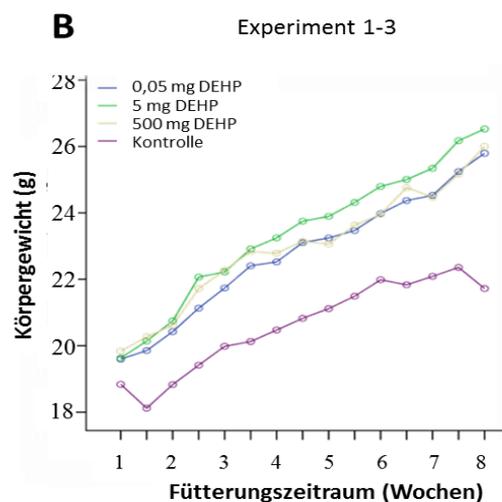
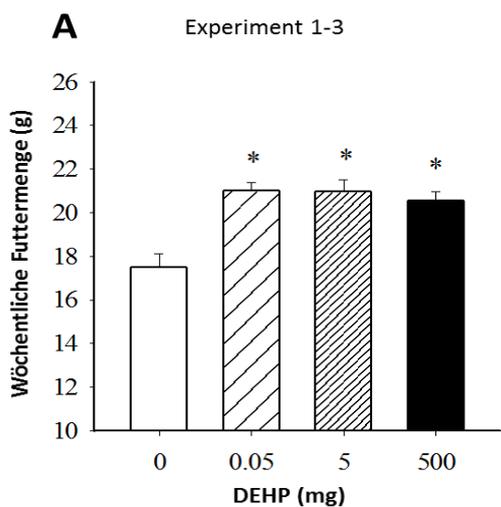


Abbildung 8 Körpergewichtsentwicklung und Futterraufnahme nach 8-wöchiger Fütterung mit DEHP

Körpergewichtsentwicklung der 3 Einzelexperimente (B: Experiment 1 mit je 10 Mäusen/Gruppe; C: Experiment 2 mit 5 Mäusen/Gruppe; D: Experiment 3 mit je 10 Mäusen/Gruppe) und die mittlere wöchentliche Futterraufnahme (E; zusammengefasste Ergebnisse der 3 Einzelexperimente mit 25 Mäusen/Gruppe). * $p < 0,05$ verglichen mit den Kontrolltieren.

3.1.1.2. Anlage und Morphologie des Fettgewebes bei DEHP-exponierten Mäusen

Der prozentuale Anteil des viszeralen Fettgewebes war bei DEHP-exponierten F0-Mäusen signifikant größer als bei nicht exponierten Kontrolltieren. Diese Zunahme trat in allen DEHP-Konzentrationsgruppen auf und folgte keiner Dosis-Wirkungsbeziehung (Kontrolle: $0,22 \pm 0,16\%$ des Körpergewichts (KG); 0,05 mg DEHP: $1,75 \pm 0,57\%$ des KG; 5 mg DEHP: $1,68 \pm 0,57\%$ des KG; 500 mg DEHP: $1,51 \pm 0,29\%$ des KG; $p < 0,05$; Abb.9A&B).

Die histologische Analyse des viszeralen Fettgewebes in einem doppelt verblindeten Test ergab, dass die Adipozyten der DEHP-exponierten Tiere hypertroph waren (Abb.9D).

In histologischen Schnitten wurden dafür die Adipozyten im gesamten Bildausschnitt gezählt (Kontrolle: $567 \pm 0,02$ Adipozyten pro Flächeneinheit; 0,05 mg DEHP: $285 \pm 0,02$ Adipozyten pro Flächeneinheit; 5 mg DEHP: $250 \pm 0,04$ Adipozyten pro Flächeneinheit; 500 mg DEHP: $236 \pm 0,06$ Adipozyten pro Flächeneinheit; $p < 0,05$; Abb.9C).

A**Kontrolle****0,05 mg DEHP****5 mg DEHP****500 mg DEHP**

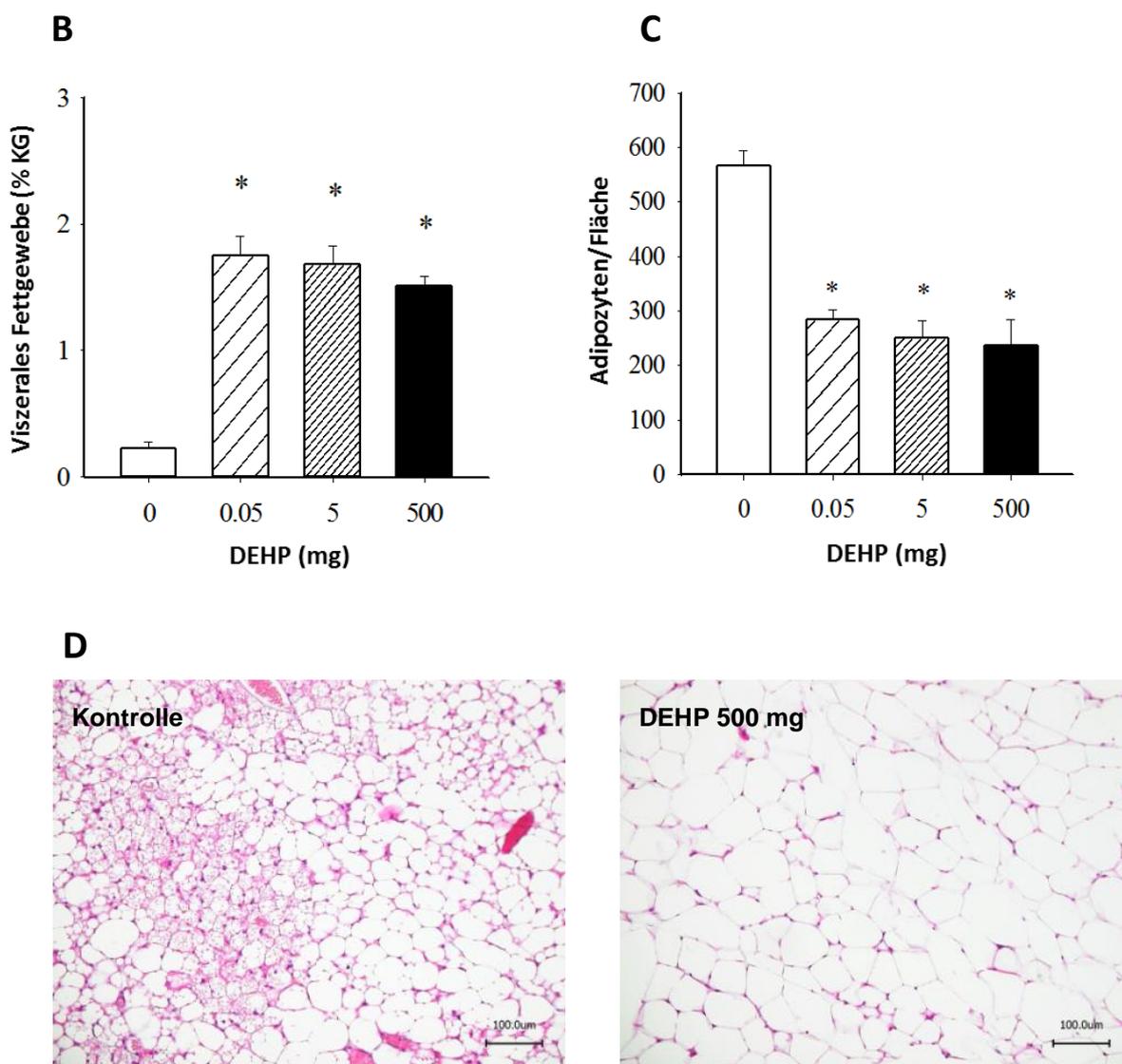


Abbildung 9 Effekte von DEHP auf die Menge des viszeralen Fettgewebes und Adipozytenanzahl Menge an viszeralem Fett (prozentual zum Körpergewicht) bei weiblichen Mäusen nach 8 Wochen Fütterung (A&B); absolute Anzahl der Adipozyten pro Flächeneinheit (C) und repräsentative histologische Schnitte des viszeralen Fettgewebes (D) (Maßstab: 1:100µm). Ergebnisse sind MW±SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit 25 Tieren/Gruppe. *p<0,05 verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

3.1.1.3. Organgewichte von DEHP-exponierten F0-Mäusen

In der Abbildung 10 sind die relativen Organgewichte aller 3 DEHP-Behandlungsgruppen aufgeführt. Die jeweilige Kontrollgruppe wurde 1 gesetzt. Die Fütterung mit DEHP über 8 Wochen führte zu Änderungen der relativen Gewichte von Herz, Hirn, sowie der Reproduktionsorgane Uterus und Ovarien im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Konzentrationsabhängige Effekte wurden nicht beobachtet. Keine Änderung konnte für die Schilddrüse beobachtet werden.

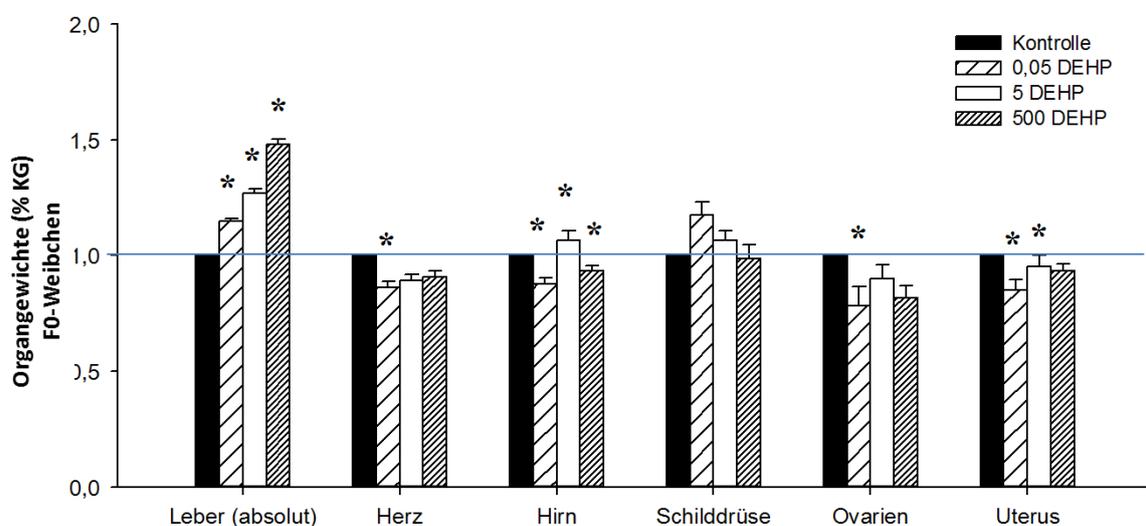


Abbildung 10 Effekte von DEHP auf das Gewicht ausgewählter Organe - Relative Änderung der Organgewichte nach 8 Wochen DEHP-Fütterung. Die Ergebnisse sind von 3 unabhängigen Experimenten mit 25 Mäusen/Gruppe. Kontrolle=1; * $p < 0,05$ verglichen mit den Kontrolltieren.

3.1.1.4. Triglyzeridkonzentration in Leber und Plasma von DEHP-exponierten F0-Mäusen

Im Plasma war die Konzentration der Triglyzeride durch DEHP nicht verändert (Abb.11A). Die Triglyzeridkonzentration der Leber war in der 0,05 mg und 5 mg DEHP-Gruppe um das 2fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht ($p < 0,05$; Abb.11B).

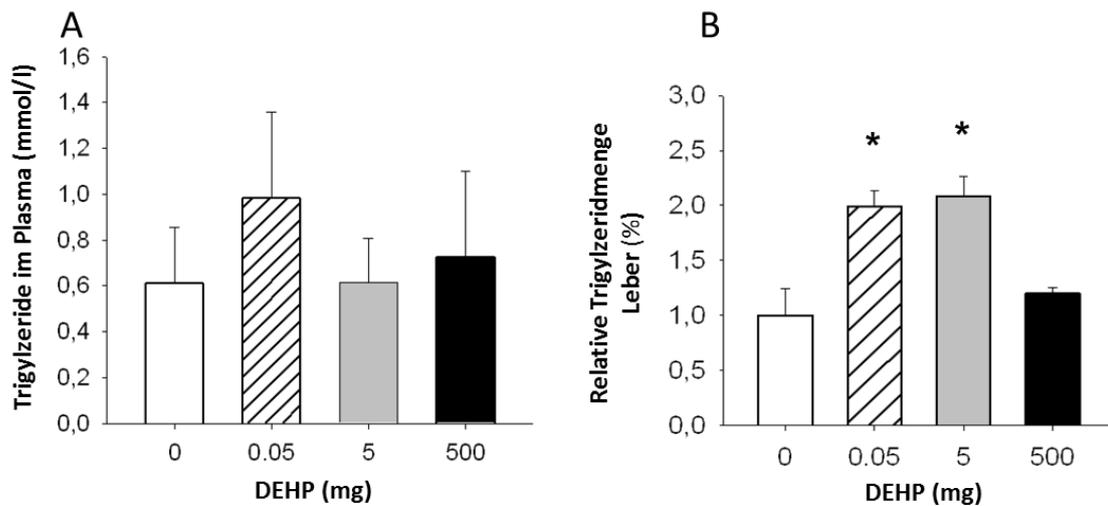


Abbildung 11 Effekte von DEHP auf die Triglyzeride in Plasma und Leber

Triglyzeridkonzentration im Plasma (mmol/l) (A) und relative Triglyzeridmenge in der Leber prozentual zum Lebergewicht berechnet (B; Kontrolle=1). Die Ergebnisse sind als MW±SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit 6 Mäusen/Gruppe dargestellt. * $p < 0,05$ verglichen mit den Kontrolltieren.

3.1.1.5. Konzentration von ASAT, ALAT und Albumin im Plasma und die mRNA-Expression der FsS in der Leber nach DEHP-Exposition

Die Konzentrationen der Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) sind im Plasma erhöht, wenn es zu zytotoxischen Prozessen in der Leber kommt. Die Behandlung mit DEHP führte zu keiner Änderung der Plasmakonzentrationen von ASAT, ALAT und Albumin (Abb.12A+B). Die Transkripte der Fettsäuresynthase (FsS) waren in den beiden höchsten DEHP-Gruppen signifikant zur Kontrolle erhöht (Kontrolle: $51 \pm 18,4$; 5 mg DEHP: $226 \pm 43,16$; 500 mg DEHP: 255 ± 67 ; $p < 0,05$; Abb.12C). Repräsentative histologische Schnitte der Leber zeigten keine Gewebeveränderungen (Daten nicht gezeigt).

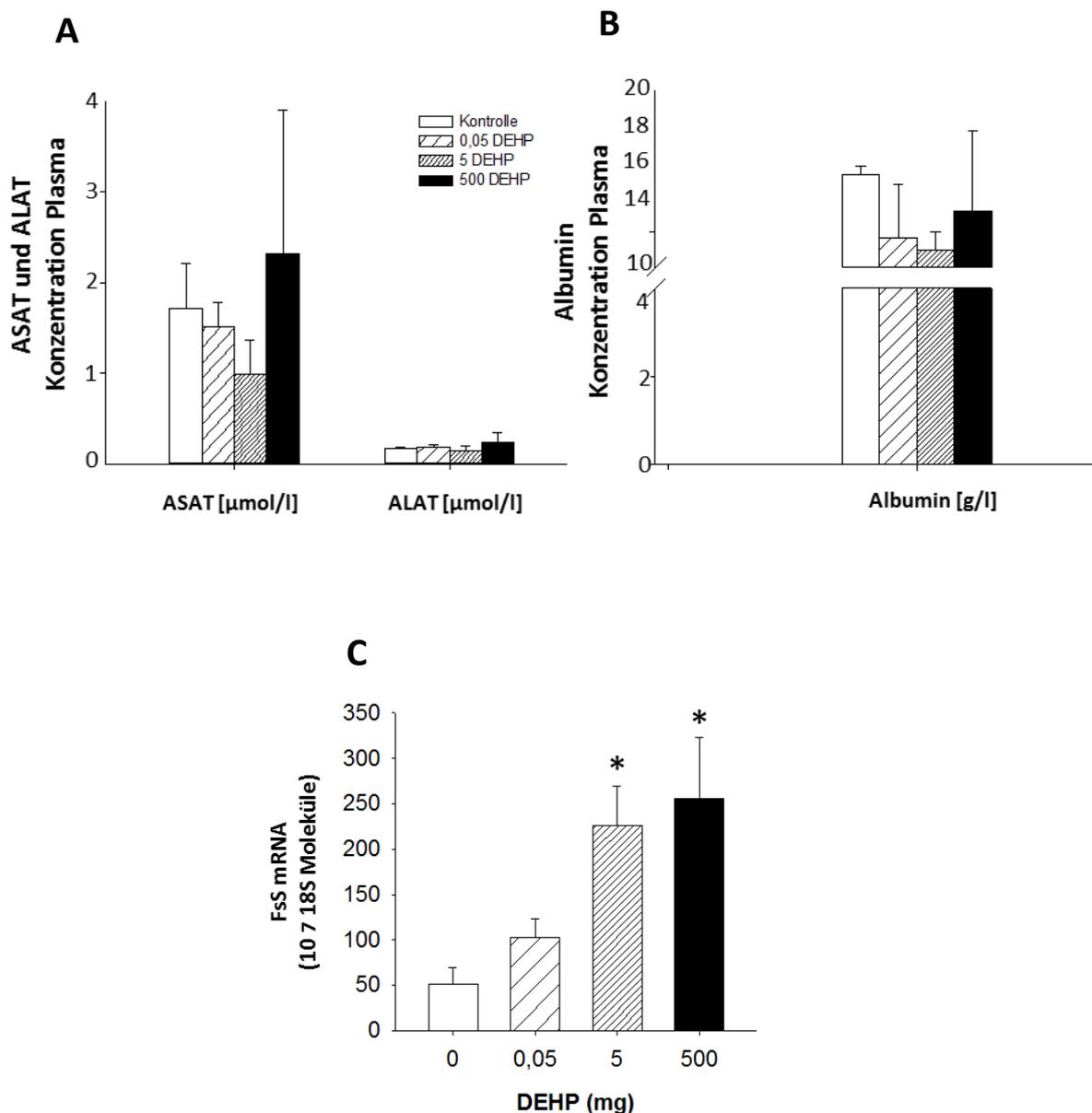


Abbildung 12 Effekte von DEHP auf Leberparameter im Plasma und FsS mRNA-Menge

Konzentration von ASAT, ALAT, Albumin im Plasma (A und B) und mRNA-Menge der FsS in der Leber (C). Die Ergebnisse sind als MW±SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit 6 Mäusen/Gruppe dargestellt. *p<0,05 verglichen mit den Kontrolltieren.

3.1.1.6. mRNA-Expression von PPARalpha und -gamma in Leber und Fettgewebe nach DEHP-Exposition

Die hepatische mRNA-Expression der PPARalpha- und PPARgamma-Transkripte war signifikant in der 500 mg DEHP-Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrolle erhöht (PPARalpha: Kontrolle: 76±3,8; 500 mg DEHP: 790±338,2; PPARgamma: Kontrolle: 16±8,2;

500 mg DEHP: $57 \pm 15,7$; $p < 0,05$; Abb.13A&B). Messungen im Fettgewebe ergaben für die mRNA-Transkripte von PPARgamma keine Änderung. PPARalpha-mRNA-Transkripte waren im Fettgewebe in der 500 mg DEHP-Behandlungsgruppe im Vergleich zu zur Kontrolle signifikant erhöht (Kontrolle: $28 \pm 8,0$; 500 mg DEHP: $2 \pm 0,1$; $p < 0,05$; Abb.13C&D).

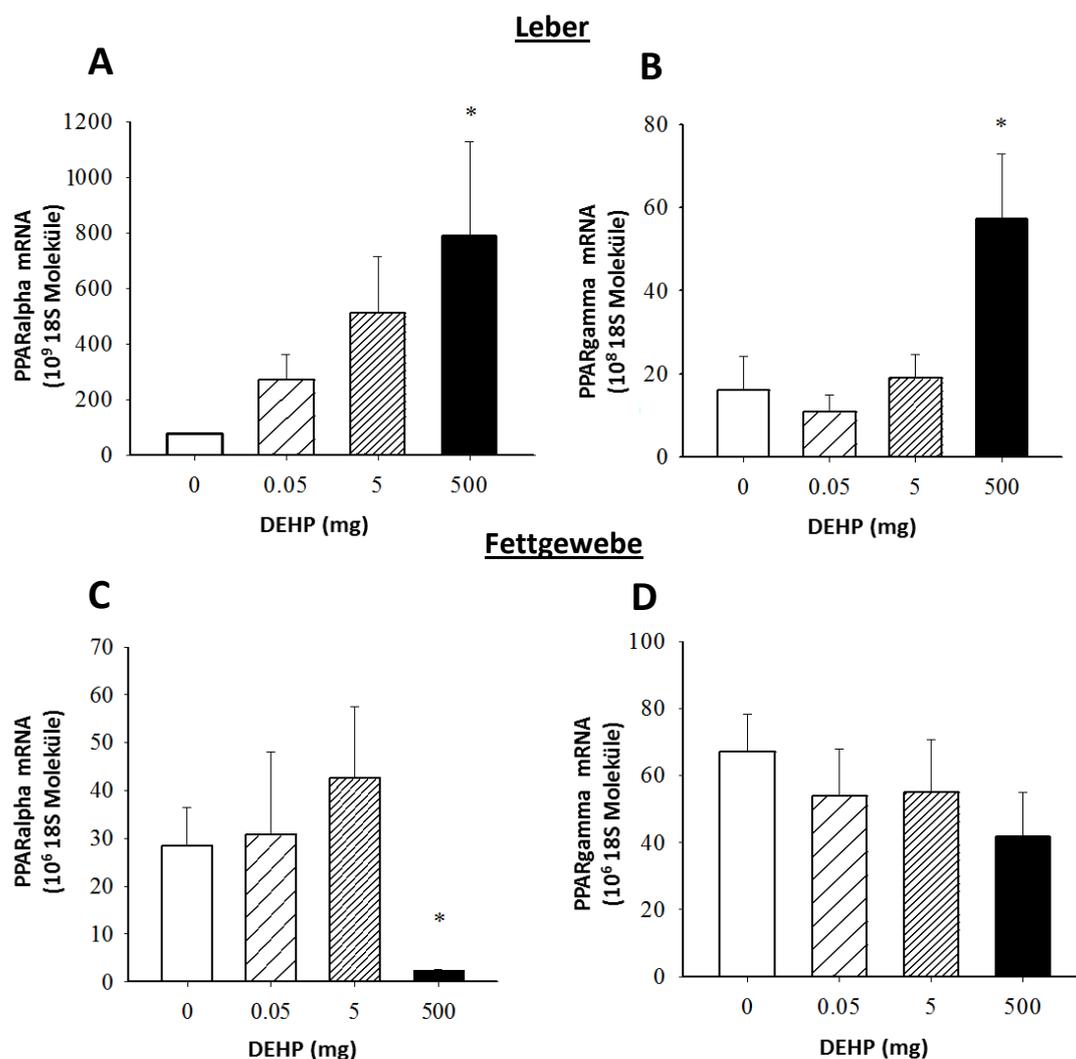


Abbildung 13 Effekte einer DEHP-Fütterung auf die mRNA-Menge von PPARalpha und PPARgamma in Leber und Fettgewebe

mRNA-Menge von PPARalpha und PPARgamma in der Leber (A&B) und viszeralem Fettgewebe (C&D). Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 3 unabhängigen Experimenten mit 5 Mäusen/Gruppe dargestellt. * $p < 0,05$ verglichen mit den Kontrolltieren.

3.1.1.7. mRNA-Expression von PPAR-Zielgenen und dem Coaktivator Med1 in Leber und Fettgewebe nach DEHP-Exposition

Die Acyl-CoA-Oxidase (AOX) ist ein Enzym der beta-Oxidation und ein bekanntes Zielgen der PPARs, v.a. von PPARalpha. In Leber- und Fettgewebe kam es zu keinem signifikanten Anstieg der AOX-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abb.14A&C). In der Leber waren die mRNA-Transkripte des PPARgamma-Coaktivators *mediator subunit 1* (Med1) signifikant in der 0,05 mg und 5 mg DEHP-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle erhöht ($p < 0,05$; Abb.14B). Die mRNA-Transkripte von FABP4, einem spezifischen Carrier-Protein für Fettsäuren im Fettgewebe, waren signifikant in der 0,05 mg DEHP-Gruppe erhöht ($p < 0,05$). In der 5 mg und 500 mg DEHP-Gruppe waren die mRNA-Expression von FABP4 tendenziell im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb.14D).

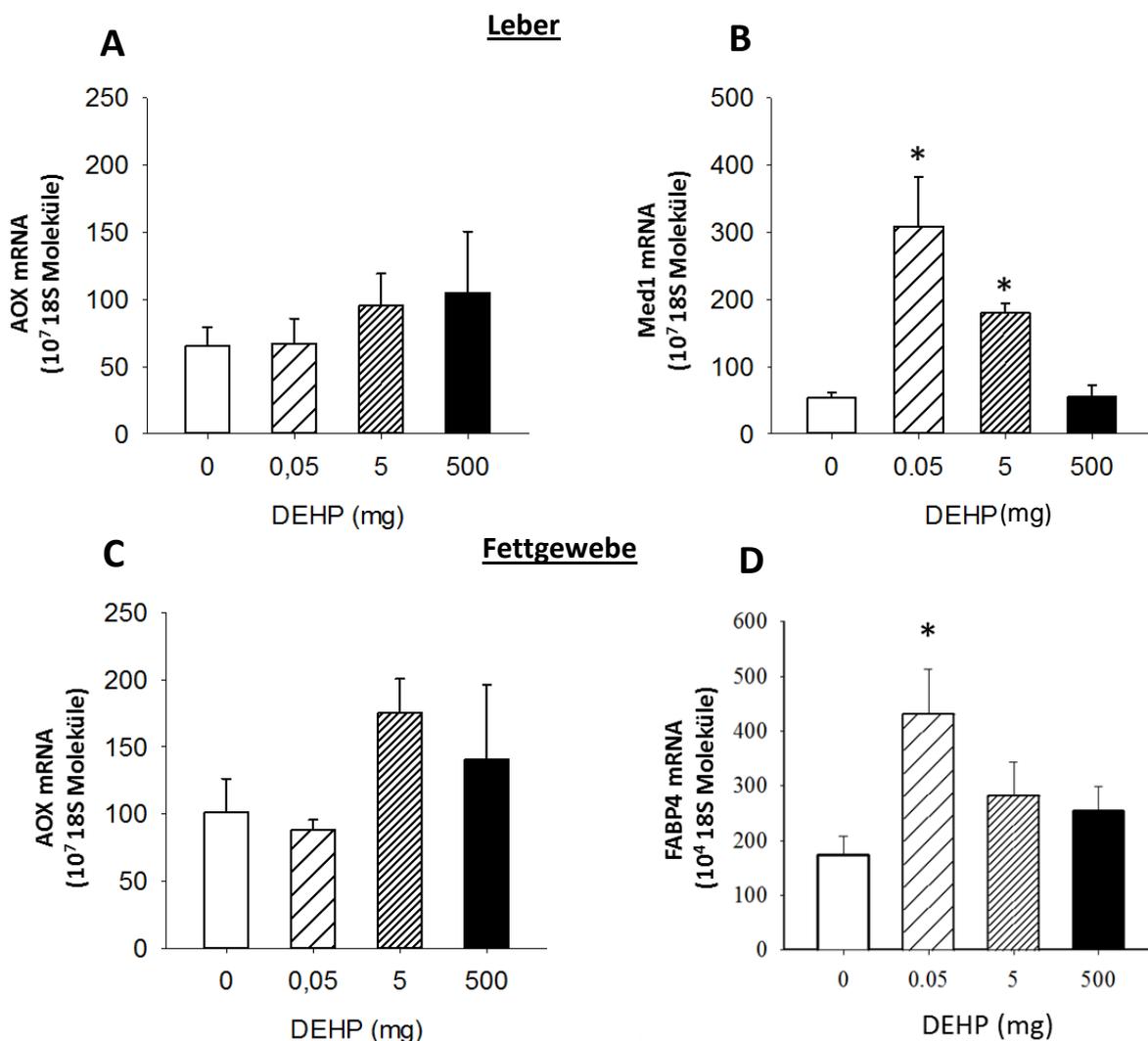


Abbildung 14 Effekte einer DEHP-Fütterung auf die mRNA-Menge von AOX, Med1 und FABP4 in Leber und Fettgewebe

mRNA-Menge der Gene AOX (A) und Med1 (B) in der Leber. Absolute mRNA-Konzentrationen von ACO (C) und FABP4 (D) im viszeralen Fettgewebe. Die Ergebnisse sind als MW±SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit 5 Mäusen/Gruppe dargestellt. *p<0,05 verglichen mit den Kontrolltieren.

3.1.1.8. Plasmakonzentration und mRNA-Menge von Adipokinen im Fettgewebe

Die DEHP-Exposition führte zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Transkripte von Leptin im Fettgewebe, mit dem höchsten Anstieg in der niedrigsten Konzentrationsgruppe im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle: 51±5,1; 0,05 mg DEHP: 535±80,9; 5 mg DEHP: 350±16,7; 500 mg DEHP: 192±70,4; p<0,05; Abb.15A). Die Leptin-Plasmakonzentration war in der 500

mg DEHP-Gruppe signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht ($p < 0,05$; Abb.15B). Die Menge der mRNA von Adiponektin war in allen DEHP-Gruppen signifikant erniedrigt ($p < 0,05$; Abb.15C).

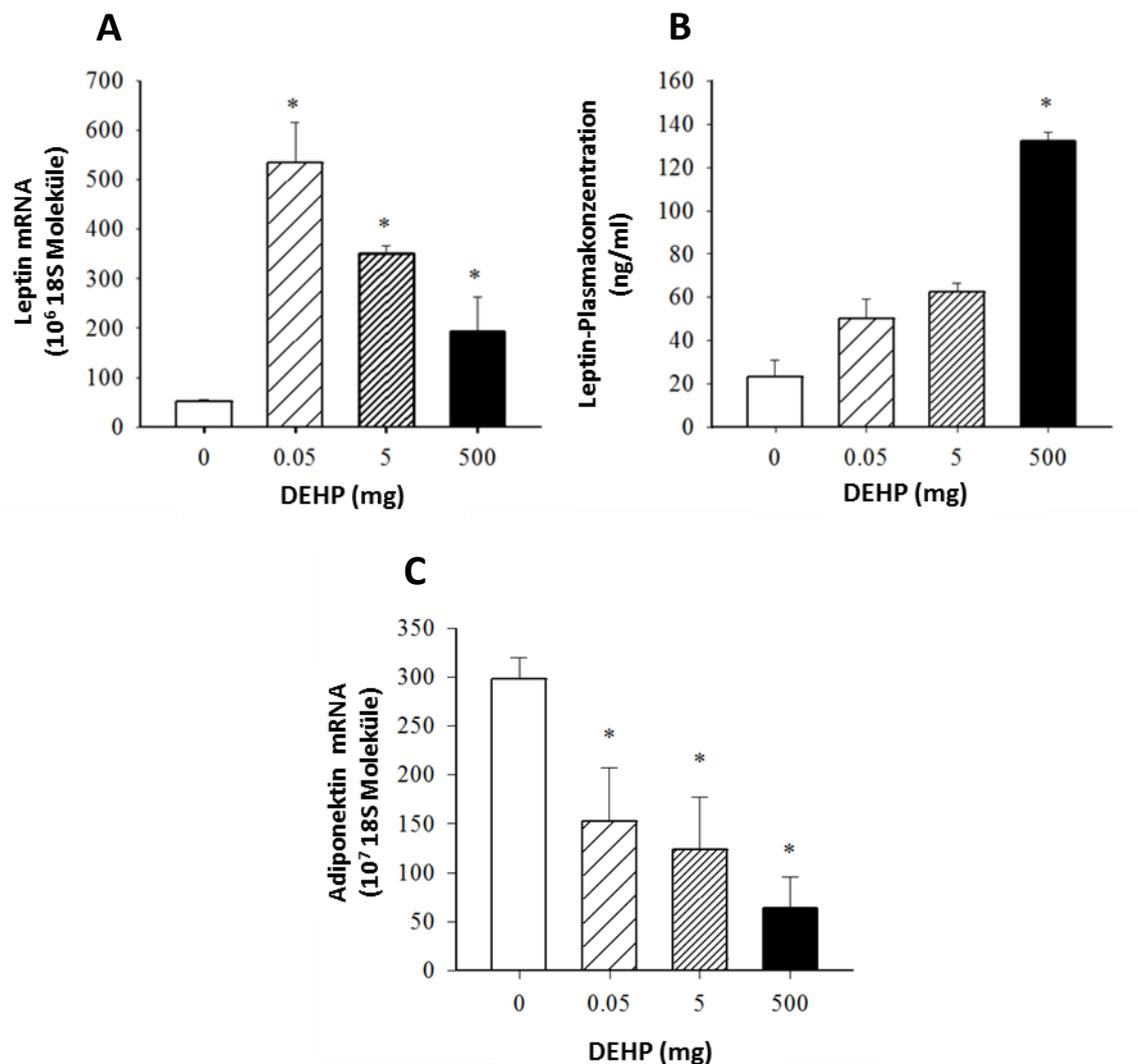


Abbildung 15 Effekte einer DEHP-Fütterung auf Adipokine in Plasma und Fettgewebe

mRNA-Menge von Leptin im Fettgewebe (A), Leptin-Plasmakonzentration (B) und mRNA-Menge von Adiponektin im Fettgewebe (C). Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 3 unabhängigen Experimenten mit 5 Mäusen/Gruppe dargestellt. * $p < 0,05$ verglichen mit den Kontrolltieren.

3.1.1.9. Schwangerschaftsrate F1-Nachkommen und Anzahl F1-Präimplantationsembryonen

Die maternale DEHP-Exposition ergab keine Änderung bei der mittleren Anzahl der Embryonen/Maus am Tag 3,5 *post coitum* (*p.c.*). In der 500 mg DEHP-Gruppe wurde ein vermehrtes Auftreten von degenerierten Embryonen beobachtet (Kontrolle: 14%; 500 mg DEHP: 32%; $p=0,0584$; Tab.3).

Tabelle 3 Effekte einer DEHP-Fütterung auf Schwangerschaftsrate und F1-Embryonenanzahl

| | DEHP (mg/kg KG/Tag) | | | |
|----------------------------|---------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 0,05 | 5 | 500 |
| F0-Muttertiere (n) | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Davon schwangere Tiere (n) | 19 | 21 | 23 | 17 |
| Embryo/Muttertier | 8±0,2 | 9±1,2 | 9±1,2 | 7±1,4 |
| Degenerierte Embryonen (%) | 14 | 11 | 12 | 32 |

Die DEHP-Fütterung erfolgte über 8 Wochen. F0-Weibchen wurden mit 7,0 IU PMSG und 48 h später mit 7,5 IU hCG über eine i.p. Injektion stimuliert. Die Verpaarung erfolgte mit nicht-exponierten Männchen. 92 h nach der hCG Injektion wurden die Weibchen durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Ergebnisse sind als MW±SEM von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.1.1.10. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F1-Präimplantationsembryonen

Um den Einfluss einer maternalen DEHP-Exposition auf F1-Präimplantationsembryonen näher zu untersuchen, wurde die Expression von PPARalpha/gamma/delta und von Leptin, CTRP2 sowie deren Rezeptoren LeptinR1 und AdipoR2 in 3,5 Tage alten F1-Embryonen bestimmt. Keine Änderung im Genexpressionsmuster war für die Gene Leptin, LeptinR1, CTRP2, AdipoR2, PPARgamma und PPARdelta zu beobachten (Abb.16A&B). Transkripte der mRNA von PPARalpha konnten in F1-Embryonen nicht detektiert werden (Abb.16).

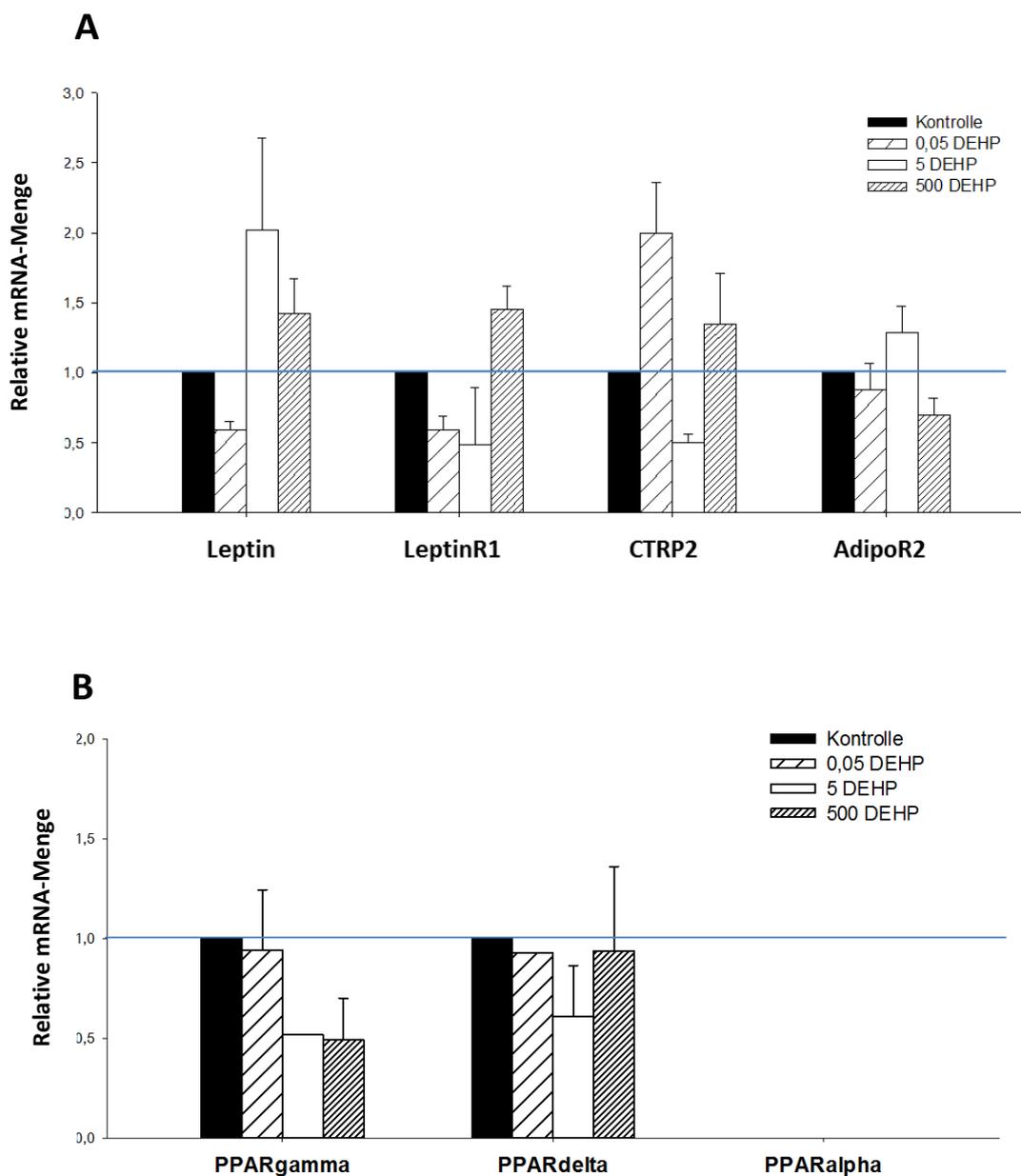


Abbildung 16 Effekte einer maternalen DEHP-Fütterung auf die Expression von Adipokinen und PPAR-Isoformen in F1-Präimplantationsembryonen

Relative mRNA-Menge von Leptin, LeptinR1, CTRP2, AdipoR2 (A) und PPARgamma, PPARdelta und PPARalpha im F1-Präimplantationsembryo der Maus. Die Ergebnisse sind als MW±SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit 30±5 Embryonen/Gruppe dargestellt. Kontrolle=1; *p<0,05 verglichen mit den Kontrollembryonen.

3.1.2. Studie II – maternal DEHP-exponierte F1-Nachkommen

3.1.2.1. Gesundheits- und Fertilitätsparameter der DEHP-exponierten F0-Muttertiere

In Studie II lag unser Interesse auf den Auswirkungen einer maternalen DEHP-Exposition auf die F1- und F2-Generation. Hier wurden die F0-Weibchen über einen Zeitraum von 8-9 Wochen über das Futter mit DEHP exponiert. Nach der ersten Fütterungswoche wurden die Weibchen spontan mit nicht-exponierten Männchen verpaart. Schwangere Weibchen haben im weiteren Verlauf bis zum Laktationsende das DEHP-Futter bekommen. Die weiblichen Nachkommen bekamen mit dem Laktationsende normales Standardfutter und wurden im geschlechtsreifen Alter mit PMSG und hCG superovuliert, verpaart und am Tag 3,5 *p.c.* getötet. Mit diesem Studienverlauf war es uns möglich, Effekte der Umweltkontaminanten auf die Nachfolgeneration zu untersuchen. Diese Generation war dem DEHP im Mutterleib und über die Muttermilch ausgesetzt.

Die tägliche DEHP-Exposition führte zu keiner negativen Beeinflussung des Gesundheitszustandes der F0-Weibchen während Schwangerschaft und Laktation. Es konnten keine toxisch-klinischen Anzeichen beobachtet werden. Demgegenüber steht die Beobachtung einer Abortrate von 100 % in der 500 mg DEHP-Gruppe. Die Wurfgröße war um ein Jungtier in der 5 mg DEHP-Gruppe verringert. Die Geschlechterverteilung in der 0,05 mg und 5 mg DEHP-Gruppe waren nicht verändert (Tab.4).

Tabelle 4 Effekte einer DEHP-Fütterung auf die Reproduktion bei den direkt exponierten F0-Muttertieren

| | DEHP (mg/kg KG/Tag) | | | |
|----------------------------|---------------------|-------|-------|-----|
| | 0 | 0,05 | 5 | 500 |
| F0-Muttertiere (n) | 15 | 14 | 13 | 14 |
| Davon schwangere Tiere (n) | 12 | 13 | 12 | 10 |
| Geburten (n) | 12 | 13 | 12 | 0 |
| Aborte (%) | 0 | 0 | 0 | 100 |
| Wurfgröße (n) | 5±1,8 | 5±1,9 | 4±1,5 | - |
| Verhältnis w:m (%) | 43:57 | 50:50 | 46:54 | - |

Die DEHP-Fütterung erfolgte über 8-9 Wochen. Nach der ersten Woche der Fütterung wurden die F0-Weibchen spontan verpaart und die Jungtiere ausgetragen. Im Alter von 3 Wochen wurden die Jungtiere abgesetzt und die F0-Muttertiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Ergebnisse sind als MW±SEM von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.1.2.2. Menge viszerales Fettgewebe von F0-Muttertieren und deren F1-Nachkommen nach DEHP-Exposition

Die viszerale Fettmenge von F0-Muttertieren (Abb.17A) und deren F1-Nachkommen (Abb.17B-D) wurde durch DEHP signifikant erhöht, wobei der Anstieg der Fettmenge bei den männlichen F1-Nachkommen nicht konzentrationsabhängig verlief (F0-Mütter: 0,05 mg DEHP: 1,8fach erhöht; 5 mg DEHP: 4,5fach erhöht; weibliche F1-Nachkommen: 0,05 mg DEHP: 1,6fach erhöht; 5 mg DEHP: 1,8fach erhöht; männliche F1-Nachkommen: 0,05 mg DEHP: 1,6fach erhöht; 5 mg DEHP: 1,25fach erhöht; $p < 0,05$). Die histologische Analyse des viszeralen Fettgewebes in einem doppelt verblindeten Test ergab, dass die Adipozyten der DEHP-exponierten F1-Weibchen hypertroph waren (Abb.17C).

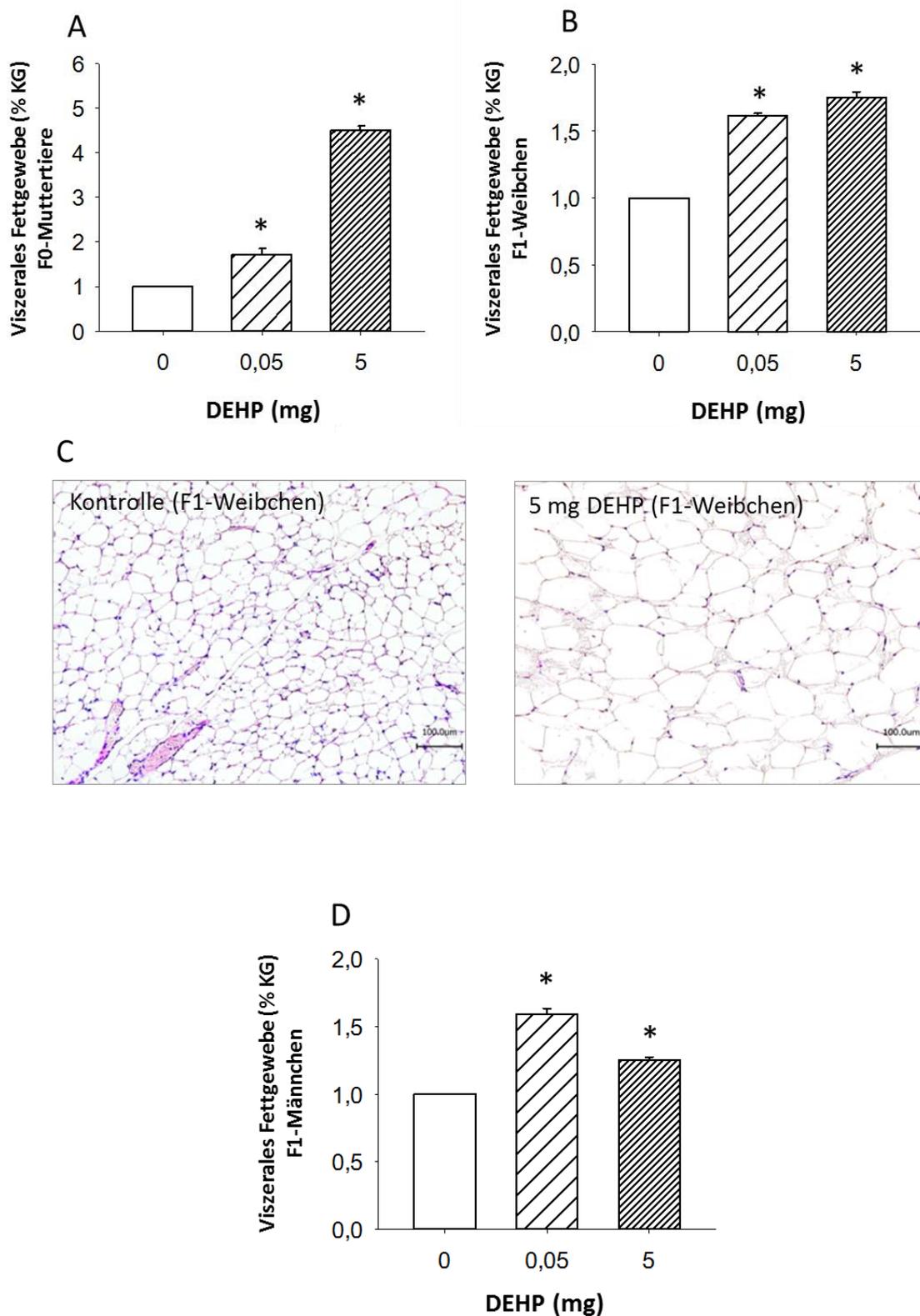
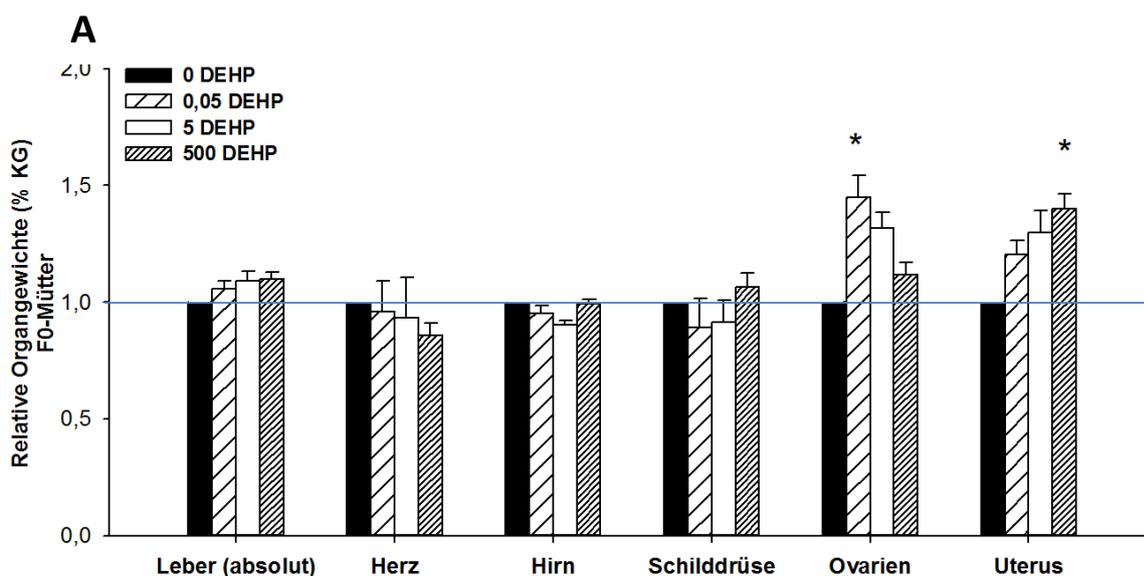


Abbildung 17 Effekte von DEHP auf die Menge des viszeralen Fettgewebes in der F0- und F1-Generation

Relative Menge des viszeralen Fettgewebes der F0-Muttertiere (nach Geburt und Laktation) ($n=15\pm 3$ Mütter/Gruppe) (A); der F1-Weibchen (B&C) und der F1-Männchen (D) (PNT 84, $n=12$ Weibchen und 12 Männchen/Gruppe). Die Ergebnisse sind dargestellt als $MW\pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten. Kontrolle=1; * $p<0,05$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

3.1.2.3. Organgewichte der F0-Muttertiere und deren F1-Nachkommen nach DEHP-Exposition

In der Abbildung 18 sind die relativen Organgewichte aller 3 DEHP-Behandlungsgruppen aufgeführt. Die Fütterung mit DEHP führte bei den direkt exponierten F0-Müttern zu geringen, signifikanten Änderungen der relativen Gewichte von Uterus und Ovarien im Vergleich zur Kontrolle ($p<0,05$). Keine Änderung der Organgewichte konnte für Leber, Herz, Hirn und Schilddrüse beobachtet werden. Eine maternale DEHP-Exposition führte in der F1-Generation zu einer geringen, signifikanten Abnahme der Organgewichte von Hirn und Schilddrüse in der 5 mg DEHP-Behandlungsgruppe im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ($p<0,05$). Keine Änderungen konnten bei Leber, Herz, Ovarien und Uterus beobachtet werden.



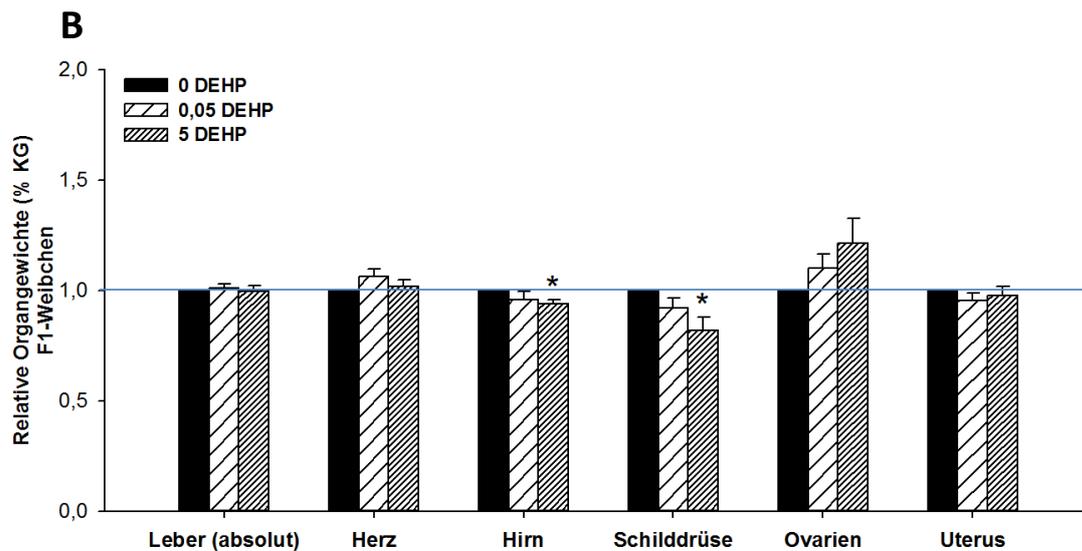


Abbildung 18 Effekte von DEHP auf das Gewicht ausgewählter Organe von F0-Müttern und ihren F1-Nachkommen

Relative Änderung der Organgewichte durch DEHP-Fütterung der F0-Mütter (nach Geburt und Laktation) (n=15±3 Mütter/Gruppe) (A); der maternal exponierten F1-Weibchen (PND 84, n=12 Weibchen/Gruppe) (B); Kontrolle=1. Die Ergebnisse sind dargestellt als MW±SEM von 2 unabhängigen Experimenten. Kontrolle=1; *p<0,05 im Vergleich zu den Kontrolltieren.

3.1.2.4. Mittleres Körpergewicht F1-Nachkommen (PNT 21 und PNT 84) nach DEHP-Exposition

Zum Zeitpunkt des Absetzens (PNT 21) war das mittlere Körpergewicht der weiblichen und männlichen F1-Nachkommen, welche pränatal und während der Laktation mit 0,05 mg DEHP und 5 mg DEHP über den mütterlichen Kreislauf exponiert worden waren, signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb.19A), (F1-Weibchen: Kontrolle: 8,07±0,40 g; 0,05 mg DEHP: 10,54±0,28 g; 5 mg DEHP: 11,84±0,33 g; F1-Männchen: Kontrolle: 9,54±0,57 g; 5 mg DEHP: 12,22±0,26 g; p<0,05). Diese signifikante Gewichtszunahme konnte bei beiden Geschlechtern auch noch im Alter von 12 Wochen beobachtet werden (Abb.19B) (F1-Weibchen: Kontrolle: 22,3±1,89 g; 0,05 mg DEHP: 25,0±1,56 g; 5 mg DEHP: 25,2±1,92 g; F1-Männchen: Kontrolle: 27,6±1,07 g; 0,05 mg DEHP: 28,8±1,62 g; 5 mg DEHP: 29,7±1,75 g; p<0,05).

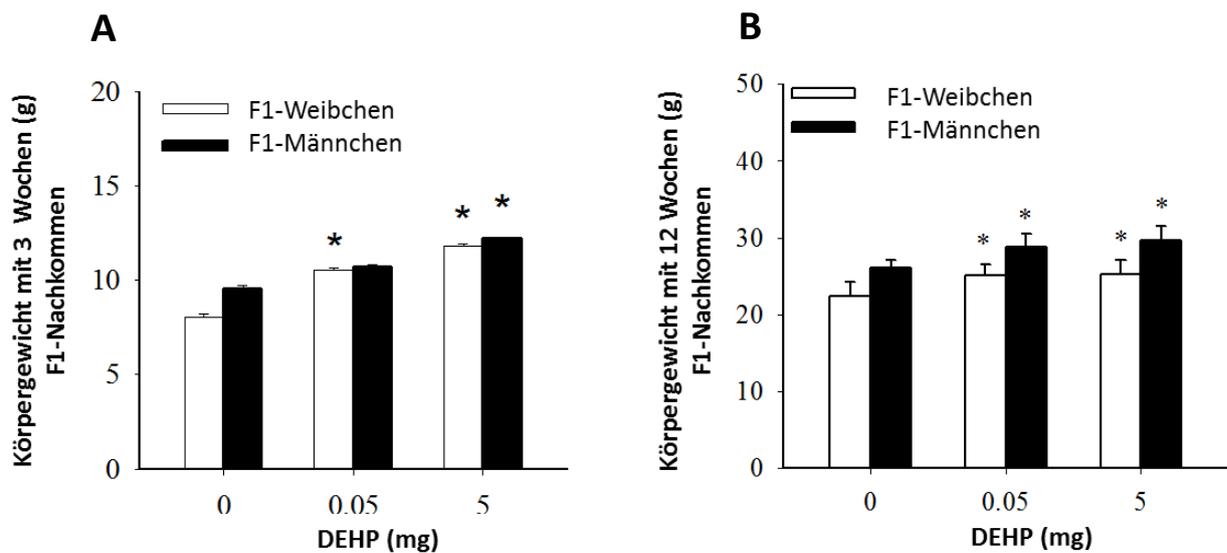


Abbildung 19 Effekte von DEHP auf die Körpergewichtsentwicklung der F1-Nachkommen

(A) Körpergewicht im Alter von 3 Wochen (PNT 21; n=12 Würfe/Gruppe), (weiße Balken: F1-Weibchen; schwarze Balken: F1 Männchen); (B) Körpergewicht im Alter von 12 Wochen (PNT 84, n=12 Weibchen und Männchen jeweils/Gruppe) (weiße Balken: F1-Weibchen; schwarze Balken: F1 Männchen). Die Ergebnisse sind dargestellt als MW±SEM von 2 unabhängigen Experimenten. *p<0,05 im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

3.1.2.5. Schwangerschaftsrate der F1-Nachkommen und Anzahl von F2-Präimplantationsembryonen

Eine DEHP-Exposition der F0-Muttertiere führte bei den F1-Weibchen zu einem Anstieg des Auftretens degenerierter F2-Präimplantationsembryonen in der 0,05 mg und 5 mg DEHP-Behandlungsgruppe (0,05 mg DEHP: 28%; 5 mg DEHP: 29%; p=0,1299). DEHP führte in keiner Konzentrationsgruppe zu einer Änderung der Schwangerschaftsrate sowie der mittleren F2-Embryonenanzahl/Maus (Tab.5).

Tabelle 5 Effekte einer DEHP-Fütterung auf die Reproduktion *in utero* exponierter F1-Weibchen

| | DEHP (mg/kg KG/Tag) | | | |
|-------------------------------|---------------------|--------|-------|-----|
| | 0 | 0,05 | 5 | 500 |
| F1-Muttertiere (n) | 15 | 15 | 15 | - |
| Davon schwangere Tiere (n) | 12 | 13 | 12 | - |
| Embryo/Muttertier (n) | 10±9,0 | 10±5,0 | 7±6,6 | - |
| Degenerierte F2-Embryonen (%) | 8 | 28 | 29 | - |

Die DEHP-Exposition der F1-Weibchen erfolgte über die Plazenta und über die Muttermilch bis zum Absetzen der Jungtiere. Im geschlechtsreifen Alter wurden die Weibchen mit 7,0 IU PMSG und 48 h später mit 7,5 IU hCG über eine i.p. Injektion stimuliert. Die Verpaarung erfolgte mit nicht-exponierten Männchen. Die F1-Weibchen wurden 92 h nach der hCG Injektion durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Ergebnisse sind als MW±SEM von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.1.2.6. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F2-Präimplantationsembryonen

Die maternale DEHP-Exposition führte in allen Behandlungsgruppen zu einer signifikanten Abnahme der Leptin-mRNA-Menge um 65% (0,05 mg DEHP) und 80% (5 mg DEHP) im Vergleich zu den Kontrollembryonen. Auch die mRNA-Menge des LeptinR1 war um 58% (0,05 mg DEHP) und 51% (5 mg DEHP) signifikant zu den Kontrollembryonen reduziert ($p < 0,05$; Abb.20A). Die mRNA-Menge von CTRP2; AdipoR2, PPARgamma und PPARdelta waren durch die maternale Behandlung mit DEHP nicht verändert. Transkripte der mRNA von PPARalpha konnten in F2-Päimplantationsembryonen nicht detektiert werden (Abb.20B).

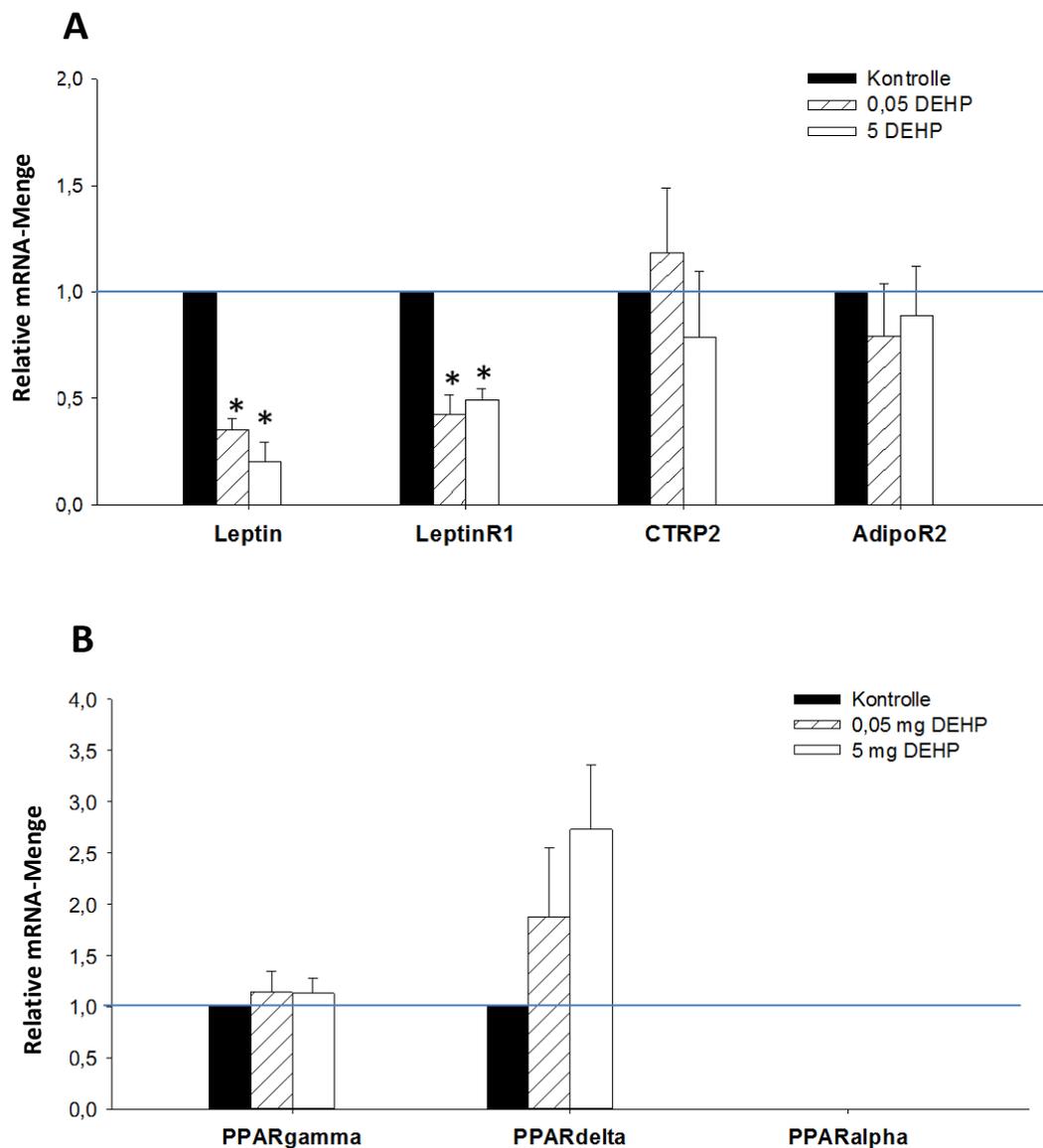


Abbildung 20 Effekte einer maternalen DEHP-Fütterung auf die Expression von Adipokinen und PPAR-Isoformen in F2-Präimplantationsembryonen

Relative mRNA-Menge von Leptin, LeptinR1, CTRP2, AdipoR2 (A) und PPARgamma, PPARdelta und PPARalpha in F2-Präimplantationsembryonen der Maus. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit 30 \pm 5 Embryonen/Gruppe dargestellt. Kontrolle=1; *p<0,05 verglichen mit unbehandelten Kontrollembryonen.

3.2. Untersuchung der Wirkung von PCB auf Fertilität und Adipositasentwicklung weiblicher C3H/N-Mäuse

3.2.1. Studie I - direkte PCB-Exposition weiblicher Mäuse

3.2.1.1. Wöchentliche Futteraufnahme und Körpergewichtsentwicklung bei PCB-exponierten Mäusen

Wie in den DEHP-Versuchen, wurde in Studie I den weiblichen Mäusen das PCB-versetzte Futter für 8 Wochen verabreicht. Nach 7 Wochen wurden sie mit PMSG und hCG superovuliert und anschließend verpaart. Nach weiteren 3,5 Tagen wurden die Mäuse getötet, das Gewebe, die Organe und Präimplantationsembryonen entnommen.

Die PCB-Exposition führte zu keiner negativen Beeinflussung des Gesundheitszustandes der F0-Muttertiere. In der 1 µg PCB-Konzentrationsgruppe verstarb ein Weibchen eine Woche nach Versuchsbeginn. Bei allen anderen Tieren konnten keine toxisch-klinischen Anzeichen beobachtet werden.

Die PCB-Exposition hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung des mittleren Körpergewichts im Vergleich zur Kontrolle (1 µg PCB: -0,05 g [95 % Konfidenz Intervall (CI): 1,26; 2,50]; 10 µg PCB: -0,09 g (95 % CI: 1,15; 2,28); 100 µg PCB: 0,5 g (95 % CI: 1,78; 3,03); Abb.21A).

Die wöchentliche Futteraufnahme der Weibchen zeigte keine Beeinflussung durch die PCB-Exposition im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb.21B). Ein leichter, tendenziell signifikanter Anstieg ($p=0,067$) der Futteraufnahmemenge war für die 100 µg PCB-Konzentrationsgruppe im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

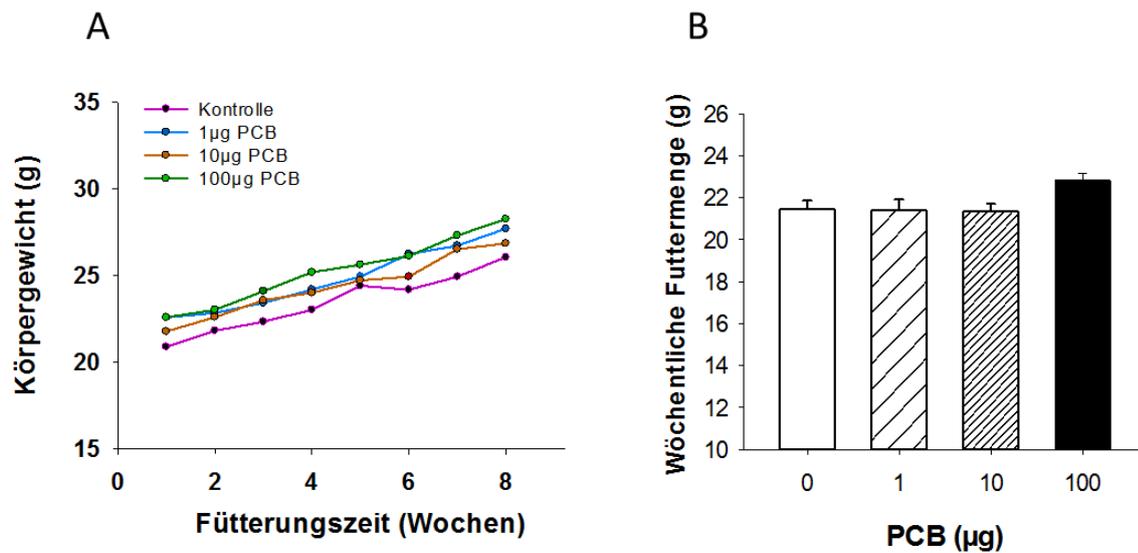


Abbildung 21 Körpergewichtsentwicklung und Futteraufnahme nach 8-wöchiger Fütterung mit PCB
Körpergewichtsentwicklung (A) und die mittlere wöchentliche Futteraufnahme (B). Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten mit $n=20$ Mäusen/Gruppe dargestellt.

3.2.1.2. Organgewichte von PCB-exponierten F0-Mäusen

Die relativen Organgewichte aller 3 PCB-Behandlungsgruppen sind in Abbildung 22 aufgeführt. Die Fütterung mit PCB über 8 Wochen führte zu keiner signifikanten Änderung der relativen Gewichte von viszeralem Fett, Leber, Hirn sowie der Reproduktionsorgane Uterus und Ovarien. Ein signifikanter Abfall des Herzgewichtes konnte in der niedrigsten und höchsten PCB-Behandlungsgruppe beobachtet werden ($p < 0,05$).

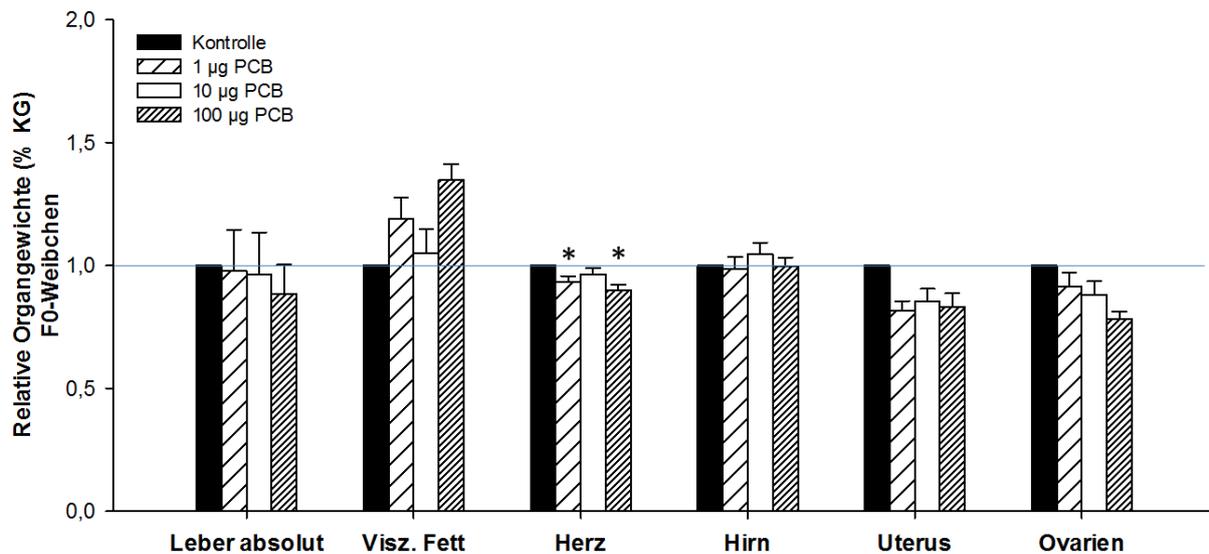


Abbildung 22 Effekte von PCB auf das Gewicht ausgewählter Organe

Relative Änderung der Organgewichte nach 8 Wochen PCB-Fütterung. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten mit $n=20$ Mäusen/Gruppe dargestellt. Kontrolle=1; * $p < 0,05$ verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

3.2.1.3. mRNA-Menge von PPARalpha und -gamma in Leber und Fettgewebe nach PCB-Exposition

In Leber- und Fettgewebe wurde die mRNA-Menge von PPARalpha und PPARgamma gemessen. In der Leber war die mRNA-Menge beider PPARs nicht verändert (Abb.23A&B). Im Fettgewebe (Abb.23C&D) kam es zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Menge von PPARgamma im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle: $159 \pm 2,08$; 1 µg PCB: $5 \pm 1,01$; 10 µg PCB: $19 \pm 4,76$; 100 µg PCB: $24 \pm 9,18$; $p < 0,05$). Die mRNA-Menge von PPARalpha war nicht verändert.

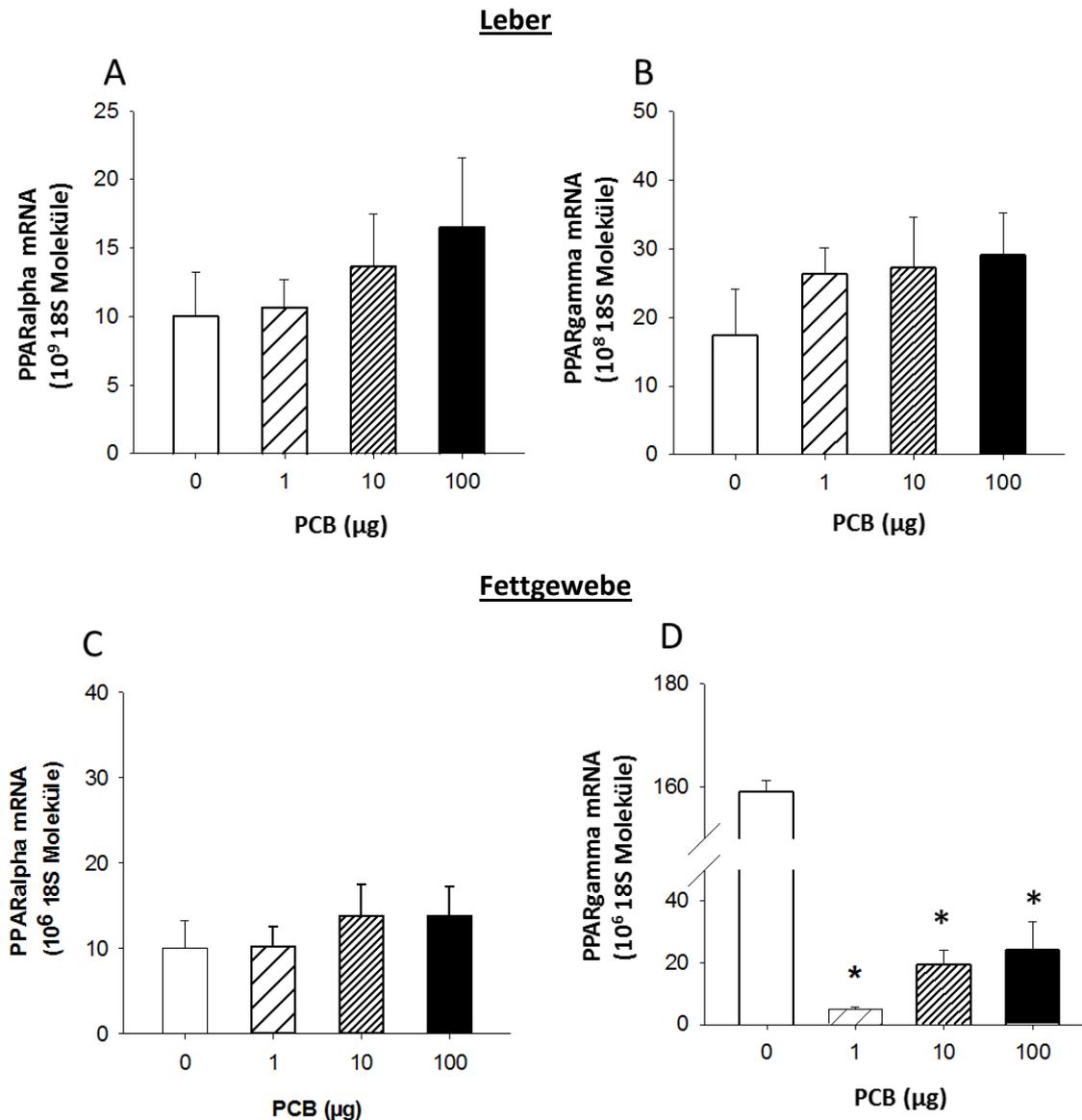


Abbildung 23 Effekte einer PCB-Fütterung auf die mRNA-Expression von PPARalpha und PPARgamma in Leber und Fettgewebe

mRNA-Menge von PPARalpha und PPARgamma in der Leber (A&B) und viszeralem Fettgewebe (C&D). Die Ergebnisse sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ von 2 unabhängigen Experimenten mit 6 Mäusen/Gruppe dargestellt. * $p < 0,05$ verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

3.2.1.5. mRNA-Menge von Adipokinen im Fettgewebe nach PCB-Exposition

Die PCB-Exposition der Tiere führte zu keiner signifikanten Änderung der Leptin- und Adiponektin-Transkriptmengen im Fettgewebe im Vergleich zur Kontrolle (Abb.24).

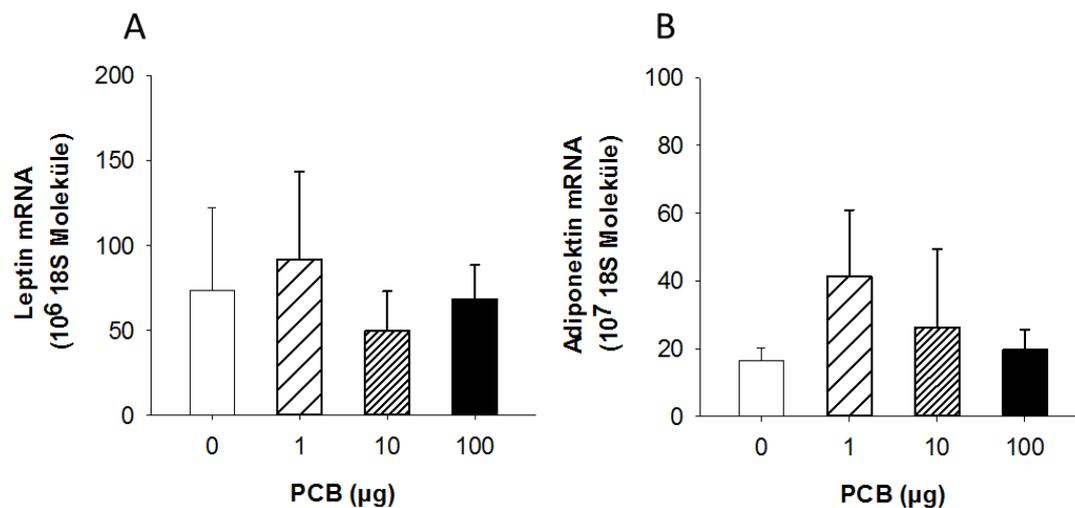


Abbildung 24 Effekte einer PCB-Fütterung auf Adipokine im Fettgewebe

mRNA-Menge von Leptin (A) und Adiponektin (B) im Fettgewebe. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten mit 4 Mäusen/Gruppe dargestellt. * $p < 0,05$ verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

3.2.1.6. Schwangerschaftsrate und Anzahl F1-Präimplantationsembryonen

Die maternale PCB-Exposition über 8 Wochen hatte keinen Einfluss auf die Schwangerschaftsrate der Weibchen und auch nicht auf die Anzahl der Embryonen/Maus am Tag 3,5 *p.c.* (Tab.6).

Tabelle 6 Effekte einer PCB-Fütterung auf Schwangerschaftsrate und F1-Embryonenanzahl

| | PCB (µg/kg KG/Tag) | | | |
|----------------------------|--------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 10 | 100 |
| F0-Muttertiere (n) | 20 | 19 | 20 | 20 |
| Davon schwangere Tiere (n) | 11 | 17 | 16 | 14 |
| Embryo/Muttertier (n) | 7±0,9 | 8±0,6 | 7±1,5 | 6±1,3 |
| Degenerierte Embryonen (%) | 20 | 27 | 28 | 25 |

Die PCB-Fütterung erfolgte über 8 Wochen. F0-Weibchen wurden mit 7,0 IU PMSG und 48 h später mit 7,5 IU hCG über eine i.p. Injektion stimuliert. Die Verpaarung erfolgte mit nicht-exponierten

Männchen. 92 h nach der hCG Injektion wurden die Weibchen durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.2.1.7. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F1-Präimplantationsembryonen

Die Leptin-mRNA-Menge war um 54 % (10 μg PCB) und um 73 % (100 μg PCB) in den zwei höchsten Konzentrationsgruppen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ($p < 0,05$; Abb.25). Die Genexpression von LeptinR1, CTRP2, AdipoR2, PPARgamma und PPARdelta war nicht verändert (Abb.25A&B). Die mRNA von PPARalpha konnte in den F1-Embryonen nicht detektiert (Abb.25B).

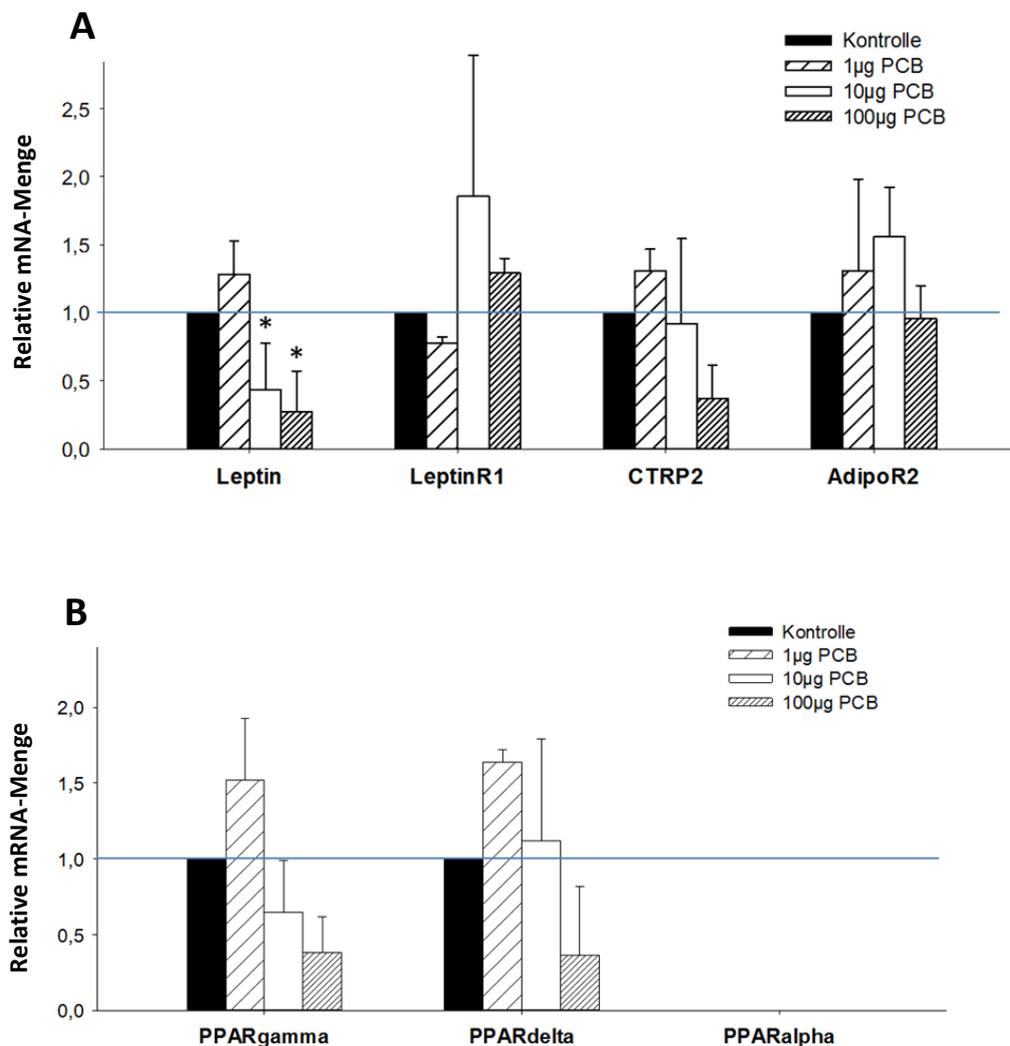


Abbildung 25 Effekte einer maternalen PCB-Fütterung auf die Expression von Adipokinen und PPAR-Isoformen in F1-Präimplantationsembryonen

Relative mRNA-Menge von Leptin, LeptinR1, CTRP2 und AdipoR2 (A) und PPAR-Isoformen (B) in F1-Präimplantationsembryonen. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten mit 30 ± 5 Embryonen/Gruppe dargestellt. Kontrolle=1; * $p < 0,05$ verglichen mit den Kontrollembryonen.

3.2.2. Studie II - maternal PCB-exponierte F1-Nachkommen

3.2.2.1. Gesundheits- und Fertilitätsparameter der PCB-exponierten F0-Muttertiere

In Studie II lag unser Interesse an Untersuchungen der Auswirkungen einer maternalen PCB-Exposition auf die F1- und F2-Generation. Dazu wurden wie in Punkt 3.1.2.1. für DEHP beschrieben, F0-Weibchen mit verschiedenen Konzentrationen an PCB (101+118) über das Futter exponiert und verpaart.

Eine tägliche PCB-Exposition führte zu keiner negativen Beeinflussung des Gesundheitszustandes der F0-Muttertiere während Schwangerschaft und Laktation. Es konnten keine toxisch-klinischen Anzeichen beobachtet werden. Schwangerschaftsverluste während der PCB-Exposition wurden nicht festgestellt (Tab.7). Die Wurfgröße war in allen Konzentrationsgruppen im Vergleich zur Kontrolle um jeweils 1 Jungtier kleiner. Die Behandlung der Muttertiere mit $10 \mu\text{g}$ PCB ergab eine verschobene Geschlechterverteilung in der F1-Generation zu Gunsten der Weibchen (Tab.7). In der $1 \mu\text{g}$ und $100 \mu\text{g}$ PCB-Behandlungsgruppe wurden keine Änderungen in der Geschlechterverteilung festgestellt.

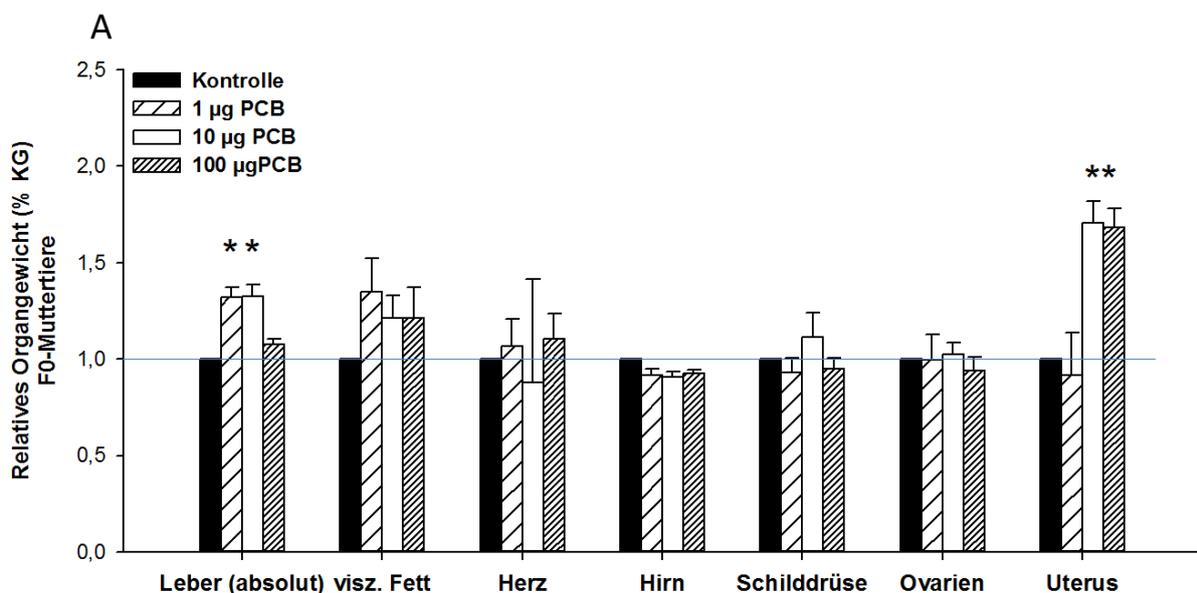
Tabelle 7 Effekte einer PCB-Fütterung auf die Reproduktion bei den direkt exponierten F0-Muttertieren

| | PCB ($\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$) | | | |
|----------------------------|---|-------------|-------------|-------------|
| | 0 | 1 | 10 | 100 |
| F0-Muttertiere (n) | 11 | 11 | 11 | 11 |
| Davon schwangere Tiere (n) | 11 | 11 | 11 | 11 |
| Geburten (n) | 11 | 11 | 11 | 11 |
| Aborte (%) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wurfgröße (n) | $6 \pm 1,4$ | $5 \pm 1,0$ | $5 \pm 1,5$ | $5 \pm 2,5$ |
| Verhältnis w:m (%) | 45:55 | 60:40 | 75:25 | 44:56 |

Die PCB-Fütterung erfolgte über 8-9 Wochen. Nach der ersten Woche der Fütterung wurden die Weibchen spontan verpaart und die Jungtiere ausgetragen. Mit dem Absetzen wurden die Mütter getötet mittels zervikaler Dislokation. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.2.2.2. Organgewichte der F0-Muttertiere und deren F1-Nachkommen nach PCB-Exposition

In der Abbildung 23 sind die relativen Organgewichte aller 3 Behandlungsgruppen dargestellt. Die Fütterung mit PCB führte bei den F0-Müttern zu geringen, dennoch signifikanten Erhöhungen der Gewichte von Leber (1 $\mu\text{g}+10 \mu\text{g}$ PCB) und Uterus (10 $\mu\text{g}+100 \mu\text{g}$ PCB) im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$; Abb.26A). Keine Änderungen konnten beim Gewicht von Herz, Hirn, Schilddrüse und Ovarien beobachtet werden. Eine maternale PCB-Exposition führte in der F1-Generation zu einer signifikanten Änderung der Organgewichte von Schilddrüse und Ovarien in allen PCB-Behandlungsgruppen ($p < 0,05$; Abb.26B). Das relative Uterusgewicht war signifikant in der 100 μg PCB-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren erniedrigt ($p < 0,05$).



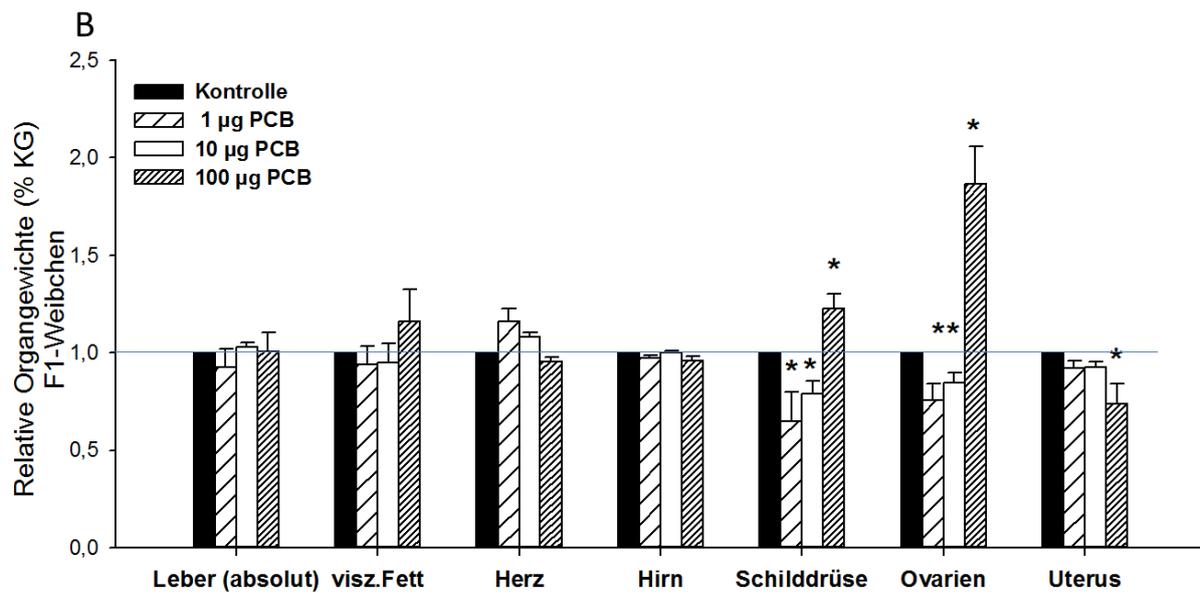


Abbildung 26 Effekte von PCB auf das Gewicht ausgewählter Organe bei F0-Müttern und ihren F1-Nachkommen

Relative Änderung der Organgewichte durch PCB-Fütterung der F0-Mütter (nach Geburt und Laktation) (n=11 Mütter/Gruppe) (A); der maternal exponierten F1-Weibchen (PND 84, n=15 Weibchen/Gruppe) (B). Die Ergebnisse sind dargestellt als MW±SEM von 2 unabhängigen Experimenten. Kontrolle=1; *p<0,05 im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

3.2.2.3. Körpergewichtsentwicklung der F1-Nachkommen nach PCB-Exposition

Zum Zeitpunkt des Absetzens (PNT 21) war das mittlere Körpergewicht der weiblichen und männlichen F1-Nachkommen, welche pränatal und während der Laktation mit 1 µg, 10 µg und 100 µg PCB exponiert worden waren, nicht beeinträchtigt (Abb.27A). Auch im Alter von 12 Wochen (PNT 84) konnte bei beiden Geschlechtern keine Beeinträchtigung durch PCB in der Gewichtszunahme beobachtet werden (Abb.27B).

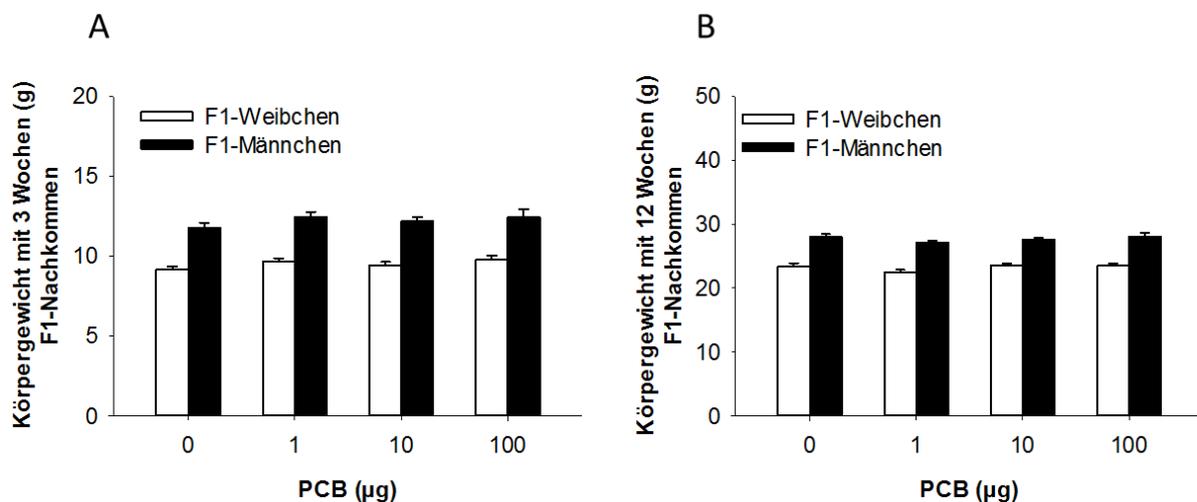


Abbildung 27 Effekte von PCB auf die Körpergewichtsentwicklung der F1-Nachkommen

Körpergewicht im Alter von 3 Wochen (PNT 21; $n=10\pm 3$ Würfe/Gruppe), (weiße Balken: F1-Weibchen; schwarze Balken: F1 Männchen) (A) Körpergewicht im Alter von 12 Wochen (PNT 84, $n=15$ Weibchen und Männchen jeweils/Gruppe) (weiße Balken: F1-Weibchen; schwarze Balken: F1-Männchen) (B). Ergebnisse sind dargestellt als $MW\pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten. * $p<0,05$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

3.2.2.4. Schwangerschaftsrate der F1-Nachkommen und Anzahl F2-Präimplantationsembryonen

Die Schwangerschaftsrate und die mittlere Anzahl der F2-Embryonen/Maus waren bei maternal exponierten F1-Weibchen nicht verändert.

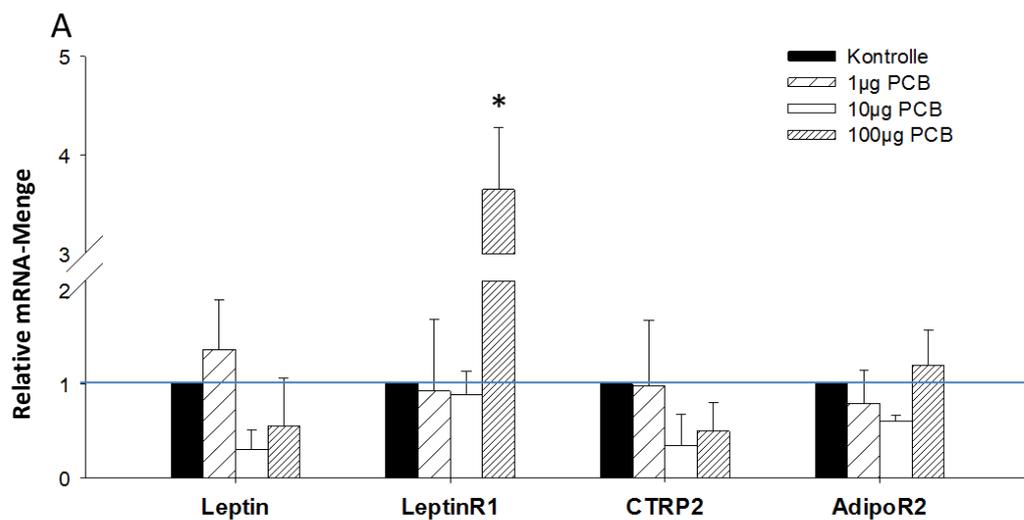
Tabelle 8 Effekte einer PCB-Fütterung auf die Reproduktion *in utero* exponierter F1-Weibchen

| | PCB (µg/kg KG/Tag) | | | |
|-------------------------------|--------------------|------------|------------|------------|
| | 0 | 1 | 10 | 100 |
| F1-Muttertiere (n) | 20 | 15 | 20 | 15 |
| Davon schwangere Tiere (n) | 12 | 12 | 15 | 13 |
| Embryo/Muttertier (n) | $6\pm 4,2$ | $5\pm 5,1$ | $8\pm 4,9$ | $7\pm 4,1$ |
| Degenerierte F2-Embryonen (%) | 15 | 8 | 12 | 18 |

Die PCB-Exposition der F1-Weibchen erfolgte über die Plazenta und über die Muttermilch bis zum Absetzen der Jungtiere. Im geschlechtsreifen Alter wurden die Weibchen mit 7,0 IU PMSG und 48 h später mit 7,5 IU hCG über eine i.p. Injektion stimuliert. Die Verpaarung erfolgte mit nicht-exponierten Männchen. F1-Weibchen wurden 92 h nach der hCG Injektion durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.2.2.5. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F2-Präimplantationsembryonen

In der höchsten Konzentrationsgruppe stieg die mRNA-Menge des LepR1 auf das 3,8fache signifikant im Vergleich zur Kontrolle an ($p < 0,05$, Abb.29A). Keine Änderung war bei der mRNA-Menge von Leptin, CTRP2, AdipoR2, PPARgamma und PPARdelta zu beobachten (Abb.28A&B). PPARalpha-mRNA konnte in F2-Embryonen nicht detektiert werden (Abb.28B).



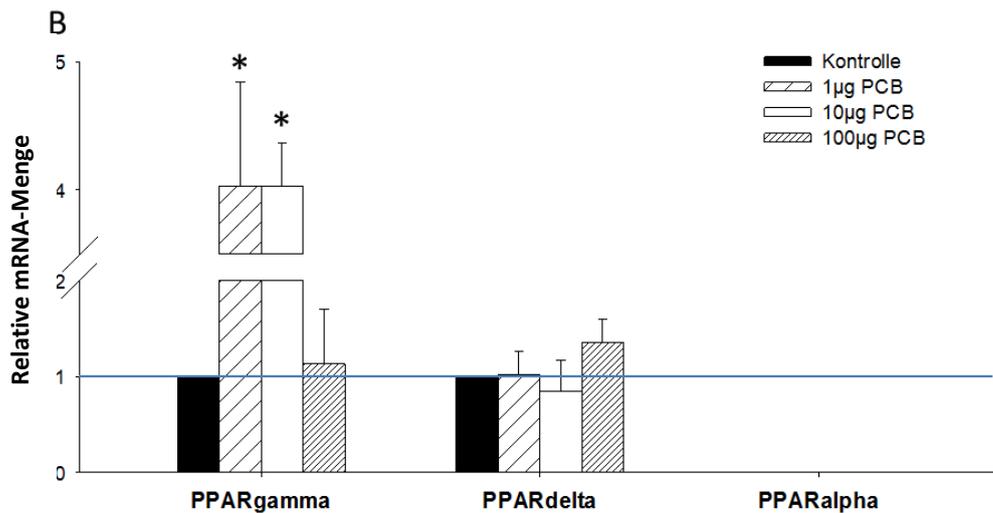


Abbildung 28 Effekte einer maternalen PCB-Fütterung auf die Expression von Adipokinen und PPAR-Isoformen in F2-Präimplantationsembryonen

Relative mRNA-Menge von Leptin, LeptinR1, CTRP2 und AdipoR2 (A) und PPAR-Isoformen (B) in F2-Präimplantationsembryonen. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten mit 30 ± 5 Embryonen/Gruppe dargestellt. Kontrolle=1; * $p < 0,05$ verglichen mit unbehandelten Kontrollembryonen.

3.3. Untersuchung der Wirkung eines DEHP/PCB-Gemisches auf Fertilität und Adipositasentwicklung weiblicher C3H/N-Mäuse

3.3.1. Studie I - direkte DEHP/PCB-Exposition weiblicher Mäuse

3.3.1.1. Wöchentliche Futteraufnahme und Körpergewichtsentwicklung bei DEHP/PCB-exponierten Mäusen

Die tägliche DEHP/PCB-Exposition führte zu keiner negativen Beeinflussung des Gesundheitszustandes der Tiere. In den F0-Mäusen wurden keine toxisch-klinischen Anzeichen festgestellt. Das mittlere Körpergewicht der Tiere aller drei Konzentrationsgruppen war signifikant erhöht (Abb.29A): 0,05 mg+1µg: 3,76 g [9 5% Konfidenz Intervall (CI): 0,94; 2,54]; 5 mg+10 µg: 2,66 g (95 % CI: 1,77; 3,72); 500 mg+100 µg: 1,86 g (9 5% CI: 1,79; 2,75)]; $p < 0,05$).

Eine signifikant erhöhte Futteraufnahme war in den zwei niedrigen DEHP/PCB-Konzentrationsgruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten (Abb.29B)

(Kontrolle: $19,6 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$; $0,05 \text{ mg} + 1 \text{ } \mu\text{g}$: $21,3 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$; $5 \text{ mg} + 10 \text{ } \mu\text{g}$: $22,8 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$; $500 \text{ mg} + 100 \text{ } \mu\text{g}$: $20,9 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$; $p < 0,05$).

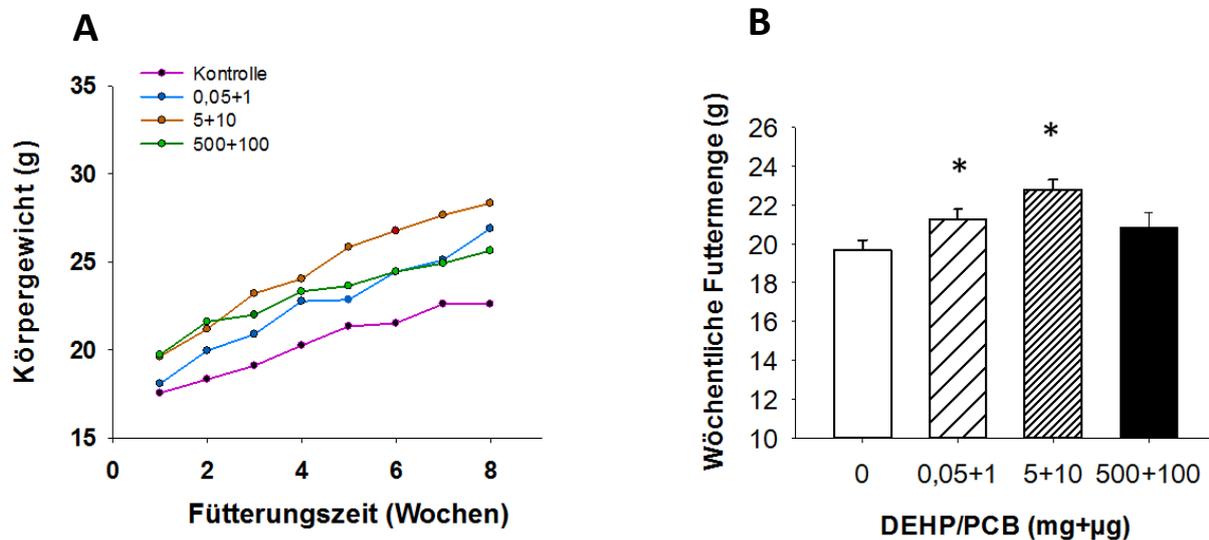


Abbildung 29 Körpergewichtsentwicklung und Futteraufnahme nach 8-wöchiger Fütterung mit DEHP/PCB

Körpergewichtsentwicklung (A) und die mittlere wöchentliche Futteraufnahme (B); $n=20$ Mäusen/Gruppe. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$ verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

3.3.1.2. Organgewichte von DEHP/PCB-exponierten Mäusen

Der prozentuale Anteil des viszeralen Fettgewebes erhöhte sich signifikant auf das 2,1fache ($0,05+1$), 2,4fache ($5+10$) und 1,4fache ($500+100$) in exponierten Tieren im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$, Abb.30). Das absolute Lebergewicht war signifikant um das 1,34fache in der höchsten Konzentrationsgruppe im Vergleich zur Kontrolle erhöht ($p < 0,05$, Abb.31). Die relativen Organgewichte von Hirn, Herz und Uterus waren signifikant erniedrigt ($p < 0,05$; Abb.30). Die Exposition übte keinen Einfluss auf die relativen Organgewichte von Ovarien und Schilddrüse aus.

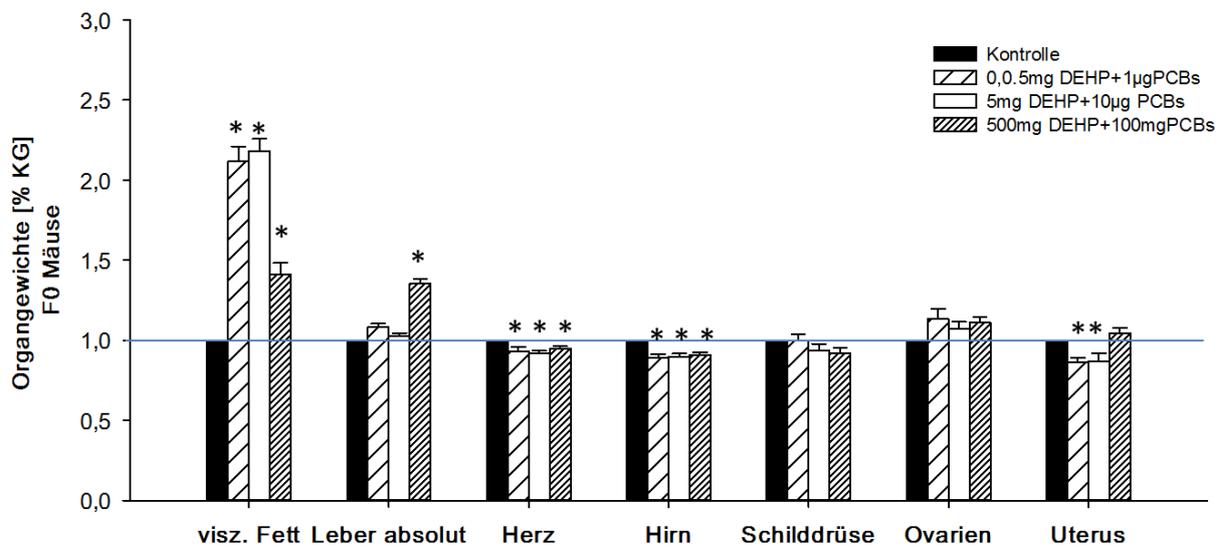


Abbildung 30 Effekte von DEHP/PCB auf das Gewicht ausgewählter Organe

Relative Änderung der Organgewichte nach 8 Wochen DEHP/PCB-Fütterung (n=20 Mäusen/Gruppe). Die Ergebnisse sind als MW±SEM von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt. Kontrolle=1; *p<0,05 verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

3.3.1.3. mRNA-Menge von PPARalpha und -gamma in Leber und Fettgewebe nach DEHP/PCB-Exposition

In der Leber von DEHP/PCB-exponierten Mäusen wurde die mRNA-Expression von PPARalpha und PPARgamma untersucht. In der Leber waren PPARalpha-Transkripte in der höchsten Konzentrationsgruppe signifikant zur Kontrolle erhöht (Abb.31A) (Kontrolle: 18±5,56; 0,05 mg+1 µg: 31±13,8; 5 mg+10 µg: 29±3,14; 500 mg+100 µg: 72±9,48; p<0,05). Eine signifikante Erhöhung in allen Konzentrationsgruppen war für die PPARgamma-Transkripte zu beobachten (Abb.31B) (Kontrolle: 17±4,2; 0,05 mg+1 µg: 32±7,4; 5 mg+10 µg: 93±25,8; 500 mg+100 µg: 105±23,1; p<0,05). Messungen im Fettgewebe ergaben für die mRNA-Menge von PPARalpha und PPARgamma keine signifikante Änderung (Abb. 31C&D).

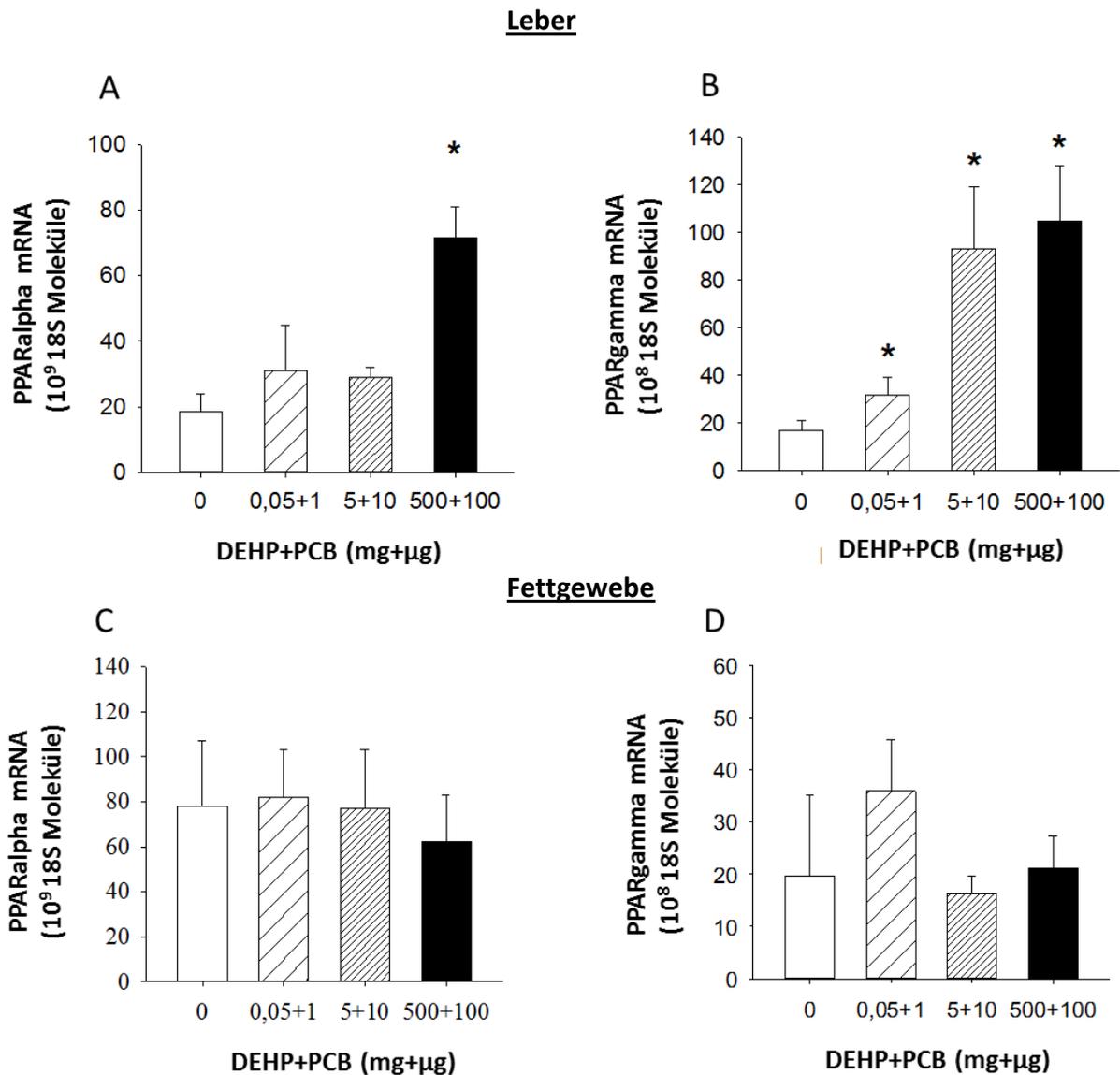


Abbildung 31 Effekte einer DEHP/PCB-Fütterung auf die mRNA-Expression von PPARalpha und PPARgamma in Leber und Fettgewebe

mRNA-Menge von PPARalpha und PPARgamma in der Leber (A&B) und viszeralem Fettgewebe (C&D). Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten mit 6 Mäusen/Gruppe dargestellt. * $p < 0,05$ verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

3.3.1.4. mRNA-Menge von PPAR-Zielgenen und dem Coaktivator Med1 in Leber und Fettgewebe nach DEHP/PCB-Exposition

In der Leber wurde die mRNA-Expression von AOX und Med1 untersucht. AOX-Transkripte waren in den beiden höchsten Konzentrationsgruppen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abb.32A) (Kontrolle: $45 \pm 12,9$; 5 mg+10 μ g: $140 \pm 51,3$; 500 mg+100 μ g: $170 \pm 53,2$;

$p < 0,05$). Med1-Transkripte waren in allen Konzentrationsgruppen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abb.32B) (Kontrolle: $60 \pm 28,2$; 0,05 mg+1 μ g: $270 \pm 70,5$; 5 mg+10 μ g: $280 \pm 100,2$; 500 mg+100 μ g: $231 \pm 60,5$; $p < 0,05$). Expressionsmessungen im Fettgewebe ergaben für die mRNA-Menge von AOX und FABP4 keine signifikante Änderung (Abb.32C&D).

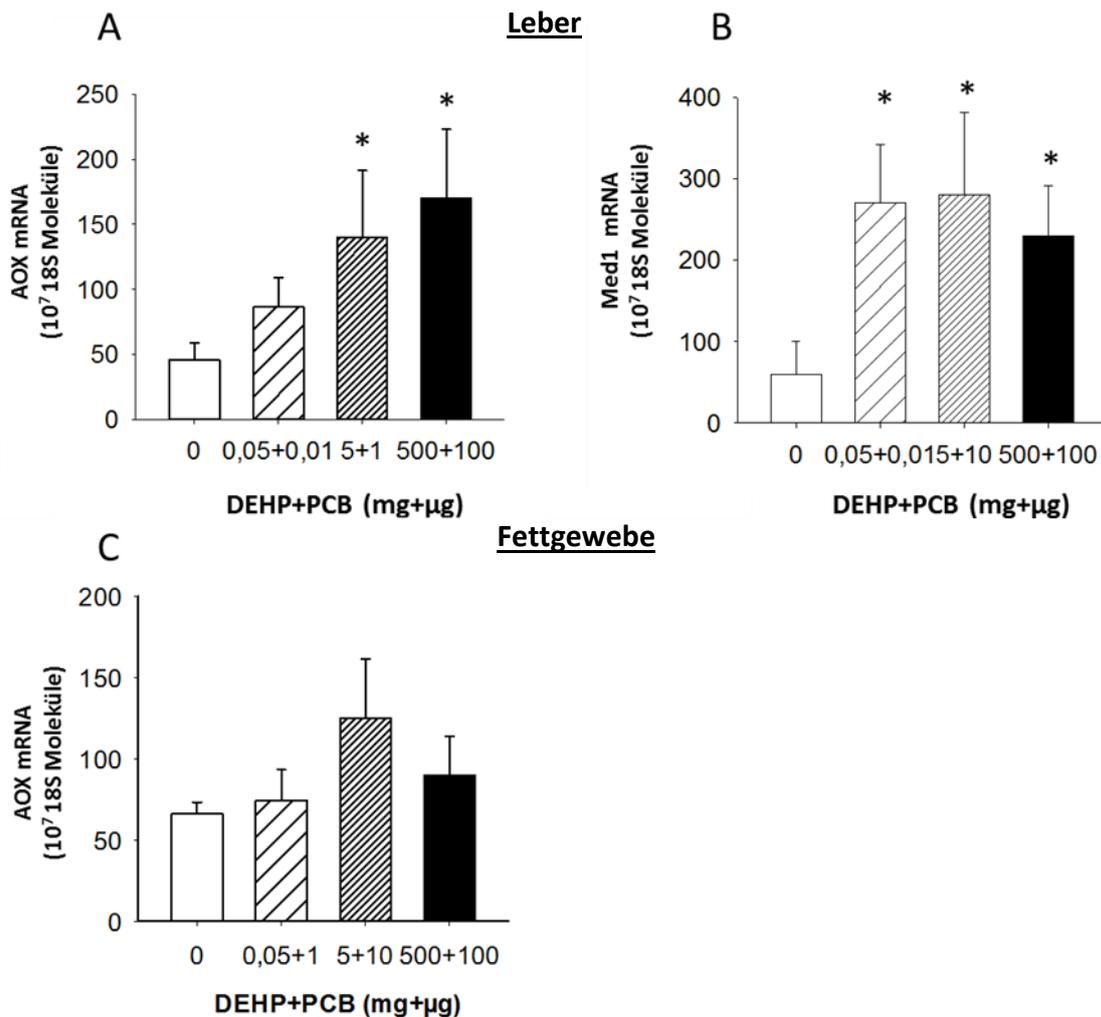


Abbildung 32 Effekte einer DEHP/PCB-Fütterung auf die mRNA-Menge von AOX, Med1 und FABP4 in Leber und Fettgewebe

mRNA-Menge von AOX (A) und Med1 (B) in der Leber. mRNA-Menge von AOX (C) und FABP4 (D) im Fettgewebe. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten mit 6 Mäusen/Gruppe dargestellt. * $p < 0,05$ verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

3.3.1.6. mRNA-Menge von Adipokinen im Fettgewebe nach DEHP/PCB-Exposition

Die DEHP/PCB-Exposition führte zu einem signifikanten Anstieg der Leptin-Transkripte im Fettgewebe, mit dem höchsten Anstieg in der niedrigsten Konzentrationsgruppe (Abb. 33A) (Kontrolle: $53 \pm 19,8$; 0,05 mg+1 μ g: 440 ± 108 ; 5 mg+10 μ g: $134 \pm 22,1$; 500 mg+100 μ g: $111 \pm 37,0$; $p < 0,05$). Die mRNA-Menge von Adiponektin zeigte keine signifikante Änderung (Abb.33B). Die mRNA-Transkripte von FABP4 waren in der höchsten Konzentrationsgruppe signifikant im Vergleich zur Kontrolle verändert (Kontrolle: $32 \pm 13,8$; 500 mg+100 μ g: $80 \pm 19,4$; $p < 0,05$; Abb. 33C).

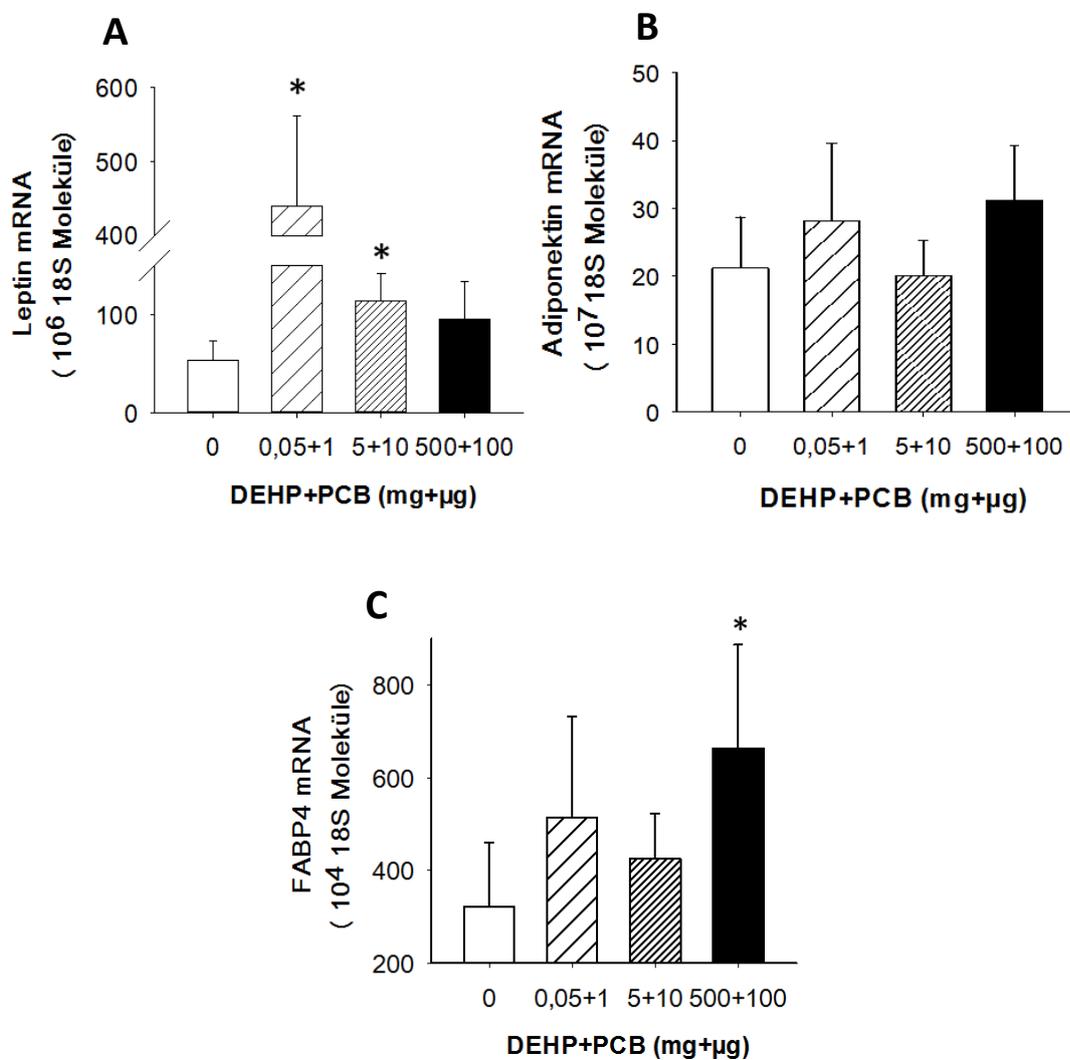


Abbildung 33 Effekte einer DEHP/PCB-Fütterung auf Adipokine im Fettgewebe

mRNA-Menge von Leptin (A), Adiponektin (B) und FABP4 (C) im Fettgewebe. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit 5 Mäusen/Gruppe dargestellt. *p<0,05 verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

3.3.1.7. Schwangerschaftsrate und Anzahl F1-Präimplantationsembryonen

Die Exposition mit DEHP und PCB ergab keine Änderung der mittleren Anzahl der Embryonen/Maus (Tab.9). In allen Konzentrationsgruppen wurde eine erhöhte Anzahl von degenerierten Embryonen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Kontrolle: 13%; 0,05 mg+1 μ g: 25% (p=0,21); 5 mg+10 μ g: 36% (p=0,16); 500 mg+100 μ g: 30%; p=0,56; Tab.9).

Tabelle 9 Effekte der DEHP/PCB-Fütterung auf Schwangerschaftsrate und F1-Embryonenanzahl

| | DEHP+PCB (mg+ μ g/kg KG/Tag) | | | |
|----------------------------|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0 | 0,05+1 | 5+10 | 500+100 |
| F0-Muttertiere (n) | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Davon schwangere Tiere (n) | 15 | 13 | 15 | 13 |
| Embryo/Muttertier (n) | 8 \pm 1,4 | 8 \pm 1,0 | 6 \pm 1,5 | 7 \pm 1,6 |
| Degenerierte Embryonen (%) | 13 | 25 | 36 | 30 |

Die DEHP/PCB-Fütterung erfolgte über 8 Wochen. F0-Weibchen wurden mit 7,0 IU PMSG und 48 h später mit 7,5 IU hCG über eine i.p. Injektion stimuliert. Die Verpaarung erfolgte mit nicht-exponierten Männchen. 92 h nach der hCG Injektion wurden die Weibchen durch eine zervikale Dislokation getötet. Ergebnisse sind als MW \pm SEM von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.3.2.8. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F1-Präimplantationsembryonen

In der höchsten Konzentrationsgruppe war die mRNA-Menge von CTRP2 um 38% im Vergleich zu den Kontrollembryonen signifikant erhöht (p<0,05; Abb.34A). Die Genexpression von Leptin, LeptinR1, AdipoR2, PPARgamma und PPARdelta war nicht

verändert (Abb.34A&B). Transkripte von PPARalpha wurden in F1-Embryonen nicht detektiert (Abb.34B).

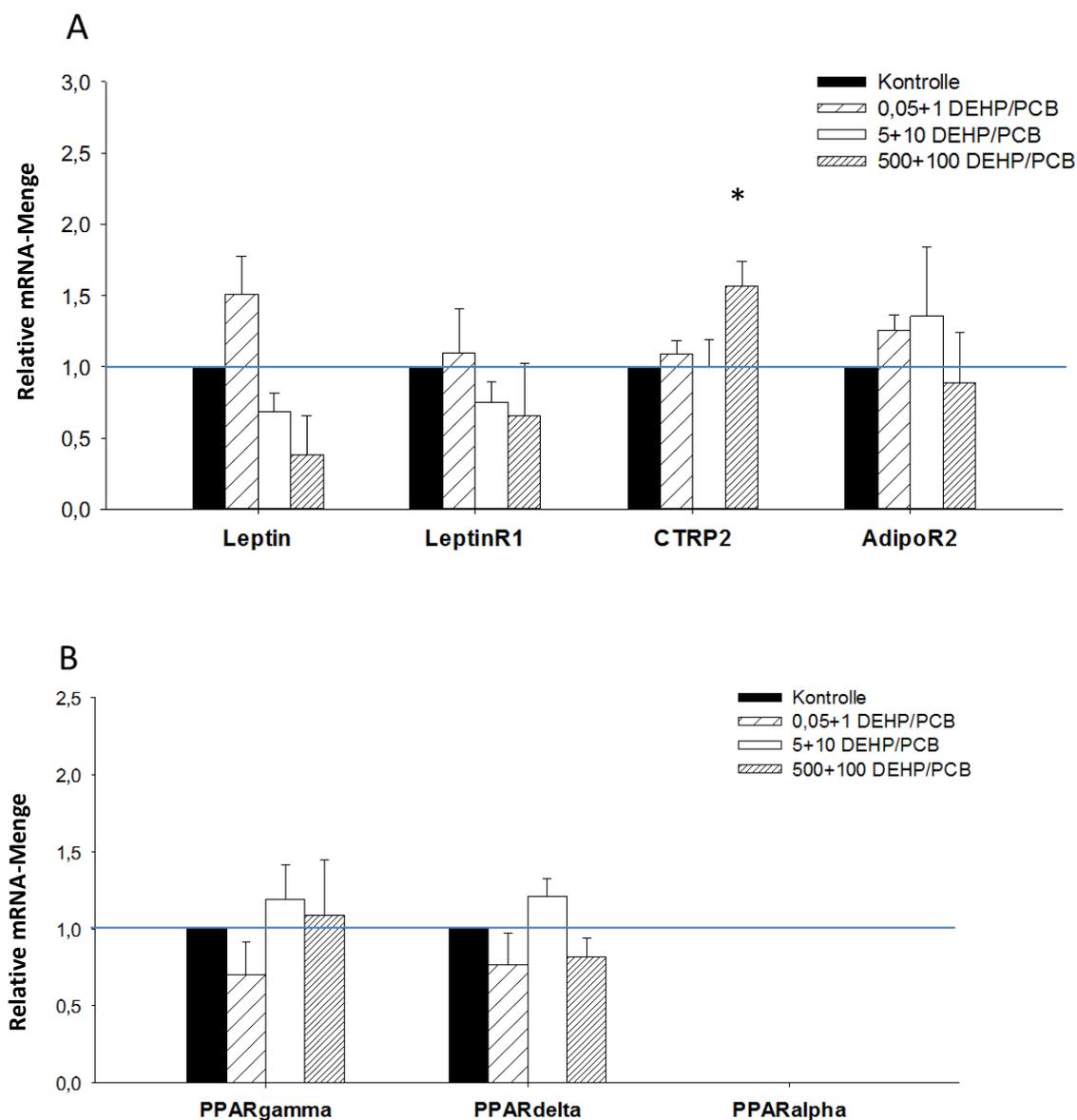


Abbildung 34 Effekte einer maternalen DEHP+PCB-Fütterung auf die Expression von Adipokinen und PPAR-Isoformen in F1-Präimplantationsembryonen

Relative mRNA-Menge von Leptin, LeptinR1, CTRP2 und AdipoR2 (A) und PPAR-Isoformen (B) in Präimplantationsembryonen. Die Ergebnisse sind als MW±SEM von 2 unabhängigen Experimenten mit 30±5 Embryonen/Gruppe dargestellt. Kontrolle=1; *p<0,05 verglichen mit unbehandelten Kontrollembryonen.

3.3.2. Studie II - maternal DEHP/PCB-exponierte F1-Nachkommen

3.3.2.1. Gesundheits- und Fertilitätsparameter der F0-Muttertiere nach DEHP/PCB-Exposition

Das Fütterungsexperiment wurde wie in Punkt 3.1.2.1. beschrieben durchgeführt. Die DEHP/PCB-Exposition führte zu keiner negativen Beeinflussung des Gesundheitszustandes der Muttertiere während Schwangerschaft und Laktation. Es wurden keine toxisch-klinischen Anzeichen beobachtet. Wie schon bei den DEHP-Experimenten, führte die Behandlung der Muttertiere mit DEHP/PCB zu einer Abortrate von 100% in der höchsten Konzentrationsgruppe (Tab.10). Die Wurfgröße und die Geschlechterverteilung in den niedrigeren Gruppen waren durch die DEHP/PCB-Exposition nicht beeinträchtigt (Tab.10).

Tabelle 10 Effekte der DEHP/PCB-Fütterung auf die Reproduktion direkt exponierter F0-Weibchen

| | DEHP+PCB (mg+µg/kg KG/Tag) | | | |
|----------------------------|----------------------------|--------|-------|---------|
| | 0 | 0,05+1 | 5+10 | 500+100 |
| F0-Muttertiere (n) | 10 | 9 | 10 | 10 |
| Davon schwangere Tiere (n) | 10 | 9 | 10 | 10 |
| Geburten (n) | 10 | 9 | 10 | 10 |
| Aborte (%) | 0 | 0 | 0 | 100 |
| Wurfgröße (n) | 6±1,4 | 6±1,7 | 6±1,6 | - |
| Verhältnis w:m (%) | 44:56 | 49:51 | 55:45 | - |

Die DEHP/PCB-Fütterung erfolgte über 8-9 Wochen. Nach der ersten Woche der Fütterung wurden die Weibchen spontan verpaart und die Jungtiere ausgetragen. Mit dem Absetzen wurden die Mütter getötet mittels zervikaler Dislokation. Die Ergebnisse sind als MW±SEM von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.3.2.2. Menge viszerales Fettgewebe der F0-Muttertiere und deren F1-Nachkommen nach DEHP/PCB-Exposition

Die viszerale Fettmenge der Muttertiere war signifikant zur Kontrolle erhöht (0,05+1: 2fach; 5+10: 1,45fach; $p < 0,05$; Abb.35A). In der 0,05+1-Konzentrationsgruppe war die Erhöhung der viszeralen Fettmenge im Vergleich zur 5+10-Konzentrationsgruppe signifikant höher.

Die viszerale Fettmenge der F1-Nachkommen wurde im Vergleich zur Kontrolle nicht durch die maternale DEHP/PCB-Exposition verändert (Abb.35B). In der 500+100-Konzentrationsgruppe kam es zu einer 100%igen Abortrate (Tab.10), sodass Embryonen dieser Gruppe nicht untersucht werden konnten.

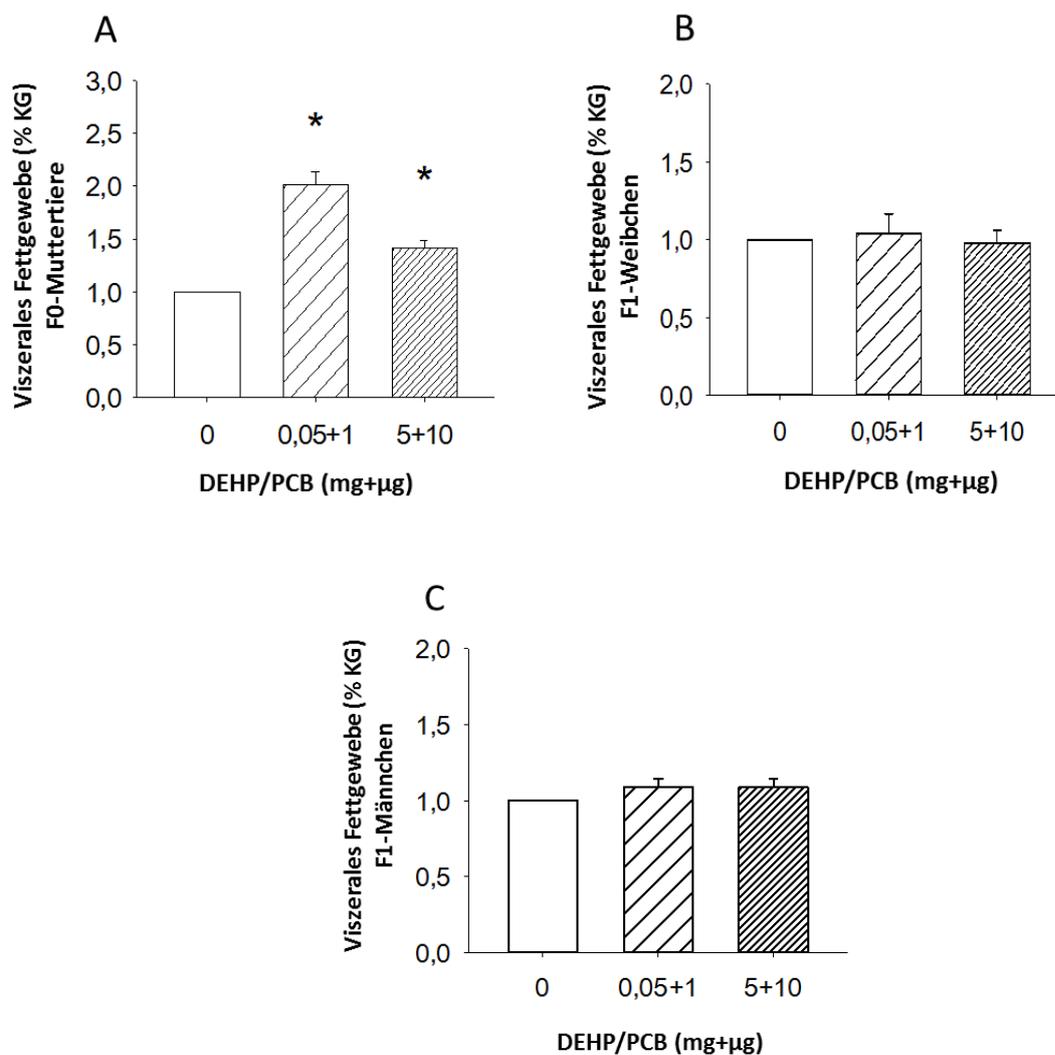
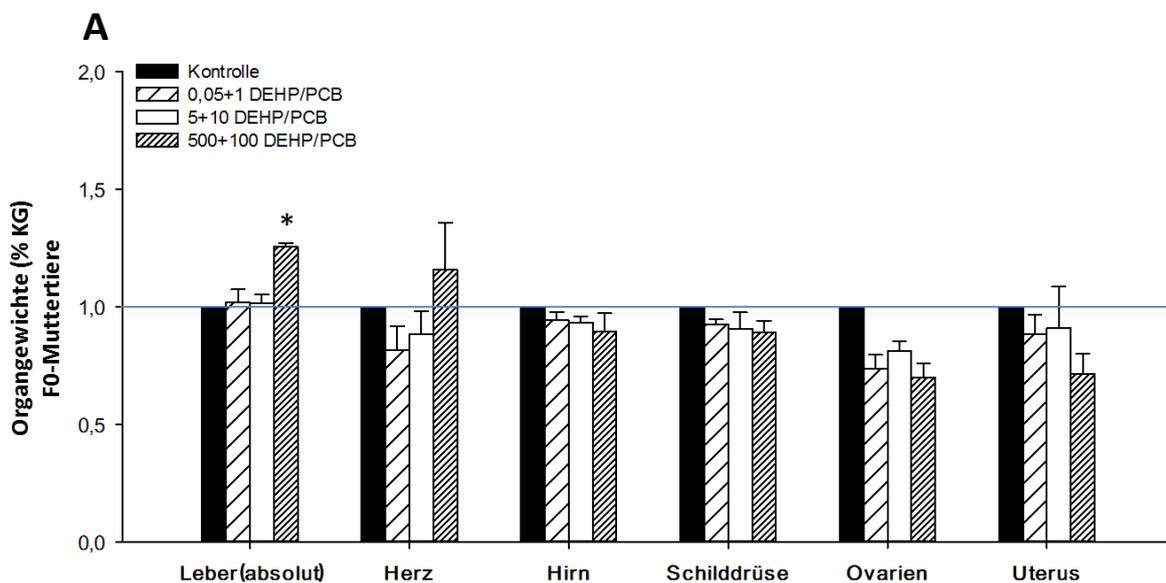


Abbildung 35 Effekte von DEHP/PCB auf die Menge des viszeralen Fettgewebes in der F0- und F1-Generation

Menge an viszeralem Fett der F0-Muttertiere (nach Geburt und Laktation) ($n=10\pm 1$ Mütter/Gruppe) (A); der F1-Weibchen und der F1-Männchen (PNT 84, $n=15$ Weibchen und 15 Männchen/Gruppe) (B&C). Die Ergebnisse sind dargestellt als $MW\pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten. Kontrolle=1; $*p<0,05$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

3.3.2.3. Organgewichte der F0-Muttertiere und deren F1-Nachkommen nach DEHP/PCB-Exposition

Die relativen Organgewichte aller DEHP/PCB-Konzentrationsgruppen wurden bestimmt. Eine Fütterung mit DEHP/PCB führte zu einem signifikanten Anstieg des Lebergewichtes auf das 2,7fache in den F0-Muttertieren in der höchsten DEHP/PCB-Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrolle ($p<0,05$; Abb.36). Eine signifikante Abnahme der relativen Gewichte der Ovarien konnte in allen Konzentrationsgruppen beobachtet werden ($p<0,05$, Abb.36). In der F1-Generation kam es zu keiner Änderung der relativen Organgewichte (Abb.36).



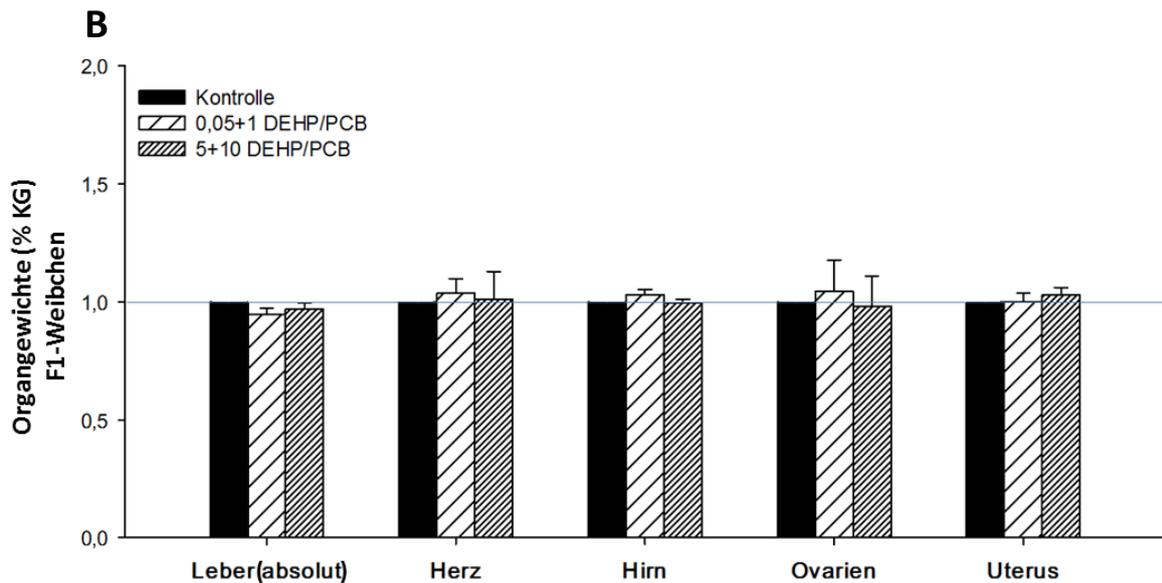


Abbildung 36 Effekte von DEHP/PCB auf das Gewicht ausgewählter Organe von F0-Müttern und ihren Nachkommen

Relative Änderung der Organgewichte durch DEHP/PCB-Fütterung der F0-Mütter (nach Geburt und Laktation) ($n=10\pm 1$ Mütter/Gruppe) (A); der maternal exponierten F1-Weibchen und F1-Männchen (PNT 84, $n=15$ Weibchen/Gruppe) (B&). Die Ergebnisse sind dargestellt als $MW\pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten. Kontrolle=1; * $p<0,05$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

3.3.2.4. Körpergewichtsentwicklung der F1-Nachkommen nach DEHP/PCB-Exposition

Am Tag des Absetzens (PNT 21) war das mittlere Körpergewicht der weiblichen und männlichen Nachkommen signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb.37A) (F1-Weibchen: Kontrolle: $10,62\pm 0,32$ g; 0,05+1: $12,92\pm 0,30$ g; 5+10: $12,09\pm 0,34$ g; F1-Männchen: Kontrolle: $11,45\pm 0,40$ g; 0,05+1: $14,15\pm 0,41$ g; 5+10: $12,91\pm 0,57$ g; $p<0,05$). Diese signifikante Gewichtszunahme konnte bei beiden Geschlechtern im Alter von 12 Wochen (PNT 84) nicht mehr beobachtet werden (Abb.37B).

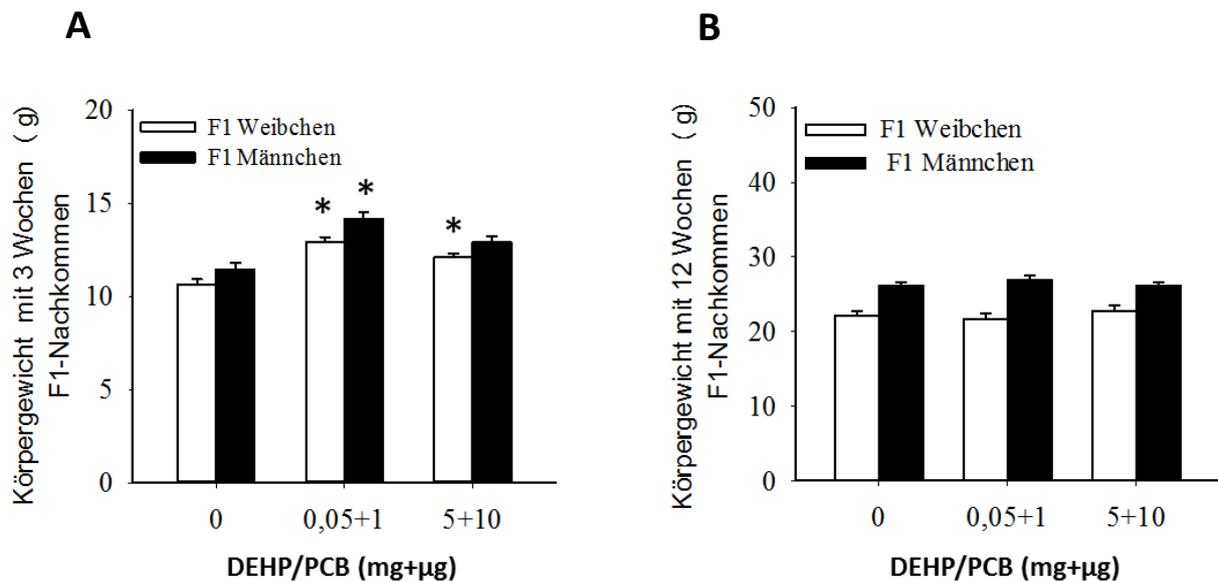


Abbildung 37 Effekte von DEHP/PCB auf die Körpergewichtsentwicklung der F1-Nachkommen

Körpergewicht im Alter von 3 Wochen (PNT 21; $n = 10 \pm 3$ Würfe/Gruppe), (weiße Balken: F1-Weibchen; schwarze Balken: F1 Männchen) (A) Körpergewicht im Alter von 12 Wochen (PNT 84, $n = 15$ Weibchen und Männchen jeweils/Gruppe) (weiße Balken: F1-Weibchen; schwarze Balken: F1-Männchen) (B). Die Ergebnisse sind dargestellt als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

3.3.2.5. Schwangerschaftsrate der F1-Nachkommen und Anzahl der F2-Präimplantationsembryonen

Die Schwangerschaftsrate und die mittlere Anzahl der F2-Präimplantationsembryonen/Maus waren bei den maternal exponierten F1-Weibchen nicht gestört (Tab.11). Ein Unterschied bei degenerierten F2-Embryonen zeigte sich zwischen der 5+10-Konzentrationsgruppe und der Kontrollgruppe (Kontrolle: 13%; 5+10: 20%; $p = 0,60$; Tab.11).

Tabelle 11 Effekte der DEHP/PCB-Fütterung auf die Reproduktion *in utero* exponierter F1-Weibchen

| | DEHP+PCB (mg+µg/kg KG/Tag) | | | |
|-------------------------------|----------------------------|--------|-------|---------|
| | 0 | 0,05+1 | 5+10 | 500+100 |
| F1-Muttertiere (n) | 8 | 15 | 15 | - |
| Davon schwangere Tiere (n) | 7 | 12 | 9 | - |
| Embryo/Muttertier (n) | 6±3,7 | 7±4,4 | 7±4,8 | - |
| Degenerierte F2-Embryonen (%) | 13 | 9 | 20 | - |

Die DEHP/PCB-Exposition der F1-Weibchen erfolgte über die Plazenta und über die Muttermilch bis zum Absetzen der Jungtiere. Im geschlechtsreifen Alter wurden die Weibchen mit 7,0 IU PMSG und 48 h später mit 7,5 IU hCG über eine i.p. Injektion stimuliert. Die Verpaarung erfolgte mit nicht-exponierten Männchen. F1-Weibchen wurden 92 h nach der hCG Injektion durch eine zervikale Dislokation getötet. Ergebnisse sind als MW±SEM von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.3.2.6. mRNA-Menge der Adipokine und PPARs in F2-Präimplantationsembryonen

Eine DEHP/PCB-Exposition in der F0-Generation führte in F2-Embryonen zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Menge von Leptin um 88% (0,05+1) und 91% (5+10) ($p < 0,05$; Abb.38A). Die mRNA-Menge von LeptinR1 war im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 78% (0,05+1) und 80% (5+10) reduziert ($p < 0,05$; Abb.38A). Eine signifikante Abnahme um 54% (0,05+1) und 65% (5+10) war für die PPARdelta-mRNA zu verzeichnen ($p < 0,05$, Abb.40B). Die mRNA-Menge von CTRP2, AdipoR2 und PPARgamma war nicht signifikant verändert. Eine Expression der mRNA von PPARalpha konnte in den F2-Embryonen nicht detektiert werden (Abb.38B).

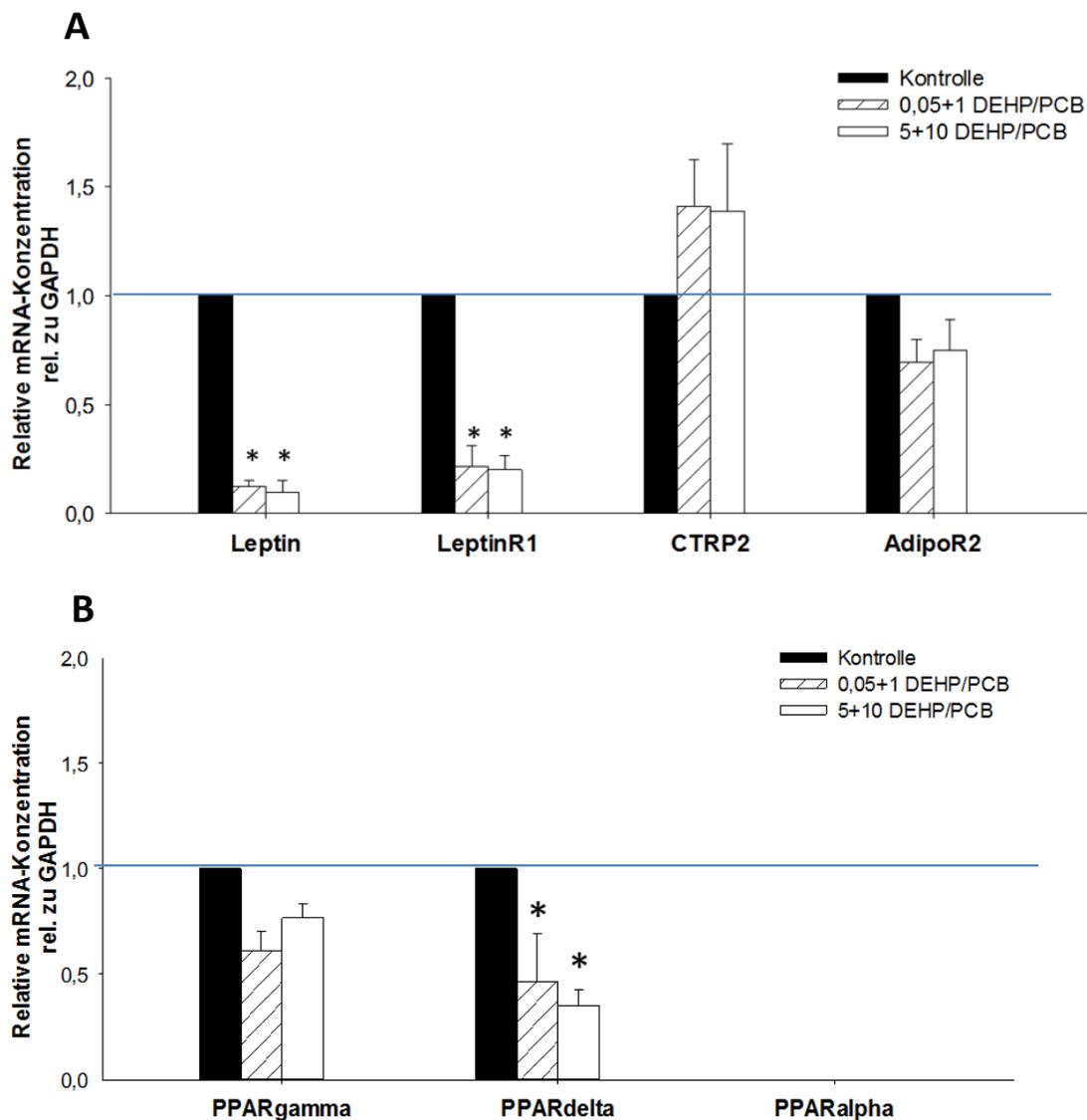


Abbildung 38 Effekte einer maternalen DEHP/PCB-Fütterung auf die Expression von Adipokinen und PPAR-Isoformen in F2-Präimplantationsembryonen

Relative mRNA-Menge von Leptin, LeptinR1, CTRP2 und AdipoR2 (A) und PPAR-Isoformen (B) in Präimplantationsembryonen. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ von 2 unabhängigen Experimenten mit 30 ± 5 Embryonen/Gruppe dargestellt. Kontrolle=1; * $p < 0,05$ verglichen mit unbehandelten Kontrollembryonen.

Diskussion

Übergewicht und Adipositas stellen ein immer größer werdendes gesundheitliches Problem dar. Die Prävalenz für Fettleibigkeit bei Erwachsenen und Kindern steigt weltweit stetig an. Finucane et al. (2011) berichten von einem doppelten Anstieg der globalen Adipositasprävalenz bei Männern und Frauen innerhalb von nur 10 Jahren. Alarmierend hoch sind die Morbiditäts- und Mortalitätsraten durch Folge- bzw. Begleiterkrankungen, zum Beispiel des kardiovaskulären Systems, durch Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom und Krebsarten wie dem Mamma- und Kolonkarzinom. Die Ursache und Entstehung einer Adipositas ist multifaktoriell. Gründe dafür sind in der Verbesserung des Lebensstandards vieler Länder und in der Imbalanz zwischen Nahrungsaufnahme und körperlichen Betätigung zu finden. Neben genetischen und sozio-kulturellen Faktoren treten pränatale Einflüsse als Ursache für Übergewicht und Adipositas immer stärker in das Zentrum wissenschaftlicher Diskussionen. Hierzu zählt neben Erkrankungen der Mutter auch der Einfluss von Umweltchemikalien auf den sich im Mutterleib entwickelnden Fetus. Viele dieser Chemikalien sind in der Lage, hormonähnliche Wirkungen im Körper auszulösen, indem sie u.a. als exogene Liganden durch Rezeptorbindung und anschließende Aktivierung bzw. Inhibierung weiterführender Signalwege das endogene System aus dem Gleichgewicht bringen. Substanzen mit solchen Eigenschaften werden als endokrine Disruptoren bezeichnet.

Abkommen der Phthalsäureester wie das Di (2-ethyl-hexyl)phthalat (DEHP) und die polychlorierten Biphenyle (PCB) werden neben vielen Umweltkontaminanten dieser Gruppe zugeordnet. DEHP findet seinen Einsatz als Weichmacher in vielen Gegenständen des alltäglichen Bedarfs. Gegenstand intensiver Forschung war bislang die teratogene, kanzerogene und reproduktionstoxische Wirkung von Phthalaten im Tiermodell (Agarwal et al. 1889; Moore et al. 1997; Shiota & Nishimura 1982).

PCB akkumulieren aufgrund ihrer hohen chemischen Stabilität in der Umwelt und reichern sich in der Nahrungskette an. Die Belastung für den Menschen ergibt sich hauptsächlich aus dem Verzehr fettreicher Lebensmittel. Neben der immuno-, neurotoxischen und kanzerogenen Wirkung lösen PCB bei Männern und männlichen Ratten Unfruchtbarkeit und genitale Fehlbildungen aus, indem sie in den natürlichen Regelkreis der Sexualhormone eingreifen (Kuriyama & Chahoud 2004; Richthoff et al. 2003). Wissenschaftliche Untersuchungen zur Wirkung dieser beiden endokrinen Disruptoren wurden bisher hauptsächlich an männlichen Tieren untersucht. Effekte auf den weiblichen Organismus und auf die weiblichen

Nachkommen sind erst ungenügend untersucht. Mit dieser Arbeit sollen Effekte der endokrinen Disruptoren DEHP und PCB auf den weiblichen Organismus und auf die Nachkommen untersucht werden. Hierbei stehen Langzeit-Wirkungen umweltrelevanter Konzentrationen auf Stoffwechsel, Reproduktion und Embryonalentwicklung im Fokus.

4.1. Aufbau der Studien

Für die Beantwortung der Fragestellung wurden zwei Tierstudien mit unterschiedlichem Zeit- und Verpaarungsregime durchgeführt. In Studie I wurde weiblichen Mäusen DEHP-versetztes Futter für 8 Wochen verabreicht. Nach 7 Wochen Fütterung wurden die Weibchen mit Hormonen stimuliert und anschließend mit nicht-exponierten Männchen verpaart. Am Tag 3,5 *p.c.* wurden die schwangeren Mäuse getötet, das Gewebe, die Organe und Präimplantationsembryonen entnommen. Durch diesen Versuchsablauf haben wir Untersuchungen zur Auswirkung einer direkten oralen Aufnahme von DEHP und PCB machen können. Auch konnten wir untersuchen, wie sich die maternale ED-Exposition auf die Entwicklung der F1-Präimplantationsembryonen auswirkt.

In Studie II standen die Auswirkungen auf die F2-Generation im Fokus der Analysen. Hier wurden die Weibchen über einen Zeitraum von 8-9 Wochen mit DEHP/PCB über das Futter exponiert. Nach der ersten Fütterungswoche wurden die Weibchen spontan mit nicht-exponierten Männchen verpaart. Schwangere Weibchen haben im weiteren Verlauf bis zum Laktationsende das DEHP/PCB-Futter zu fressen bekommen. Die weiblichen Nachkommen bekamen mit dem Laktationsende normales Standardfutter und wurden im geschlechtsreifen Alter mit Hormonen stimuliert, verpaart und am Tag 3,5 *p.c.* getötet. Wie in Studie I wurden Organe, Gewebe und Präimplantationsembryonen entnommen. Mit diesem Studienverlauf war es uns möglich, Effekte der Umweltkontaminanten auf die Nachfolgenerationen zu untersuchen, welche nur im Mutterleib und durch die Muttermilch (F1) oder von denen nur die Urkeimzellen (F2) mit den Substanzen in Kontakt kamen. Von den F1- und F2-Generationen haben wir Präimplantationsembryonen im Blastozystenstadium untersucht.

Alle Tierexperimente wurden mit weiblichen Mäusen des Stammes C3H/N durchgeführt. Dieser Inzuchtstamm besitzt eine hohe Fruchtbarkeit und wurde in vielen Reproduktionsstudien eingesetzt. Die Maus als Nagetiermodell ist aufgrund seiner einfachen Haltungsbedingungen, schnellen Generationsfolge und stabilen Nachkommenschaft gut für

unsere Fragestellungen geeignet. Des Weiteren wurden Mäuse dieser Zuchtlinie für grundlegende Untersuchungen zu verschiedenen Stoffwechselfragestellungen genutzt. So wurden Untersuchungen zum metabolischen Syndrom (Henkel et al. 2012) und Leberstoffwechsel (Spruss et al. 2009) an C3H/N-Mäusen durchgeführt.

Als Gesundheits- und Adipositasparameter wurden die Körpergewichtszunahme im zeitlichen Verlauf, die Futtermittelaufnahme, die viszerale Fettmenge und Fettzellgröße untersucht. Adipokine wurden im Plasma und im Fettgewebe bestimmt. Als Stoffwechselfparameter wurde die Expression ausgewählter Gene (PPARs, FABP4, AOX, FcS, Med1) in Leber und Fettgewebe bestimmt. Reproduktionsparameter stellten die Schwangerschaftsrate, Anzahl der Nachkommen, Anzahl der Geburten/Aborte dar. Die Embryonenanzahl und das Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gene wurden als Parameter zur Einschätzung der Entwicklung der Präimplantationsembryonen ausgesucht.

4.2. Gewählte Konzentrationen an DEHP und PCB

Der eingesetzte PCB-Konzentrationsbereich wurde von uns anhand gemessener PCB-Konzentrationen in der Muttermilch (19 ng/g Körperfett für PCB 118) (*World Health Organization* (WHO, 1996) gewählt. Der Gehalt an PCB im Fett der Muttermilch ist der gleiche wie im mütterlichen Fettgewebe. Unter Berücksichtigung, dass die Gesamtfettmenge einer adulten Maus ca. 20 % ihres Körpergewichtes ausmacht (Kuriyama and Chahoud, 2004), können die angestrebten PCB-Konzentrationen berechnet werden. Die tägliche Futtermittelaufnahme beträgt 2,3 µg PCB. Der gewählte PCB-Konzentrationsbereich [1–100 µg/Kg KG/ Tag] entspricht einer 0,3 – 30 fachen Erhöhung im Vergleich zur durchschnittlichen PCB-Aufnahme von Kindern über die Muttermilch. Mit den von uns gewählten DEHP-Konzentrationen (0,05, 5, 500 mg/kg KG/Tag) wurden die durchschnittliche tägliche humane Exposition (Kavlock et al. 2002), der NOAEL und eine hohe Dosis (Moore et al. 2001) abgedeckt.

4.3. DEHP-Effekte auf allgemeine Gesundheits- und Adipositasparameter

4.3.1. Eine DEHP-Exposition hat bereits in umweltrelevanten Konzentrationen adipogene Effekte in C3H/N-Weibchen und bewirkt eine Änderung der Expression der PPARs und der hepatischen FsS

Verschiedene experimentelle Studien haben bereits endokrin wirksame Umweltschadstoffe als *obesogene* Faktoren einstufen können (Grun et al. 2006; Kanayama et al. 2005; Hope et al. 2007). Erste epidemiologische Beobachtungen zeigen einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Phthalat-Exposition und Übergewicht (Stahlhut et al. 2007).

In unserer Studie I wurde nach der DEHP-Exposition eine erhöhte viszerale Fetteinlagerung und eine Hypertrophie der Adipozyten bei den weiblichen Mäusen beobachtet. Bereits in der niedrigsten DEHP-Behandlungsgruppe (entspricht dem TDI) waren diese Beobachtungen signifikant. DEHP-gefütterte Tiere zeigten in allen Versuchen der Studie I und II eine gesteigerte Futtermittelaufnahme, erhöhte Körpergewichte und mehr viszerales Fett. Bereits zuvor haben Hatch et al. (2008) eine positive Korrelation bei Frauen zwischen Phthalatmetaboliten im Urin und dem BMI sowie des Hüftumfangs feststellen können.

In unserer Studie I war nach DEHP-Exposition (0,05 mg, 5 mg und 500 mg) zusätzlich das Lebergewicht der Mäuse signifikant erhöht. Chronisch hohe Dosen an DEHP (3000 mg und 1000 mg/Kg KG/Tag) können eine hepatische Peroxisomen- und Leberzellproliferation und eine dadurch bedingte beginnende Leberkanzerogenese hervorrufen (Kluwe et al. 1982; Lapinskas et al. 2005). Um im Weiteren eine Leberschädigung ausschließen zu können, haben wir im Plasma die Konzentration der ASAT und ALAT, zwei Indikatorenzyme der Leber, untersucht. Für die genannten Enzyme wurden durch DEHP-Behandlung keine Änderungen beobachtet.

Die Triglyzeridkonzentration in der Leber ist in unserer Studie bei einer DEHP-Exposition (5 mg und 500 mg) signifikant erhöht. Triglyzeride entstehen durch Veresterung freier Fettsäuren. Für die hepatische Triglyzeridsynthese werden freie Fettsäuren zum einen aus den Nahrungsfetten und zum anderen aus dem Fettgewebe (durch Lipolyse) verwendet. An Albumin gebunden werden sie zur Leber transportiert und dort entweder der beta-Oxidation zugeführt oder zu Triglyzeriden verestert. In unserer Studie bewirkte eine DEHP-Exposition eine Hypertrophie der Adipozyten, jedoch nicht einen Anstieg der Lipidkonzentration im Plasma. Dies lässt vermuten, dass im Fettgewebe die Lipolyse nicht erhöht ist und die gesteigerte hepatische Triglyzeridspeicherung mit erhöhtem Lebergewicht nach einer DEHP-

Exposition eine andere Ursache haben muss. Bekannt ist, dass eine krankhaft erhöhte *de novo*-Fettsäuresynthese in der Leber zur verstärkten Einlagerung von Triglyzeriden und erhöhtem Lebergewicht führt (Baltzell und Berdanier 1985, Nace&Szepesi 1976). Eine gesteigerte hepatische Lipidakkumulation ist die Ursache von *nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)* und wird mit Adipositas und peripherer Insulinresistenz assoziiert (Choi&Diehl 2008; Diehl et al. 2003).

Die FcS katalysiert als lipogenes Enzym den Aufbau von Fettsäuren, hauptsächlich Palmitinsäure aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in der Leber. Sie wird darüber hinaus auch in der Lunge und im Gehirn exprimiert. Dieses Enzym wurde von uns auf Expressionsebene untersucht. Nach einer DEHP-Exposition konnten wir eine Erhöhung der FcS in der Leber beobachten (5 mg und 500 mg DEHP). Gleichzeitig war die AOX, als wichtiges Enzym der beta-Oxidation, nicht durch die DEHP-Exposition in ihrer Expression verändert. Dies ist ein erster Anhaltspunkt dafür, dass durch DEHP in der Leber die Fettsäuresynthese beeinflusst werden kann und es zu einer Lipidanreicherung kommt. Um diesen ersten Hinweis näher aufzuklären müssen weiterführend Transkriptionsfaktoren wie dem *Sterol regulatory element binding protein 1c* und Fettsäure-Transporter wie FATPs und CD36 der Leber unter DEHP-Einfluss untersucht werden. Dies könnte man durch Signalweg-spezifische Analysen in *in vitro*-Expositionsversuchen an Leberzelllinien machen. Im Weiteren wollten wir klären, ob durch die DEHP-Exposition eine mögliche Aktivierung der PPARs stattgefunden hat und diese für Veränderungen in der Leber DEHP-exponierter Mäuse mit verantwortlich sein können.

DEHP und die PPARs

MEHP als Hauptmetabolit von DEHP agiert als Modulator der PPARs (Lapinskas et al. 2005; Feige et al. 2010). Dies weist auf einen möglichen Wirkmechanismus hin. Feige et al. (2010) zeigten, dass DEHP-exponierte Mäuse mit einem hepatischen humanisierten PPARalpha (hPPARalpha-Mäuse) signifikant mehr viszerales Fettgewebe und höhere Körpergewichte hatten und eine diätinduzierte Adipositas zeigten. Der Wildtyp (Stamm: C57/Bl6) hingegen reagierte auf eine DEHP-Exposition mit erhöhter hepatischer Peroxisomenproliferation und zeigte keine Zunahme an viszeralem Fett und Körpergewicht durch die verabreichte hochkalorische Diät. Dies zeigt, dass PPARalpha-vermittelte DEHP-Effekte im Metabolismus sich von Spezies zu Spezies unterscheiden können.

In unserer Studie konnten wir über alle eingesetzten DEHP-Konzentrationen (0,05 mg - 500 mg) eine Zunahme an viszeraler Fettmenge, Körpergewicht und Futteraufnahme

beobachten. Eine Änderung der PPARalpha- und PPARgamma-Expression in Fett und Leber konnten wir ausschließlich in der höchsten DEHP-Konzentrationsgruppen verzeichnen. Diese Beobachtungen zeigen, dass es im Hinblick auf eine metabolische Antwort auf oral zugeführtes DEHP stammesspezifische Unterschiede zwischen C57/Bl6-Weibchen (Feige et al. 2010) und C3H/N-Weibchen gibt. Da die C3H/N-Mäuse ähnlich dem humanisierten Modell reagieren, kann man postulieren, dass der von uns untersuchte Stamm für metabolische Untersuchungen im Hinblick auf den Menschen besser geeignet ist.

Im Gegensatz zu den adipogenen DEHP-Effekten im Mausstamm C3H/N haben andere Reproduktionsforschergruppen eine Verringerung des Körpergewichts bei Mäusen beobachten können (Kluwe et al. 1982; Marsman 1995). Unterschiede innerhalb der Mausstämme begründet durch Genmutationen, unterschiedliche Enzymaktivierungen und Koaktivatorrekrutierungen können dafür eine Erklärung sein (Feige et al. 2010).

In unserer Studie untersuchten wir im Weiteren die Expression des PPARgamma im Fettgewebe. Durch *in vitro*-Versuche an einer murinen embryonalen Fibroblasten-Zelllinie (3T3L1) (Feige et al. 2007; Hao et al. 2012) konnte aufgeklärt werden, dass MEHP ein selektiver PPARgamma-Modulator ist und über PPARgamma-Aktivierung und seine Expressionssteigerung die Adipozytendifferenzierung stimuliert. Auch in der humanen SW 872-Prädipozyten-Zelllinie (Campioli et al. 2011) und in humanen subkutanen Adipozyten (Ellero-Simatos et al. 2011) wurde *in vitro* eine verstärkte Adipozytendifferenzierung durch MEHP und PPARgamma-Aktivierung beobachtet.

In unserer Studie führte die DEHP-Exposition zu keiner Erhöhung der PPARgamma-Expression im Fettgewebe der C3H/N-Mäuse. So änderte die DEHP-Exposition nicht direkt die PPARgamma-Expression und weitere Untersuchungen sind zur Aufklärung des beobachteten adipogenen Effekts bei unseren C3H/N-Mäusen nötig.

Ellero-Simatos et al. (2011) haben zeigen können, dass MEHP in Adipozyten *in vitro* neben PPARgamma zudem Gene des Lipidmetabolismus, der Fettsäurebiosynthese, der Fettsäurebindung und der Glyceroneogenese im subkutanen Adipozyten-Modell hochreguliert. Biemann et al. (2012) konnten zeigen, dass eine DEHP-Exposition muriner mesenchymaler Stammzellen (C3H/10T1/2) zu einer Genexpressionssteigerung von FABP4, einem spezifischen Transportprotein für Fettsäuren in Adipozyten, führt. Darüber hinaus kam es unter DEHP-Einfluss (100µM) zu einer Förderung der Adipogenese während der weiteren Differenzierung.

In unserer Studie waren nach der DEHP-Exposition die Genexpression von FABP4 im Fettgewebe erhöht und die Adipozyten hypertroph. Die C3H/10T1/2-Zelllinie (Biemann et al

2012) ist ursprünglich aus C3H/N-Mäusen generiert worden. Biemann et al. (2012) konnten auch *in vitro* eine gesteigert FABP4-Expression zeigen. Dies stimmt schlüssig mit unseren beobachteten adipogenen DEHP-Effekten *in vivo* überein. Tierstudien an Mäusen konnten zeigen, dass ein FABP4-knockout vor einer diätinduzierten Adipositas schützt und die Lipolyse im Fettgewebe verringert (Hotamisligil et al. 1996). Erhöhte FABP4-Plasmawerte konnten in Humanstudien mit Adipositas und dem Metabolischen Syndrom in Verbindung gebracht werden (Queipo-Ortuño et al. 2012; Terra et al. 2011; Xu et al. 2006). Darüber hinaus wird in aktuellen Studien untersucht, ob FABP4 als weiteres, neues Adipokin einzuordnen ist (Rhee et al. 2012, Solini et al. 2013).

Die von uns erhobenen Daten (erhöhte FABP4-Expression, erhöhte viszerale Fettmenge und hypertrophe Adipozyten) zeigen, dass im C3H/N-Mausmodell mit der Nahrung aufgenommenes DEHP adipogen wirken.

Feige et al. (2007) haben in murinen 3T3L1-Zellen nachweisen können, dass MEHP u.a. den PPAR-Koaktivator Med1 aktiviert. Nach Ligandenbindung rekrutiert das PPAR/RXR-Heterodimer verschiedene Koaktivatoren im Bereich der PPRE der Zielgene. Med1 als Untereinheit des Mediatorkomplexes assistiert dem PPAR/RXR-Heterodimer bei der Einleitung der Transkription durch direkte Bindung an die RNA Polymerase II (Chen et al. 1995; Tetel et al. 2005). In unserer Studie war nach DEHP-Exposition die hepatische Med1-Expression erhöht (0,05 mg und 5 mg). In der Leber führte, wie bereits erwähnt, die DEHP-Exposition erst in der höchsten DEHP-Behandlungsgruppe zu einer Erhöhung der Expression von PPARalpha und PPARgamma (500 mg).

Im Fettgewebe kam es zu keiner Änderung der PPARgamma-Expression. PPARalpha war im Fettgewebe erst in der höchsten Gruppe verändert. So kann man zusammenfassen, dass im C3H/N-Modell die Expressionsänderung der PPARs im Gegensatz zu *in vitro*-Studien (s.o.) moderat und erst bei sehr hohen DEHP-Konzentrationen auftritt. Somit vermuten wir, dass der adipogene DEHP-Effekt in unserer Studie nicht hauptsächlich über PPAR-gekoppelte Signalwege vermittelt wird. Eine ähnliche Beobachtung konnten Feige et al. (2010) machen. Sie postulieren in ihrer Studie, dass eine gesteigerte Gewichtszunahme humanisierter PPARalpha-Mäuse nicht über PPARgamma-Aktivierung und eine damit verbundene erhöhte Adipogenese ausgelöst wird. Sie sehen eine mögliche Ursache in einem durch DEHP veränderten Metabolismus der Leber.

Aufgrund dieser Datenlage sind zusätzliche Studien zur Klärung der Ätiologie nötig. So gilt es zum einen die Unterschiede der adipogenen DEHP- und MEHP-Effekte zwischen *in vivo* und

in vitro-Modellen aufzuklären. Zum anderen gilt es zu erkennen, ob die von uns beobachteten Effekte von DEHP eine Folge der erhöhten Futterraufnahme oder eine Folge metabolischer Effekte unabhängig von der Futterzufuhr sind. Dazu könnte man im Fortlauf generationsübergreifende *Pair feeding*-Studien durchführen in denen eine zusätzliche Versuchsgruppe ohne DEHP jedoch mit gleicher Kalorienzufuhr durch Futterrestriktion mitgeführt wird.

4.3.1. Eine DEHP-Exposition bewirkt eine Änderung der Expression und Konzentration der Adipokine Leptin und Adiponektin in weiblichen C3H/N Mäusen

Leptin ist ein bedeutendes Adipokin und wird unter anderem vom Fettgewebe sezerniert und in die Blutbahn abgegeben. Die Menge an Leptin im Plasma ist ein Indikator für die Menge an Fett im Körper (Frederich et al. 1995). Wir konnten in unserer Studie einen signifikanten Anstieg an zirkulierendem Leptin im Plasma und einen Anstieg der Leptin-Expression im viszeralen Fettgewebe messen. Die beobachtete Zunahme an viszeralem Fett stimmt mit der Zunahme der Leptinkonzentration im Plasma und der gesteigerten Leptinexpression in unserer Studie gut überein. Dies ist ein weiterer Beweis für die adipogene Wirkung von DEHP in unseren Versuchen.

Erhöhte Leptinkonzentrationen im Plasma bewirken, vermittelt durch hypothalamische Signale, eine Reduktion der Nahrungsaufnahme, einen erhöhten Energieverbrauch und somit eine Normalisierung des Körpergewichts (Campfield et al. 1995; Cusin et al. 1996). Leptin bindet im Hypothalamus an den Leptinrezeptor und es kommt unter anderem zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges. Dadurch werden appetitanregende Neuropeptide vermindert und appetithemmende Neuropeptide vermehrt ausgeschüttet. Dies bewirkt eine verminderte Nahrungsaufnahme und eine erhöhte Energiebereitstellung peripherer Organe (Fettgewebe, Muskel, Leber) und somit eine Normalisierung des Körpergewichts (Morris&Rui 2009). Es ist bekannt, dass erhöhte Leptinkonzentrationen im Plasma und eine gesteigerte Leptinexpression im Fettgewebe positiv mit Adipositas korrelieren (Hamilton et al. 1995; Zhang et al.1994). Obwohl wir in unseren Versuchen die Leptinkonzentration erst am Ende der 8-wöchigen Expositionsdauer gemessen haben, konnten wir im Versuchsverlauf keinen Einfluss von Leptin weder auf die Reduktion der Nahrungsaufnahme noch auf das Körpergewicht feststellen. Dies deutet auf eine mögliche Leptinresistenz durch die stattgefundenene DEHP-Exposition hin. Eine Leptinresistenz kann verschiedene Ursachen haben. Eine ist ein gestörter Leptintransport über die Blut-Hirn-Schranke (Caro et al. 1996).

Eine kurze Isoform des Leptinrezeptors vermittelt im Gehirn den aktiven Transport von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke. Banks et al. (2004) konnten zeigen, dass Triglyzeride an der Blut-Hirn-Schranke den Transport von Leptin behindern. Dieser erste Hinweis lässt uns vermuten, dass DEHP diesen Transport möglicherweise beeinträchtigt und es somit zu keiner normalen Leptin-bedingten Regulation des Körpergewichts und der Nahrungsaufnahme in unserer Studie kommen konnte. Um die Hypothese einer DEHP-bedingten Leptinresistenz zu belegen, müssen weiterführende Untersuchungen vorgenommen werden. So könnte eine zentrale Leptin-Gabe Aufschluss darüber geben, ob der Transport von Leptin in das Gehirn durch DEHP gestört ist, oder ob es weiterführend in der JAK/STAT-Signaltransduktion zu Störungen durch DEHP im Hypothalamus kommt. Der LeptinR1 vermittelt im Hypothalamus die Leptinwirkung. Änderungen in der Expression des LeptinR1 konnten im Gehirn in unserer Studie nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Neben Leptin wurde von uns die Expression von Adiponektin untersucht. Eine DEHP-Exposition führte zu einer Abnahme der Expression von Adiponektin im Fettgewebe (0,05 mg, 5 mg und 500 mg). Mit diesem Ergebnis stimmt die mit beobachtete Hypertrophie der Fettzellen gut überein, die mit den erhöhten Leptinkonzentrationen und erniedrigten Adiponektinkonzentrationen korreliert. Adiponektin, welches voranging von Adipozyten exprimiert wird, erhöht die Glukoseutilisation und Fettsäureoxidation in Muskelzellen und verstärkt die Insulinsensibilität in der Leber (Kadowaki et al. 2006). Niedrige Adiponektin-Plasmaspiegel werden mit einem erhöhten Risiko für das Metabolische Syndrom und Insulinresistenz assoziiert (Trujill&Scherer 2005).

4.3.3. Adipogene Effekte von DEHP konnten auch in den maternal exponierten F1-Nachkommen festgestellt werden

DEHP und seine Metabolite können die Plazentaschranke überqueren und den Fetus erreichen (Adibi et al. 2008; Wittassek et al. 2009). Phthalate gehen in die Muttermilch über und gelangen so zu den Nachkommen (Dostal et al. 1987).

Um DEHP-Effekte auf die Nachkommenschaft zu untersuchen, haben wir Jungtiere exponierter Mütter untersucht. Diese F1-Generation wurde zum einen über die Plazenta während der Schwangerschaft und zum anderen über die Muttermilch während der Laktation mit DEHP exponiert. Ein erhöhtes Körpergewicht direkt nach dem Absetzen (PNT 21) konnte bei weiblichen und männlichen Nachkommen beobachtet werden (0,05 mg und 5 mg). Auch im jungen Erwachsenenalter (PNT 84) war das Körpergewicht der F1-

Nachkommen in beiden Geschlechtern erhöht. Des Weiteren kam es zu einer Zunahme an viszeraler Fettmenge bei beiden Geschlechtern und zu einer Hypertrophie der Fettzellen (Weibchen) durch DEHP. Diese Effekte traten in allen eingesetzten DEHP-Konzentrationen (0,05 mg und 5 mg) auf. Sie sind eine wichtige unabhängige Bestätigung der DEHP-Effekte der Studie I. Wir gehen davon aus, dass DEHP über die Muttermilch gleiche Effekte hat wie über das Futter zugeführtes DEHP. Da das Körpergewicht der F1-Generation auch noch im jungen Erwachsenenalter erhöht ist, lässt dies die Vermutung zu, dass eine maternale DEHP-Exposition während der Embryonalentwicklung eine langfristige Beeinträchtigung der Regulation des Energiestoffwechsels zur Folge hat.

Das embryonale Entwicklungsstadium während der Präimplantationsphase gilt im Allgemeinen als sehr empfindlich gegenüber der Einwirkung der Umwelt. In dieser Phase kommt es entwicklungsbedingt zu genomweiten Reprogrammierungen. Epidemiologische Studien berichten über Zusammenhänge von Umwelteinflüssen und dem späteren Auftreten von Krankheiten im Erwachsenenalter (Jirtl&Skinner 2007; Szyf 2007). Erklärungen für diese Prädisposition können epigenetischen Veränderungen sein. Als epigenetische Modifikationen bezeichnet man vererbbare Änderungen der Genomfunktion, die ohne Änderung der DNA-Sequenz auftreten. Der Organismus wird dadurch lebenslang geprägt, da u.a. Genexpressionsmuster langfristig verändert werden können (Skinner et al. 2010). Da in der vorliegenden Arbeit DNA-Methylierung, nichtkodierende RNA-Moleküle und Histonmodifikationen (Szyf 2007) nicht untersucht wurden, können epigenetische auf die gesteigerte Adipogenese durch DEHP nur vermutet werden.

4.4. Wirkung von DEHP auf die maternale Reproduktion und die Präimplantationsembryonen

Weltweit wurden im Jahr 2010 mehr als 48 Millionen Paare ungewollt nicht schwanger (Mascarenhas et al. 2012). Im Durchschnitt liegt die Unfruchtbarkeitsrate in Europa bei 16 % (Juil et al. 1999). Bei der Aufklärung der zugrundeliegenden Ursachen sind Alkoholkonsum, Zigarettenrauch, ein erhöhtes Schwangerschaftseintrittsalter und Adipositas häufig diskutierte mögliche Auslöser für diese hohe Rate der Unfruchtbarkeit.

Weitestgehend unbekannt sind die Ursachen der schlechten Fertilität adipöser Frauen. Zytokine, Adipokine und Hormone gelten als Vermittler einer Adipositas-assoziierten Infertilität (Brewer&Bahlen 2010). So sind Leptin-defiziente Mäuse infertil. Verabreicht man

ihnen rekombinantes Leptin, führt dies zu einer Wiederherstellung der Fertilität (Chehab 1996). Leptin kann *in vitro* die ovarielle Steroidsynthese beeinflussen. In Ratten können hohe Leptinspiegel die Follikelentwicklung, die Oozytenreifung und die Ovulation hemmen (Duggal et al. 2000).

Auch Umweltgifte, wie Schwermetalle und Pestizide, werden als Verursacher mitverantwortlich gemacht. Studien an männlichen Ratten konnten belegen, dass Phthalate reproduktionstoxisch wirken. Phthalate führten bei Ratten zu einer geringeren Nachkommenanzahl, zu einer niedrigeren Spermienzahl und einer geringeren Spermienmotilität (Agarwal et al. 1985; Tyl et al. 1988). Während reproduktionstoxische Effekte der Phthalate bei männlichen Individuen gut untersucht sind, ist der Phthalat-Einfluss auf die Reproduktion der Frau erst ungenügend erforscht.

Lamb et al. (1987) zeigten, dass oral zugeführtes DEHP die Zahl der Nachkommen reduziert und das Überleben der Jungtiere herabsetzt. Grande et al. (2006) berichteten, dass *in utero* und über die Muttermilch zugeführtes DEHP (135 und 405 mg/kg/Tag) den Beginn der Pubertät bei den weiblichen Nachkommen verspätet. Die Studie von Takai et al. (2009) zeigte, dass weibliche Ratten durch hohe DEHP-Konzentrationen (3000 mg/kg/Tag) unregelmäßige Zyklen hatten und ein leichter Rückgang der Schwangerschaften zu verzeichnen war. Diesen drei Studien gemein ist der negative Effekt einer hohen Phthalat-Exposition auf Fertilität und Nachkommenschaft. In der Vielzahl der Studien sind die Phthalat-Konzentrationen nicht umweltrelevant. Im Hinblick auf die Phthalat-Exposition über die gesamte Lebensspanne und deren langfristigen Effekte ist es angebracht, in Tiermodellen und in *in vitro*-Versuchen vermehrt im Niedrig-Konzentrationsbereich Untersuchungen durchzuführen.

4.4.1. Eine direkte DEHP-Exposition bewirkt eine Abortrate von 100 % in der 500 mg-Konzentrationsgruppe

Die Tiere unserer Studie II sollten unter DEHP-Exposition ihren Nachwuchs austragen. In der höchsten Konzentrationsgruppe (500 mg) bewirkte DEHP eine Abortrate von 100 %. Die Aborte wurden durch blutige Rückstände im Käfig und starken Gewichtsverlust der Tiere von bis zu 8 g innerhalb von 24 h beobachtet. Die Aborte fanden im 2. und 3. Trimester statt. Bei den schwangeren Tieren der 0,05 mg und 5 mg DEHP-Gruppe beobachteten wir keine Aborte. Diese hohe Schwangerschaftsabbruchrate durch DEHP (500 mg) konnte innerhalb des EU-Projektes „REEF“ auch Pocar et al. (2012a) an CD-1- Mäusen zeigen. Durch eine

Autopsie der schwangeren Mäuse konnten sie feststellen, dass am Tag 10,5 und 11,5 die Resorption der Embryonen begann und an Tag 15,5 der Schwangerschaft nur noch blutige Rückstände im Uterus zu finden waren.

In unserer Studie konnte die Wurfgröße bestimmt werden. Durch eine DEHP-Exposition kam es zu keiner Änderung der Wurfgröße. In einer Studie an Ratten konnten Gray et al. (2006) reproduktionstoxische Effekte von Phthalaten erst ab einer Gabe von 500 mg und 1000 mg (erhöhte Abortrate, Minderung der Wurfgröße und Erhöhung der Anzahl von Totgeburten) zeigen. Bei einer Konzentration von 250 mg waren diese Effekte noch nicht zu beobachten. Dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein. In der 500 mg-Gruppe kam es zu einer 100%igen Abortrate.

Das Überleben der geborenen Jungtiere war in unserer Studie durch DEHP nicht beeinträchtigt. Das Verhältnis zwischen weiblichen und männlichen Nachkommen war in allen Behandlungsgruppen gleich.

4.4.2. Effekte einer DEHP-Exposition auf die Anzahl und Morphologie von Präimplantationsembryonen

In der Studie I+II haben wir die Zahl der Blastozysten am Tag 3,5 *p.c.* pro Muttertier analysiert. Die Anzahl der F1+F2-Embryonen je Mutter war nach DEHP nicht verändert. F1-Embryonen waren direkt mit DEHP über die Mutter exponiert. Die F2-Embryonen stammen von *in utero*-exponierten F1-Weibchen und waren mit DEHP nur im Stadium der Urkeimzellen in Kontakt gekommen.

Bei den direkt exponierten F1-Embryonen konnten wir feststellen, dass 32 % der Embryonen durch DEHP (500 mg) morphologisch degeneriert waren (Kontrollgruppe: 14 %; $p=0,0584$). Auch bei den F2-Embryonen traten degenerierte Embryonen auf. Diese Beobachtung konnte jedoch statistisch nicht signifikant abgesichert werden ($p=0,1299$).

Die beobachtete Degeneration der direkt exponierten Embryonen steht im logischen Zusammenhang mit der beobachteten Abortrate; Degenerationen und die Aborte traten nur in der höchsten DEHP-Konzentration auf. In diesen Fällen erfolgte die DEHP-Exposition direkt über die Mutter. Dies lässt vermuten, dass bereits die Blastozysten durch hohe Konzentrationen mütterlichen DEHP soweit geschädigt wurden, dass es im weiteren Schwangerschaftsverlauf zu Entwicklungsbeeinträchtigungen kam, die mit dem Leben nicht mehr vereinbar sind und schließlich Schwangerschaftsabbrüche bedingten. Weiterführende Untersuchungen an exponierten Blastozyten könnten nähere Aufschlüsse über die

Embryonalentwicklung unter DEHP-Einfluss geben und durch DEHP veränderte Signalwege offenlegen.

Bereits bekannt ist, dass durch DEHP und MEHP im Kulturmedium die Entwicklung befruchteter Oozyten beeinträchtigt wird. DEHP und MEHP führt zu einer signifikant erniedrigten Blastozystenbildung (Huang et al. 2012) und zu einer erniedrigten Zellzahl in Blastozyten (Grossman et al. 2012). MEHP *in vitro* bewirkt zudem einen 2-Zellblock bei murinen Präimplantationsembryonen. Chu et al. (2012) konnten zeigen, dass ein 2-Zellarrest zustande kommt, indem MEHP die Genexpression von Hsc70, MuERV-L, Hsp 70 inhibiert. Die Aktivierung dieser Gene ist nötig für die embryonale Genomaktivierung und somit für die Initiation der Entwicklung zum 4-Zellembryo.

4.4.3. Eine DEHP-Exposition bewirkt in F2-Präimplantationsembryonen eine Veränderung der Expression des Leptin und des LeptinR1, jedoch nicht in F1-Präimplantationsembryonen

In der vorliegenden Arbeit sollte im Weiteren geklärt werden, ob eine maternale DEHP-Exposition über PPARs und Adipokine im Embryo entwicklungsrelevante Effekte hat.

DEHP und die PPARs

Die zentrale Rolle der PPARs im Energiestoffwechsel ist gut untersucht. Bekannt ist, dass der Energiestatus Auswirkungen auf die Reproduktion und Fruchtbarkeit haben kann. *In vivo*-Studien konnten bereits zeigen, dass PPARs wichtige Funktionen in der weiblichen Reproduktion besitzen (Froment et al. 2006; Yang et al. 2008). Die PPARs werden im Ovar (Komar et al. 2001), im Uterus (Berry et al. 2003) und im Embryo exprimiert (Huang et al. 2006). Barak et al. (1999) zeigten, dass ein PPARgamma-knockout bei Mäusen zu einer gestörten Vaskularisierung von Trophoblast und Plazenta führt und dieser Defekt für den Embryo letal ist. Ein PPARdelta-knockout bei Mäusen führt zu einer gestörten Plazentausbildung (Barak et al. 2002). Ein PPARalpha-knockout erhöht das Risiko eines Aborts und führt zu einem erhöhten Sterben der neugeborenen Nachkommen in der Maus (Yessoufou et al. 2006). Huang et al. (2006) konnten zeigen, dass neben dem maternalen PPARdelta im Uterus auch der embryonal exprimierte PPARdelta wichtige Prozesse während der Implantationsphase initiiert und reguliert. Über entwicklungsrelevante und metabolische Funktionen der PPARs im Embryo selbst und über mögliche Störungen durch exogene Faktoren gibt es erst wenige Studien.

In unseren Studien I+II wurde von uns die Expression von PPARgamma, PPARalpha und PPARdelta in den Embryonen nach DEHP-Exposition gemessen. PPARgamma und PPARdelta waren in ihrer Expression nicht verändert. Eine PPARalpha-Expression konnte von uns nicht nachgewiesen werden. PPARalpha wird in murinen Embryonen im Blastozystenstadium noch nicht exprimiert (Schmidt et al. 2010; Königsdorf et al. 2012). Somit können wir davon ausgehen, dass maternales DEHP unter den von uns gewählten Experimentalbedingungen keinen Effekt auf die Expression der PPARs im Embryo hat.

DEHP und die Adipokine

Leptin ist ein Modulator bei reproduktionsbiologischen Prozessen (Holness et al. 1999). Leptin und sein Rezeptor wurden in der Oozyte und im Präimplantationsembryo nachgewiesen (Cioffi et al. 1997; Antczak&Van Blerkom 1997). Eine Expression von LeptinR1 konnte von der Oozyte bis zur Blastozyste nachgewiesen werden, die Leptinexpression jedoch erst ab dem Blastozystenstadium, was vermuten lässt, dass in früheren Stadien mütterliches Leptin über den Rezeptor aufgenommen wird und für den Embryo zur Verfügung steht (Kawamura et al. 2003). Wie auch das Leptin werden Adiponektin und seine Rezeptoren im Ovar, Uterus (Richards et al. 2012) und während der Schwangerschaft in der Plazenta exprimiert (Chen et al. 2006). Adiponektin fördert *in vitro* die Oozytenreifung und die embryonale Entwicklung (Richards et al. 2012). Adiponektin und seine Rezeptoren können durch PPARs reguliert werden (Wong et al. 2004). Fischer et al. (2010) konnten zeigen, dass Adiponektin die Glukoseaufnahme von Kaninchenblastozysten *in vitro* fördert und somit den Glukosestoffwechsel beeinflussen kann.

In unserer Studie war die Expression von Leptin, LeptinR1, CTRP2 und AdipoR2 in F1-Embryonen durch eine direkte DEHP-Exposition der Mutter nicht verändert. In F2-Embryonen hingegen konnten wir eine Änderung der Expression von Leptin und dem LeptinR1 beobachten (0,05 mg und 5 mg DEHP). Die zirkulierende Leptin-Konzentration im Plasma korreliert positiv mit dem BMI. Arias-Alvarez et al. (2010) konnten zeigen, dass hohe Leptinkonzentrationen im Kulturmedium (100 ng/ml) die *in vitro*-Reifung von Oozyten verschlechtert und zu einer erniedrigten Zellzahl bei *in vitro*-kultivierten Embryonen führt. Dies lässt vermuten, dass erhöhte Leptinkonzentrationen der Mutter sich negativ auf die Entwicklung der Embryonen auswirken. Kawamura et al. (2003) beobachteten einen physiologischen Anstieg der Leptinkonzentration im Uterus zum Zeitpunkt der Implantation. Embryonen von Leptin-knockout Mäusen waren erst nach einer Leptin-Applikation in der Lage zu implantieren (Malik et al. 2001), was zeigt, dass in physiologischen Konzentrationen

Leptin essentiell für diesen Entwicklungsschritt ist. Im Embryo selbst fördert Leptin die Expression von Adhäsionsmolekülen und das Blastozystenwachstum (Cevero et al. 2004). F2-Embryonen unserer Studie zeigten eine erniedrigte Expression von Leptin und dem LeptinR1. Ausschließlich ihre Urkeimzellen hatten über den mütterlichen Kreislauf Kontakt mit DEHP. Eine maternale DEHP-Exposition bewirkt somit langanhaltend Störungen der Leptinexpression. *In vitro*-Studien an Embryonen von Maus (Chu et al. 2012), Ratte (Robinson et al. 2012), Rind (Grossman et al. 2012) und humanen Stammzellen (Shi et al. 2013) belegen die Embryotoxizität von MEHP, dem Hauptmetabolit von DEHP.

Unsere *in vivo*-Daten lassen eine erste Vermutung zu, dass der direkt über die Mutter exponierte F1-Embryo bis zum Blastozystenstadium vor DEHP und seinen Metaboliten, die bestimmte Konzentrationen nicht überschreiten, durch maternale oder embryonale Mechanismen geschützt zu sein scheint. DEHP erreicht erst in späteren Stadien nach der Implantation den Fetus über das mütterliche Blut und kann dann nachhaltig den Organismus, die Entwicklung nachhaltig negativ beeinflussen.

Für die grundlegende Aufklärung dieser generationsübergreifenden Störungen und Effekte durch DEHP müssen Transgenerationsstudien bis zur F3-Generation durchgeführt und Untersuchungen zu DEHP-bedingten epigenetischen Modifikationen gemacht werden. Erst die F3-Generation der exponierten F0-Generation ist die erste Generation, die epigenetische transgenerationale Vererbung von Krankheitsbildern zeigen kann (Skinner et al. 2008). Einige Studien konnten bereits epigenetische Effekte von Phthalaten belegen. Bekannt ist, dass DEHP die Demethylierung in der Promotor-Region des Östrogenrezeptor alpha erhöht (Kang&Lee 2005). Maternal zugeführtes DEHP verursacht im fetalen Testis in der Maus Erhöhungen der DNA-Methylierung und Änderungen der DNA-Methyltransferase-Expression (Wu et al. 2010).

4.5. Effekte von PCB und DEHP/PCB auf allgemeine Gesundheits- und Adipositasparameter

4.5.1. Eine DEHP/PCB-Exposition hat adipogene Effekte in C3H/N-Weibchen, eine alleinige PCB-Exposition wirkt nicht adipogen

PCB-Exposition

Neben den diskutierten Phthalaten sind PCB eine weitere Gruppe endokrin wirksamer Disruptoren. Sie sind vor allem bekannt für ihre reproduktionstoxische Wirkung nach *in*

utero- und pränataler Exposition. Wenige Studien jedoch existieren darüber, ob PCB mit einer anabolen Stoffwechsellage in Verbindung gebracht werden können. Arsenescu et al. (2008) haben den Einfluss vom planaren PCB 153 und vom koplanaren PCB 77 auf die Adipogenese untersucht. Sie zeigten, dass niedrige Konzentrationen von PCB 77 (3,4 µM) die Adipogenese in 3T3-L1-Zellen fördern und die Expression von PPARgamma im Fett signifikant erhöhen. In hohen Konzentrationen (68 µM) kam es zu keiner Änderung der benannten Parameter. *In vivo* hatten sie erhöhte Körpergewichte und Fettgewebismengen nach mehreren *i.p.* Injektionen (Zeitraum: 6 Wochen) mit dem PCB 77 (49 mg/kg) bei C57/Bl6-Mäusen festgestellt. Keinen Einfluss auf die Adipogenese und das Körpergewicht *in vivo* hatte jedoch das planare PCB 153.

In unserer Studie I gab es keine Änderung der Körpergewichtsentwicklung, der Futterraufnahme, der Fettgewebismenge und der Lebergewichte und hepatischen Expression (PPARs) nach einer PCB-Exposition. Auch in unserer Studie II kam es zu keiner Beeinflussung der Adipositasparameter in der maternal exponierten F1-Generation. Expressionsmessungen der Adipokine Leptin und Adiponektin im Fettgewebe ergaben keine Änderung durch die PCB-Exposition.

Die PPARgamma-Expression im Fettgewebe war nach PCB-Exposition (1 µg, 10 µg und 100 µg) erniedrigt (ohne Änderungen der Fettgewebismasse). Dies steht im Gegensatz zu den *in vitro* Daten von Arsenescu et al. (2008), die eine gesteigerte Adipogenese unter PPARgamma-Aktivierung bei PCB 77 zeigten. Dies lässt vermuten, dass es zu einem kongenerenabhängigen Effekt gibt und zum anderen unterschiedliche Konzentrationen und Expositionszeiträume der *in vitro*- und *in vivo*-Studien ein einfaches Vergleichen der Ergebnisse nicht zulassen.

Bekannt ist, dass PCB sich langfristig im Fettgewebe einlagern und in die Muttermilch übergehen. PCB sind plazentagängig, erreichen somit den Embryo und Fetus (Safe et al. 1990; Guvenius et al. 2003) und tragen so dazu bei, dass die Nachkommen auch mit PCB belastet werden.

Kombinierte PCB/DEHP-Exposition

Um zu untersuchen, ob ein Gemisch aus den beiden ED (DEHP+PCB(101+118)) synergistische, agonistische oder antagonistische Effekte hat wurde ein weiterer Fütterungsversuch mit PCB und DEHP in Kombination durchgeführt. Die Futterraufnahme, das Körpergewicht (0,05 mg und 5 mg), die viszerale Fettmenge und auch Leptin- und

FABP4-Expression im Fett waren erhöht. Somit hatte auch die Kombination aus DEHP und PCB adipogene Effekte.

Einen Anstieg der PPARalpha- und PPARgamma-Expression war in der Leber direkt exponierter Mäuse zu beobachten. PPARgamma war im Unterschied zur alleinigen DEHP-Exposition in allen Behandlungsgruppen signifikant erhöht. Die PPARalpha-Expression war, wie auch im DEHP-Einzelversuch, nur in der höchsten Behandlungsgruppe erhöht. Eine Erhöhung der Expression des MED1 war wie im DEHP-Einzelversuch auch zu beobachten, im Kombinationsversuch jedoch zusätzlich auch in der höchsten Behandlungsgruppe. Die PPAR-Expression im Fett war nach der Exposition von DEHP und PCB nicht verändert. Im Gegensatz dazu kam es im PCB-Versuch zu einer Erhöhung der PPARgamma-Expression in allen Gruppen. Im DEHP-Versuch waren Expressionsänderungen ausschließlich auf die höchste Behandlungsgruppe beschränkt. Im Fettgewebe kam es wie im DEHP-Einzelversuch zu keiner Expressionsänderung der AOX. Die Beobachtung, dass im Kombinationsversuch in allen Behandlungsgruppen im Gegensatz zum DEHP-Versuch eine Erhöhung der AOX in der Leber erhöht war, ist ein interessanter Aspekt der organspezifischen Wirkung von Substanzgemischen, welcher jedoch durch weitere Untersuchungen molekularer Marker noch zu aufklären ist.

Da es in den PCB-Fütterungsstudien zu keinem Anstieg adipogener Parameter kam, kann man feststellen, dass trotz der erwähnten veränderten Effekte (AOX in der Leber, PPARs im Fett) im Kombinationsversuch der DEHP-Effekt wiederholt beobachtet werden konnte und durch die zusätzliche PCB-Exposition der adipogene Effekt weder geschwächt noch verstärkt oder verändert wurde.

4.5.2. Dosis-Wirkungsbeziehungen

Bei den überwiegenden Endpunkten der Kombinations-Versuche kam es zu keiner monotonen Dosis-Wirkungsbeziehung. In den Fütterungsstudien mit den Einzelsubstanzen DEHP oder PCB war dies auch zu sehen. Hier kam es mit der niedrigsten Konzentration schon zum überschreiten eines Schwellenwerts und somit zu gleichbleibend signifikanten Effekten in allen Konzentrationsgruppen (Endpunkte: DEHP-Studie I: Futteraufnahme, Körpergewicht). In toxikologischen Studien zur Dosis-Wirkungsbeziehung endokrin wirksamer Chemikalien ist man in den letzten Jahren von dem Dogma: „Die Dosis macht das Gift“ abgekommen. Vielmehr wirken viele ED in sehr niedrigen Konzentrationen und folgen keiner linearen Dosis-Wirkungsbeziehung (Vandenberg et al. 2012). Wissenschaftler des

National Toxicology Program (NTP) der U.S. Environmental Protection Agency (EPA) befassen sich seit Jahren ausführlich mit der Frage welche Konzentrationen von ED wirklich als sicher gelten und in wieweit man diese Erkenntnisse in die Politik transferieren kann. In den vorliegenden DEHP und/oder PCB-Versuchen kam es ebenfalls zu nicht monotonen Dosis-Wirkungsbeziehungen und zu Wirkungen im Bereich umweltrelevanter Konzentrationen - ein weiterer Beweis für das Wirken der ED im Niedrig-Konzentrationsbereich.

4.5. Wirkung von PCB und DEHP/PCB auf die maternale Reproduktion und die Präimplantationsembryonen

4.5.1. Effekte einer PCB- und DEHP/PCB-Exposition auf die Anzahl und Morphologie von Präimplantationsembryonen und die Wurfgröße

PCB sind plazentagängig und akkumulieren in der Muttermilch (Safe et al. 1990). Studien von Rhind et al. (2009&2010) an Schafen zeigten, dass bei Tieren, die auf Klärschlamm gedüngten Flächen grasten, die beiden PCB-Kongeneren 101+118 relativ zur Mutter stärker im fetalem Gewebe akkumulieren und gerade deswegen ihre Wirkungen während der Fetalentwicklung wichtig sind. Eine Exposition mit PCB 101+118 während empfindlicher Stadien der Embryonalentwicklung kann nachhaltig zu reproduktionstoxischen Effekten bei beiden Geschlechtern führen (Pocar et al. 2012b). Eine maternale PCB-Exposition führte in der F2-Generation der Studie zu kleineren Wurfgrößen. Die Wurfgröße der F1-Generation war hingegen noch nicht verändert.

PCB-Exposition

In Übereinstimmung mit Pocar et al. (2012b) wurde in unserer Studie nach direkter PCB-Exposition keine geringere Wurfgröße in der F1-Generation beobachtet. Die Anzahl der Embryonen je Mutter wurde in unserer Studie durch PCB nicht verändert. Übereinstimmend mit diesen Daten konnten auch Humanstudien keinen Zusammenhang zwischen einer direkten PCB-Belastung und einer erhöhten Rate spontaner Aborte finden (Small et al. 2007). Gennings et al. (2013) beobachteten, dass Frauen, deren Mütter eine starke PCB-Belastung aufwiesen, es schwerer hatten schwanger zu werden. Zusammen mit unseren Daten kann man vermuten, dass der Einfluss der PCB während kritischer Zeitfenster der Embryonalentwicklung nachhaltig und langfristig zu Störungen führt, welche sich bis in das

Erwachsenenalter fortsetzen und sich erst in nachfolgenden Generationen manifestieren können.

Kombinierte DEHP/PCB-Exposition

In unserer Studie untersuchten wir, ob die Kombination aus PCB und DEHP mögliche synergistische, agonistische oder antagonistische Effekte auf reproduktive Parameter hat.

Die Kombination aus DEHP und PCB führte zu keiner Änderung der Wurfgröße und zu keiner Beeinträchtigung der Anzahl der Embryonen je Mutter. In der höchsten Konzentrationsgruppe (500 mg+100 µg) war eine Abortrate von 100 % zu beobachten. Dies trat bereits im Einzelversuch mit DEHP in gleicher Weise auf. Somit ist zu schlussfolgern, dass eine Kombination dieser beiden ED in den ausgewählten Konzentrationen keinen synergistischen oder antagonistischen Effekt hat.

Die Kombination von DEHP und PCB verursachte eine tendenziell erhöhte Degeneration von F1-Embryonen und F2-Embryonen bereits in umweltrelevanten Konzentrationen (0,05 mg DEHP). Dieser Effekt ist in dem DEHP-Einzelversuch im selben Ausmaß, jedoch nicht im PCB-Einzelversuch aufgetreten. Da dies statistisch zu keinen signifikanten Änderungen führte, wäre es in Folgeversuchen sinnvoll zu untersuchen, ob die Blastozystenentwicklung beeinträchtigt wird. Solche *in vitro*-Kulturversuche eignen sich gut, um im Detail embryoschädigende Wirkungen von Umweltkontaminanten näher zu charakterisieren.

4.5.2. Eine PCB-Exposition und eine PCB/DEHP-Exposition verändert die Expression von Adipokinen und PPARs in Präimplantationsembryonen auf unterschiedliche Weise

PCB-Exposition

PCB sind in der Lage, die Blastozyste zu erreichen (Seiler et al. 1994). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass das PCB-Gemisch Aroclor 1260 (5 µg/ml) schon im Morula-Stadium embryotoxisch wirkt (Lindenau und Fischer 1993).

In unserer Studie wurde die Expression der Adipokine nach PCB-Exposition untersucht. Die Leptin-Expression war nach direkter maternaler PCB-Exposition in den F1-Embryonen erniedrigt (10 µg und 100 µg). In F2-Embryonen war die Expressionsverringering des Leptin tendenziell zu beobachten zusätzlich kam es zu einer Erhöhung der LepR1-Expression (100 µg). Die Expressionssteigerung des Rezeptors könnte eine mögliche Reaktion der

Blastozyste darstellen, um den endogenen Mangel an Leptin zu kompensieren und vermehrt mütterliches Leptin zu nutzen. Seiler et al. (1994) konnten beobachten, dass eine 12-wöchige PCB-Exposition (Aroclor 1260: 4 mg/Kg KG/Tag) der Mutter zum signifikanten Abfall der Überlebensfähigkeit von Blastozysten um 20 % führt. Pocar et al. (2012b) konnte zeigen, dass sich die Wurfgröße um ein Jungtier nach maternalen Exposition der PCB-Kongenere 101+118 (1 µg, 10 µg, 100 µg/kg KG/Tag) in der F2- und F3-Generation verringert.

Da nach PCB-Exposition zwar weniger, aber lebensfähige F2-Nachkommen erzeugt wurden, ist dieser Effekt durch die PCB-Kongenere 101+118 nicht zu 100 % letal. Das Gemisch der Kongenere 101+118 allein führt nicht zu einer toxischen Wirkung auf den Embryo. Die von Seiler et al. (1994) und Lindenau und Fischer et al. (1996) beobachtete Embryotoxizität *in vitro* und *in vivo* lassen sich nur so erklären, dass erst ein Gemisch mehrerer Kongenere und höhere PCB-Konzentrationen nötig sind, um diesen Effekt so klar sichtbar zu machen.

Darüber hinaus ist es notwendig, Analysen zu epigenetischen Veränderungen durchzuführen, da man aufgrund der sichtbaren Effekte in der F2-Generation einen möglichen Einfluss der PCB101+118 auf das Epigenom vermuten muss. Unser gewählter Versuchsaufbau eignet sich dafür gut. Untersuchungen am adulten Tier und an der Blastozyste sind im gleichen Versuch möglich. Man müsste den Versuchsaufbau dahingehend modifizieren, dass für das Studieren epigenetischer Effekte auch die F3-Generation mit in die Untersuchungen einbezogen werden sollten. Es gilt zum einem mögliche DNA-Methylierungsmuster und/oder Histonmodifikationen zu erkennen und im Weiteren ihre Vererbung zu zeigen. Für einen ersten Anhaltspunkt könnte man Unterschiede des Gesamtmethylierungsstatus der Embryonen bestimmen und im Weiteren könnte man Promotoranalysen und Expressionsanalysen methylierungsspezifischer Marker (DNA-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen) durchführen.

Bekannt ist, dass eine Exposition von endokrinen Disruptoren epigenetische Veränderungen bewirken, die mit der Ätiologie einiger Krankheiten (Adipositas, Fehlbildungen der Geschlechtsorgane) in Verbindung gebracht werden können (Anway et al. 2005, Skinner et al. 2010). Wenige Studien jedoch existieren, die diese Assoziationen durch biologische Mechanismen aufklären können. So zeigten Desaulniers et al. (2009), dass nach maternalen PCB-Exposition (Gestationstag 1-21) die Expression der DNA-Methyltransferasen in der Leber bei den Nachkommen verringert war und die Methylierung im Promotorbereich eines Tumorsuppressorgens reduziert war. Weitere Versuche sind dringend erforderlich, um verstehen zu helfen, wie genau endokrine Disruptoren in das Epigenom eingreifen und

welche molekularen Mechanismen für das Auftreten bestimmter Krankheiten in Folgegenerationen verantwortlich sind.

In unserer Studie haben wir die Expression von PPARalpha, PPARdelta und PPARgamma unter PCB-Exposition in Embryonen untersucht. Die einzige Expressionsänderung unter PCB-Exposition war der Anstieg der PPARgamma-Expression in den F2-Embryonen (0,05 mg+1 µg und 5 mg+10 µg). Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Gesamtheit der Expressionsänderungen im Embryo nach DEHP-, PCB- und kombinierter DEHP/PCB-Exposition.

Tabelle 12 Überblick der Expressionsänderung in Präimplantationsembryonen nach DEHP-, PCB- und kombinierter DEHP/PCB-Exposition

| | DEHP | PCB | DEHP/PCB |
|-----------|---------|---------|----------|
| | F1 / F2 | F1 / F2 | F1 / F2 |
| Leptin | - / ↓ | ↓ / - | - / ↓ |
| LeptinR1 | - / ↓ | - / ↓ | - / ↓ |
| PPARgamma | - / - | - / ↓ | - / - |
| PPARdelta | - / - | - / - | - / ↓ |

Derzeit gibt es einige tierexperimentelle Studien, die belegen, dass dioxinähnliche PCB im Energiestoffwechsel vor allem in die Glukose- und Insulinhomöostase eingreifen können und proinflammatorisch wirken (Baker et al. 2013). Arsenescu et al. (2008) konnten zeigen, dass durch eine PCB 77-Exposition *in vivo* und *in vitro* PPARgamma in murinen Adipozyten stimuliert werden kann. Kim et al. (2014) konnten epidemiologisch zeigen, dass Plasmakonzentrationen an dioxinähnlichen PCB positiv mit einer Insulinresistenz und erhöhtem Erkrankungsrisiko für Diabetes und Adipositas korrelieren. Im Fokus dieser Untersuchungen stehen die Gruppe der dioxinähnlichen PCB. Die veränderte Genexpression in den F2-Embryonen unserer Studie lassen eine erste Vermutung zu, dass auch nicht-dioxinähnliche PCB langfristig eine Veränderung des Metabolismus (via PPARs) haben könnten und dass dieser Effekt in der Blastozyste beginnt. Durch molekularbiologische

Analysen regulatorischer Transkriptionsfaktoren, Zielgene und Transportern metabolisch wichtiger Signalwege muss dieser erste Hinweis belegt werden.

Die Änderung in der Genexpression der F2-Embryonen unserer Studie ist auf die PCB 101+118-Exposition während des Keimzell-Stadiums zurückzuführen. Einige Studien berichten, dass die Einwirkung von Umweltschadstoffen während der Entwicklung neben Effekten in der direkt exponierten Generation auch vielfältige negative Auswirkungen in den folgenden Generationen hervorrufen können (Anway et al. 2005; Fernie et al. 2003; Shipp et al. 1998). Da PCB langlebig sind, sich im Fettgewebe, Hirn, Blastozyste und im fetalen Gewebe anreichern, kann es möglich sein, dass die vom Organismus gespeicherten PCB diese generationsübergreifenden Effekte bewirken. Mechanismen, die diesen Effekt verstehen helfen, müssen dringend gefunden werden.

Aufklärende entwicklungsbiologische Studien zu solchen PCB-Kongeneren, die sich verstärkt im Embryo und Fetus anreichern (Rhind et al. 2009&2010), sind notwendig, um ein Umdenken in der Risikobewertung zu erreichen. Aktuell gehören zu den dioxinähnlichen Indikator-PCB nur 6 Kongenere, für die es Höchstmengenbestimmungen laut der Verordnung zur Begrenzung von Kontaminanten in Lebensmitteln (Kontaminanten-Verordnung) gibt und auf deren Grundlage der Gesamt-PCB-Gehalt umweltanalytisch ermittelt wird. Die Auswahl dieser Indikator-Kongenere gilt es aufgrund der aktuellen Datenlage zu erneuern und schlussendlich auf weitere Kongenere auszuweiten. Auch wenn der Verkehr und die Produktion der PCB weltweit seit 2001 (Stockholmer Konvention) verboten sind, so sind diese Industrieschadstoffe durch die Anwendung in offenen Systemen und ihre hohe chemische Stabilität umweltmedizinisch nach wie vor aktuell und hoch relevant.

Kombinierte DEHP/PCB-Exposition

In unserer Studie wurde unter gleichzeitiger DEHP/PCB-Exposition in F1- und F2-Embryonen die Expression der PPARs und Adipokine untersucht. In den F1-Embryonen kam es zu keinen nennenswerten Änderungen der Genexpression. Wie bei unseren Versuchen mit alleiniger DEHP-Exposition zeigten die F2-Präimplantationsembryonen im Kombinationsversuch in allen Konzentrationen eine signifikante Abnahme der Genexpression von Leptin und vom LeptinR1. Zusätzlich führte die DEHP/PCB-Exposition zu einer erniedrigten PPARdelta-Expression in allen Behandlungsgruppen. Diese Expressionsänderung trat in den Einzelversuchen nicht auf (Tab.12). PPARdelta ist neben der Plazentaentwicklung (Nadra et al. 2006) für das *Hatching* der Blastozysten und eine erfolgreiche Implantation (Huang et al. 2006) und somit für die weitere Embryonalentwicklung wichtig.

Da diese Expressionsänderung erst im Kombinationsversuch aufgetreten ist, kann man hier von einem additiven Effekt ausgehen, welcher durch die zeitgleiche Exposition von DEHP und PCB aufgetreten ist. Bemerkenswert ist, dass dieser additive Effekt bereits in umweltrelevanten Konzentrationen zu beobachten war. Bedenkt man die vielen, in der Umwelt vorkommenden Chemikalien mit hormonähnlichen Wirkungen, dann wird das Ausmaß möglicher weiterer Effekte von umweltbedingten Substanzgemischen und die damit verbundene medizinische Relevanz deutlich. Verschiedene Expositionspfade, Wirkmechanismen, Dosis-Wirkungsbeziehungen und interindividuelle Reaktionen machen es Wissenschaftlern und Politikern, schwer Substanzgemische gesundheitlich zu bewerten und etwaige Richtlinien und Verbote zeitnah zu erlassen. Bei der Risikoabschätzung von Umweltschadstoffen wie endokrine Disruptoren sind die Langzeiteffekte eine besondere Schwierigkeit.

Es ist hervorzuheben, dass die in dieser Studie erhobenen Daten zeigen, wie weitgreifend und langfristig weltweit verbreitete Industriechemikalien in den Hormonhaushalt und Energiestoffwechsel exponierter Individuen eingreifen und sowohl diese als auch nachfolgende Generationen schädigen können. Der Einsatz solcher Stoffe in industriellen Prozessen nimmt stetig zu. Aufgrund der wissenschaftlichen Datenlage wird es auf Dauer zu Veränderungen im umweltpolitischen Umgang mit endokrin wirksamen Industriechemikalien kommen müssen.

Zusammenfassung

Viele Umweltchemikalien mit endokrin störenden Effekten begegnen uns täglich und sind aus unserem Leben nicht wegzudenken. Sie reichern sich in Nahrungsketten an, kontaminieren viele Lebensmittel und gelangen so in den menschlichen Organismus. Parallel mit der Zunahme von Produktion und Einsatz von Umweltchemikalien findet man eine alarmierende Zunahme an übergewichtigen Menschen weltweit. Dazu steigt die Zahl an Paaren mit nicht erfülltem Kinderwunsch. Bekannt ist, dass EDs in den Haushalt der Sexualhormone eingreifen können. Inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Wirkung endokriner Disruptoren auf die Fruchtbarkeit und auf die Entwicklung von Übergewicht auch generationsübergreifend besteht, ist erst ungenügend untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die endokrinen Disruptoren DEHP und PCB (101+118), einzeln und in Kombination, in umweltrelevanten und in höheren Konzentrationen eingesetzt. In Fütterungsversuchen wurden weiblichen C3H/N-Mäusen diese EDs für 8 Wochen oral verabreicht. In Studie I wurden direkte Effekte der eingesetzten EDs auf die Muttertiere und Embryonen analysiert. In Studie II wurden Effekte der EDs bei F1-Nachkommen und F2-Embryonen untersucht.

Eine Langzeit-Exposition weiblicher C3H/N-Mäuse mit DEHP:

- führt in umweltrelevanten Konzentrationen zu einer erhöhten Futteraufnahme, erhöhtem Körpergewicht, mehr viszeralem Fettgewebe und zur Hypertrophie der Adipozyten (Studie I).
- führt in umweltrelevanten Konzentrationen zu einer veränderten Adipokin-Expression im Fettgewebe und einer veränderten Adipokin-Plasmakonzentration (500 mg) (Studie I).
- führt in umweltrelevanten Konzentrationen zu einem erhöhten Lebergewicht und hepatischer Triglyzeridanreicherung (Studie I).
- führt zu einer Erhöhung der F_sS-Expression in der Leber (5 mg und 500 mg) (Studie I).
- führt in der Folgegeneration zu den gleichen adipogenen Effekten. Diese Nachkommen wurden ausschließlich *in utero* und während der Laktation mit DEHP exponiert (Studie II).
- bewirkt während der Schwangerschaft in toxikologisch hohen Konzentrationen (500 mg) eine Abortrate von 100 % im 2. und 3. Trimester.

- bewirkt in der 0,05 mg und 5 mg DEHP-Konzentrationsgruppe ein verändertes Genexpressionsmuster bei Leptin und LeptinR1 in den F2-Embryonen. Embryonen dieser Generation waren ausschließlich als Keimzellen dem DEHP ausgesetzt.
- bewirkt jedoch kein verändertes Genexpressionsmuster metabolischer Marker (Leptin, LeptinR1, PPARs, CTRP2, AdipoR2) in den direkt maternal exponierten F1-Embryonen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass DEHP in umweltrelevanten Konzentrationen bei weiblichen C3H/N-Mäusen und ihren Nachkommen deutliche adipogene Effekte zeigt und sich störend auf Schwangerschaft und Embryonalentwicklung auswirkt. Einen generationsübergreifenden Effekt hatte die zurückliegende DEHP-Exposition in der F0-Generation auf die Genexpression der F2-Embryonen. Umweltrelevante DEHP-Dosen führten bei diesen Embryonen zu Expressionsänderungen von metabolischen Genen.

Eine Langzeit-Exposition weiblicher C3H/N-Mäuse mit PCB (101+118):

- führt in der F0-Generation und der F1-Generation zu keiner Änderung der Futteraufnahme, des Körpergewichts und des viszeralen Fettgewebes und Adipokin-Expression im Fettgewebe (Studie I/II).
- bewirkt eine veränderte Genexpression von Leptin in den F1-Embryonen (10 µg und 100 µg).
- bewirkt eine veränderte Genexpression von PPARgamma in den F2-Embryonen (1 µg und 10 µg) und vom LeptinR1 (10 µg). Embryonen dieser Generation waren ausschließlich als Keimzellen den PCB (101+118) ausgesetzt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine Exposition mit PCB (101+118) in umweltrelevanten und toxikologisch hohen Konzentrationen bei weiblichen C3H/N-Mäusen und ihren Nachkommen zu keinen adipogenen Effekten führt. Demgegenüber hat die Exposition der beiden PCB einen Einfluss auf die Embryonalentwicklung. Darüber hinaus kam es in den F1-Embryonen durch toxikologisch hohe PCB-Dosen zu einer veränderten Genexpression von Leptin. Einen generationsübergreifenden Effekt hat eine umweltrelevante PCB-Exposition in der F0-Generation. Dies zeigt sich im veränderten Genexpressionsmuster von F2-Embryonen bei PPARgamma und LeptinR1.

Eine Langzeit-Exposition weiblicher C3H/N-Mäuse mit einer Kombination aus DEHP und PCB:

- führt in umweltrelevanten Konzentrationen wie die alleinige DEHP-Exposition zu einer erhöhten Futteraufnahme, erhöhtem Körpergewicht, mehr viszeralem Fettgewebe und zu einer Hypertrophie der Adipozyten (Studie I).
- führt in umweltrelevanten Konzentrationen zu einer veränderten Adipokin-Expression im Fettgewebe (Studie I).
- führt in der Folgegeneration zu adipogenen Effekten. F1-Nachkommen, welche ausschließlich *in utero* und während der Laktation mit DEHP+PCB exponiert waren, zeigen ein erhöhtes Körpergewicht am Tag 21 *post natal* (Studie II).
- bewirkt während der Schwangerschaft eine Abortrate von 100 % im 2. und 3. Trimester in hohen Konzentrationen (500 mg+100 µg).
- bewirkt ein verändertes Genexpressionsmuster metabolischer Marker (Leptin, LeptinR1 und PPARdelta) in den F2-Embryonen (0,05 mg+1 µg und 5 mg+10 µg). Embryonen dieser Generation waren ausschließlich als Keimzellen dem Gemisch aus DEHP und PCB ausgesetzt.
- bewirkt jedoch kein verändertes Genexpressionsmuster metabolischer Marker (Leptin, LeptinR1, CTRP2, AdipoR2, PPARs) in den direkt exponierten F1-Embryonen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Substanzgemisch aus DEHP und PCB (101+118) in umweltrelevanten Konzentrationen bei weiblichen C3H/N-Mäusen (Studie I) und ihren Nachkommen (Studie II) adipogene Effekte hat. Ein vergleichbarer adipogener Effekt wurde auch in der DEHP-Einzelexposition beobachtet. Im Kombinationsversuch konnten diesbezüglich keine additiven oder antagonistischen Effekte durch die gleichzeitige PCB-Exposition beobachtet werden.

Die Kombination beider Substanzen hatte zudem einen Einfluss auf Schwangerschaft und Embryonalentwicklung. In toxikologisch hohen DEHP/PCB-Konzentrationen kam es wie auch in den DEHP-Einzelversuchen zu Aborten. In umweltrelevanten Konzentrationen kam es zu Änderungen des Genexpressionsmuster entwicklungsrelevanter und metabolischer Marker in den F1- und F2-Embryonen. Als Fazit des Kombinationsversuches ist festzuhalten, dass der adipogene und embryoschädigende Effekt des DEHP auch im Kombinationsversuch sowohl in Studie I und auch in Studie II vorherrschend war. Einzig im Kombinationsversuch der Studie II kam es durch die gleichzeitige Exposition von DEHP und PCB zu einem additiven Effekt bei den F2-Embryonen. In Studie II führten die Einzelexposition von DEHP zu einer Expressionsänderung von Leptin und LeptinR1 und eine PCB-Exposition zu einer

Expressionsänderung von PPARgamma. Demgegenüber führte das Substanzgemisch aus DEHP und PCB im Kombinationsversuch (Studie II) zu einer erhöhten Expression von Leptin, LeptinR1 und PPARDelta.

Literaturverzeichnis

- Adibi JJ**, Perera FP, Jedrychowski W, Camann DE, Barr D, Jacek R, et al. 2003. Prenatal Exposures to Phthalates among Women in New York City and Krakow, Poland. *Environ Health Perspect* 111:1719–1722.
- Adibi JJ**, Whyatt RM, Williams PL, Calafat AM, Camann D, Herrick R, et al. 2008. Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples. *Environ Health Perspect* 116(4):467-473.
- Agarwal DK**, Maronpot RR, LambIV JC, KluweWM. 1985. Adverse effects of butyl benzyl phthalate on the reproductive and hematopoietic systems of male rats. *Toxicology* 35:189–206.
- Agarwal DK**, Lawrence WH, Turner JE, Autian J. 1989. Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *J Toxicol Environ Health* 26:39–59.
- Agudo A**, Goni F, Etxeandia A, Vives A, Millan E, Lopez R, Amiano P, Ardanaz E, Barricarte A, Chirlaque MD et al. 2009. Polychlorinated biphenyls in Spanish adults: Determinants of serum concentrations. *Environ. Res.* 109, 620–628.
- Antczak M**, Van Blerkom J. 1997. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod.* 3(12):1067-86.
- Anway MD**, Cupp AS, Uzumcu M and Skinner MK. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308, 1466–1469.
- Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP)**. 2009. AMAP Assessment 2009: Human Health in the Arctic, pp. xiv+256. Arctic Monitoring and Assessment Programme, Oslo, Norway.
- Arias-Alvarez M**, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Lorenzo PL, Lonergan P. 2011. Effect of leptin supplementation during in vitro oocyte maturation and embryo culture on bovine embryo development and gene expression patterns. *Theriogenology.*;75(5):887-96.
- Arsenescu V**, Arsenescu RI, King V, Swanson H, Cassis LA. 2008. Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ Health Perspect.* 116(6):761-8.

- Bai L**, Jia Y, Viswakarma N, Huang J, Vluggens A, Wolins NE, Jafari N, Rao MS. 2011. Transcription Coactivator Mediator Subunit Med1 is Required for the Development of Fatty Liver in the Mouse. *Hepatology*. 53(4): 1164–1174.
- Banks WA**, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, Morley JE. 2004. Triglycerides Induce Leptin Resistance at the Blood-Brain Barrier. *Diabetes* 53:1253-1260.
- Baker NA**, Karounos M, English V, Fang J, Wei Y, Stromberg A, Sunkara M, Morris AJ, Swanson HI, Cassis LA. 2013. Coplanar polychlorinated biphenyls impair glucose homeostasis in lean C57BL/6 mice and mitigate beneficial effects of weight loss on glucose homeostasis in obese mice. *Environ Health Perspect*. 121(1):105-10.
- Baltzell JK, Berdanier CD**. 1985. Effect on the interaction of dietary carbohydrate and fat on the responses of rats to starvation-refeeding. *J Nutr*. 115(1):104-10.
- Barak Y**, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*. 4(4):585-95.
- Barak Y**, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. 2008. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(1):303-8.
- Berg V**, Lyche JL, Gutleb AC, Lie E, Skaare JU, Aleksandersen M, Ropstad E. 2010. Distribution of PCB 118 and PCB 153 and hydroxylated PCB metabolites (OH-CBs) in maternal, fetal and lamb tissues of sheep exposed during gestation and lactation. *Chemosphere*. 80(10):1144-50.
- Berry EB**, Eykholt R, Helliwell RJ, Gilmour RS, Mitchell MD, Marvin KW. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor isoform expression changes in human gestational tissues with labor at term. *Mol Pharmacol*. 64(6):1586-90.
- Berry DC**, Noy N. 2009. All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor β/δ and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol*. 29:3286–3296.
- Biemann R**, Navarrete Santos A, Navarrete Santos A, Riemann D, Knelangen J, Blüher M, Koch H, Fischer B. 2012. Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows. *Biochem Biophys Res Commun*. 417(2):747-52.
- Brewer CJ, Balen AH**. 2010. The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction*. 140(3):347-64.

- Campfield LA**, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995. Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. *Science* 269(5223):546-549.
- Campioli E**, Batarseh A, Li J, Papadopoulos V. 2011. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate affects the differentiation of human liposarcoma cells (SW 872). *PLoS One*. 6(12):e28750.
- Caro JF**, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL et al. 1996. Decreased cerebrospinal fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 348:159-161.
- Carpenter DO**. 2008. Environmental contaminants as risk factors for developing diabetes. *Rev Environ Health*. 23(1):59-74.
- Carpenter DO**. 2011. Health effects of persistent organic pollutants: the challenge for the Pacific Basin and for the world. *Rev Environ Health*. 26(1):61-9.
- Carr MC, Brunzell JD**. 2004. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6):2601-2607.
- Chen J**, Tan B, Karteris E, Zervou S, Digby J, Hillhouse EW, Vatish M, Randevara HS. 2006. Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia* 49(6):1292–1303
- Cerna M**, Maly M, Grabic R, Batariova A, Smid J and Benes B. 2008. Serum concentrations of Indicator PCB congeners in the Czech adult population. *Chemosphere* 72, 1124–1131.
- Cervero A**, Horcajadas JA, Martín J, Pellicer A, Simón C. 2004. The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development. *J Clin Endocrinol Metab*. 89(5):2442-51.
- Choi SS, Diehl AM**. 2008. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol*. 19(3):295-300.
- Chu DP**, Tian S, Qi L, Hao CJ, Xia HF, Ma X. 2013. Abnormality of maternal-to-embryonic transition contributes to MEHP-induced mouse 2-cell block. *J Cell Physiol*. 228(4):753-63.
- Cioffi JA**, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. 1997. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod*. 3(6):467-72.

- Colborn T**, vom Saal FS and Soto AM. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378–384.
- Gennings C**, Carrico C, Factor-Litvak P, Krigbaum N, Cirillo PM, Cohn BA. 2013. A Cohort study evaluation of maternal PCB exposure related to time to pregnancy in daughters. *Environ Health.* 2013;12(1):66.
- Comerford KB**, Buchan W, Karakas SE. 2013. The Effects of Weight Loss on FABP4 and RBP4 in Obese Women with Metabolic Syndrome. *Horm Metab Res.*[Epub ahead of print]
- Connor K**, Ramamoorthy K, Moore M, Mustain, M, Chen I, Safe S, Zacharewski T, Gillesby B, Joyeux A and Balaguer P. 1997. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: Structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 111–123.
- Correia Carreira S**, Cartwright L, Mathiesen L, Knudsen LE, Saunders M. 2011. Studying placental transfer of highly purified non-dioxin-like PCBs in two models of the placental barrier. *Placenta.*
- Cusin I**, Rohner-Jeanrenaud F, Stricker-Krongrad A, Jeanrenaud B. 1996. The weight reducing effect of an intracerebro-ventricular bolus injection of leptin in genetically obese fa/fa rats. *Diabetes.* 45:1446-1450.
- Dalman A**, Eimani H, Sepehri H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Shahverdi A. 2008. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on resumption of meiosis, in vitro maturation and embryo development of immature mouse oocytes. *Biofactors.* 33(2):149-55.
- Davis BJ**, Maronpot RR, Heindel JJ. 1994. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 128(2):216-223.
- Desaulniers D**, Xiao G, Lian H, Feng YL, Zhu J, Nakai J and Bowers WJ. 2009. Effects of mixtures of polychlorinated biphenyls, methylmercury, and organochlorine pesticides on hepatic DNA methylation in prepubertal female Sprague-Dawley rats. *Int. J. Toxicol* 28, 294–307.
- Desvergne B, Wahli W.** 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20(5):649-88.
- Diehl AM**, Clarke J, Brancati F. 2003. Insulin resistance syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Endocr Pract.* 9(2):93–96.
- Dostal LA**, Weaver RP, Schwetz BA. 1987. Transfer of di(2-ethylhexyl) phthalate through rat milk and effects on milk composition and the mammary gland. *Toxicol Appl Pharmacol.* 91(3):315-25.

- Dreyer C**, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G and Wahli W. 1992. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879–887.
- Ellero-Simatos S**, Claus SP, Benelli C, Forest C, Letourneur F, Cagnard N, Beaune PH, de Waziers I. 2011. Combined transcriptomic-(1)H NMR metabonomic study reveals that monoethylhexyl phthalate stimulates adipogenesis and glyceroneogenesis in human adipocytes. *J Proteome Res.* 10(12):5493-502.
- Fajas L**, Fruchart JC and Auwerx J. 1998. PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters.* 438(1-2):55–60.
- Feige JN**, Gelman L, Rossi D, Zoete V, M \acute{e} tivier R, Tudor C, et al. 2007. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *Biol Chem* 282(26):19152-19166.
- Feige JN**, Gerber A, Casals-Casas C, Yang Q, Winkler C, Bedu E, et al. 2010. The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPARalpha-dependent mechanisms. *Environ Health Perspect* 118(2):234-241.
- Fernie K**, Bortolotti G, Drouillard K, Smits J and Marchant T. 2003. Developmental toxicity of in ovo exposure to polychlorinated biphenyls: II. Effects of maternal or paternal exposure on second-generation nestling American kestrels. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2688–2694.
- Finucane MM**, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M. 2011. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants.; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group. *Lancet.* 377(9765):557-67.
- Fischer S**, Santos AN, Thieme R, Ramin N, Fischer B. 2010. Adiponectin stimulates glucose uptake in rabbit blastocysts. *Biol Reprod.* 83(5):859-65.
- Fowler PA**, Bellingham M, Sinclair KD, Evans NP, Pocar P, Fischer B, et al. 2012. Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive. Health. *Mol Cell Endocrinol.* 355(2):231-9.
- Frederich RC**, Hamann A, Anderson S, L \ddot{o} llmann B, Lowell BB, Flier JS. 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med.* 12:1311-1314.

- Frederiksen H**, Skakkebaek NE, Andersson A-M. 2007. Metabolism of phthalates in humans. *Mol. Nutr. Food Res* 51, 899.
- Froment P**, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J, Monget P. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J Endocrinol.* 189(2):199-209. Review.
- Fromme H**, Gruber L, Schlummer M, Wolz G, Bohmer S, Angerer J, Mayer R, Liebl B, Bolte G. 2007. Intake of phthalates and di(2-ethylhexyl)adipate: results of the Integrated Exposure Assessment Survey based on duplicate diet samples and biomonitoring data. *Environ. Int.* 33, 1012–1020.
- Fruhbeck G**, Aguado M, Martinez JA. 1997. In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:590-594.
- Ge K**, Cho YW, Guo H, Hong TB, Guermah M, Ito M, Yu H, Kalkum M, Roeder RG. 2008. Alternative Mechanisms by Which Mediator Subunit MED1/TRAP220 Regulates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Stimulated Adipogenesis and Target Gene Expression *Mol Cell Biol.* 28(3): 1081–1091.
- Grande SW**, Andrade AJM, Talsness ChE, Grote K, Chahoud I. 2006. A Dose-Response Study Following In Utero and Lactational Exposure to Di(2 ethylhexyl)phthalate: Effects on Female Rat Reproductive Development. *Toxicol Sci* 91(1), 247–254.
- Gray Jr LE**, Laskey J, Ostby J. 2006. Chronic di-n-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian function during pregnancy in female Long Evans hooded rats. *Toxicol Sci* 93:189–195.
- Gray SL**, Shaw AC, Gagne AX, Chan HM. 2013. Chronic exposure to PCBs (Aroclor 1254) exacerbates obesity-induced insulin resistance and hyperinsulinemia in mice. *J Toxicol Environ Health A.* 76(12):701-15.
- Grossman D**, Kalo D, Gendelman M, Roth Z. 2012. Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Cell Biol Toxicol.* 28(6):383-96.
- Grun F, Blumberg B.** 2009. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol Cell Endocrinol.* 304(12):19-29.
- Grun F**, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Cubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. 2006. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol.* 20(9):2141-55.

- Guvenius DM**, Aronsson A, Ekman-Ordeberg G, Bergman A and Noren K. 2003. Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorobiphenyls, and pentachlorophenol. *Environ. Health Perspect.* 111, 1235–1241.
- Halberg N**, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. 2008. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 37:753–768.
- Hamilton BS**, Paglia D, Kwan AYM, et al. 1995. Increased obese mRNA expression in mental fat cells from massively obese humans. *Nat. Med.* 1:953-956.
- Hao C**, Cheng X, Xia H, Ma X. 2012. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Biosci Rep.* 32(6):619-29.
- Hatch EE**, Nelson JW, Qureshi MM, Weinberg J, Moore LL, Singer M, et al. 2008. Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999-2002. *Environ Health Perspect.* 7:27.
- Hauser R**, Chen Z, Pothier L, Ryan L and Altshul L. 2003. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p, p'-DDE. *Environ. Health Perspect.* 111, 1505–1511.
- Hauser R**, Calafat AM. 2005. Phthalates and human health. *Occup Environ Med.* 2(11):806-818.
- Hauser R**, Meeker JD, Singh NP, Silva MJ, Ryan L, Duty S, et al. 2007. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod* 22(3):688-695.
- Heindel JJ**. 2003. Endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Toxicol. Sci.* 76, 247–249.
- Heindel JJ**, vom Saal FS. 2009. Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 304(1-2):90-96.
- Henkel J**, Frede K, Schanze N, Vogel H, Schürmann A, Spruss A, Bergheim I, Püschel GP. 2012. Stimulation of fat accumulation in hepatocytes by PGE₂-dependent repression of hepatic lipolysis, β -oxidation and VLDL-synthesis. *Lab Invest.* 92(11):1597-606.
- Heudorf U**, Mersch-Sundermann V, Angerer J. 2007. Phthalates: toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, pp. 623–634.
- Hileman SM**, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjørbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, Flier JS. 2002. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels

- and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 143: 775–783.
- Hoggard N**, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. 1997. Leptin and leptinreceptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:11073-11078.
- Holness MJ**, Munns MJ, Sugden MC. 1999. Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function. *Mol Cell Endocrinol.* 157(1-2):11-20.
- Horiguchi T**, Shiraishi H, Shimizu M, Morita M. 1997. Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. *Environ Pollut.* 95(1):85-91.
- Hotamisligil GS**, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE and Spiegelman BM. 1996. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science.* 274:1377-1379.
- Huang JC**, Wun WS, Goldsby JS, Wun IC, Noorhasan D, Wu KK. 2007. Stimulation of embryo hatching and implantation by prostacyclin and peroxisome proliferator-activated receptor delta activation: implication in IVF. *Hum Reprod.* 22(3):807-14
- Huang XF**, Li Y, Gu YH, Liu M, Xu Y, Yuan Y, Sun F, Zhang HQ, Shi HJ. 2012. The effects of Di-(2-ethylhexyl)-phthalate exposure on fertilization and embryonic development in vitro and testicular genomic mutation in vivo. *PLoS One.* 7(11):e50465.
- Hurst CH and Waxman DJ.** 2003. Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci* 74(2): 297-308.
- International Council for the Exploration of the Seas (ICES).** 1992. A Compilation of Standards and Guidance Values for Contaminants in Fish, Crustaceans and Molluscs for the Assessment of Possible Hazards to Human Health. International Council for the Exploration of the Seas, Copenhagen, Denmark. Document JMG 17/3/10E.
- Janjua NR**, Frederiksen H, Skakkebaek NE, Wulf HC, Andersson AM. 2008. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *International Journal of Andrology.* 118–130.
- Juul S**, Karmaus W, Olsen J. 1999. Regional differences in waiting time to pregnancy: pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden. The European Infertility and Subfecundity Study Group. *Hum Reprod.* 14(5):1250-4.
- Kadowaki T**, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, et al. 2006. Adiponectin and Adiponectin Receptors in insulin resistance, diabetes and metabolic syndrom. *J. Clin Invest.* 116, 1784-1792.

- Kawamura K**, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Murata M, Tanaka T. 2003. The role of leptin during the development of mouse preimplantation embryos. *Mol Cell Endocrinol.* 202(1-2):185-9.
- Kavlock R**, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P et al. 2002. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod Toxicol.* 16: 529-653.
- Kanayama T**, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa J. 2005. Organotin promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol.* 67(3):766-74.
- Kang SC, Lee BM.** 2003. DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates. *J Toxicol Environ Health A.* 68(23-24):1995-2003.
- Kim KS**, Lee YM, Kim SG, Lee IK, Lee HJ, Kim JH, Kim J, Moon HB, Jacobs DR Jr, Lee DH. 2014. Associations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in visceral vs. subcutaneous adipose tissue with type 2 diabetes and insulin resistance. *Chemosphere.* 94:151-7
- Kluwe WM**, McConnell EE, Huff JE, Haseman JK, Douglas JF, Hartwell WV. 1982. Carcinogenicity testing of phthalate esters and related compounds by the National Toxicology Program and the National Cancer Institute. *Environ Health Perspect.* 45:129-133.
- Kodavanti PR**, Ward TR, Derr-Yellin EC, Mundy WR, Casey AC, Bush B, Tilson HA. 1998. Congener-specific distribution of polychlorinated biphenyls in brain regions, blood, liver, and fat of adult rats following repeated exposure to Aroclor 1254. *Toxicol Appl Pharmacol.* 153(2):199-210
- Koo HJ, Lee BM.** 2007. Toxicokinetic relationship between di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *J Toxicol Environ Health A.*;70(5):383-7.
- Komar CM**, Braissant O, Wahli W, Curry TE Jr. 2001. Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology.* 142(11):4831-8.
- Kuchenhoff A**, Eckard R, Buff K and Fischer, B. 1999. Stage-specific effects of defined mixtures of polychlorinated biphenyls on in vitro development of rabbit preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 54, 126–134.
- Kuriyama SN**, Chahoud I. 2004. In utero exposure to low-dose 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring. *Toxicology.* 202(3):185-97.

- Lamb JC 4th**, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR. 1987. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 88(2):255-269.
- Lapinskas PJ**, Brown S, Leesnitzer LM, Blanchard S, Swanson C, Cattley RC, et al. 2005. Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology* 207(1):149-163.
- Latham KE**. 1999. Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *Int Rev Cytol.*193:71-124. Review.
- Latini G**, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, et al. 2003. In Utero Exposure to Di-(2-ethylhexyl)phthalate and Duration of Human Pregnancy. *Environ Health Perspect* 111:1783–1785.
- Latini G**, Gallo F, Iughetti L. 2010. Toxic environment and obesity pandemia: is there a relationship? *Ital J Pediatr.*36:38.
- Lebrethon MC**, Aganina A, Fournier M, Gérard A, Parent AS, Bourguignon JP. 2007. Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. *J Neuroendocrinol.* 19(3):181-8.
- Lee SA**, Dai Q, Zheng W, Gao YT, Blair A, Tessari JD, Tian Ji B, Shu XO. 2007. Association of serum concentration of organochlorine pesticides with dietary intake and other lifestyle factors among urban Chinese women. *Environ Int.* 33(2):157-63.
- Lee DH**, Steffes MW, Sjödin A, Jones RS, Needham LL, Jacobs DR Jr. 2010. Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: a nested case–control study. *Environ Health Perspect.* 118:1235–1242.
- Li LH**, Jester WF Jr, Laslett AL, Orth JM. 2000. A single dose of Di-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation, and decreases cyclin D2 expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 166(3):222-9.
- Lin Y**, Wei J, Li Y, Chen J, Zhou Z, Song Let al. 2011. Developmental Exposure to Di(2-ethylhexyl) Phthalate Impairs Endocrine Pancreas and Leads to Long-term Adverse Effects on Glucose Homeostasis in the Rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 301(3):E527-38.
- Li X**, Pham HT, Janesick AS, Blumberg B. 2012. Triflumizole Is an Obesogen in Mice that Acts through Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPARγ). *Environ Health Perspect.*; 120(12): 1720–1726.
- Lindenau A, Fischer B**. 1996. Embryotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBS) for preimplantation embryos. *Reprod Toxicol.*10(3):227-30.

- Malik NM**, Carter ND, Murray JF, Scaramuzzi RJ, Wilson CA, Stock MJ. 2001. Leptin requirement for conception, implantation, and gestation in the mouse. *Endocrinology*. 142(12):5198-202.
- Main KM**, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, et al. 2005. Human Breast Milk Contamination with Phthalates and Alterations of Endogenous Reproductive Hormones in Infants Three Months of Age. *Environ Health Perspect*. 114(2):270-276.
- Mascarenhas MN**, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. 2012. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*. 9(12):e1001356.
- Marsman D**. 1995. NTP technical report on the toxicity studies of Dibutyl Phthalate (CAS No. 84-74-2) Administered in Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *Toxic Rep Ser*; 30: 1-G5.
- Max Rubner-Institut**. 2008. Nationale Verzehrsstudie II, Ergebnisbericht Teil I, Seite XI, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe.
- McMillen IC, Robinson JS**. 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol. Rev*. 85, 571–633.
- McKee RH**, Butala JH, David RM, Gans G. 2004. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: addressing the data gaps. *Reprod Toxicol* 18:1–22.
- Méndez-Sánchez N**, Chávez-Tapia NC, Medina-Santillán R, Villa AR, Sánchez-Lara K, Ponciano-Rodríguez G, Ramos MH, Uribe M. 2006. The efficacy of adipokines and indices of metabolic syndrome as predictors of severe obesity-related hepatic steatosis. *Dig Dis Sci*. 51: 1716-1722.
- Mitchell M**, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ (2005) Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction*. 130(5):583–597.
- Mohan M**, Malayer JR, Geisert RD and Morgan GL. 2002. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor γ in bovine preattachment embryos. *Biology of Reproduction*. 66(3):692–700.
- Moore RW**, Rudy TA, Lin TM, Ko K, Peterson RE. 2001. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 109(3):229-237.
- Morley JE**, Alshaher MM, Farr SA, Flood JF and Kumar VB. Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. In: *Peptides*. 20(5):595–600.

- Morris DL**, Rui L. 2009. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(6): E1247–E1259.
- Mylchreest E**, Sar M, Wallace DG, Foster PM. 2002. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol.* 16(1):19-28.
- Nace CS, Szepesi B.** 1976. Dietary fatty acids on the control of glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme in the starved-refed rat. *J Nutr.*106(2):285-91.
- Nadra K**, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D, Wahli W, Desvergne B.2006. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Mol Cell Biol.*26(8):3266-81.
- NHANES** *National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002*
- Newbold RR.** 2008. Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES).*Fertil Steril.* 89(2 Suppl) e55-6.
- Ntambi JM, Young-Cheul K.** 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130(12): 3122-3126.
- Ogden CL**, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM 2007. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 132: 2087-2102.
- Pant N**, Shukla M, Kumar Patel D, Shukla Y, Mathur N, Kumar Gupta Y, et al. 2008. Correlation of phthalate exposures with semen quality. *Toxicol and Appl Pharmacol* 231(1):112-116.
- Pasquali R**, Gambineri A. 2006. Polycystic ovary syndrome: a multifaceted disease from adolescence to adult age. *Ann N Y Acad Sci.*1092:158-174.
- Pocar P**, Fiandanese N, Secchi C, Berrini A, Fischer B, Schmidt JS, Schaedlich K, Borromeo V. 2012a. Exposure to di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) in utero and during lactation causes long-term pituitary-gonadal axis disruption in male and female mouse offspring. *Endocrinology.*153(2):937-48.
- Pocar P**, Fiandanese N, Secchi C, Berrini A, Fischer B, Schmidt JS, Schaedlich K, Rhind SM, Zhang Z, Borromeo V. 2012b. Effects of polychlorinated biphenyls in CD-1 mice: reproductive toxicity and intergenerational transmission. *Toxicol Sci.* 126(1):213-26.
- Queipo-Ortuño MI**, Escoté X, Ceperuelo-Mallafre V, Garrido-Sanchez L, Miranda M, Clemente-Postigo M, Pérez-Pérez R, Peral B et al. 2012. FABP4 Dynamics in Obesity: Discrepancies in Adipose Tissue and Liver Expression Regarding Circulating Plasma Levels. *PLoS One.* 7(11): e48605.

- Rhee EJ**, Seo MH, Jeon WS, Won HK, Choi JH, Park SE, Park CY, Kwag HJ, Oh KW, Park SW, Kim SW, Lee WY. 2012. The association of baseline adipocytokine levels with glycemic progression in nondiabetic Korean adults in 4 years of follow-up. *Diabetes Res Clin Pract.* 98(3):501-7.
- Rhind SM**, Kyle CE, Mackie C and McDonald L. 2009. Accumulation of endocrine disrupting compounds in sheep fetal and maternal liver tissue following exposure to pastures treated with sewage sludge. *J. Environ. Monit.* 11, 1469–1476.
- Rhind SM**, Kyle CE, Mackie C, McDonald L, Zhang Z, Duff EI, Bellingham M, Amezaga MR, Mandon-Pepin B, Loup B, et al. 2010. Maternal and fetal tissue accumulation of selected endocrine disrupting compounds (EDCs) following exposure to sewage sludge-treated pastures before or after conception. *J. Environ. Monit.* 12, 1582–1593.
- Richthoff J**, Rylander L, Jonsson BA, Akesson H, Hagmar L, Nilsson-Ehle P, Stridsberg M and Giwercman A. 2003. Serum levels of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) in relation to markers of reproductive function in young males from the general Swedish population. *Environ. Health Perspect.* 111, 409–413.
- Robert Koch-Institut.** 2007. KiGGS.- Kinder- und Jugendgesundheitssurvey, Die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 50:736–743. DOI 10.1007/s00103-007-0235-5.
- Robinson JF**, Verhoef A, van Beelen VA, Pennings JL, Piersma AH. 2012. Dose-response analysis of phthalate effects on gene expression in rat whole embryo culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 264(1):32-41
- Roos V**, Rönn M, Salihovic S, Lind L, van Bavel B, Kullberg J, Johansson L, Ahlström H, Lind PM. 2013. Circulating levels of persistent organic pollutants in relation to visceral and subcutaneous adipose tissue by abdominal MRI. *Obesity (Silver Spring).*;21(2):413-8.
- Rosen ED**, **Spiegelman BM.** 2001. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem.* 276(41):37731-4.
- Safe S.** 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* 21, 51–88.
- Safe S.** 2004. Endocrine disruptors and human health: Is there a problem? *Toxicology* 205, 3–10.
- Sager DB**, and Girard DM. 1994. Long-term effects on reproductive parameters in female rats after translactational exposure to PCBs. *Environ. Res.* 66, 52–76.

- Sargis RM**, Johnson DN, Choudhury RA, Brady MJ. 2009. Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity (Silver Spring)* 18(7):1283-1288.
- Schmidt T**, Fischer S, Tsikolia N, Navarrete Santos A, Rohrbach S, Ramin N, Thieme R, Fischer B. 2008. Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochem Cell Biol.* 129:817–825
- Seiler P**, Fischer B, Lindenau, A and Beier HM. 1994. Effects of persistent chlorinated hydrocarbons on fertility and embryonic development in the rabbit. *Hum. Reprod.* 9, 1920–1926.
- Senaris R**, Garcia-Cabbalaero T, Casaiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. 1997. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinol.* 138:4501-4505.
- Sharpe RM**. 2006. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20(1):91-110.
- Shi C**, Chen X, Cai XH, Yu WD, Liang R, Lu Q, Shen H. 2013. Cytotoxic effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human embryonic stem cells. *Chin Med J (Engl).* 126(9):1714-9.
- Shiota K, Nishimura H**. 1982. Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in mice. *Environ Health Perspect.* Nov;45:65-70.
- Shipp EB**, Restum JC, Bursian SJ, Aulerich RJ and Helferich WG. 1998. Multigenerational study of the effects of consumption of PCB-contaminated carp from Saginaw Bay, Lake Huron, on mink. 3. Estrogen receptor and progesterone receptor concentrations, and potential correlation with dietary PCB consumption. *J. Toxicol. Environ. Health A* 54, 403–420.
- Skinner MK**. 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reprod Toxicol.* 25(1):2-6.
- Skinner MK**, Guerro-Bosagna C, Haque M, Nilsson E, Bhandari R, McCarrey JR. 2013. Environmentally Induced Transgenerational Epigenetic Reprogramming of Primordial Germ Cells and the Subsequent Germ Line. *PLoS ONE* 8(7): e66318.
- Small CM**, Cheslack-Postava K, Terrell M, Blanck HM, Tolbert P, Rubin C, Henderson A, Marcus M. 2007. Risk of spontaneous abortion among women exposed to polybrominated biphenyls. *Environ Res.* 105(2):247-55.
- Solini A**, Dardano A, Santini E, Polini A, Monzani F. 2013. Adipocytokines mark insulin sensitivity in euthyroid Hashimoto's patients. *Acta Diabetol.* 50(1):73-80.

- Spruss A**, Henkel J, Kanuri G, Blank D, Püschel GP, Bischoff SC, Bergheim I. 2012. Female mice are more susceptible to nonalcoholic fatty liver disease: sex-specific regulation of the hepatic AMP-activated protein kinase-plasminogen activator inhibitor 1 cascade, but not the hepatic endotoxin response. *Mol Med.*18:1346-55.
- Stefan N**, Stumvoll M. 2002. Adiponectin—its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res.* 34: 469-474.
- Steinberg RM**, Walker DM, Juenger TE, Woller MJ and Gore AC. 2008. Effects of perinatal polychlorinated biphenyls on adult female rat reproduction: Development, reproductive physiology, and second generation effects. *Biol. Reprod.* 78, 1091–1101.
- Stahlhut RW**, van Wijngaarden E, Dye TD, Cook S, Swan SH. 2007. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect* 115(6):876-882.
- Sutherland AE, Calarco-Gillam PG.** 1983. Analysis of compaction in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol.* 100(2):328-38.
- Swan SH.** 2008. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res.*108(2):177-184. Review.
- Takai R**, Hayashi S, Kiyokawa J, Iwata Y, Matsuo S, Suzuki M et al. 2009. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 10) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in female rats. *J Toxicological Science* 34 Suppl 1:SP 111-119.
- Takemura Y**, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kadowaki T, Taketani Y. 2006. Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology* 147(7):3203–3210
- Taxvig C**, Dreisig K, Boberg J, Nellemann C, Schelde AB, Pedersen D, Boergesen M, Mandrup S, Vinggaard AM. 2012. Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and PPAR γ activation. *Mol Cell Endocrinol.*361(1-2):106
- Terra X**, Quintero Y, Auguet T, Porrás JA, Hernández M, Sabench F, et al. 2011. FABP 4 is associated with inflammatory markers and metabolic syndrome in morbidly obese women. *Eur J Endocrinol.* 164(4):539-547.
- Tontonoz P**, Hu E, Graves RA, Budavari AI and Spiegelman BM. 1994. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & Development.* 8(10):1224–1234.

- Tontonoz P**, Spiegelman BM. 2008. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 77:289-312.
- Trujillo ME**, Scherer PE. 2005. Adiponectin-journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J. Intern. Med* 257, 167-175.
- Tsuchida A**, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T. 2005. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose Tissue. *Diabetes* 54:3358–3370.
- Tyl RW**, Price CJ, Marr MC, Kimmel CA. 1988. Developmental toxicity evaluation of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate in Fischer 344 rats and CD-1 mice. *Fund am Appl Toxicol* 10:395–412.
- Umweltbundesamt. 2012.** Phthalat-Belastung der Bevölkerung in Deutschland: Expositionsrelevante Quellen, Aufnahmepfade und Toxikokinetik am Beispiel von DEHP und DINP. Band III: Humane Toxikokinetikstudie. Schriftenreihe 04/2012. <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/4393.pdf> [aufgerufen am 2. Mai 2013].
- Uysal KT**, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Wei S and Hotamisligil GS. 2000. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*.141:3388-3396.
- Vandenberg LN**, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS et al. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*.33(3):378-455.
- Wahlang B**, Falkner KC, Gregory B, Ansert D, Young D, Conklin DJ, Bhatnagar A, McClain CJ, Cave M. 2013. Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL6/J mice. *J Nutr Biochem*.(9):1587-95.
- Welt CK**, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, Karalis A, Mantzoros CS. 2004. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med*. 351(10):987-97.
- Wittassek M**, Angerer J, Kolossa-Gehring M, Schäfer SD, Klockenbusch W, Dobler L, et al. 2009. Fetal exposure to phthalates-a pilot study. *Int J Hyg Environ Health* 212(5):492-498.

- WHO (World Health Organization).** 2000. Technical report series 894. Part I: The problem of overweight and obesity. Geneva: World Health Organization. Available: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_894\(part1\)pdf/](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_894(part1)pdf/) [Accessed August, 2011].
- WHO (World Health Organization).** 2012. Obesity - facts and figures. Verfügbar: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity>. [aufgerufen am 1. Juni 2013].
- Wong GW,** Wang J, Hug C, Tsao TS, Lodish HF. 2004. A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10302–10307.
- Wu S,** Zhu J, Li Y, Lin T, Gan L, Yuan X, Xu M, Wei G. 2010. Dynamic effect of di-2-(ethylhexyl) phthalate on testicular toxicity: epigenetic changes and their impact on gene expression. *Int J Toxicol.* 29(2):193-200
- Xu A,** Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, et al. 2006. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem.* 52(3):405-413.
- Yamauchi T,** Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, et al. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 8: 1288-1295.
- Yamauchi T,** Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M et al. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 423:762-769.
- Yang J,** Chen L, Zhang X, Zhou Y, Zhang D, Huo M, Guan Y. 2008. PPARs and Female Reproduction: Evidence from Genetically Manipulated Mice. *PPAR Res.* 2008:72324.3
- Yessoufou A,** Hichami A, Besnard P, Moutairou K, Khan NA Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: Modulation of T cell differentiation. *Endocrinology.* 147(9):4410-8.
- Zhang W,** Sargis RM, Volden PA, Carmean CM, Sun XJ, Brady MJ. 2012. PCB 126 and other dioxin-like PCBs specifically suppress hepatic PEPCK expression via the aryl receptor. *PLoS One.* 7(5):e37103.
- Zhang Y,** Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zhou YT,** Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang MY, Trieu F, Newgard CB, Unger RH. 1997. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sc.i USA* 94:6386-6390

ANHANG

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Strukturformel von DEHP | 4 |
| Abbildung 2 Schema zum metabolischen Abbau der Phthalate..... | 5 |
| Abbildung 3 Strukturformel von PCB 118 und PCB 101..... | 7 |
| Abbildung 4 Schema zur Studie I - mögliche Effekte | 11 |
| Abbildung 5 Schema zur Studie II - mögliche Effekte | 12 |
| Abbildung 6 Methodische Darstellung der Studie I..... | 19 |
| Abbildung 7 Methodische Darstellung der Studie II..... | 21 |
| Abbildung 8 Körpergewichtsentwicklung und Futteraufnahme nach 8-wöchiger Fütterung mit DEHP | 37 |
| Abbildung 9 Effekte von DEHP auf die Menge des viszeralen Fettgewebes und Adipozytenanzahl ... | 38 |
| Abbildung 10 Effekte von DEHP auf das Gewicht ausgewählter Organe | 39 |
| Abbildung 11 Effekte von DEHP auf die Triglyzeride in Plasma und Leber..... | 40 |
| Abbildung 12 Effekte von DEHP auf Leberparameter im Plasma und FsS mRNA-Menge | 41 |
| Abbildung 13 Effekte einer DEHP-Fütterung auf die mRNA-Menge von PPARalpha und PPARgamma in Leber und Fettgewebe | 42 |
| Abbildung 14 Effekte einer DEHP-Fütterung auf die mRNA-Menge von AOX, Med1 und FABP4 in Leber und Fettgewebe | 44 |
| Abbildung 15 Effekte einer DEHP-Fütterung auf Adipokine in Plasma und Fettgewebe | 45 |
| Abbildung 16 Effekte einer maternalen DEHP-Fütterung auf die Expression von Adipokinen und PPAR-Isoformen in F1-Präimplantationsembryonen | 47 |
| Abbildung 17 Effekte von DEHP auf die Menge des viszeralen Fettgewebes in der F0- und F1-Generation..... | 50 |
| Abbildung 18 Effekte von DEHP auf das Gewicht ausgewählter Organe von F0-Müttern und ihren F1-Nachkommen | 52 |
| Abbildung 19 Effekte von DEHP auf die Körpergewichtsentwicklung der F1-Nachkommen | 53 |

Abbildung 20 Effekte einer maternalen DEHP-Fütterung auf die Expression von Adipokinen und PPAR-Isoformen in F2-Präimplantationsembryonen 55

Abbildung 21 Körpergewichtsentwicklung und Futteraufnahme nach 8-wöchiger Fütterung mit PCB 57

Abbildung 22 Effekte von PCB auf das Gewicht ausgewählter Organe 58

Abbildung 23 Effekte einer PCB-Fütterung auf die mRNA-Expression von PPARalpha und PPARgamma in Leber und Fettgewebe 59

Abbildung 24 Effekte einer PCB-Fütterung auf Adipokine im Fettgewebe 60

Abbildung 25 Effekte einer maternalen PCB-Fütterung auf die Expression von Adipokinen und PPAR-Isoformen in F1-Präimplantationsembryonen 61

Abbildung 26 Effekte von PCB auf das Gewicht ausgewählter Organe bei F0-Müttern und ihren F1-Nachkommen 64

Abbildung 27 Effekte von PCB auf die Körpergewichtsentwicklung der F1-Nachkommen..... 65

Abbildung 28 Effekte einer maternalen PCB-Fütterung auf die Expression von Adipokinen und PPAR-Isoformen in F2-Präimplantationsembryonen 67

Abbildung 29 Körpergewichtsentwicklung und Futteraufnahme nach 8-wöchiger Fütterung mit DEHP/PCB 68

Abbildung 30 Effekte von DEHP/PCB auf das Gewicht ausgewählter Organe 69

Abbildung 31 Effekte einer DEHP/PCB-Fütterung auf die mRNA-Expression von PPARalpha und PPARgamma in Leber und Fettgewebe 70

Abbildung 32 Effekte einer DEHP/PCB-Fütterung auf die mRNA-Menge von AOX, Med1 und FABP4 in Leber und Fettgewebe 71

Abbildung 33 Effekte einer DEHP/PCB-Fütterung auf Adipokine im Fettgewebe..... 72

Tabellen

Tabelle 1 Verwendete Primer für die qRT-PCR und die Standard-PC29

Tabelle 2 Standard-3-Step-Protokoll für qRT-PCR33

Tabelle 3 Effekte einer DEHP-Fütterung auf Schwangerschaftsrate und F1-Embryonenanzahl46

Tabelle 4 Effekte einer DEHP-Fütterung auf die Reproduktion direkt exponierter F0-Weibchen48

Tabelle 5 Effekte einer DEHP-Fütterung auf die Reproduktion in utero exponierter F1-Weibchen54

| | |
|--|-----|
| Tabelle 6 Effekte einer PCB-Fütterung auf Schwangerschaftsrate und F1-Embryonenanzahl | 60 |
| Tabelle 7 Effekte einer PCB-Fütterung auf die Reproduktion direkt exponierter F0-Weibchen | 62 |
| Tabelle 8 Effekte einer PCB-Fütterung auf die Reproduktion <i>in utero</i> exponierter F1-Weibchen | 65 |
| Tabelle 9 Effekte der DEHP/PCB-Fütterung auf Schwangerschaftsrate und F1-Embryonenanzahl | 73 |
| Tabelle 10 Effekte der DEHP/PCB-Fütterung auf die Reproduktion direkt exponierter F0-Weibchen | 75 |
| Tabelle 11 Effekte der DEHP/PCB-Fütterung auf die Reproduktion <i>in utero</i> exponierter F1-Weibchen | 80 |
| Tabelle 12 Überblick der Expressionsänderung in Präimplantationsembryonen nach DEHP-, PCB- und kombinierter DEHP/PCB-Exposition | 102 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| BMI | <i>body mass index</i> |
| bp | Basenpaare |
| BPA | Bisphenol A |
| CAS | <i>chemical abstracts service</i> |
| Cyp1A1 | <i>cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1</i> |
| d | Tag |
| DEHP | Di(2-ethylhexyl)phthalat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | desoxy-Nukleotid-Triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| ED | Endokrine Disruptoren |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EU | Europäische Union |
| FABP4 | <i>fatty acid binding protein</i> |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glycerolaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase |
| h | Stunde |
| hCG | humanes Choriongonadotropin |
| H ₂ O | Wasser |
| ICM | Innere Zellmasse |
| IPTG | Isopropylthio-β-D-galaktosid |
| l | Liter |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| MEHP | Mono(2-ethylhexyl)phthalat |
| M | Molar |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mRNA | Messenger-RNA |
| MW | Mittelwert |
| NAFLD | <i>nonalcoholic fatty liver disease</i> |
| NTC | <i>no template control</i> |

| | |
|--------------|---|
| OD | Optische Dichte |
| PBS | <i>phosphat buffered saline</i> |
| PBST | <i>phosphat buffered saline +TWEEN</i> |
| <i>p.c.</i> | <i>post coitum</i> |
| PCB | Polychlorierte Biphenyle |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMSG | <i>pregnant mare serum gonadotropin</i> |
| PPARalpha | Peroxisom-Proliferator aktivierbarer Rezeptor alpha |
| PPARgamma | Peroxisom-Proliferator aktivierbarer Rezeptor gamma |
| PPARdelta | Peroxisom-Proliferator aktivierbarer Rezeptor delta |
| PVA | Polyvinylalkohol |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| qRT-PCR | quantitative Echtzeit-PCR |
| <i>REEF</i> | <i>Reproductive Effects of Environmental chemicals in Females</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| <i>rpm</i> | <i>rounds per minute</i> |
| s | Sekunde |
| SEM | Standardfehler |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBT | Tributylzinn |
| TCDD | 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin |
| TDI | <i>tolerable daily intake</i> |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| U | <i>unit</i> |
| V | Volt |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D- galaktosid |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| $^{\circ}$ C | Grad Celsius |

Chemikalienverzeichnis

| Chemikalien | Firma | Firmensitz |
|---|----------------------------|-------------------|
| Agar-Agar | Carl-Roth GmbH und Co.KG | Karlsruhe |
| Agarose | Biozym | Oldendorf |
| Ampicillin | Carl-Roth GmbH und Co.KG | Karlsruhe |
| Apal | Thermo Scientific | St. Leon-Rot |
| BigDye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems, | Darmstadt |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| Chloroform | Carl-Roth GmbH und Co.KG | Karlsruhe |
| Crimson Taq | NEB | Frankfurt am Main |
| DEHP | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| DNA-Leiter 100bp Gene Ruler | Thermo Scientific | St. Leon-Rot |
| dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | Thermo Scientific | St. Leon-Rot |
| Dynabeads® Oligo(dT)25 | Invitrogen | Karlsruhe |
| Eisessig | Carl-Roth GmbH und Co.KG | Karlsruhe |
| Ethanol absolut | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| Ethidiumbromid | Carl-Roth GmbH und Co.KG | Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| Glycerin | Serva Electrophoresis GmbH | Heidelberg |
| Guanidiniumthiocyanat (GTC) | Serva Electrophoresis GmbH | Heidelberg |
| Haltungsgdiät 1320® | Altromin | Lage |
| Hämtoxylin | Merck | Darmstadt |
| Hefeextrakt | Carl-Roth GmbH und Co.KG | |
| humanes Choriongonadotropin (hCG) | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| IMBX | Applichem | Darmstadt |

| | | |
|---|----------------------------|--------------|
| Isopropanol | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) | Carl-Roth GmbH und Co.KG | Karlsruhe |
| Kochsalzlösung (isotonisch) | Fresenius Kabi GmbH | Bad Homburg |
| Methanol | Carl-Roth GmbH und Co.KG | Karlsruhe |
| Moviol® 4-88 | Calbiochem | Darmstadt |
| Natriumcitrat | Carl-Roth GmbH und Co.KG | Karlsruhe |
| Natriumlaurosylsarcosinat | Carl-Roth GmbH und Co.KG | Karlsruhe |
| Oligonukleotide | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| Paraffin | Merck | Darmstadt |
| Paraformaldehyd | Merck | Darmstadt |
| PCB 101 und 118 | LGC Standards | Wesel |
| PeqGold Plasmid MiniPrep | Peqlab | Erlangen |
| pGEM T-Vector | Promega | Mannheim |
| Phenol | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| Phosphate buffer solution (PBS) Dulbecco | Biochrom AG | Berlin |
| Polyvinylalkohol (PVA) | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| <i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i> (PMSG) | Calbiochem | Darmstadt |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen | Hilden |
| Random Primer | Roche Diagnostics | Mannheim |
| Reverse Transkriptase | Thermo Scientific | St. Leon-Rot |
| SaI | Thermo Scientific | St. Leon-Rot |
| Salzsäure (36%) | Carl-Roth GmbH und Co.KG, | Karlsruhe |
| SYBR Green | Eurogentec | Köln |
| Tween® 20 | Sigma-Aldrich | Taufkirchen |
| Wasserstoffperoxid | Merck | Darmstadt |
| X-Gal | Carl-Roth GmbH und Co.KG | Karlsruhe |
| β -Mercaptoethanol | Serva Electrophoresis GmbH | Heidelberg |

Software- und Geräteverzeichnis

Geräte

| | |
|--------------------------------|--|
| Agarosegel-Dokumentationsgerät | LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland |
| ChemiDoc-It Imaging System | UVP, Cambridge, UK |
| Gelkammer | Biometra, Göttingen, Deutschland |
| halbsterile Werkbank | Haereus, Hanau, Deutschland |
| Kühlzentrifugen | Haereus, Hanau, Deutschland |
| Mikrotom | Medizinische Diagnostik-Methoden GmbH, Giessen, Deutschland |
| NOVEX Gelkammern | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| DNA Engine Opticon® 2 System | MJ Research, München, Deutschland |
| Stereomikroskop | Carl Zeiss, Jena, Deutschland |
| Lichtmikroskop | BZ-8100; Keyence Germany, Frankfurt |
| Thermocycler TRIO-Thermoblock | Biometra, Göttingen, Deutschland |
| Ultra-Turrax T25 | Janke & Kunkel GmbH & Co. KG –IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland |
| UV/VIS Spektrometer NanoVu | GE Healthcare, Solingen, Deutschland |

Software

| | |
|--------------------------|------------------------------|
| Bio1D Software | LTF, Wasserburg, Deutschland |
| BioCaptMW | LTF, Wasserburg, Deutschland |
| Generunner Software 3.05 | Hastings Software Inc., USA |

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Juliane-Susanne Schmidt
geboren am 10. September 1980
in Wernigerode
1 Sohn (2 Jahre)

Akademischer Werdegang

- Seit 10/2013 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Heike Kielstein am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 05/2008-09/2013 Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Dr. Bernd Fischer am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, gefördert durch das EU-Projekt „REEF-Reproductive Effects of Environmental chemicals in Females“ (FP7/2007-2013)
- 10/2010-02/2011 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Naturwissenschaftliche Fakultät III, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 04/2008-05/2008 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Ausbildung & Promotion

- 05/2008-09/2013 Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Anatomie und Zellbiologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Dr. Bernd Fischer. Thema: „Einfluss der endokrinen Disruptoren DEHP und PCB auf Fertilität und Adipositasentwicklung weiblicher Mäuse“

| | |
|-------------------|--|
| 02/2007-03/2008 | Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Gabriele Stangl. Thema: „Untersuchungen zur Expression des Monocarboxylattransporters (MCT-1) unter PPARalpha-Aktivierung in nichtproliferierenden Spezies“ Note: „sehr gut“ (1,1) |
| 10/2002-03/2008 | Studium der Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Diplom, Gesamtnote: „sehr gut“ (1,4) |
| 08/1999 – 08/2002 | Ausbildung zur Photographin, Wernigerode |
| Bis 1999 | Gerhart-Hauptmann-Gymnasium, Wernigerode Allgemeine Hochschulreife |

Wissenschaftliche Auszeichnungen

| | |
|---------|--|
| 02/2010 | Posterpreis <i>“Environmentally relevant doses of DEHP impair female fertility and promote adipogenesis in mice”</i> 53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Leipzig, dotiert mit 200 EUR |
| 05/2010 | <i>Travel award, Gordon Research conference for congress participation: “Environmental endocrine disruptors”</i> Les Diablerets, Schweiz, 1300 USD |

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Zeitschriftenartikel

Schmidt JS, Schädlich K, Fiandanese N, Pocar P, Fischer B (2012) Effects of Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on female Fertility and adipogenesis in C3H/N mice. *Environmental Health Perspectives*; 120(8):1123-9

Königsdorf CA, Navarrete Santos A, **Schmidt JS**, Fischer S, Fischer B (2012) Expression profile of fatty acid metabolism genes in preimplantation blastocysts of obese and non-obese mice. *Obes Facts*; 5(4):575-86

Pocar P, Fiandanese N, Secchi C, Berrini A, Fischer B, **Schmidt JS**, Schaedlich K, Rhind SM, Zhang Z, Borromeo V (2012) Effects of polychlorinated biphenyls in CD-1 mice: reproductive toxicity and intergenerational transmission. *Toxicol Sci.* 126(1):213-26

Pocar P, Fiandanese N, Secchi C, Berrini A, Fischer B, **Schmidt JS**, Schaedlich K, Borromeo V (2012) Exposure to di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) in utero and during lactation causes long-term pituitary-gonadal axis disruption in male and female mouse offspring. *Endocrinology*; 153(2):937-48

Kristina Schaedlich, **Juliane-Susanne Schmidt**, Wing Yee Kwong, Kevin D. Sinclair, Randy Kurz, Heinz-Georg Jahnke and Bernd Fischer. Impact of di-ethylhexylphthalate (DEHP) exposure on metabolic programming in P19-ECC derived cardiomyocytes. *Submitted*.

Reviews

Fowler PA, Bellingham M, Sinclair KD, Evans NP, Pocar P, Fischer B, Schaedlich K, **Schmidt JS**, Amezaga MR, Bhattacharya S, Rhind SM, O'Shaughnessy PJ.(2012) Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. *Mol Cell Endocrinol.* 22; 355(2):231-9

Rhind SM, Evans NP, Bellingham M, Sharpe RM, Cotinot C, Mandon-Pepin B, Loup B, Sinclair KD, Lea RG, Pocar P, Fischer B, van der Zalm E, Hart K, **Schmidt JS**, Amezaga MR, Fowler PA (2010) Effects of environmental pollutants on the reproduction and welfare of ruminants. *Animal*; 4(7):1227-1239

Abstracts für Poster und Kurzvorträge

Schmidt JS, Schaedlich K, Fiandanese N, Pocar P, Fischer B (2011) Dietary exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) stimulates adipogenesis in female C3H/N mice and their offspring. EPH Consultative Conference Berlin-Potsdam, Germany

Schaedlich K, **Schmidt JS**, Kwong WY, Sinclair KD, Fischer B (2011) Di-ethylhexylphthalate (DEHP) alters CpG-methylation of Pparg in P19 ECC derived cardiomyocytes. EPH Consultative Conference Berlin-Potsdam, Germany

Schmidt JS, Schaedlich K, Fiandanese N, Pocar P, Fischer B (2011) The endocrine disruptor DEHP interferes with female reproduction and adipogenesis in mice. XXIV. Bilaterales Symposium "Molecular Medicine", Halle, Germany

Schmidt JS, Schaedlich K, Fiandanese N, Pocar P and Fischer B (2011) Exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) stimulates adipogenesis in female C3H/N mice and their offspring. 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters, Copenhagen, Denmark

Schaedlich K, **Schmidt JS** and Fischer B. (2011) DEHP, PCB101+118, separately and combined, disrupt embryonic cell development and metabolism. 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters, Copenhagen, Denmark

Fiandanese N, Borromeo V, Secchi C, Berrini A, Fischer B, **Schmidt JS**, Schädlich K and Pocar P (2011) In-utero and lactational exposure to di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) disturbs pituitary-gonad axis development in mice. 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters, Copenhagen, Denmark

Pocar P, Fiandanese N, Borromeo V, Berrini A, Rhind SM, Zhang ZL, Fischer B, **Schmidt JS**, Schädlich K and Secchi C (2011) In-utero and lactational exposure to PCB 101 and 118 results in transgenerational disturbance of reproductive development. 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters, Copenhagen, Denmark

Hart K, **Schmidt JS**, Kurz R and Fischer B (2010). DEHP exposure interferes with development and disrupts metabolic processes in embryonic cells. Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors, Switzerland

Schmidt JS, Hart K and Fischer B (2010) DEHP impairs female fertility and acts as an obesogen in C3H/N mice. Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors, Switzerland

Schmidt JS, Hart K, Kurz R and Fischer B (2010) Induction of obesity and impairment of fertility by di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure. 105th Annual Meeting of the Society of Anatomy

Hart K, **Schmidt JS**, Kurz R and Fischer B (2010) Impairment of metabolism due to short-time exposure to DEHP early in development. 53th Symposium of the German Society of Endocrinology (DGE)

Schmidt JS, Hart K and Fischer B (2010) Environmentally relevant doses of DEHP impair female fertility and promote adipogenesis in mice. 53th Symposium of the German Society of Endocrinology (DGE)

Schmidt JS, Hart K and Fischer B (2010) Metabolic effects of DEHP during embryonic cell development / DEHP impairs female fertility and acts as an obesogen in C3H/N mice. 43. Annual Workshop of Physiology and Pathology of Reproduction

Hart K, **Schmidt JS** and Fischer B (2009) Effects of DEHP on embryonic cell development and metabolism. Annual workshop of the Society of Anatomy

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Datum / Unterschrift des Antragstellers

DANKSAGUNG

Ich möchte hiermit all den Personen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei **Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer** für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie anzufertigen. Ferner möchte ich mich für die konstruktive Betreuung und für die Ermöglichung der Teilnahme an zahlreichen Kongressen während meiner Doktorandenzeit bedanken.

Im Weiteren möchte ich mich bei meinen Kollegen für die stete Hilfsbereitschaft und immerwährende freundliche Unterstützung bedanken. Meinen besonderen Dank möchte ich **Katrin Rabe, Christine Fröhlich** und **Alexander Hecht** aussprechen. Danke für eure Ausdauer, Flexibilität und eure nie endende Hilfsbereitschaft bei all den Laborarbeiten.

Ebenso danke ich **Frau PD Dr. Anne Navarrete Santos, Matthias Jung, Ronald Biemann, Dr. Martin Schicht, Dr. Insa Schröder, Dr. Kristina Schädlich, Dr. René Thieme, Dr. Julia Knelangen, Dr. Sünje Fischer** und **Maria Schindler** für die zahlreichen Tipps, das Interesse an meiner Arbeit, für die vielen fruchtbaren fachlichen Diskussionen und für die immer angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und im Büro. Frau **Dr. Nora Klötting** möchte ich meinen Dank aussprechen, da Sie uns die ELISA-Messungen ermöglicht haben.

Bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und das immer gute Arbeitsklima.

Meiner Familie, meinen Freunden und allen Bekannten danke ich für das Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit und für eure moralische Unterstützung gerade in Zeiten, die etwas anders als gedacht und teilweise recht turbulent verliefen.

Lieber **Matthias** und lieber kleiner **Theodor**, ihr zwei seid mein Glück, meine Freude und meine tägliche Motivation - Danke!