

Abschlussbericht zum Vorhaben

„ Untersuchung des PCB-Metabolismus
des Menschen im Hinblick auf eine
individuelle Prädiktion des
Erkrankungsrisiko“

(FB295)

Laufzeit

01.02.2020 – 31.01.2023

Kostenneutrale Laufzeitverlängerung

31.01.2023- 31.07.2023

Bericht vom 15.11.2023

Patrick Ziegler
Isabella Randerath

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch

Kurzfassung englisch

1. Problemstellung

2. Forschungszweck/-ziel

3. Methodik

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

8. Anhang/Anhänge

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Kurzfassung deutsch

Das Hauptziel dieses Projekts bestand darin, bestimmte Enzyme, die so genannten Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP-Enzyme), zu identifizieren, die dazu beitragen, aus bestimmten Arten von polychlorierten Biphenylen (PCB) schädliche Metaboliten zu bilden. PCB sind Chemikalien, die, wenn sie metabolisch aktiviert werden, ihre Toxizität und Mutagenität erhöhen können, d. h. sie können potenziell Schäden an unserer DNA verursachen und das Risiko genetischer Mutationen erhöhen. Wir wissen jedoch immer noch nicht genau, wie diese Stoffwechselaktivierung im menschlichen Körper, insbesondere in der Leber, abläuft. Dieser Mangel an Wissen erschwert eine genaue Bewertung der potenziellen Risiken und Auswirkungen dieser Chemikalien. Mit diesem Projekt sollten diese Wissenslücken geschlossen und unser Verständnis dieser Prozesse verbessert werden. Die Ergebnisse könnten dazu beitragen, die Beurteilung von Personen zu verbessern, die diesen Chemikalien bei der Arbeit ausgesetzt waren und bei denen der Verdacht auf eine Berufskrankheit besteht. Sie könnten auch dazu beitragen, Hochrisikogruppen zu identifizieren, die von präventiven arbeitsmedizinischen Maßnahmen profitieren könnten. Einfacher ausgedrückt, ging es bei diesem Projekt darum zu verstehen, wie die PCB-Kongenere 28, 52, 101 und 118 in unserem Körper, insbesondere in der Leber, verarbeitet werden und ob dies ihre schädlichen Auswirkungen verstärken kann. Das Wissen darüber kann uns helfen, die mit der Exposition gegenüber diesen Chemikalien verbundenen Gesundheitsrisiken besser einzuschätzen und zu bewältigen.

Das Projekt gliederte sich in zwei Teile: Erstens wurden die CYP-Enzyme identifiziert, die für den Abbau der PCB-Kongenere 28, 52, 101 und 118 verantwortlich sind. Zweitens wurde ein in vitro-System entwickelt, das vorhersagen kann, ob die Verstoffwechslung dieser PCBs Zellschäden oder genetische Veränderungen verursacht.

Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Enzyme CYP1A2 und CYP2A6 für die Metabolisierung der PCB-Kongenere 28, 52, 101 eine wichtige Rolle spielen. Für die Metabolisierung von PCB118 konnte das Enzym CYP2E1 identifiziert werden. Es wurde desweiteren gezeigt, dass sowohl PCB28 als auch PCB101 genetische Veränderungen und Zellschäden in vitro verursachen. Durch die Metabolisierung von PCB28 durch die Enzyme CYP1A2 und CYP2A6 kann durch einen Prozess der als Dechlorierung bezeichnet wird, die Verbindung 3-OHCB15 entstehen. Diese Verbindung kann weiter in

andere Verbindungen, so genannte Hydrochinone, umgewandelt werden, die in Tierversuchen nachweislich die Entstehung von Tumoren auslösen. Im Rahmen des Projektes wurde 3-OHCB15 in höheren Konzentration in Blutproben von Personen aus der HELPcB-Kohorte nachgewiesen.

In einer unabhängig vom Forschungsvorhaben FB295 durchgeführten pharmakologischen Studie wurden in Personen aus der HELPcB-Kohorte Untersuchungen zur Stoffwechselaktivität von CYP2A6 durchgeführt. Dabei konnte eine Person mit einer signifikant erhöhten Aktivität von CYP2A6 hinsichtlich der Verstoffwechslung von Paraxanthin identifiziert werden. Retrospektiv wurde bei derselben Person eine erhöhte Verstoffwechslung von PCB28 nachgewiesen. Dieses Ergebnis bestätigte die herausragende Bedeutung des von uns identifizierten Enzyms CYP2A6 für die Verstoffwechslung des WHO-Indikator Kongeners PCB28 in vivo und deutet darauf hin, dass CYP2A6 eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von PCB28 im menschlichen Körper spielt.

In der praktischen Anwendung sollte bei der Bewertung des Risikopotentials von PCB-Gemischen der Metabolismus von PCB28 zu hydroxyliertem PCB15 (3-OHCB15) und dem daraus entstehenden Hydrochinon-Metaboliten berücksichtigt werden. Die Bildung und Elimination des krebserzeugenden Metaboliten von PCB28, 3-OHPCB15 ist abhängig von den Enzymen CYP1A2 und CYP2A6, für die genetische Variationen in der Bevölkerung existieren, die deren Aktivität erhöhen. Bei beruflich gegenüber PCB28-exponierten Beschäftigten mit einer erhöhten Aktivität dieser Enzyme zeigt sich vermutlich eine erhöhte genotoxische Wirkung von PCB28.

Kurzfassung englisch

The main aim of this project was to identify certain enzymes, known as cytochrome P450 monooxygenases (CYP enzymes), which contribute to the formation of harmful metabolites from certain types of polychlorinated biphenyls (PCBs). PCBs are chemicals that, when metabolically activated, can increase their toxicity and mutagenicity, meaning they can potentially cause damage to our DNA and increase the risk of genetic mutations. However, we still do not know exactly how this metabolic activation occurs in the human body, particularly in the liver. This lack of knowledge makes it difficult to accurately assess the potential risks and effects of these chemicals. This project aimed to close these knowledge gaps and

improve our understanding of these processes. The results could help to improve the assessment of people who have been exposed to these chemicals at work and who are suspected of having an occupational disease. They could also help to identify high-risk groups who could benefit from preventive occupational health measures.

In simpler terms, this project was about understanding how PCB congeners 28, 52, 101 and 118 are processed in our bodies, particularly in the liver, and whether this can amplify their harmful effects. Knowing this can help us to better assess and manage the health risks associated with exposure to these chemicals.

The project was divided into two parts: Firstly, the CYP enzymes responsible for the degradation of PCB congeners 28, 52, 101 and 118 were identified. Secondly, an in vitro system was developed that can predict whether the metabolism of these PCBs can cause cell damage or genetic changes.

Experiments have shown that the enzymes CYP1A2 and CYP2A6 play an important role in the metabolism of PCB congeners 28, 52 and 101. The enzyme CYP2E1 was identified for the metabolism of PCB118. It was also shown that both PCB28 and PCB101 cause genetic changes and cell damage in vitro. Metabolism of PCB28 by the enzymes CYP1A2 and CYP2A6 can produce the compound 3-OHCB15 through a process known as dechlorination. This compound can be further converted into other compounds, so-called hydroquinones, which have been shown to trigger the development of tumours in animal experiments. As part of the project, 3-OHCB15 was detected in higher concentrations in blood samples from people in the HELPcb cohort.

In an independently from FB295 conducted pharmacological study, the metabolic activity of CYP2A6 was investigated in individuals from the HELPcb cohort. One person was identified with a significantly increased activity of CYP2A6 with regard to the metabolism of paraxanthine. Retrospectively, an increased metabolism of PCB28 was detected in the same person. This result confirmed the outstanding importance of the enzyme CYP2A6 identified by us for the metabolism of the WHO indicator congener PCB28 in vivo and indicates that CYP2A6 plays an important role in the metabolism of PCB28 in the human body.

In practical application, the metabolism of PCB28 to hydroxylated PCB15 (3-OHCB15) and the resulting hydroquinone metabolite should be taken into account when assessing the risk potential of PCB mixtures. The formation and elimination of the carcinogenic metabolite of PCB28, 3-OHPCB15, is dependent on the

enzymes CYP1A2 and CYP2A6, for which genetic variations exist in the population that increase their activity. Employees occupationally exposed to PCB28 with an increased activity of these enzymes probably show an increased genotoxic effect of PCB28.

1. Problemstellung

Die International Agency for the Research on Cancer (IARC) hat polychlorierte Biphenyle (PCBs) als krebserzeugend für den Menschen eingestuft (Gruppe 1) [1]. Die IARC weist weiterhin auf die Bedeutung der metabolischen Aktivierung für die toxische und krebsauslösende Wirkung von PCBs hin [2] und wir können in eigenen Vorarbeiten genotoxische und somit potentiell kanzerogene Effekte von aktivierten PCB28 Metaboliten nachweisen. Generell können solche Effekte aufgrund unzureichender Forschungsergebnisse bezüglich ihrer Entstehungsmechanismen nicht hinreichend genau eingeschätzt werden. Für die DGUV stellt dies eine besonders große Herausforderung dar, da durch das Fehlen geeigneter Biomarker für die innere Beanspruchung nach PCB-Exposition (Effektmonitoring) die Zusammenhangsbegutachtung von Patienten mit Verdacht auf eine Berufskrankheit erschwert wird. Zusätzlich ist in der Einzelfallbeurteilung trotz der oftmals vorhandenen, durch humanes Biomonitoring gewonnenen Messdaten, eine belastbare Expositionsermittlung oft nicht möglich, da die Bedeutung verschiedener Rahmenbedingungen, insbesondere von Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme, nicht richtig eingeschätzt werden kann. Epidemiologische Befunde weisen bereits darauf hin, dass die kumulative Expositionsdosis nicht das einzig relevante Risikomaß für die Wirkung von PCBs darstellt [3]. Die initiale metabolische Aktivierung von PCB Kongeneren im menschlichen Körper erfolgt abhängig von deren Chlorierungsgrad unterschiedlich schnell durch Oxidation und anschließende Hydroxylierung. Sie wird durch verschiedene Isoenzyme der Cytochrom P450-abhängigen (CYP450) Monooxygenasen katalysiert. Die dabei entstehenden Hydroxy-PCBs (OH-PCBs) werden durch Glukuronsäure, Glutathion oder Sulfat verbunden und ausgeschieden. Oftmals werden aus einem einzigen Kongener, mehrere, mittels HPLC-MS/MS unterscheidbare OH-PCBs gebildet, die sich hinsichtlich ihrer Halbwertszeiten sowie ihrer Genotoxizität untereinander und von der Ausgangssubstanz deutlich unterscheiden. Dadurch ergibt sich in exponierten Personen durch eine unterschiedliche Kongenerzusammensetzung von PCB-haltigen Stoffen am Arbeitsplatz ein äußerst komplexes Stoffwechselverhalten unter Beteiligung unzureichend definierter CYP450-Isoenzyme und ihrer funktionell

bedeutenden Varianten. In der Folge ergeben sich für den menschlichen Organismus individuelle Belastungen durch kanzerogene Metabolite, die für die arbeitsmedizinische Vorsorge als auch für die gutachterliche Kausalzusammenhangsbeurteilung von Bedeutung sein können.

Polychlorierte Biphenyle, Struktur und Eintrag in die Umwelt. Polychlorierte Biphenyle (PCB) sind aromatische Kohlenwasserstoffe, die mit bis zu zehn Chloratomen substituiert sind. Die Gruppe der PCB besteht aus 209 Kongeneren mit sehr unterschiedlichen chemischen und toxikologischen Eigenschaften. Sie wurden großtechnisch in Form von Gemischen aus 50-80 verschiedenen Kongeneren hergestellt und wurden über viele Jahrzehnte weltweit genutzt. Für PCB gilt ein weltweites Herstellungs- und Verwendungsverbot. Je nach Anzahl substituierender Chloratome werden sie in niedrig (<6 Chloratome) und höher chlorierte (≥ 6 Chloratome) PCB unterteilt. Die einzelnen Chloratome können in ortho-(2,2' und 6,6'), meta-(3,3' und 5,5') oder para-Stellung (4,4') an den Phenylringen angeordnet sein [4]. Nicht-ortho-chlorierte PCB besitzen eine koplanare räumliche Struktur und tragen in Gemischen erheblich zu deren Toxizität bei [5]. Die Verwendung von PCB in geschlossenen, sowie in offenen und halboffenen Systemen führte zu unterschiedlichen Verteilungen in der Umwelt. Aus offenen Systemen (z.B. Fugendichtungsmasse) gelangen niedrig chlorierte, volatile PCB durch permanente Emission in die Luft und können so inhalativ in den menschlichen Körper gelangen (Gebäudeschadstoff). Zum Einsatz in geschlossenen Systemen kamen PCB in erster Linie als Dielektrika in Kondensatoren und Transformatoren. Nach dem Verwendungsverbot für PCB wurden solche Geräte u.a. durch die Envio Recycling GmbH & Co. KG in Dortmund wiederaufbereitet. Hierbei kam es zu einer erheblichen PCB-Belastung von Mitarbeitern und Umwelt. Bei ca 30% der Arbeiter wurden Blutwerte gemessen, die für die Summe der Indikatorgene deutlich über dem biologischen Arbeitsstoffreferenzwert der DFG lagen [6].

Toxizität von PCB. Die akute Toxizität von PCB ist gering und beschränkt sich auf Haut- und Augenirritationen, Kopfschmerzen und Übelkeit nach direktem Kontakt. Eine chronische Toxizität und Langzeitwirkung ist bereits bei Exposition mit geringeren Mengen feststellbar: Häufig beschrieben werden unter anderem dermale Veränderungen (sog. „Chlorakne“), Hypothyreose, erhöhte Serumlipidwerte, hepatische Erkrankungen und eine verringerte Immunabwehr [7]. PCB sind hormonell wirksame Substanzen, sogenannte endokrine Disruptoren [8] [9], sowie Kanzerogene mit tumorinitiierenden und promovierenden Eigenschaften [1]. So wird zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen PCB-Exposition und dem Auftreten von Non-Hodgkin-Lymphomen diskutiert [10]. Für die krebserzeugende Wirkung

niedrigchlorierter PCBs (z. B. PCB 28, 52, 101) wird deren Genotoxizität, vermittelt durch Adduktbildung sowie durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, als wichtiger Mechanismus angesehen [11]. Die Oxidation von niedrigchlorierten PCBs im Rahmen des Phase-I-Metabolismus der Leber zu reaktiven Zwischenprodukten ist dafür eine Voraussetzung und ein wesentlicher Schritt für die Toxizität und Kanzerogenität von PCB. Katalysiert durch CYP450 Monooxygenasen, entstehen hydroxylierte PCB-Metabolite (mono- und dihydroxy-Metabolite, OH-PCBs), die im Blut nachgewiesen werden können und jedes hydrophile Kompartiment im Körper erreichen. Dabei führt der enterohepatische Kreislauf vieler PCB-Metabolite zu einer dauerhaften systemischen Belastung mit OH-PCBs. Je nach Position der OH-Gruppen können PCB in peripheren Geweben durch enzymatische Katalyse (z.B. Myeloperoxidase, Prostaglandin H-Synthase) oder Autoxidation zu Katecholen oder Hydrochinonen aufoxidiert werden, die nach weiterer Oxidation zu Chinonen und Semichinonen kovalent an biologische Makromoleküle wie z. B. Purinbasen binden können (Adduktbildung) [12] [13]. Die mit der Oxidation der OH-PCBs verbundene Elektronenübertragung führt zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen und somit zu weiteren genotoxischen Effekten.

CYP450-Isoenzyme im Stoffwechsel von PCB. Die Hydroxylierung der PCB erfolgt durch verschiedene Isoformen der CYP450 abhängigen Monooxygenasen (CYP450-Isoenzyme). CYP450 Isoenzyme werden in fast allen humanen Geweben exprimiert und sind in der inneren Membran der Mitochondrien und im glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. CYP450-Isoenzyme weisen eine große genetische Variabilität auf und für alle zwölf am menschlichen Arzneimittelstoffwechsel beteiligten CYP450-Isoenzyme wurden genetische Polymorphismen identifiziert, die deren Funktion beeinflussen. PCB induzieren bereits nach einmaliger Gabe das CYP450- System der Leber. Durch Fütterungsversuche an Ratten mit kommerziell erhältlichen PCB-Gemischen wie Aroclor 1254, fire-master Bp-6 oder einzelnen Kongeneren konnte in Abhängigkeit von der Position der Chloratome am Phenylring die Induktion unterschiedlicher CYP450-Isoenzyme nachgewiesen werden: Nicht-ortho-chlorierte, koplanare PCB wie z. B. PCB126, PCB169 und PCB77 induzieren die Expression von CYP450 1A1 und 1A2. Ortho-chlorierte PCB wie PCB128, PCB153, PCB155 und PCB180 induzieren die Expression von CYP450 2B1. Anders strukturierte PCB, wie z.B. PCB118, PCB138 und PCB170 induzieren die Expression von sowohl CYP450 1A1 als auch von CYP450 2B [14]. Teilweise konnte einige dieser CYP450-Isoenzyme als tatsächliche Katalysatoren der Hydroxylierung dieser PCBs *in vitro* bestätigt werden [15] [16,17], [18], [19]. Zusätzlich

wurde die Hydroxylierung einiger Tri- und Tetrachlorbiphenyle (PCB 20, 22, 52 und 74) durch CYP2E1 [20] und die Bildung von 4-OHPCB101 aus PCB101 durch CYP 2A6 *in vitro* gezeigt [21]. Eine Übertragung dieser Daten auf die Situation *in vivo* wird dabei jedoch durch die Tatsache erschwert, daß ein spezifisches PCB-Kongener prinzipiell von verschiedenen CYP450-Isoenzyme metabolisiert werden kann, und daß es auf der anderen Seite CYP450-Isoenzyme gibt, die nur eine einzige definierte Reaktion (z.B. die Bildung eines ganz bestimmten Metaboliten) katalysieren können und damit nur teilweise zur Hydroxylierung von bestimmten Kongeneren beitragen [22].

2. Forschungszweck/-ziel

Ziel dieses Antrages war es diejenigen Cytochrom P450 Enzyme zu erfassen, die zur Bildung reaktiver OH-PCB Metabolite aus ausgewählten PCB Kongeneren beitragen und somit eine mechanistisch sinnvolle Rolle bei der Vermittlung der gesundheitsschädlichen Wirkung von PCBs erkennen lassen. Dabei soll durch die Generierung transgener Zelllinien ein Modell geschaffen werden, durch das zellbiologische und genotoxische Effekte ausgewählter PCBs direkt vorhergesagt werden können. Generell kann die Expression von Cytochrom P450 Enzymen durch aufgenommene Schadstoffe selektiv induziert oder supprimiert werden und stellt somit einen potenziellen prospektiven Biomarker für die innere Belastung nach einer Gefahreexposition dar. Damit kann durch dieses Projekt ein Beitrag zur Risikobeurteilung geleistet werden und damit Risikogruppen mit einem vergleichsweise höheren Erkrankungsrisiko eingegrenzt werden.

3. Methodik

Fütterung von *Drosophila melanogaster* mit PCBs (Arbeitspaket 1)

Um die Metabolisierung und Letalität von PCBs (PCB 28,101,52 und PCB 118) in *Drosophila melanogaster* zu untersuchen, wurden die PCBs den Fliegen über künstliches Fliegenfutter (2% Agar, 2% LB-Bouillon, 4% Saccharose) verabreicht. Die für den jeweiligen Assay optimale PCB-Konzentration und die Verweildauer der Fliegen auf PCB-haltigem Futter waren dabei unterschiedlich und wurden empirisch ermittelt. Um die Letalität in WT-Stämmen zu bestimmen, wurde den Fliegen 100 µM des jeweiligen PCBs über das Futter mit verabreicht und die Tiere wurden 24-48h beobachtet. Metabolismusscreens und Letalitätsscreens mit CYP-defizienten Tieren wurden mit 20 µM (24h) bzw. 60 µM (48h) Endkonzentration durchgeführt. (Arbeiten mit Kooperationspartner Aaron Voigt, Klinik für Neurologie)

Analyse von PCB-Metaboliten in *Drosophila*-Lysaten (Arbeitspaket 1)

Für die Bestimmung der Metabolite wurden die Fliegen durch Einfrieren (Gefrierschrank - 25 °C; 15 min) abgetötet und mit PBS gewaschen, um PCB-Reste zu entfernen. Fliegenlysate wurden in RIPA-Puffer durch mechanischen Aufschluss unter Verwendung von Keramikkügelchen hergestellt. Die Lysate wurden durch Zentrifugation von Exoskelett und Zelltrümmern befreit. Für die analytischen Präparationen wurden die *Drosophila*-Lysate nach bereits beschriebenen Verfahren behandelt: Dafür wurden die Lysate (Äquivalent von 10 Fliegen) 1:2 mit 80 µL Ammoniumacetat-Puffer 0,1 mol/L (pH = 5,3) verdünnt. 100 µL dieser Verdünnung wurden weiter mit 100 µL Ammoniumacetatpuffer 0,1 mol/L (pH = 5,3) und 5 µL des Enzyms β -Glucuronidase/Arylsulfatase über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C inkubiert, um durch enzymatische Hydrolyse konjugierte Verbindungen freizusetzen. 50 µL eines Gemischs aus internen Standards (10 ng/mL) und 600 µL Methanol wurden zu den Proben gegeben, dann durch Vortexen für 1 min gemischt und für 10 min bei zur Proteinfällung zentrifugiert. Die einzelnen Überstände wurden in LC-Glasflaschen überführt und bei 45 °C unter leichtem Stickstoffstrom auf ca. 50 µL eingedampft. Abschließend wurde 0,1 mol/L Ammoniumacetatpuffer bis zu einem Endvolumen von 100 µL zugegeben und dann zur Analyse in einen Einsatz überführt. Die Online-Festphasenextraktions (SPE)-Methode, gekoppelt mit Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), wurde wie zuvor beschrieben mit einem API 5500 QTrapmassenspektrometer durchgeführt. (Arbeiten mit Thomas Schettgen und Thomas Kraus, Institut für Arbeits-, Sozial-, und Umweltmedizin)

Genetischer Screen von CYP-defizienten *Drosophila*-Stämmen (Arbeitspaket 1)

Um herauszufinden, welche Cytochrom P 450-Enzyme (CYP) aus *Drosophila melanogaster* an der Bioaktivierung der PCBs beteiligt sind, haben wir *Drosophila*-Stämme mit GAL4-abhängiger Expression von short hairpin (sh)-RNA exprimiert um ein RNAi-vermitteltes Gen-Silencing einzelner CYP-kodierender Gene (n=19) zu induzieren. GAL4-Treiber, die zur Aktivierung der UAS-gesteuerten Expression der shRNA zur Induktion RNAi-vermitteltem Abschalten verschiedener CYP-Gene verwendet wurden, waren Actin-GAL4 und daughterless-GAL4. Nach Kreuzung beider Stämme wurde die entstandene F1-Generation mit PCBs unterschiedlicher Konzentration gefüttert und anschließend hinsichtlich Letalität und Metabolisierung analysiert.

In vitro Metabolisierung von PCB 28 (Zusatzversuch 1)

Für die *in vitro* Metabolisierung von PCB 28 wurden rekombinant hergestellte CYP-Baktosomen (coexprimiert mit CYP-Reduktase in *Escherichia coli*) verwendet. Dabei handelte es sich im Einzelnen um CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A4 die in unterschiedlichen Konzentrationen entsprechend ihrer Expressionslevel in der Leber eingesetzt wurden. Die Inkubationen enthielten PCB 28 (100 µM), HEPES-Puffer (50 mM pH 7,4), MgCl₂ (30 mM) und NADPH (1 mM) in einem Gesamtvolumen von 500 µL. Die Inkubationen wurden nach 3 min Vorinkubation bei 37 °C durch Zugabe von NADPH initialisiert und nach 60 min beendet. Kontrollproben wurden in Abwesenheit von Substrat, in Abwesenheit von NADPH oder unter Verwendung hitzeinaktivierter Enzyme durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels GC/MS und LC/MS wie beschrieben.

Klonierung ausgewählter humaner CYPs in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Arbeitspaket 2)

A) Ziel von AP2 ist die Verifizierung und Charakterisierung derjenigen Cytochrom P450 Isoenzyme, für die eine Beteiligung an der Metabolisierung von PCBs in AP1 (*Drosophila* screen) nachgewiesen werden kann. Dazu sollen entsprechende orthologe Enzyme des Menschen in Zelllinien überexprimiert werden. Als Ausgangsmaterial für die Klonierung humaner CYPs wurde Leber RNA, RNA aus HEPG2 Zellen oder kommerzielle Expressionsplasmide gewählt. Für die Klonierung von Fliegen-CYPs wurde Gesamt-RNA aus *Drosophila*-Lysaten gewählt. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und folgende CYPs wurden mithilfe sequenzspezifischer Primer (PCR) amplifiziert: (human) CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2A6, CYP1A1, CYP2E1; *Drosophila*: CYP18a1, CYP9f2. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurden diese mit dem Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO in einem Ligationsansatz konjugiert und im Anschluss in hitzeschockkompetente *E. coli* transformiert. Nach 24h Wachstum auf antibiotikahaltigen Agarplatten wurden *E. coli* Klone mithilfe der PCR und Restriktionsverdau auf Positivität überprüft. Positive Klone wurden durch Sequenzierung weitergehend analysiert.

Herstellung stabil exprimierender Zelllinien

Im Rahmen von AP2 wurden klonierte und vollständig sequenzierte Cytochrom P450 Isoenzyme lipidbasiert in die Zelllinie HEK293 transfiziert. In dem Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO wird die Expression des Zielgens (CYP) durch einen starken viralen Promoter (aus dem Zytomegalievirus) kontrolliert. Auf

demselben Vektor befindet sich das Selektionsgen, eine Aminoglykosid-Phosphotransferase unter separater Kontrolle des Promoters der SV40 Virus. In Kombination mit dem großen T-Antigen des SV40 Virus, das von der Zielzelllinie (HEK293) generiert wird, lassen sich erfolgreich transfizierte Zellen mithilfe des Antibiotikums Geneticin gezielt selektieren. Dafür wurden die Zellen 72h nach Transfektion mit Geneticin (1 mg/ml) für die Dauer von 2 Wochen inkubiert. Überlebende Klone wurden abgewaschen und zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden resuspendiert und die Zellen wurden in limitierender Verdünnung (ca. 1: 100000) in 96-well Platten neu ausgesät. 24h nach der Aussat wurden die einzelnen Wells mikroskopisch auf das Vorhandensein von Einzelzellen gescreent und gegebenenfalls markiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 4-6 Wochen in Gegenwart von Geneticin (1 mg/ml) kultiviert. Nur Zellklone, die aus einer Einzelzelle entstanden sind, wurden weiter expandiert und weitergehend charakterisiert. Für folgende CYPs wurden stabil exprimierende Zelllinien hergestellt: CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CYP2A6, CYP2E1 (alle human), CYP18a1 (*Drosophila*). Die generierten Zelllinien wurden im Anschluss hinsichtlich der Expression der unterschiedlichen CYPs charakterisiert:

a) Western-Blotting: Mithilfe des Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO werden Zielgene (CYPs) als Fusion mit dem V5-Epitop und einem Polyhistidin-Tag exprimiert. Durch die Verwendung entsprechender gegen V5 oder Polyhistidin gerichteter Antikörper kann (theoretisch) die Expression des jeweiligen CYP-Gens in den Zelllinien überprüft werden. Dafür wurden zunächst Zelllysate generiert, die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Nach Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembranen wurden folgende Zellklone mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert: V5; CYP1A2 (polyklonal und Klone A1, B4, C1, B4, B6, D3, D8, F3, F5, G5, G8); CYP2E1 (polyklonal) CYP2A6 (polyklonal), CYP2C8 (polyklonal). Polyhistidin-Tag, CYP1A2 (Klone A1, F5, G5, G8)

b) RT-PCR: Von den generierten Zelllinien wurde die RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Das jeweilige CYP-Enzym wurde mithilfe sequenzspezifischer Primer amplifiziert. Dabei wurden die Primer für die Amplifikation so gewählt, dass eine Interferenz mit der cDNA, die für die endogenen CYP-Enzyme kodiert ausgeschlossen werden konnte. Mithilfe der qualitativen RT-PCR wurden folgende Zelllinien gescreent: CYP2C8 (Klone A3, D8), CYP2E1 (Klone B4, D5), CYP2A6 (Klone B7, C4), CYP2C9 (Klone B4, B5). Desweiteren wurde eine semiquantitative PCR mit 18sRNA als housekeeping Gen etabliert. Damit wurde in den bereits qualitativ charakterisierten Zelllinien, sowie zusätzlich in den Linien CYP3A4 (Klone E6 und F4) und CYP1A2 (Klone G5 und G8) die Expression des Transgens quantifiziert.

c) PCR an genomischer DNA: Zur Überprüfung der stabilen Integration der CYP-DNA in das Erbgut der Zielzelle und für die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Zellklone im Hinblick auf ihre funktionelle Charakterisierung wurden die Klone mithilfe einer plasmidspezifischen PCR gescreent. Dabei wurden die Primer für die Amplifikation so gewählt, dass eine Interferenz mit der DNA die für die endogenen CYP-Enzyme kodiert ausgeschlossen werden konnte. Für die absolute Quantifizierung und die Berechnung der sogenannten copy-number wurde parallel die Amplifikation der entsprechenden Plasmid-DNA in einer Verdünnungsreihe durchgeführt. Mit diesem Verfahren wurden folgende Zellklone untersucht: CYP2E1 (Klone B4, D5) CYP2A6 (Klone B7, C4)

d) Funktionelle Charakterisierung durch Metabolisierung von PCBs

Alle generierten Zellklone wurden für 72h jeweils einzeln mit folgenden PCBs inkubiert (20 µM/Ansatz): PCB28, PCB 52, PCB 101 und PCB118. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Zellüberstand für die Analyse der Metabolisierung verwendet: Dafür wurden die Überstände 1:1 mit 80 µL Ammoniumacetat-Puffer 0,1 mol/L (pH = 5,3) verdünnt. 100 µL dieser Verdünnung wurden weiter mit 100 µL Ammoniumacetatpuffer 0,1 mol/L (pH = 5,3) und 5 µL des Enzyms β -Glucuronidase/Arylsulfatase über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C inkubiert, um durch enzymatische Hydrolyse konjugierte Verbindungen freizusetzen. 50 µL eines Gemischs aus internen Standards (10 ng/mL) und 600 µL Methanol wurden zu den Proben gegeben, dann durch Vortexen für 1 min gemischt und für 10 min zur Proteinfällung zentrifugiert. Die einzelnen Überstände wurden in LC-Glasflaschen überführt und bei 45 °C unter leichtem Stickstoffstrom auf ca. 50 µL eingedampft. Abschließend wurde 0,1 mol/L Ammoniumacetatpuffer bis zu einem Endvolumen von 100 µL zugegeben, vortexen und dann zur Analyse in einen Einsatz überführt. Die Online-Festphasenextraktions (SPE)-Methode, gekoppelt mit Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), wurde mit einem API 5500 QTrapmassenspektrometer durchgeführt.

Nachweis einer durch Bioaktivierung vermittelten PCB-Toxizität in Cytochrom P450

Isoenzym transgenen Zelllinien (Arbeitspaket 2)

1. Bestimmung der Atmungsaktivität (MTT-Assay): Die metabolische Aktivität Cytochrom P450 transgener Zelllinien wurde durch MTT-Assays bestimmt. Dafür wurden die Zelllinien HEK293CYP2A6 und HEK293CYP2C9 in 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten in einer Dichte von 1×10^2 Zellen in 100 µl Medium ohne Geneticin plattiert und für 24 Stunden bei 37°C und 5%CO₂ in DMEM präinkubiert. Nach Ablauf von 24 Stunden wurden jeweils 6 Inkubationsreplikate folgender Ansätze weiterkultiviert: nk (2x),

1% EtOH, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM, 60µM und 70µM PCB. Nach Ablauf von weiteren 24h wurde der MTT-Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der entstehende Farbumschlag wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Die aus dem MTT-Test gewonnenen Daten wurden zur Berechnung der Hemmung der Stoffwechselrate (%) mit der folgenden Formel verwendet: (1-Behandlungsgruppe/Kontrollgruppe). Dann wurden die Daten in die betroffene Fraktion (Fa; Bereich 0-1) transformiert, wobei Fa = 0 und 1 für 100 % Lebensfähigkeit bzw. 0 % Lebensfähigkeit steht.

2. Einzelzellgelelektrophorese (neutraler Comet-Assay): Im neutralen Comet-Assay werden vorhandene Doppelstrangbrüche (DSB) in der DNA auf Einzelzellebene durch elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente und anschließender Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Dies gibt Aufschluss über tatsächlich vorhandene DNA-Fragmente in der Zelle. Durch die Berechnung des sogenannten „Olive-tail-moments“ kann die individuelle Cytochrom P450 Isoenzym abhängige DNA-Schädigung quantifiziert werden. Bei der Auswertung mittels „OpenComet“- Software (<http://www.cometassayindia.org>) werden die „Olive Tail Momente“ aus den mikroskopischen Aufnahmen von mindestens 50 Zellen/Ansatz berechnen. Durch die Software wird eine willkürliche Auswahl der Zellen gewährleistet. Fehlerhaft detektierte Zellen und Ausreißer werden der Berechnung entzogen. Die Zelllinien HEK293CYP2A6 und HEK293CYP2C9 wurden in 12-Wells á 50.000 Zellen ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ genecinfrei vorinkubiert. Nach der Zugabe von 1% EtOH, 10 µM Etoposid oder 20 bzw. 30µM des gewünschten PCB folgte eine weitere Inkubation für 5h. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^5 eingestellt und der Comet-Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Auswertung wurden Bilder der Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 494/521 nm aufgenommen und mit OpenComet (ImageJ Plug-in) analysiert.

3. Nachweis einer H2Ax-Phosphorylierung

Eine zelluläre Antwort auf Doppelstrangbrüche in der DNA erfolgt wenige Minuten nach der Schädigung der DNA durch Phosphorylierung des Histons H2Ax. Der Nachweis dieser Schädigung erfolgte durch Analyse der Phosphorylierung des Histons H2Ax mittels Immunblotting. Dafür wurden die Zellen lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Standardprotokollen auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Die Membran wurde über Nacht mit Roti R-Block blockiert und mit einem primären Anti-Phospho-H2Ax-Antikörper inkubiert. Die Membran wurde 15 Minuten lang dreimal mit TBST-Puffer

(200 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 1,5 M NaCl, 1% (v/v) Tween-20, pH 7,5) gewaschen und mit einem geeigneten sekundären Anti-Maus-IgG-Antikörper behandelt, der mit Meerrettichperoxidase konjugiert war behandelt. β -Actin diente als Kontrolle und wurde mit einem Anti- β -Actin-Antikörper nachgewiesen. Gebundene Antikörper wurden durch Chemilumineszenz detektiert.

4. Mikrokerntest

Über den Mikrokerntest kann der Nachweis einer manifestierten DNA-Schädigung erbracht werden. Mikrokerne sind DNA-Bruchstücke, die neben dem Kern separat im Zytosol liegen. Sie enthalten Chromatin und besitzen eine intakte Kernmembran. Durch Färbung werden sie mikroskopisch sichtbar und können quantifiziert werden. Nach Schulung von Frau Randerath durch das Institut für Prävention und Arbeitsmedizin in Bochum (Arbeitsgruppe Dr. Heiko Käfferlein) wurde der Mikrokernassay von ihr zum Nachweis sich manifestierender Mutationen im Labor etabliert. Die Zelllinien HEK293CYP2A6 und HEK293CYP2C9 wurden in T25 Flaschen á 1 Mio Zellen ausgesät und 24 Stunden bei 38°C und 5% CO₂ präinkubiert. Anschliessend erfolgte die Zugabe von entweder 1% EtOH, 1% Nitroquinolinoxid oder 20µM und 30µM des jeweiligen PCBs für weitere 24 Stunden. Der Zellzyklus wurde durch die Zugabe von Cytochalasin B synchronisiert und die Zellernte erfolgte nach insgesamt 72 Stunden. Dabei wurden die Zellen trypsinisiert und zentrifugiert, bevor sie mit PBS gewaschen wurden. Für den hypotonen Schock wurde den Zellen unter Schütteln kalte Kaliumchlorid-Lösung (4°C) zugegeben. Anschliessend wurden die Zellen vollständig resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Um die Zellen zu fixieren wurden sie mit einer Methanol/Essigsäure-Lösung (-20°C) behandelt. Die Inkubationszeit war mindestens 15 min bei Raumtemperatur. Anschliessend wurden die Zellen abzentrifugiert. Die Fixierung wurde dreimal wiederholt. Zuletzt wurden die Proben in 1mL Fixierungslösung über Nacht im Kühlschrank (4°C) inkubiert. Für die mikroskopische Analyse wurde von jeder Probe etwas auf einen Objektträger getropft, wobei der Objektträger immer wieder erhitzt wurde. Anschliessend wurden die Zellen mit Acridinorange gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Pro Ansatz wurden 2.000 Zellen gezählt. Die Auswertung erfolgte bei 40 facher Vergrößerung.

Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Fütterung von *Drosophila Melanogaster* mit PCBs (Arbeitspaket 1)

Nach Fütterung mit den PCB-Kongeneren 28, 52 und 101, konnten in *Drosophila*-Lysaten OH-Metabolite detektiert werden, die den OH-Metaboliten in menschlichen Plasmaproben entsprachen und die sich nicht von den chromatographischen Retentionszeiten interner Standards unterschieden was auf die Bildung identischer Metabolite in beiden Organismen hindeutet (siehe Publikation im Anhang). Zusätzlich konnte für hohe PCB28 Konzentrationen Mortalität nachgewiesen werden. Diese war für die Kongenere PCB52, PCB101 und PCB 118 nicht nachweisbar (Abbildung 1).

Genetischer Screen von CYP-defizienten *Drosophila*-Stämmen (Arbeitspaket 1)

Die PCBs wurden einem genetischen Screen in 18 unterschiedlichen CYP-defizienten *Drosophila*-Stämmen unterzogen. Nach Fütterung der Fliegen mit dem entsprechenden PCB konnte in allen Stämmen die Aufnahme des Ursprungkongeners regelmäßig nachgewiesen werden. Es wurden darüber hinaus Stämme identifiziert, deren Metabolisierungsraten im Vergleich zu Kontrollen stark reduziert waren. Eine Übersicht der Ergebnisse des Screens befindet sich im Anhang (Abbildung 2 und 3). Es ist erkennbar, dass für die Metabolisierung von PCB 28 4 *Drosophila*-Stämme in Frage kommen, die eine deutliche Reduktion (mindesten 50% im Vergleich zu Kontrolltieren) der Metabolisierungsrate aufweisen und deren orthologen Enzyme im Menschen eine wesentliche Rolle im Stoffwechsel von Gefahrstoffen spielen. Es handelt sich hierbei um CYP9b1 (humanes Ortholog CYP3A5), CYP18a1 (humane Orthologe: CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9, CYP2A6, CYP2D6 und CYP2E1), CYP9f2 (humanes Ortholog: CYP3A4) und CYP307a2 (humane Orthologe: CYP1A1 und CYP1A2). Für PCB 52, PCB 101 und PCB 118 konnten ebenfalls CYP18a1, und für PCB 52 zusätzlich CYP9b1 identifiziert werden (Abbildung 2 und 3). Fliegenstämme, die ebenfalls eine deutliche Reduktion der Metabolisierungsrate im Vergleich zur Kontrolle aufweisen, deren humanes Ortholog jedoch eine geringe Rolle im Gefahrstoffwechsel des Menschen spielt (zum Beispiel CYP4ad1 bei PCB 52) wurden nachrangig behandelt.

In vitro Metabolisierung von PCB 28 (Zusatzversuch)

Um einen Teil der Ergebnisse des *Drosophila*-Screens zu verifizieren, wurde PCB 28 *in vitro* durch einen der menschlichen Leber ähnlichen Cytochrom-P450-Cocktail (rhCYP-Cocktail) verstoffwechselt. Der leberähnliche rhCYP-Cocktail besteht aus dem Hauptleberenzym CYP1A2 (*Drosophila*-Ortholog: Cyp307a2), CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 (*Drosophila*-Ortholog:CYP18a1) und CYP3A4 (*Drosophila*-Ortholog: Cyp9f2) in Konzentrationsbereichen, die ihren Expressionsleveln in der Leber entsprechen. Durch Inkubation von PCB28 mit dem rhCYP-Cocktail konnten wir 3-OH-CB28 und 3'-OH-CB28 produzieren und damit bestätigten, dass die *in vivo* Aktivierung von PCB28 *in vitro* reproduziert werden kann. Als nächstes teilten wir den rhCYP-Cocktail in Fraktionen und führten einzelne rhCYP-Enzym-Inkubationen durch, um zu sehen, welche spezifischen Enzyme für die metabolische Aktivierung von PCB 28 im rhCYP-Cocktail verantwortlich waren. Die gesamte enzymatische Aktivität hinsichtlich PCB 28 wurde in der Fraktion gefunden, die CYP1A2, CYP2E1 und CYP3A4 enthält. Insbesondere CYP1A2 erzeugte hohe Mengen der OH-CB28-Metaboliten (siehe Publikation im Anhang und Abbildung 4). Dies bestätigt CYP1A2 als zentrales CYP bei der Bildung von reaktiven OH-Metaboliten aus PCB28. Da CYP1A2 ein menschliches Ortholog von *Drosophila* Cyp307a2 ist, und wir Cyp307a2 in unserem genetischen Screen identifiziert hatten, wird unsere vorgeschlagene Vorgehensweise eindrucksvoll bestätigt. Die Ergebnisse deuten somit auf eine Konservierung der PCB28 Aktivierung in *Drosophila melanogaster* und dem menschlichen System hin.

Klonierung der cDNA humaner CYPs in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO und die Herstellung stabil exprimierender Zelllinien (Arbeitspaket 2)

Entsprechend der Ergebnisse des *Drosophila*-Screens (AP1 in Berichtszeitraum 1 abgeschlossen) müssen Zelllinien etabliert werden, die humane CYP-Enzyme überexprimieren und Zelllinien die CYP-Enzyme aus *Drosophila melanogaster* überexprimieren. Bei den in Frage kommenden humanen CYP-Enzymen handelt es sich um CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9, CYP2A6, CYP2D6, CYP2E1, CYP1A2, CYP1A1, CYP3A4 und CYP3A5. Bei den CYP-Enzymen aus *Drosophila* handelt es sich um Cyp307a2, Cyp18a1, CYP9b1 und CYP9f2. Für die Herstellung dieser Zelllinien sind mehrere Zwischenschritte notwendig, die im Folgenden zusammengefasst werden: Zunächst wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion Reaktion (PCR) folgende CYPs aus cDNA amplifiziert: CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5 CYP2A6, CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 (human), sowie CYP18a1 und CYP9f2

(*Drosophila*). CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CYP2A6, CYP2E1 (human) und CYP18a1 (*Drosophila*) wurden in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO kloniert und die Orientierung innerhalb der Expressionskassette des Vektors wurde durch den Verdau mit Restriktionsenzymen bestätigt. Weiterhin wurde die Integrität der Konstrukte durch Sequenzierung bestätigt. Nach Transfektion in HEK 293 Zellen und Selektion mittels Geneticin liegen folgende CYP-Enzyme in stabil exprimierende Zelllinien vor: CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CYP2A8, CYP2A6 und CYP18a1. Die Tabelle in Abbildung 5 fasst für jede der generierten Zelllinie die einzelnen Klonierungsschritte zusammen.

Charakterisierung stabil exprimierender Zelllinien

a) Western-Blotting

Um die Expression der jeweiligen CYP-Enzyme auf Proteinebene zu zeigen, wurde mit einer Anzahl der generierten Klone Western-Blot Experimente sowohl mit gegen V5- als auch gegen den Polyhistidin-Tag gerichtete Antikörper durchgeführt. Es wurden zwar mit beiden Antikörpern der Größe des jeweiligen CYP-Enzyms entsprechende Banden detektiert, leider wurden diese Banden auch regelmäßig in der Negativkontrolle nachgewiesen. Wir sind deshalb davon ausgegangen, dass mit den verwendeten Antikörpern kein sicherer Nachweis der CYP-Expression in unseren Zelllinien durchgeführt werden kann (siehe Abbildung 6).

b) RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR konnte die transgene Expression folgender CYP-Gene qualitativ nachgewiesen werden: CYP2C8 (Klone A3, D8), CYP2E1 (Klone B4, D5), CYP2A6 (Klone B7, C4) und CYP2C9 (Klone B4, B5) (siehe Anlage Abbildung 2). Mittels Realtime PCR wurde die Expression dieser Klone bestätigt und zusätzlich die Expression folgender Zellklone nachgewiesen: CYP3A4 (Klone E6, F4) und CYP2A6 (Klon C4). (Abbildung 7)

c) PCR an genomischer DNA

Durch die PCR an genomischer DNA konnte die Integration von CYP2E1 (Klone B4, D5) und CYP2A6 (Klone B7, C4) in das Genom der Zelle sicher nachgewiesen werden. (Siehe Abbildung 8).

d) Funktionelle Charakterisierung durch Metabolisierung von PCBs

Für die funktionelle Charakterisierung hergestellten Zelllinien, wurden diese mit den PCB-Kongeneren PCB28, PCB101, PCB52 oder PCB118 inkubiert und die Bildung von entsprechenden OH-Metaboliten wurde mittels HPLC/MS/MS nachgewiesen. Dabei wurde festgestellt, dass die Hauptmetabolite des

PCB28-Stoffwechsels 3-OHCB28 und 3'-OHCB28 fast ausschließlich von Zellklonen gebildet werden, die entweder CYP1A2 oder CYP2A6 exprimieren. Die Nebenmetabolite von PCB28 (4, 4'-OHCB) wurden zusätzlich in geringem Ausmaß von Zellklonen gebildet, die CYP2E1 exprimieren (siehe Abbildung 9 und 10). PCB52 und PCB 101 wurden von Zelllinien, die CYP2C8, CYP2E1 und CYP2A6 exprimierten verstoffwechselt. Dabei wurden beide Kongenere von der Zelllinie CYP2C8 gering verstoffwechselt, während die Zelllinie CYP2A6 eine sehr starke Aktivität hinsichtlich der Metabolisierung dieser Kongenere zeigte. Die Verstoffwechslung von PCB118 konnte nur in Zellklonen nachgewiesen werden, die CYP2E1 exprimierten. Für Klone von der Zelllinie CYP3A4 und CYP2C9 konnte keine Verstoffwechslung der PCBs 28, 52, 101 und 118 nachgewiesen werden.

Nachweis einer durch Bioaktivierung vermittelten PCB-Toxizität in Cytochrom p450 Isoenzym transgenen Zelllinien (Arbeitspaket 2).

Da PCB28, 52 und 101 alle von der Zelllinie HEK293CYP2A6 verstoffwechselt wurden, konnten alle cytotoxischen Assays mit dieser Zelllinie durchgeführt werden. Dies hat den Vorteil, daß ein direkter Vergleich, der von den einzelnen PCB-Kongeneren ausgehenden Toxizität, unabhängig von Expressionsschwankungen des Transgens durchgeführt werden kann. Die Verstoffwechslung von PCB118 durch HEK293CYP2E1 fiel allerdings so gering und inkonsistent aus, daß keine toxikologischen Versuche mit PCB118 durchgeführt werden konnten.

1. Bestimmung der Atmungsaktivität (MTT-Assay)

Wurden HEK293CYP2A6 mit PCB28 oder PCB52 für 24h inkubiert, so verringerte eine Konzentration von bis zu 30 µM die Stoffwechselaktivität der Zelllinie auf unter 30% der Kontrollwerte. Die als Kontrolle mitgeführte HEK293CYP2C9 Zelllinie erreichte diesen Wert erst bei einer PCB-Konzentration von 70 µM, während HEK293 WT-Zellen diesen Wert nicht erreichten. Die IC₅₀ konnte für PCB28 mit 26.98 µM und für PCB52 mit 26.15 µM angegeben werden. Für PCB 101 ergab sich ein ähnliches Bild: hier lag die IC₅₀ bei 34.82 µM. Diese wurde von der Kontrollzelllinie HEK293CYP2C9 bei ca 60 µM erreicht und war für HEK293 WT-Zellen nicht erreichbar. Bei allen drei PCB-Kongeneren war eine Beeinflussung der Stoffwechselaktivität ab einer Konzentration von 20 µM nachweisbar. Der MTT-Assay unterscheidet nicht zwischen einer Beeinflussung der Stoffwechselaktivität durch Absterben der Zellen oder Stopp der Proliferation. Eine lichtmikroskopische Beurteilung von HEK293CYP2C9 nach 24h Inkubation mit PCBs

ergab für PCB28 eher cytotoxische Effekte (Absterben der Zellen) und für PCB52 und 101 eher cytostatische Effekte (Proliferationsstopp). (Abbildung 11)

2. Einzelzellgelelektrophorese (neutraler Comet-Assay):

Um zu überprüfen, ob die durch die Metabolisierung von PCB28, 52 und 101 induzierte Zytotoxizität durch DNA-Schäden, die in der Zelllinie HEK293CYP2A6 entstehen verursacht wird, haben wir neutrale Comet-Assays durchgeführt. Dieser Assay weist DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen (DSB) nach. Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von 20 oder 30 μM mit den entsprechenden PCB-Kongeneren für 3h inkubiert und anschliessend durch Einzelgelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle wurde die Zelllinie HEK293CYP2C9 eingesetzt. Es zeigte sich für PCB28 ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Olive-Tail Moments in der HEK293CYP2A6 Zelllinie, der in HEK293CYP2C9 nicht nachweisbar war. Für PCB101 konnte ebenfalls die Induktion von DNA-Schäden gezeigt werden, während eine Inkubation mit PCB52 in dem gewählten Zeitraum keinen solchen Effekt zeigte. (Abbildung 12)

3. Nachweis einer H2Ax-Phosphorylierung

Eine indirekte Reaktion auf DSB in der Zelle ist die Phosphorylierung des Histons H2Ax an Serin 139 (γH2Ax), die unmittelbar nach dem Auftreten von DNA-Schäden erfolgt und mit einem phosphospezifischen Antikörper im Western-Blot gezeigt werden kann. Durch Inkubation von HEK293CYP2A6 Zellen mit PCB28 konnte eine Phosphorylierung des Histons H2Ax gezeigt werden. Allerdings mussten die Verweildauer von PCB28 auf der Zelllinie auf 24h verlängert werden, um mit diesem Nachweissystem ein Signal zu generieren. Damit war eine Vergleichbarkeit mit dem Comet-Assay nicht mehr zu gewährleisten und es wurde auf eine weitere Durchführung von H2Ax Phosphorylierungsstudien verzichtet. (Abbildung 13)

4. Mikrokerntest

Als zusätzlicher Genotoxizitätstest zum Comet-Assay wurde der Mikrokerntest durchgeführt. Im Gegensatz zum Comet-Assay ist der durch Mikrokerne angezeigte DNA-Schaden nicht reparabel und abhängig von der Teilung der Zelle. Kriterien zur Bestimmung eines Mikrokers waren: komplette Trennung vom Hauptkern, Färbung des Mikrokers in derselben Weise wie der Hauptkern und Lage beider Kerne in der gleichen Schärfeebene. Effekte im Mikrokerntest konnten in der Zelllinie HEK293CYP2A6 für alle 3 PCB-Kongeneren nachgewiesen werden. Die Effekte von PCB28 und 101 waren jedoch im Vergleich zu den Effekten in der Kontrollzelllinie HEK293CYP2C9 stark ausgeprägt, während die Effekte von PCB52 zwischen der Zelllinie

HEK293CYP2A6 und der Kontrollzelllinie HEK293CYP2C9 ähnlich waren. Wir werten deswegen PCB28 und PCB101 als positiv im Mikrokerntest während wir PCB52 als negativ werten. (Abbildung 14)

Identifizierung einer metabolischer Dechlorierung von PCB28 durch CYP1A2 und CYP2A6 (Zusatzversuch 2).

Als wir den Metabolismus von PCB28 in vitro unter Verwendung von rekombinantem humanem (rh)CYP1A2, analysierten, konnten wir alle aus humanem Plasma bekannten monohydroxylierten Metaboliten von PCB28 reproduzieren. Darüber hinaus erschien im Chromatogramm ein auffälliger Ionenpeak bei einer Retentionszeit von 16,25 min. Ein Vergleich mit der Kalibrierungskurve der Standardverbindungen mit der nächstgelegenen Retentionszeit legte nahe, dass es sich bei diesem Peak um den hydroxylierten Metaboliten von 4,4'-Dichlorbiphenyl (3-OHCB15) handelte. Dasselbe Muster an Metaboliten konnte auch durch Inkubation der Zelllinien HEK293CYP1A2 und HEK293CYP2A6 erreicht werden. Desweiteren war (3-OHCB15) auch im Blutplasma stark PCB 28 exponierter Personen aus der HELPcB-Kohorte nachweisbar. Dabei ist von Bedeutung, daß das parentale PCB15 nur mit einem sehr geringen Masseanteil in Arochlorgemischen vorkommt, so daß eine Bildung von 3-OHCB15 aus PCB28 in vivo wahrscheinlich erscheint.(Abbildung 15-17)

In vivo Charakterisierung von Cytochrom-p450 Enzymen bei erhöhter innerer PCB-Belastung (Zusatzversuch 3). *Dieses Projekt wurde durch Institutsmittel des Instituts für Arbeits-Sozial und Umweltmedizin finanziert und nicht mit Mitteln aus FB295.*

Das Institut für Arbeitsmedizin hat unter Leitung des Antragstellers eine klinisch-pharmakologische Studie durchgeführt in der der Einfluss einer Langzeitbelastung mit PCBs auf das Stoffwechselverhalten und die Aktivität ausgesuchter CYP450 Monooxygenasen in 10 Personen aus der HELPcB-Kohorte untersucht wurde. Als Kontrollgruppe dienten 10 alters- und geschlechtsgepaarte nicht-exponierte Normalpersonen. Die Bestimmung der Stoffwechselaktivität erfolgte durch die gleichzeitige Gabe von Arzneistoffen, die durch bestimmte CYP450 Monooxygenasen selektiv verstoffwechselt werden und die anschließende Bestimmung der Enzymaktivität über einen Zeitraum von 24h. Bei den zu untersuchenden Enzymen handelte es sich um die CYP-Enzyme 2C9, 2C19, 2D6, 1A2, 2A6, 2B6 und 3A4.

CYP1A2 und CYP2A6 verstoffwechseln beide Coffein. Das Hauptprodukt von CYP1A2 ist dabei Paraxanthin, das im Blutplasma nachgewiesen werden kann. Paraxanthin kann weiter zu 1,7-Dimethylursäure abgebaut werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß CYP2A6 für diese Umwandlung ein

Hauptenzym ist, und daß Deletionsmutanten von CYP2A6 die Bildung von 1,7-Dimethylursäure reduzieren. Einen Überblick über diese Zusammenhänge geben folgende Literaturstellen: URL: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165884757> und <https://www.pharmgkb.org/literature/14795094> (abgerufen am 15.11.2023). Die Bestimmung des Dimethylursäure/Paraxanthin Quotienten im Urin gibt somit Aufschluss über die Enzymaktivität von CYP2A6 im Menschen. Wir haben diesen Quotienten im Urin der Studienteilnehmer bestimmt und dabei eine Person aus der HELPCB-Kohorte identifiziert, die eine signifikant höhere metabolische Ratio für Dimethylursäure/Paraxanthin hat als alle anderen Studienteilnehmer. Eine retrospektive Analyse dieser Person hinsichtlich ihrer Verstoffwechslung von PCB28 im Jahre 2010 zeigte ebenfalls eine deutlich höhere Bildung der Hauptmetaboliten 5OHCB28. Diese Ergebnisse legen nahe, daß in dieser Person eine genetische Variation von CYP2A6 vorliegt, die eine erhöhte Stoffwechselaktivität hinsichtlich der Aktivierung bestimmter PCB-Kongenere zur Folge hat. (Abbildung 18-21)

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

PCB28:

1. Qui et al: Associations between functional polychlorinated biphenyls in adipose tissues and prognostic biomarkers of breast cancer patients. Environ Res . 2020 Jun;185:109441

„Verschiedene funktionelle PCB-Kongenere weisen unterschiedliche Assoziationen (sowohl positive als auch negative) mit prognostischen Biomarkern für Brustkrebs sowie mit dem Stadium der Tumorklassifikation auf. Daher können die Entwicklung und die Aggressivität von Brustkrebs von der Exposition gegenüber einer spezifischen Struktur-Aktivität von PCBs abhängen“. PCB28 ist positiv mit HER-2 (ORT3 = 5,43, Ptrend = 0,006) und der Tumorgroße (OR = 2,37) assoziiert. Diese Publikation ergänzt unsere mechanistischen Daten und gibt einen epidemiologischen Hinweis auf die Kanzerogenität von PCB28.

PCB52:

1. Zhou et al: N-acetylcysteine alleviates PCB52-induced hepatotoxicity by repressing oxidative stress and inflammatory responses. PeerJ 2020 Aug 11;8:e9720.

„PCB52 induziert oxidativen Stress und Inflammation in humanen und Rattenhepatozyten“ Diese Publikation bestätigt unsere Ergebnisse eines Effekts von PCB52 auf die Zellatmung in CYP kompetenten Zellen.

2. Zhao et al. PCB52 exposure alters the neurotransmission ligand-receptors in male offspring and contributes to sex-specific neurodevelopmental toxicity. Environ Pollut 2020 Sep;264:114715.

“Die PCB52-Exposition während der Trächtigkeit und Laktation führt zu einer abnormalen Expression von Neurotransmissions-Liganden-Rezeptoren bei männlichen Nachkommen mit einem Geschlechtsunterschied, und dies kann zur Toxizität für die Neuroentwicklung beitragen. **Dieser Artikel bestätigt generell die Toxizität von PCB52.**

3. Qui et al: Associations between functional polychlorinated biphenyls in adipose tissues and prognostic biomarkers of breast cancer patients. Environ Res . 2020 Jun;185:109441

„Verschiedene funktionelle PCB-Kongenere weisen unterschiedliche Assoziationen (sowohl positive als auch negative) mit prognostischen Biomarkern für Brustkrebs sowie mit dem Stadium der Tumorklassifikation auf. Daher können die Entwicklung und die Aggressivität von Brustkrebs von der Exposition gegenüber einer spezifischen Struktur-Aktivität von PCBs abhängen“. Eine erhöhte PCB52-Exposition ist positiv mit der PR-Expression assoziiert (ORT2 = 2,36, Ptrend = 0,054). **Diese Publikation ergänzt unsere mechanistischen Daten und gibt einen epidemiologischen Hinweis auf eine positive Assoziation von PCB52 mit Brustkrebsmarkern.**

PCB101:

1. Qui et al: Associations between functional polychlorinated biphenyls in adipose tissues and prognostic biomarkers of breast cancer patients. Environ Res . 2020 Jun;185:109441

„Verschiedene funktionelle PCB-Kongenere weisen unterschiedliche Assoziationen (sowohl positive als auch negative) mit prognostischen Biomarkern für Brustkrebs sowie mit dem Stadium der Tumorklassifikation auf. Daher können die Entwicklung und die Aggressivität von Brustkrebs von der Exposition gegenüber einer spezifischen Struktur-Aktivität von PCBs abhängen“. Ein höherer PCB101-Spiegel stand in negativem Zusammenhang mit HER-2 (ORT3 = 0,24, Ptrend = 0,029) und der Tumorgroße (OR = 0,43) **Diese Publikation ergänzt unsere mechanistischen Daten und gibt einen epidemiologischen Hinweis auf eine negative Assoziation von PCB 101 mit Brustkrebsmarkern.**

PCB118:

1. Zhang et al: Effects of 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl exposure during pregnancy on DNA methylation in the testis of offspring in the mouse. Reprod Fertil Dev 2020 Aug;32(12):1048-1059.

„PCB118 schädigte das Fortpflanzungssystem von männlichen F1-Mäusen. Darüber reduzierte PCB118 die Methylierungsrate von genomischen, und die Expression der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. **Diese Publikation gibt experimentelle Hinweise auf eine Toxizität von PCB118 in Vertebraten.**

2. Parada et al: Plasma levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) and breast cancer mortality: The Carolina Breast Cancer Study. Int J Hyg Environ Health 2020 Jun;227:113522.

“Die höchsten Perzentile von PCB74, PCB99 und PCB118 waren mit 5-Jahres-Brustkrebs-spezifischen Mortalitäts-HRs von 1,46 (95%CI = 0,86-2,47), 1,57 (95%CI = 0,90-2,73) bzw. 1,86 (95%CI = 1,07-3,23) assoziiert.“ **Diese Publikation gibt einen epidemiologischen Hinweis auf eine Assoziation von PCB 118 mit einer erhöhten Gesamtmortalität bei Frauen mit Brustkrebs.**

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Die hohe Relevanz der in diesem Projektantrags erzielten Ergebnisse für die Arbeit der gesetzlichen Unfallversicherung ergibt sich im Wesentlichen durch drei Aspekte:

1. Unsere Ergebnisse ermöglichen ein besseres Verständnis für die Entstehung von PCB-bedingten Erkrankungen (vorallem der PCBs 28, 52, 101) als Berufskrankheit, die durch die Exposition gegenüber verschiedenen PCB-Kongeneren mit unterschiedlicher Toxizität (Mischexposition) entstehen.
2. Es wurde eine Grundlage geschaffen, um die individuelle Risikobewertung im Rahmen der Untersuchung möglicher Berufskrankheiten gemäß BK-Nr. 1302 BKV zu verbessern.
3. Es wurden ebenfalls Grundlagen gelegt, um Risikogruppen zu identifizieren, die möglicherweise eine arbeitsmedizinische Vorsorge benötigen oder durch andere Präventivmaßnahmen besonders geschützt werden müssen.

Erläuterung:

Eine Herausforderung bei der Untersuchung von Krankheiten, die durch polychlorierte Biphenyle verursacht werden können, besteht darin, dass verschiedene PCB-Kongeneren und ihre Abbauprodukte unterschiedliche Wirkungen und Wirkstärken haben. Daher ist es schwierig, einfache Zusammenhänge zwischen der Menge an PCB im Blut und den gesundheitlichen Auswirkungen herzustellen. In unseren Experimenten haben wir festgestellt, dass zwei bestimmte PCB-Verbindungen (PCB101 und PCB28) nach ihrer Metabolisierung das Erbgut schädigen können, was bedeutet, dass kein sicherer toxikologischer Schwellenwert für diese Substanzen abgeleitet werden kann. Außerdem konnten wir zeigen, dass bei der Verstoffwechlung von PCB28 ein Abbauprodukt entsteht (3OH-CB15), das als sicher krebserregend eingestuft wird. Dies deutet darauf hin, dass selbst eine sehr geringe Belastung mit PCB28 mit einem Krebsrisiko verbunden sein kann. Daher sollte bei Expositionen gegenüber PCB28 die Belastung mit den von PCB28 gebildeten Metaboliten, insbesondere 3-OHCB15 in den betroffenen Personen bestimmt werden.

Die Kenntnis über die schädlichen Wirkungen von PCB ist für die Prävention wichtig, da individuelle Faktoren wie genetische Unterschiede in Enzymen die Toxizität und damit das Krankheitsrisiko erhöhen

können. Wir haben herausgefunden, dass die Enzyme CYP1A2 und CYP2A6 an der Verstoffwechslung von PCB28, 101 und 52 beteiligt sind. Diese Erkenntnis ermöglicht es, neben der allgemeinen Bewertung der Gefahrstoffbelastung auch individuelle Faktoren der betroffenen Personen in die Bewertung einzubeziehen. Für beide Enzyme sind genetische Variationen in der Bevölkerung bekannt, die vermutlich die individuelle Empfindlichkeit gegenüber PCB-Exposition beeinflussen. Bei beruflich PCB28-exponierten Personen mit einer erhöhten Aktivität dieser Enzyme ist wahrscheinlich eine erhöhte Bildung des Abbauprodukts 3-OHCB15 und damit eine erhöhte genotoxische Wirkung von PCB28 zu erwarten. Die Bedeutung einzelner bereits bekannter genetischer Variationen in diesen Enzymen für die Abschätzung individueller Krankheitsrisiken nach PCB-Exposition ist jedoch noch nicht geklärt und sollte in weiteren Studien untersucht werden. Trotzdem könnte bereits jetzt eine Untersuchung der genetischen Variationen von CYP2A6 und CYP1A2 in Kombination mit dem Nachweis von 3-OHCB15 im Blutplasma die Risikoeinschätzung von beruflich PCB-exponierten Personen sinnvoll ergänzen und Risikogruppen identifizieren, die besonders geschützt werden müssen.

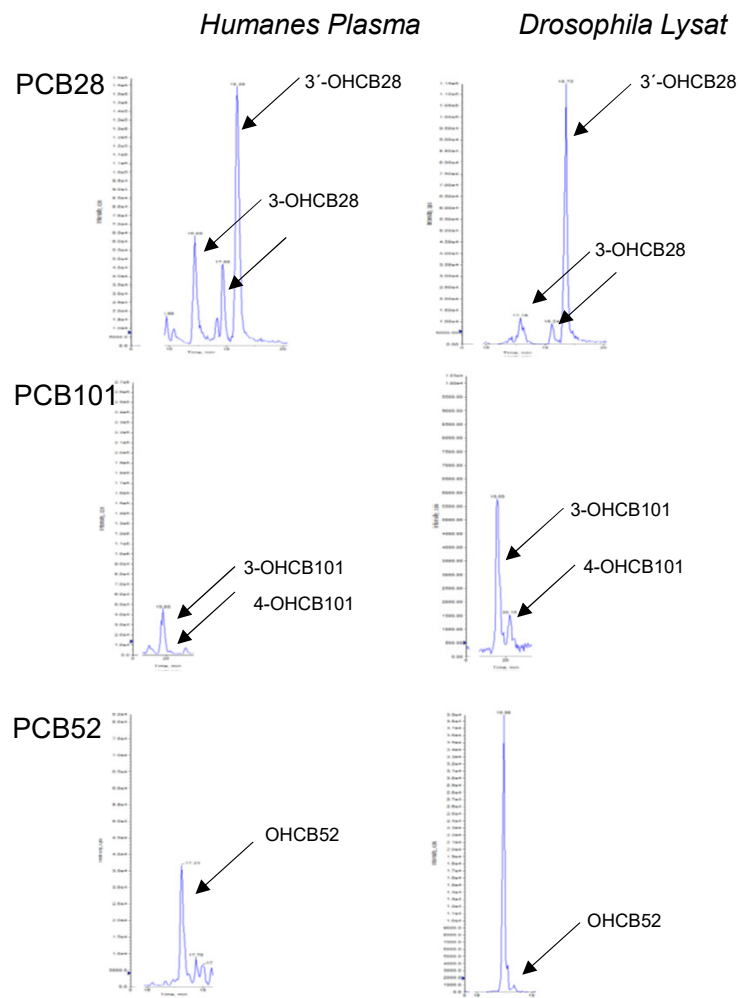
7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Publikationen:

1. Idda et al: Metabolic activation and toxicological evaluation of polychlorinated biphenyls in *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep*. 2020 Dec 9;10(1):21587.
2. Randerath et al: Partial dechlorination of 2,4,4'-trichlorobiphenyl (PCB 28) mediated by recombinant human CYP1A2. *Arch Toxicol*. 2023 Nov 2. doi: 10.1007/s00204-023-03621-1
3. Randerath et al: Arbeitstitel "Untersuchung des PCB- Metabolismus des Menschen im Hinblick auf eine individuelle Prädiktion des Erkrankungsrisikos". *Manuskript in Vorbereitung*

Anhang/Anhänge

Fütterung von *Drosophila Melanogaster* mit PCBs (Arbeitspaket 1)



Metabolite	Retention time human	Retention time drosophila
3-OHCB28	16,89	17,16
3'-OHCB28	18,39	18,72
3OHCB101	19,89	19,69
4OHCB101	20,12	20,16
OHCB52	17,23	17,14

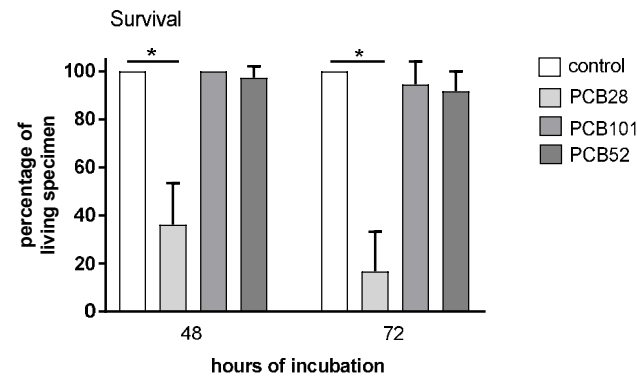


Abbildung 1 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Genetischer Screen von CYP-defizienten Drosophila-Stämmen (Arbeitspaket 1)

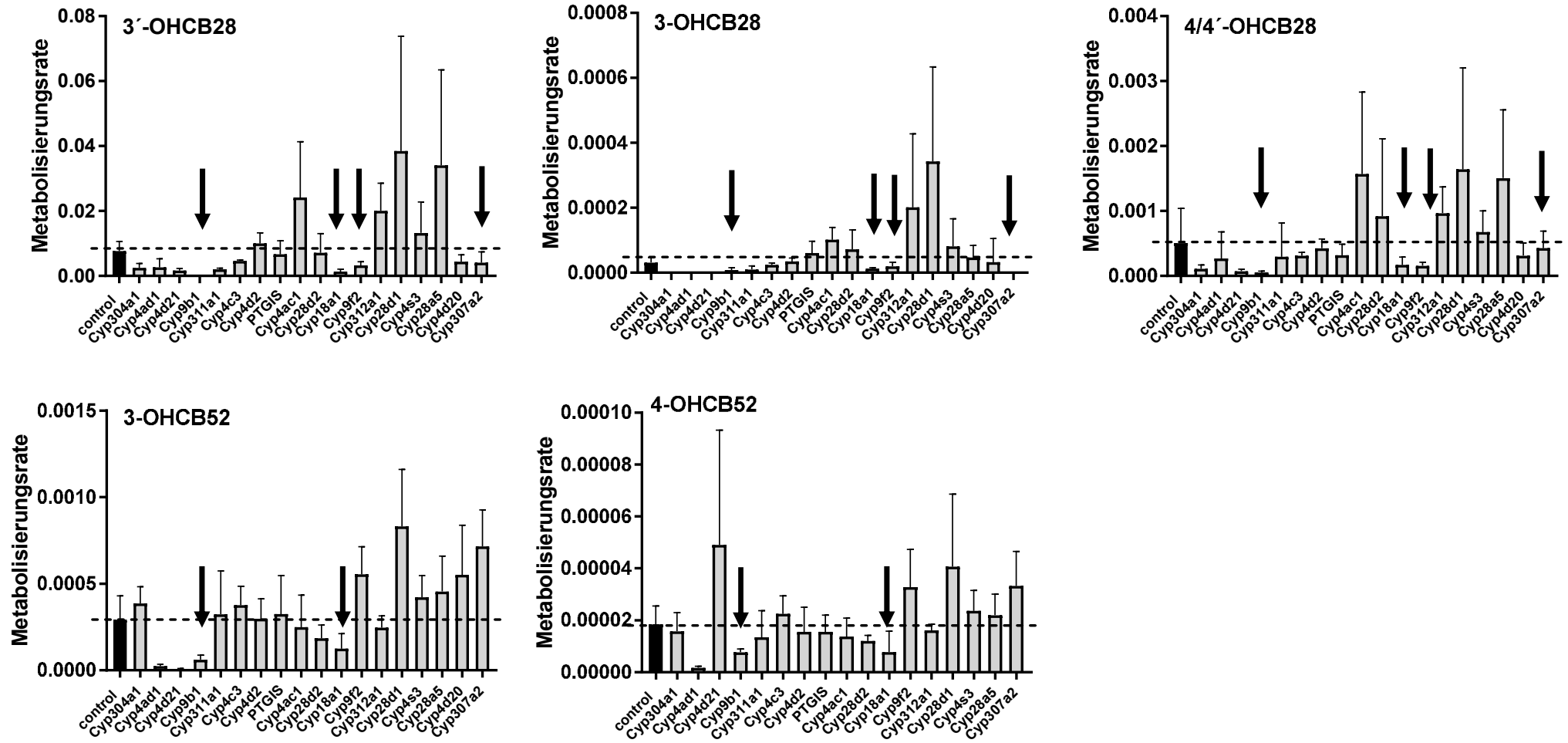


Abbildung 2 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Genetischer Screen von CYP-defizienten Drosophila-Stämmen (Arbeitspaket 1)

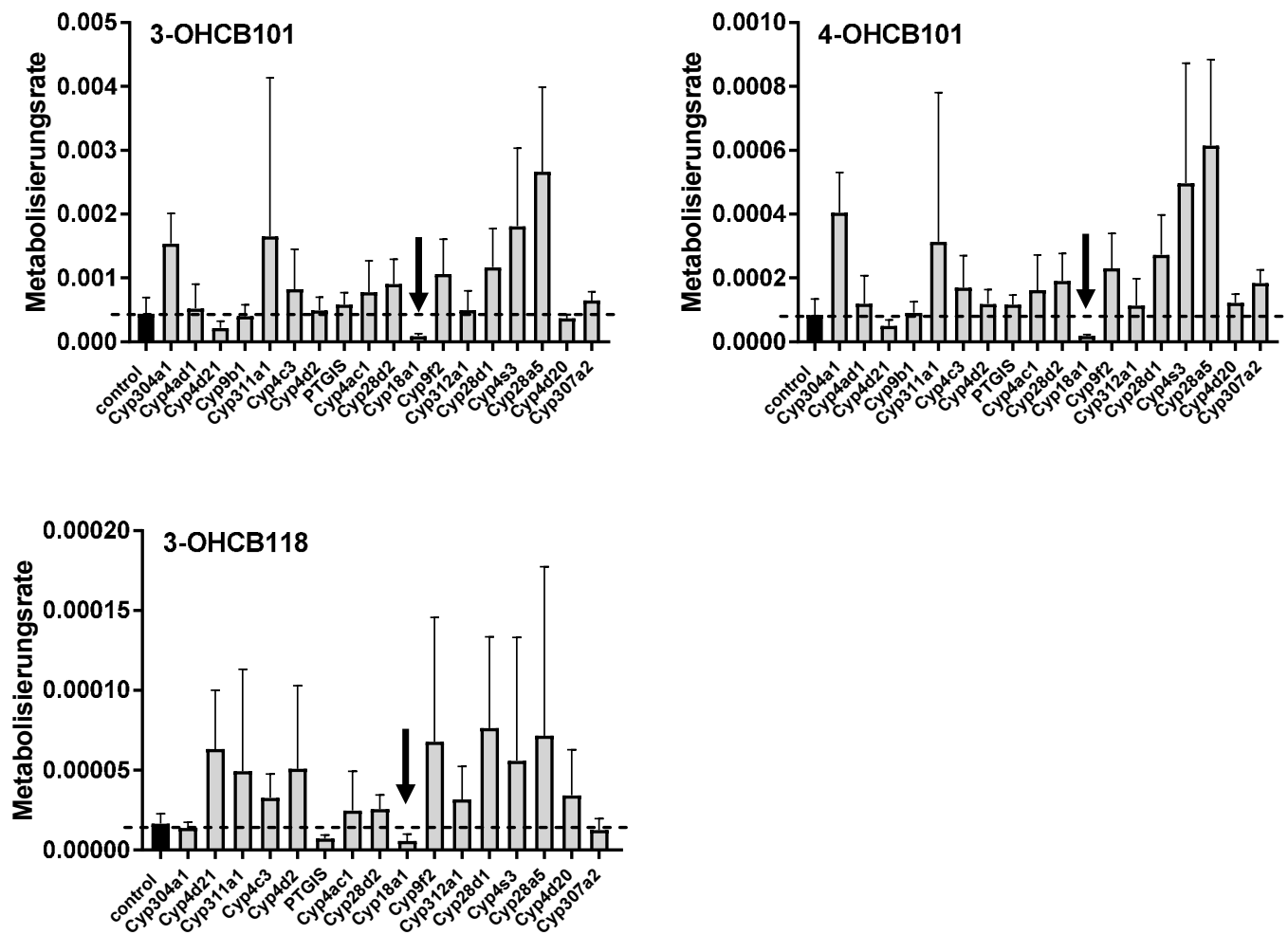
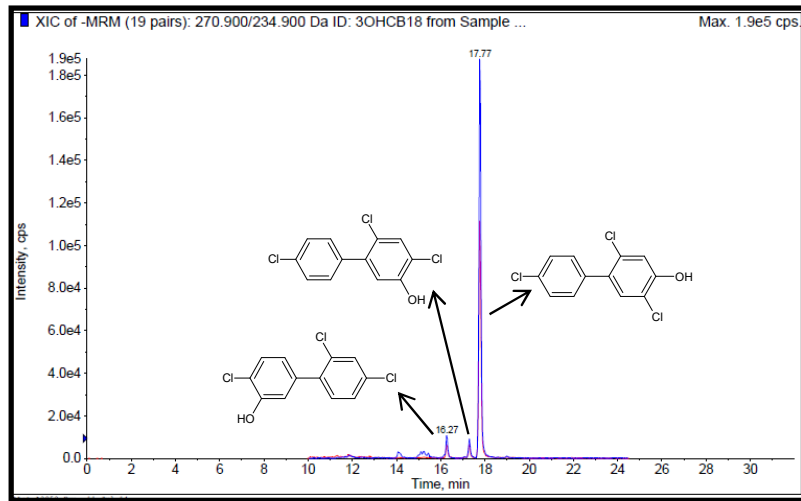
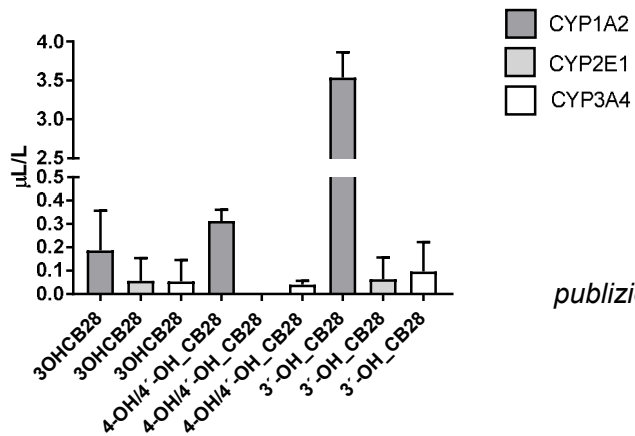
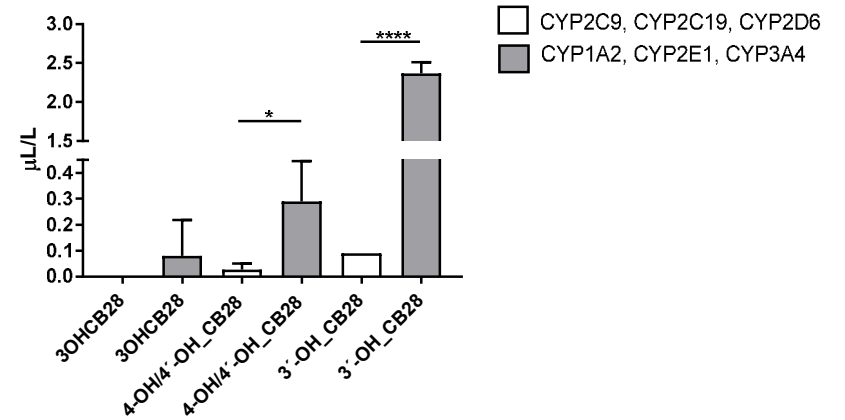


Abbildung 3 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

In vitro Metabolisierung von PCB28 (Zusatzversuch 1)



CYP1A2
 CYP2C9
 CYP2C19
 CYP2D6
 CYP2E1
 CYP3A4



publiziert in: Idda et al. Scientific reports

Abbildung 4 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Klonierung der cDNA humaner CYPs in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO und die Herstellung stabil exprimierender Zelllinien (Arbeitspaket 2)

CYP-human	Primer-Funktionalität	Ligations-ansatz	Positive Klone (bakteriell)	Orientierung	Sequenzierung	Transfektion	Stabiler Klon
CYP1A2	23/11/20 59°C	25/11/20	26/11/20	02/12/20 (Klone 1, 4, 10)	09/02/21 (Klon 4)	20/04/21	15/06/21
CYP2C8	24/11/20 59°C	18/01/21	19/01/21	29/01/21	23/03/21 (Klon 4)	16/06/21	30/08/21
CYP2C9	07/12/20 59°C, 1,5 mM MgCl ₂	25/01/21	26/01/21	03/05/21 (8,9,10)	01/09/21 (Klon 10)	12/10/21	29/11/21
CYP3A4	15/07/21 59°C, Plasmid addgene	03/08/21	04/08/21	11/08/21 (Klone 3, 4, 7)	04/10/21 (Klon 4)	26/10/21	13/12/21
CYP2A6	31/03/21 59°C	12/04/21	13/04/21	16/04/21 (Klone 2,4,7)	31/05/21 (Klon 7)	24/08/21	14/10/21
CYP2E1	31/03/21 60°C	19/04/21	20/04/21	21/04/21 (Klone 4,6,7,8,9,10)	31/05/21 (Klon4)	10/08/21	27/09/21
CYP-Drosophila							
Cyp18a1	28/05/21 55°C, 2µL Template	07/06/21	08/06/21	15/06/21 (Klon3,6,8)	13/08/21 (Klon 8)	28/09/21	18/11/21

Abbildung 5 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Charakterisierung stabil exprimierender Zelllinien: a) Western-Blotting (Arbeitspaket 2)

CYP2E1 und CYP2A6-V5

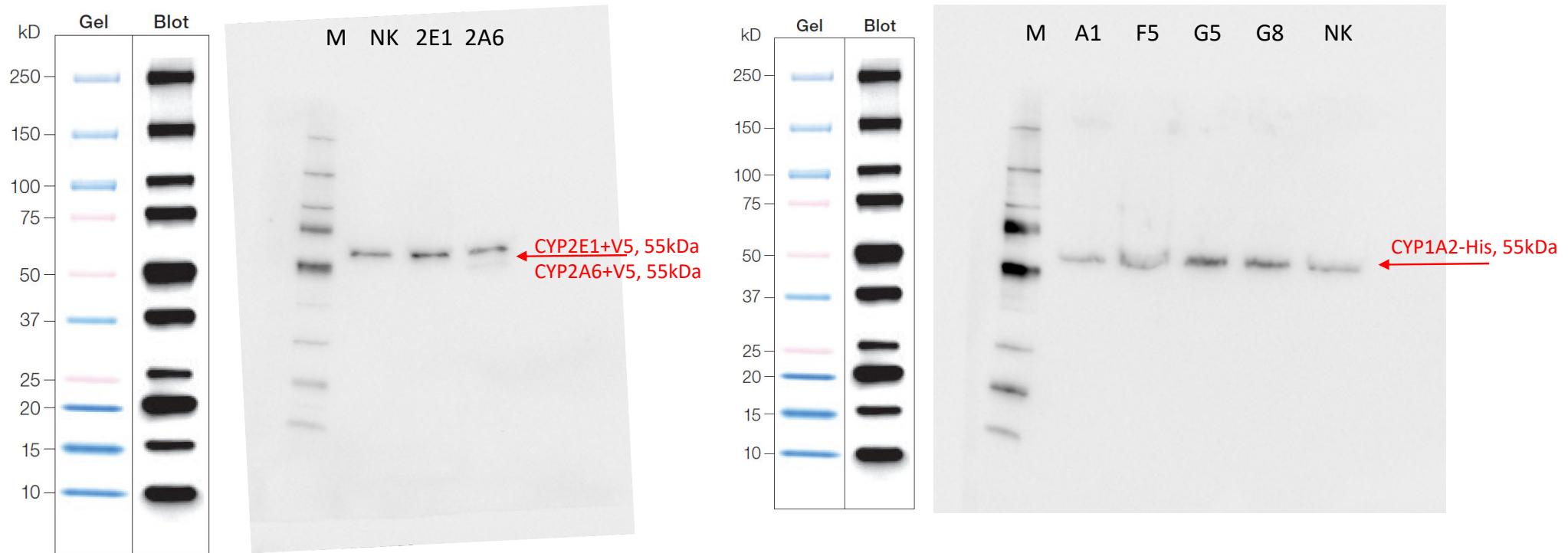
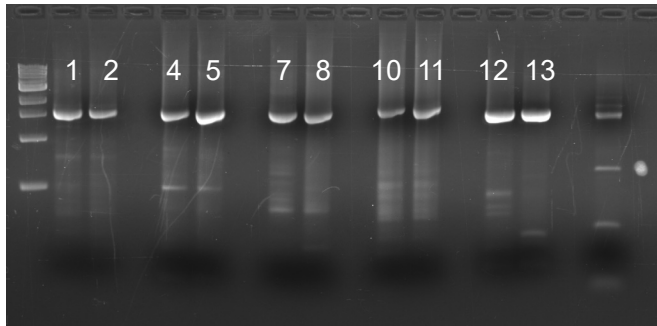
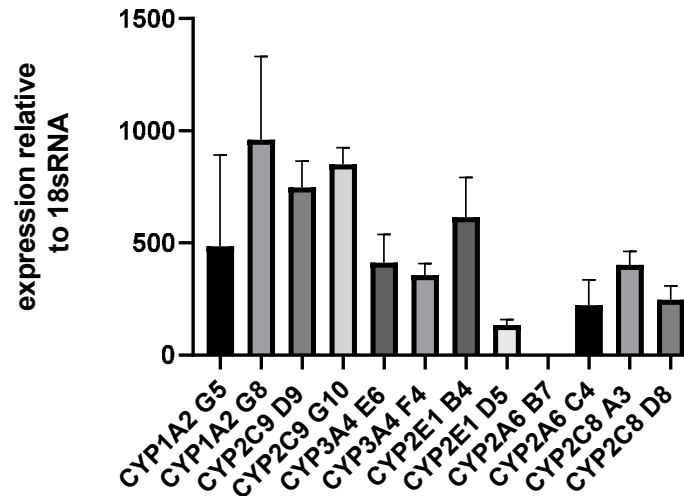


Abbildung 6 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Charakterisierung stabil exprimierender Zelllinien: b) RT-PCR (Arbeitspaket 2)



Linie (1,2) CYP2C8 Klone A3, D8
 Linie (4,5) CYP2E1 Klone B4, D5
 Linie (7,8) CYP2A6 Klone B7, C4
 Linie (10, 11) Cyp18a1 Klone B3, B9
 Linie (12, 13) CYP2C9 Klone B4, B5



Verwendete Primer:

Vorwärts:

Cyp18a1 forward: 5'-AGCTACAGCTACACCGCCATG-3'

CYP2C8 forward: 5'-ACAATGGAACCTTTTGTGGTCC-3'

CYP2C9 forward: 5'-GAGAAGGCTTCAATGGATTC-3'

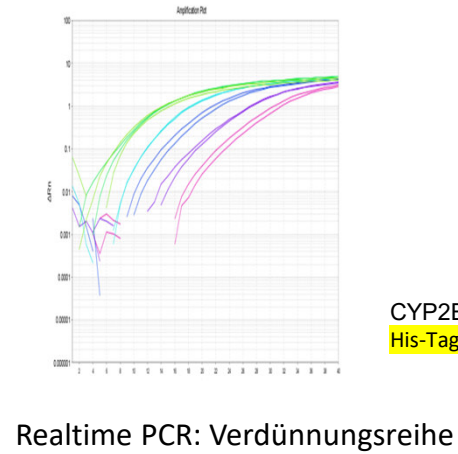
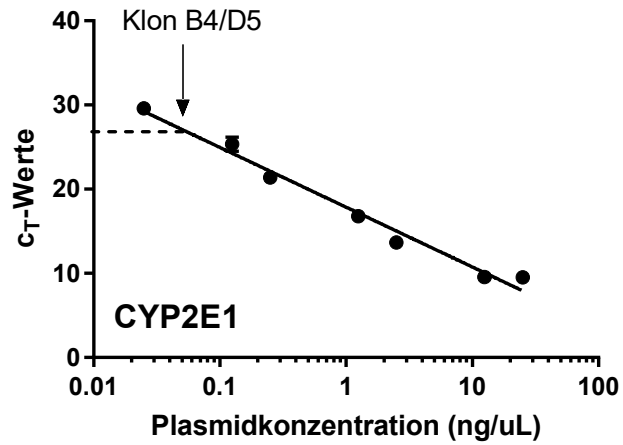
CYP2E1 forward: 5'-CCCAGCGGCACCATGTCTG-3'

CYP2A6 forward: 5'-ACCATGCTGGCCTCAGGGAT-3'

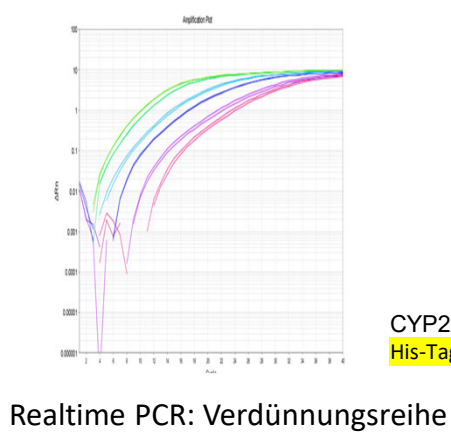
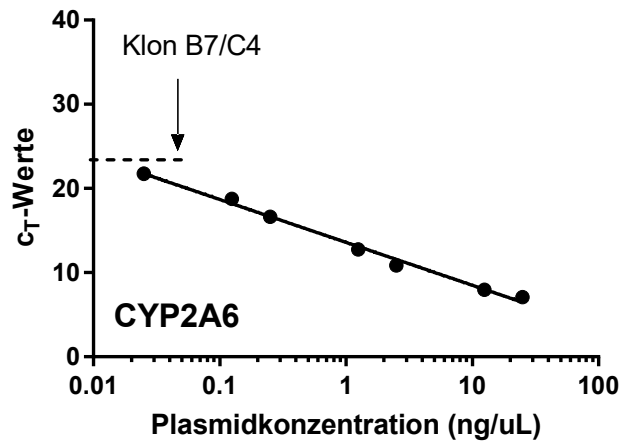
Rückwärts:

Alle: His-Tag reverse: 5'-TGGTGATGATGACCGGTACG-3'

Charakterisierung stabil exprimierender Zellen: c) PCR an genomischer DNA



CYP2E1 forward: 5'-CCCAGCGGCACCATGTCTG-3'
His-Tag reverse: 5'-TGGTGATGATGACCGGTACG-3'



CYP2A6 forward: 5'-ACCATGCTGGCCTCAGGGAT-3'
His-Tag reverse: 5'-TGGTGATGATGACCGGTACG-3'

Abbildung 8 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Funktionelle Charakterisierung stabil exprimierender Zelllinien:
Metabolisierung von PCBs (Arbeitspaket 2)

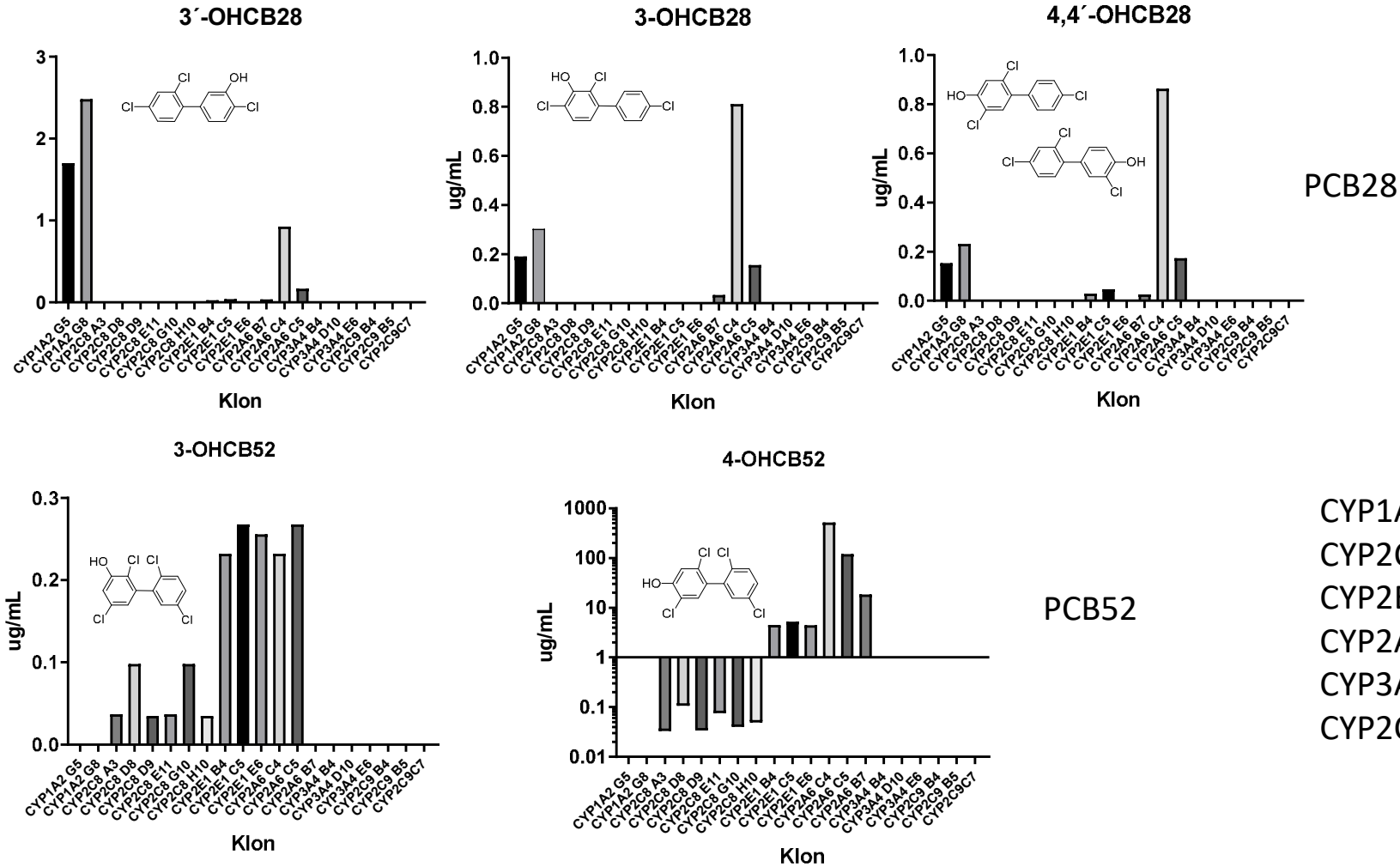
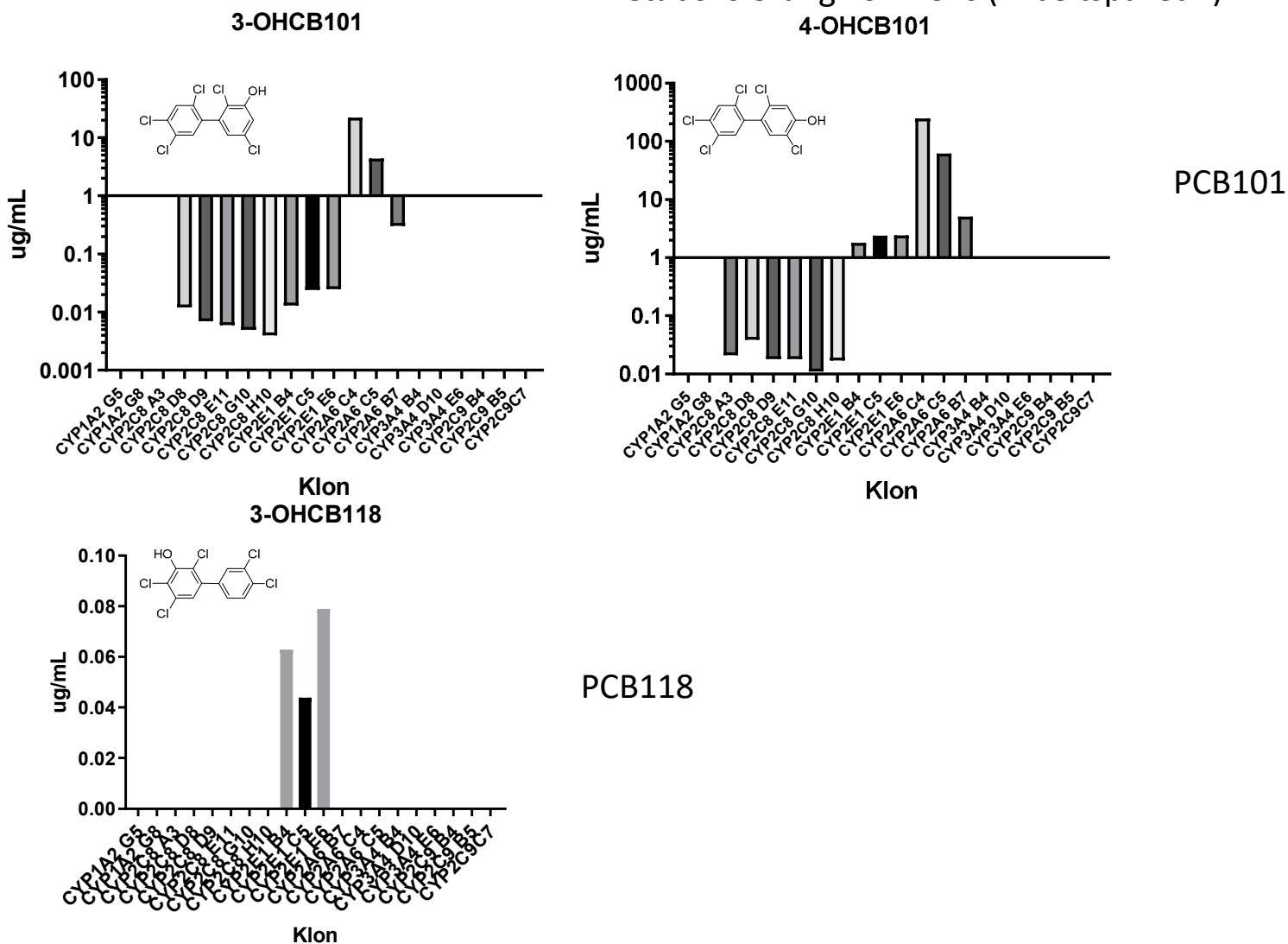


Abbildung 9 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Funktionelle Charakterisierung stabil exprimierender Zelllinien:
Metabolisierung von PCBs (Arbeitspaket 2)



CYP1A2: 2 Klone
CYP2C8: 6 Klone
CYP2E1: 3 Klone
CYP2A6: 3 Klone
CYP3A4: 3 Klone
CYP2C9: 3 Klone

Abbildung 10 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Nachweis einer durch Bioaktivierung vermittelten PCB-Toxizität in Cytochrom P450 Isoenzym transgenen Zelllinien: Bestimmung der Atmungsaktivität (Arbeitspaket 2)

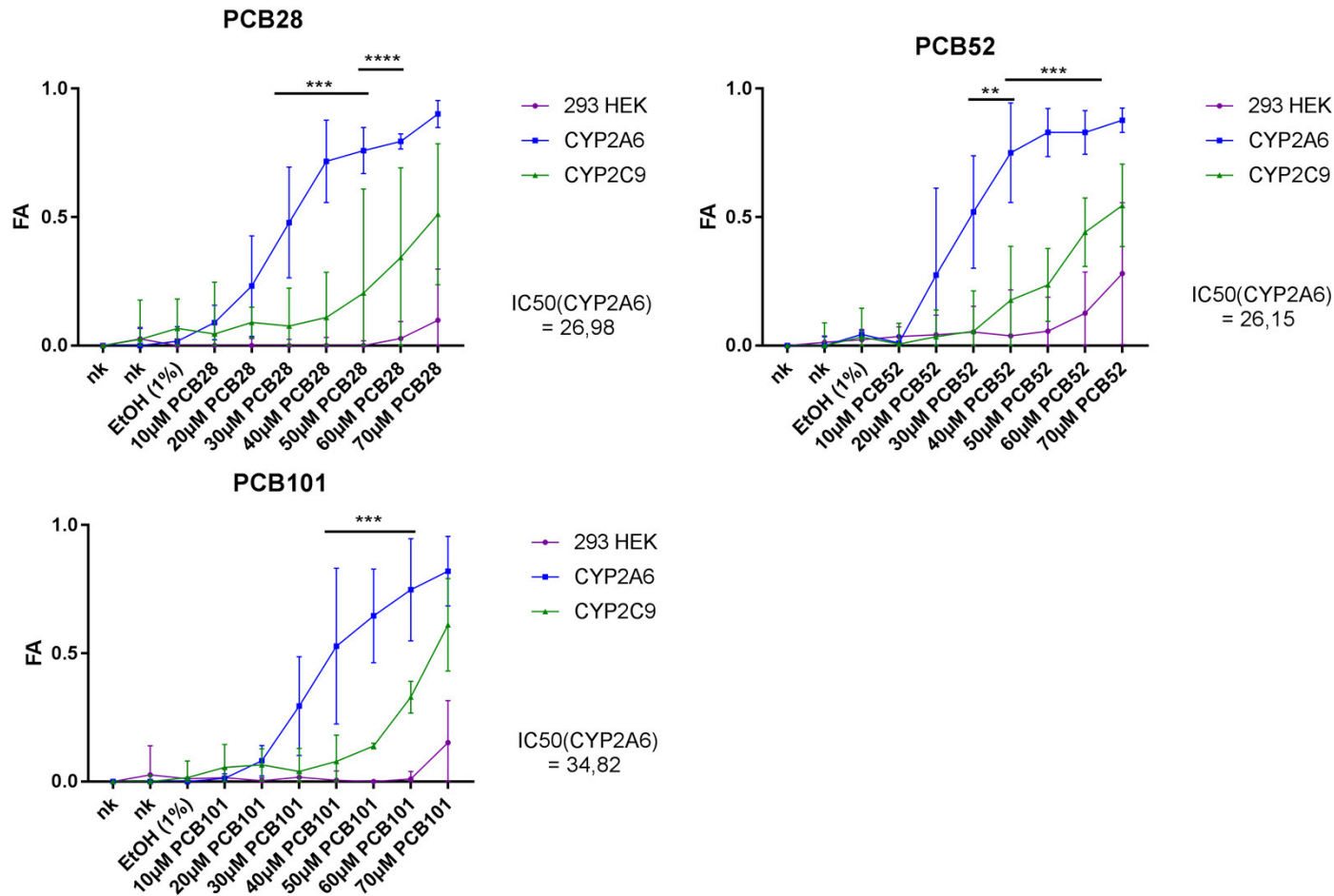


Abbildung 11 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Nachweis einer durch Bioaktivierung vermittelten PCB-Toxizität in Cytochrom P450 Isoenzym transgenen Zelllinien: Comet-Assay (Arbeitspaket 2)

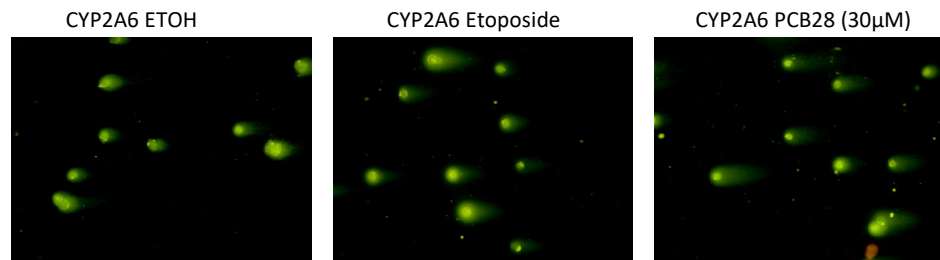
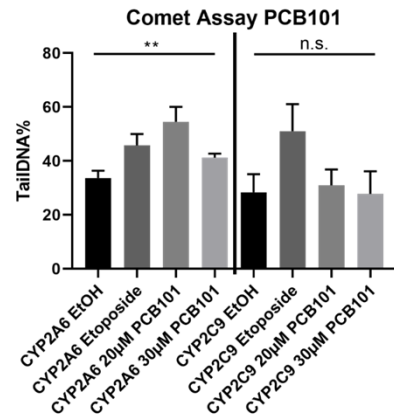
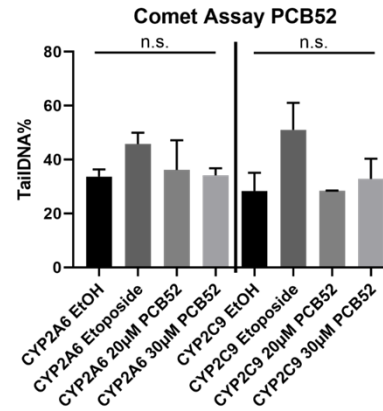
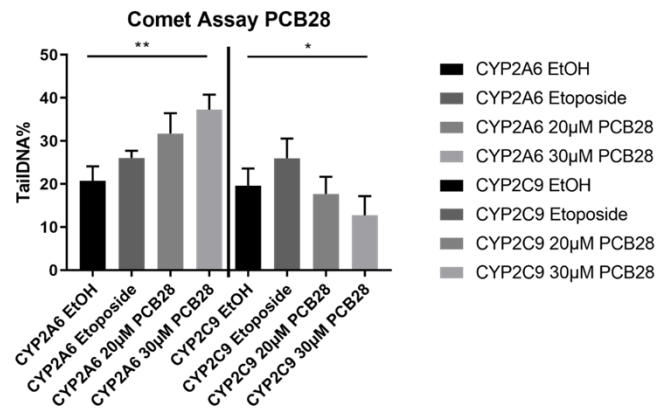


Abbildung 12 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Nachweis einer durch Bioaktivierung vermittelten PCB-Toxizität in Cytochrom P450 Isoenzym transgenen Zelllinien: H2Ax-Phosphorylierung (Arbeitspaket 2)

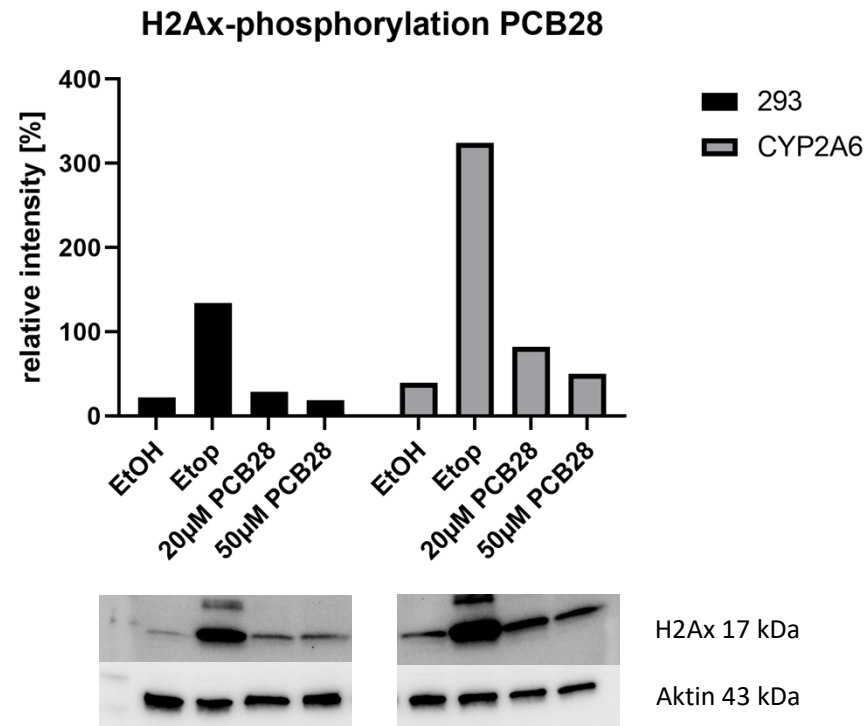


Abbildung 13 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Nachweis einer durch Bioaktivierung vermittelten PCB-Toxizität in Cytochrom P450 Isoenzym transgenen Zelllinien: Mikrokern-Assay (Arbeitspaket 2)

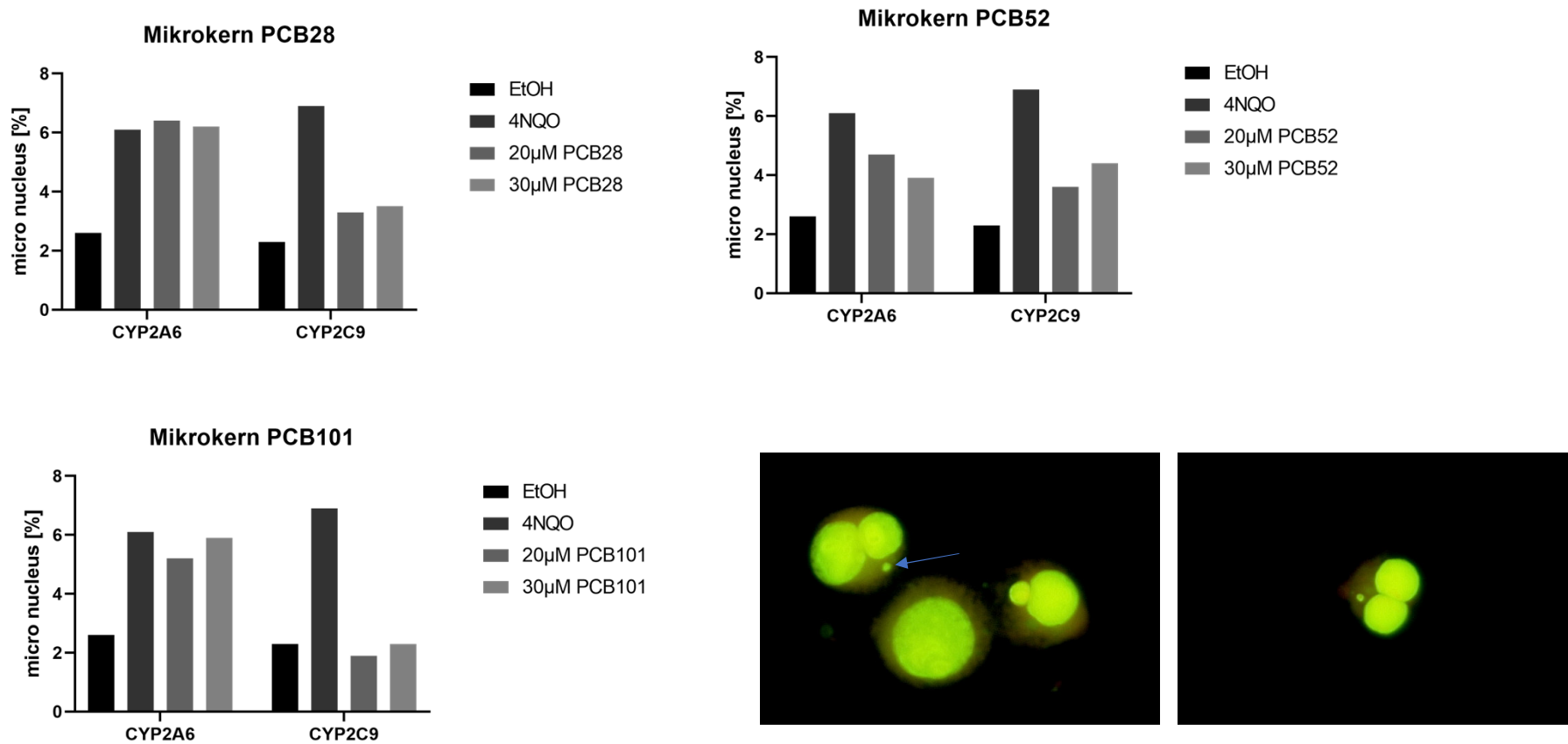


Abbildung 14 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Identifizierung einer metabolischen Dechlorierung von PCB28 durch CYP1A2 und CYP2A6 (Zusatzversuch 2)

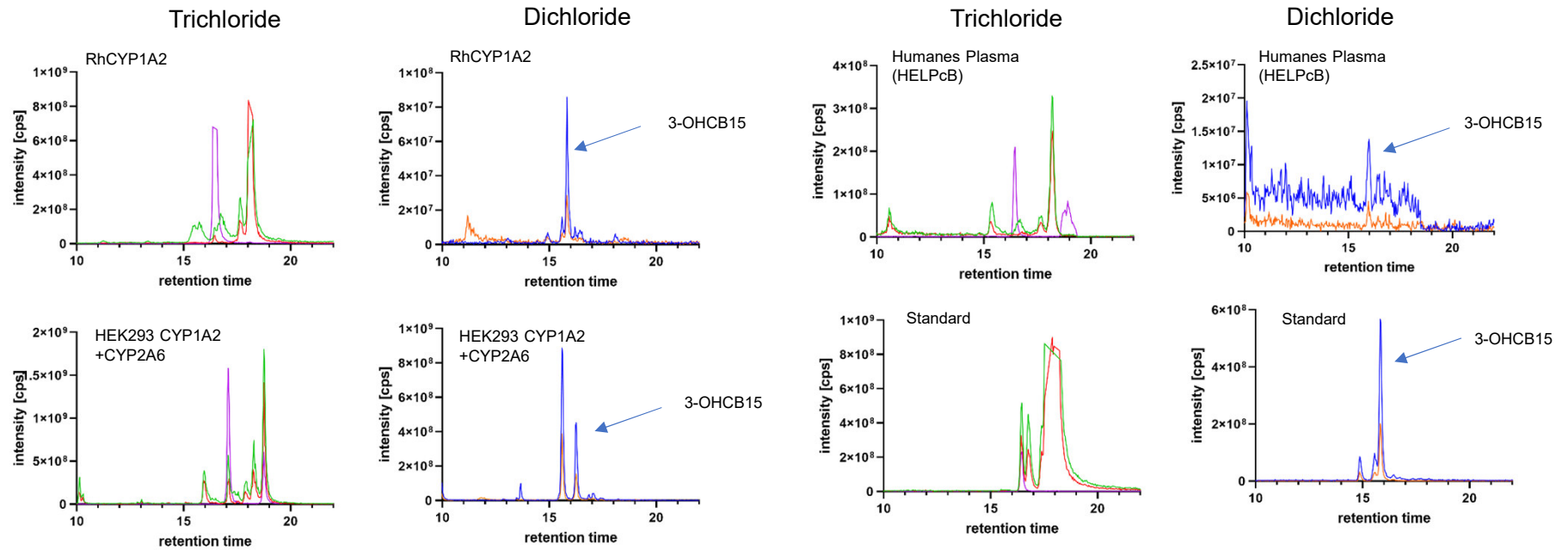


Abbildung 15 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Identifizierung einer metabolischen Dechlorierung von PCB28 durch CYP1A2 und CYP2A6 (Zusatzversuch 2)

abbreviation	metabolite	retention time [min]	concentration [$\mu\text{g/L}$]	
M1/M2	5-OHCB28/ 4'-OHCB31	17,09	0	HEK293human + 20 μM PCB28
M3	4-OHCB25	18,28	0,01	
M4	3'-OHCB28	18,76	0,01	
DM	3-OHCB15	16,25	0	
M1/M2	5-OHCB28/ 4'-OHCB31	17,09	0,21	HEK293humanCYP 1A2 + 20 μM PCB28
M3	4-OHCB25	18,28	0,07	
M4	3'-OHCB28	18,76	1,02	
DM	3-OHCB15	16,25	0,16	
M1/M2	5-OHCB28/ 4'-OHCB31	17,36	0,11	rhCYP1A2 + PCB28 (bactosomes)
M3	4-OHCB25	18,57	0,12	
M4	3'-OHCB28	19,05	2,14	
DM	3-OHCB15	16,66	0,10	
M1/M2	5-OHCB28/ 4'-OHCB31	17,57	3,15/2,17	Human Plasma of PCB28 exposed individual
M3	4-OHCB25	18,63	2,38	
M4	3'-OHCB28	19,16	16,41	
DM	3-OHCB15	16,83	2,60	

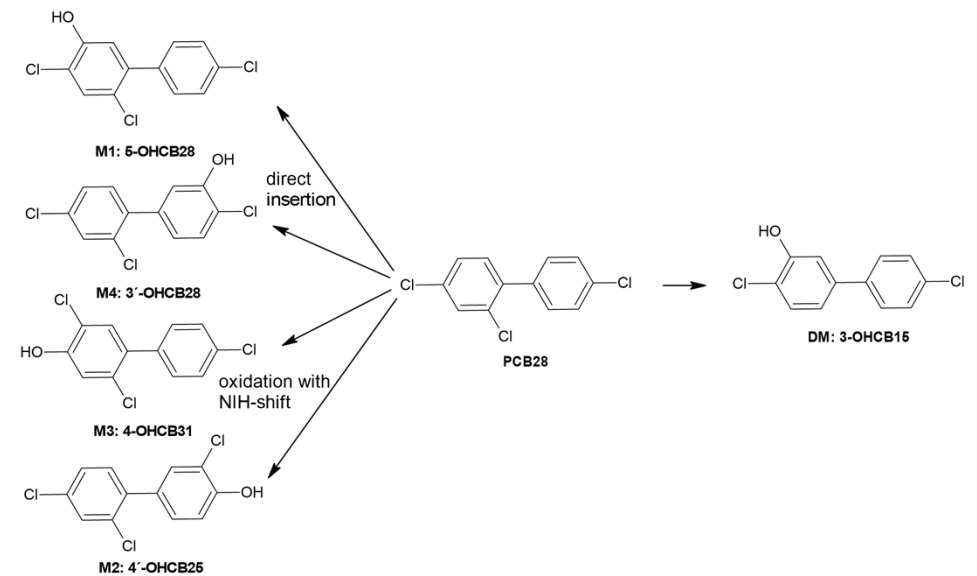


Abbildung 16 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

Identifizierung einer metabolischen Dechlorierung von PCB28 durch CYP1A2 und CYP2A6 (Zusatzversuch 2)

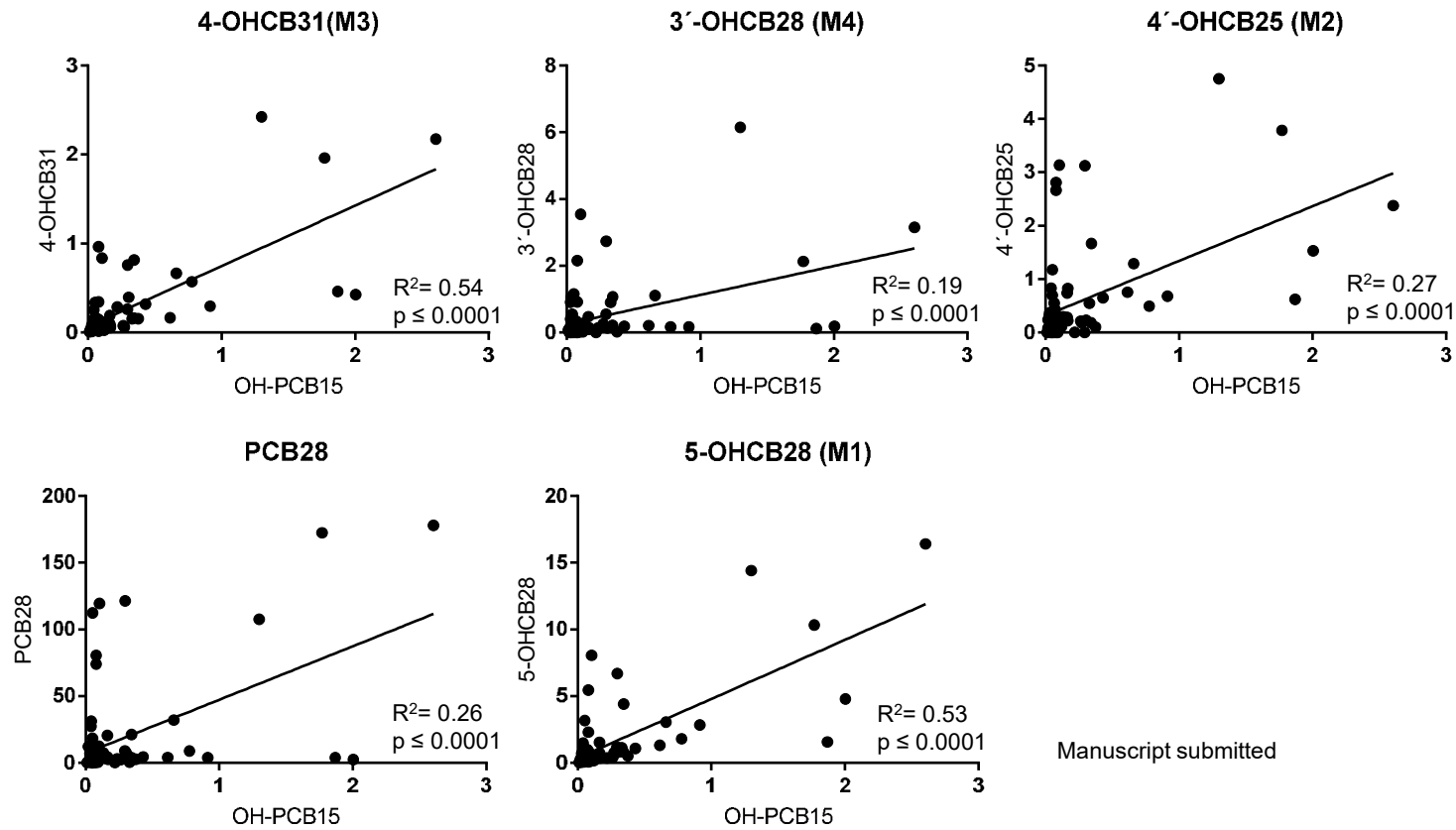


Abbildung 17 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

In vivo Charakterisierung von Cytochrom-p450 Enzymen bei erhöhter innerer PCB-Belastung (Zusatzversuch 3)

CYP-Enzym	Testsubstanz	Dosis	Arte der Gabe
CYP1A2 / CYP2A6	Coffein	50mg	p.o.
CYP2B6	Efavirenz	50 mg	p.o.
CYP2D6	Metoprolol	12,5 mg	p.o.
CYP3A	Midazolam	1 mg	p.o.
CYP2C9	Torasemid	2,5 mg	p.o.
CYP2C19	Omeprazol	10 mg	p.o.

Abbildung 18 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

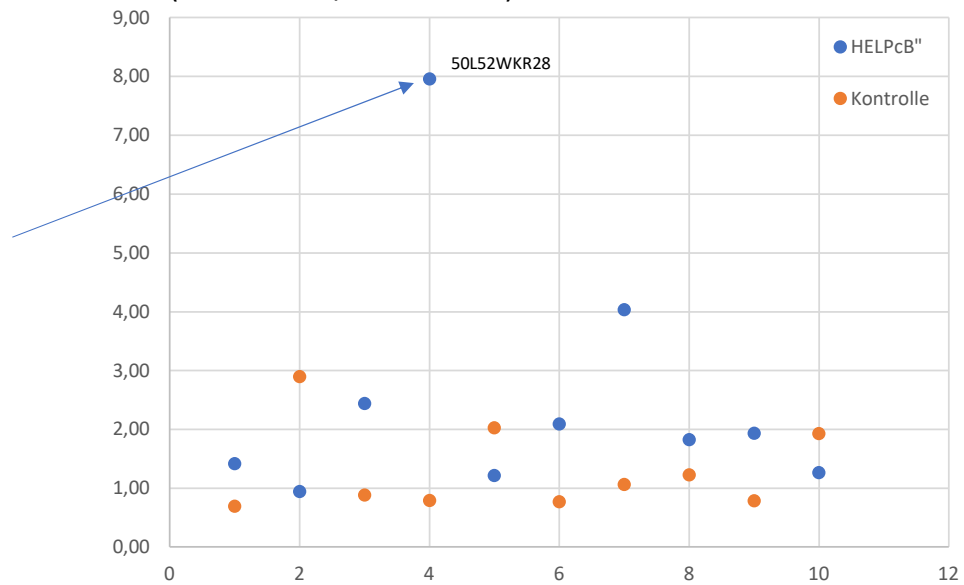
In vivo Charakterisierung von Cytochrom-p450 Enzymen bei erhöhter innerer PCB-Belastung (Zusatzversuch 3)

Zeit (min)	0	15	30	45	60	90	120	150	180	240	300	360	420	480	1440
Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Blutentnahme	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Spontanurin	x				x		x			x		x			x
Testsubstandsgabe	x														
Monitorüberwachung	x	x	x	x	x	x	x	x	x						
EKG	x														
Adverse event monitoring	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

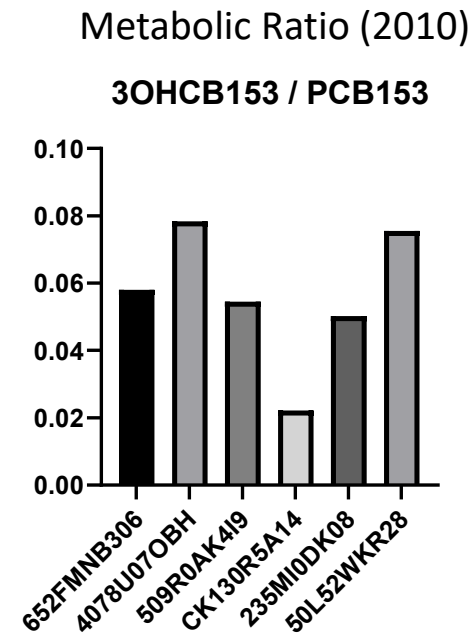
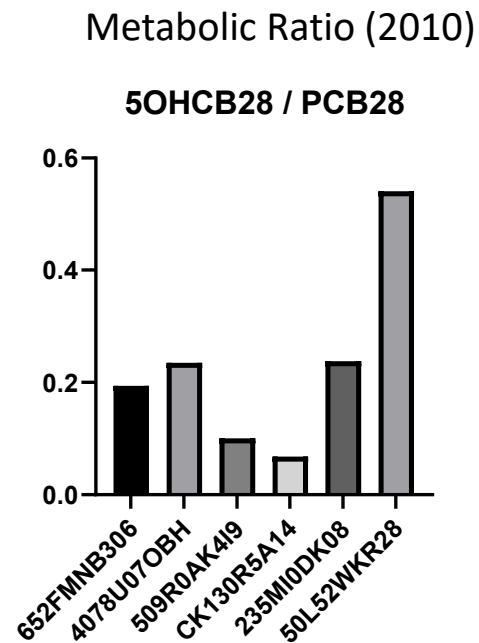
Abbildung 19 zu Abschlussbericht FB295, Berichtszeitraum 01.02.2020-31.07.2023

In vivo Charakterisierung von Cytochrom-p450 Enzymen bei erhöhter innerer PCB-Belastung (Zusatzversuch 3)

Pharmakologische Phänotypisierung CYP2A6:
(MR:17DMU/Paraxanthin)



In vivo Charakterisierung von Cytochrom-p450 Enzymen bei erhöhter innerer PCB-Belastung (Zusatzversuch 3)





OPEN

Metabolic activation and toxicological evaluation of polychlorinated biphenyls in *Drosophila melanogaster*

T. Idda^{1,7}, C. Bonas^{1,7}, J. Hoffmann¹, J. Bertram¹, N. Quinete^{1,2}, T. Schettgen¹, K. Fietkau³, A. Esser¹, M. B. Stope⁴, M. M. Leijs³, J. M. Baron³, T. Kraus¹, A. Voigt^{5,6} & P. Ziegler¹✉

Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) is initiated by cytochrome P450 (CYP) enzymes and includes PCB oxidation to OH-metabolites, which often display a higher toxicity than their parental compounds. In search of an animal model reflecting PCB metabolism and toxicity, we tested *Drosophila melanogaster*, a well-known model system for genetics and human disease. Feeding *Drosophila* with lower chlorinated (LC) PCB congeners 28, 52 or 101 resulted in the detection of a human-like pattern of respective OH-metabolites in fly lysates. Feeding flies high PCB 28 concentrations caused lethality. Thus we silenced selected CYPs via RNA interference and analyzed the effect on PCB 28-derived metabolite formation by assaying 3-OH-2',4,4'-trichlorobiphenyl (3-OHCB 28) and 3'-OH-4',4,6'-trichlorobiphenyl (3'-OHCB 28) in fly lysates. We identified several drosophila CYPs (dCYPs) whose knockdown reduced PCB 28-derived OH-metabolites and suppressed PCB 28 induced lethality including dCYP1A2. Following in vitro analysis using a liver-like CYP-cocktail, containing human orthologues of dCYP1A2, we confirm human CYP1A2 as a PCB 28 metabolizing enzyme. PCB 28-induced mortality in flies was accompanied by locomotor impairment, a common phenotype of neurodegenerative disorders. Along this line, we show PCB 28-initiated caspase activation in differentiated fly neurons. This suggested the loss of neurons through apoptosis. Our findings in flies are congruent with observation in human exposed to high PCB levels. In plasma samples of PCB exposed humans, levels of the neurofilament light chain increase after LC-PCB exposure, indicating neuronal damage. In summary our findings demonstrate parallels between *Drosophila* and the human systems with respect to CYP mediated metabolism and PCB mediated neurotoxicity.

The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified polychlorinated biphenyls (PCBs) as carcinogenic to humans (Group 1)¹. IARC also points to the importance of metabolic activation for the toxic and carcinogenic effects of PCBs². Our own work shows genotoxic and thus potentially carcinogenic effects of activated PCB 28 metabolites in vitro³. The metabolic activation of PCBs is initiated by cytochrome p450 (CYP) family members and includes the oxidation of PCBs to OH-PCBs. OH-PCBs are expected to be readily conjugated and excreted, however some OH-PCBs have been shown to be strongly retained in human blood by enterohepatic circulation^{4,5}. OH-PCBs can potentially reach any hydrophilic compartment in the body, where they are oxidized in peripheral tissues by enzymatic catalysis (e.g. myeloperoxidase, prostaglandin-H-synthase) or autoxidized to catechols or hydroquinones, which after further oxidation to quinones and semichinones can covalently bind to biological macromolecules such as purine bases or proteins (adduct formation)^{6–8}. Compared to their parental compounds OH-PCBs often show equal or higher toxicity, greater distribution in the human

¹Institute for Occupational, Social and Environmental Medicine, RWTH Aachen University, Aachen, Germany. ²Department of Chemistry and Biochemistry, Florida International University Florida, Florida, USA. ³Department of Dermatology and Allergology, RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany. ⁴Department of Gynecology and Gynecological Oncology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany. ⁵Department of Neurology, University Medical Center, RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany. ⁶JARA-BRAIN Institute Molecular Neuroscience and Neuroimaging, Forschungszentrum Jülich GmbH, RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany. ⁷These authors contributed equally: T. Idda and C. Bonas. ✉email: pziegler@ukaachen.de

body and longer half-lives^{9,10}. With the CYP- dependent metabolism of PCBs, excessive amounts of reactive oxygen species (ROS) can be generated, which mediate cytotoxic effects. It has been shown that PCBs cause oxidative stress in nerve cell cultures as well as in the hippocampus, the cerebral cortex and the cerebellum of rats^{11,12}, which in turn induces apoptosis and necrosis. In PCB treated rats, ROS oxidized proteins to protein-carbonylene and inhibited the function of the enzyme acetylcholine esterase and a number of other enzymes involved in the elimination of oxygen radicals¹³. In the same study, an accumulation of hydrogen peroxide and an increased lipid peroxidation were demonstrated. These results suggested that reactive intermediates of the PCB metabolism trigger neurodegenerative processes in the brain, which can eventually lead to the loss of neurons. These findings are supported by the fact, that behavioral studies in animals show that PCBs influence learning behavior, memory and fine motor skills¹⁴. Similar effects are documented in humans after accidental exposure to PCBs^{15–18}.

To predict adverse effects of PCB exposure on humans, simple animal models that reflect the human situation as accurately as possible are invaluable. We therefore asked whether *Drosophila melanogaster* might be a suitable model to analyze the metabolism of lower chlorinated PCBs and the associated toxicity. We knocked down selected Cyps in *Drosophila* (dCyps) using RNA interference (RNAi) in order to identify isoenzymes responsible for the conversion of the indicator congener 2,4,4'-trichlorobiphenyl (PCB 28) in vivo. To test whether human orthologs of identified dCyps were involved in PCB28 hydroxylation we used a human liver-like CYP-cocktail. Finally, we investigated the PCB 28-mediated lethality in *Drosophila* using the neuron-specific expression of an apoptosis-sensitive biosensor.

Material and methods

Fly stocks. Flies were raised and maintained on standard cornmeal-yeast medium under a 12/12 h light-dark cycle at 25 °C. The fly stocks used were obtained either from the Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC, www.vdrc.at), or the Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC, www.bdsf.indiana.edu). Strains with GAL4-dependent expression of short hairpins (sh) to induce gene silencing via RNA interference (RNAi) of the following genes were used: sh-Cyp4ac1 (BDSC #67005), sh-Cyp307a2 (VDRC #330647), sh-Cyp18a1 (BDSC #64923), sh-Cyp9f2 (BDSC #67806), sh-Cyp4d2 (BDSC #42600), sh-Cyp4d1 (BDSC #52979), sh-Cyp311a1 (BDSC #67792), sh-Cyp312a1 (VDRC #101231), sh-Cyp28d2 (BDSC #61282), sh-Cyp28d1 (BDSC #53892), sh-Cyp4d21 (BDSC # 29238), sh-Cyp28a5 (BDSC #77405), sh-4d20 (BDSC #77341), sh-Cyp4s3 (BDSC #66978), sh-Cyp4c3 (BDSC #64213), h-Cyp304-a1 (BDSC #67805). Canton-S (BDSC #64349) served as wild type control. GAL4 drivers used to activate UAS-controlled expression of above mentioned sh-lines were actin-GAL4 (BDSC #4414) and daughterless-GAL4 (BDSC #55850) for ubiquitous expression. The driver elav-GAL4 (BDSC #458) was used to induce pan neural expression and/or GMR-GAL4 (BDSC #1104) to induce retina specific expression of transgenes under UAS-control. UAS-Apoliner (BDSC #32122) was used to detect caspase activation in flies after PCB 28 treatment.

Fly crossing. In genomic profiling experiments, ubiquitous expression of shRNA to silence certain Cyps was achieved by crossing virgin act-GAL4 driver females with male flies of the respective sh-RNA strain. In the F1 generation, carriers of the ubiquitous Cyp knockdown were selected and used for experiments. To investigate the influence of certain Cyps on PCB 28-mediated neurotoxicity, we used Apoliner, a biosensor for caspase activation and thus an indicator of apoptosis. Neuronal specific expression of the caspase biosensor was achieved by pairing parental Apoliner line UAS-GMR strains with the neuronal driver strain elav-GAL4. Age matched females were transferred to PCB 28-containing food and analyzed for the induction of apoptosis by flow cytometry.

PCB administration. PCBs were administered through artificial fly food (2% agar, 2% LB broth, 4% sucrose) to flies. For initial experiments food containing 100 µM PCB (PCB 28, PCB 101 or PCB 52) was feed to flies to determine lethality. For metabolism screening, 20 µM PCB were administered via the fly food. Lethality screenings with Cyp knockdowns were performed using a 60 µM PCB 28 concentration in the fly food and viability was assayed after 48 h. Metabolism screenings were performed with a sublethal concentration of 20 µM PCB 28 for 24 h. Lethality screenings with Apoliner caspase biosensor flies were performed on 10 to 40 µM PCB 28 for 24 h. For detection of free GFP by flow cytometry, the duration of the PCB treatment was reduced to 4 h.

Analysis of PCB metabolites by online solid phase extraction (SPE) method coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Male flies (≤ 5 days post eclosion) were transferred to artificial fly food containing sub-lethal concentrations of PCBs as indicated. After 24 h on PCB food, flies were killed by freezing (freezer – 25 °C; 15 min) and washed with PBS to remove residual PCB. Fly lysates were generated in RIPA buffer by mechanical disruption in a speed mill (Analytic Jena) using ceramic beads. Lysates were cleared of exoskeleton and cell debris by centrifugation. For analytical preparations, *Drosophila* lysates were prepared following the procedures previously reported in¹⁹. In brief, *Drosophila* lysate (equivalent of 12 flies) were diluted 1:2 with 80 µL of ammonium acetate buffer 0.1 mol L⁻¹ (pH = 5.3). 100 µL of this dilution were further incubated with 100 µL of ammonium acetate buffer 0.1 mol L⁻¹ (pH = 5.3) and 5 µL of β-Glucuronidase/Arylsulfatase enzyme overnight in a drying oven at 37 °C for enzymatic hydrolysis in order to release conjugated compounds. 50 µL of a mix of internal standards (10 ng mL⁻¹) and 600 µL of methanol were added to the samples, then mixed by vortexing for 1 min and centrifuged for 10 min at 4500 rpm for protein precipitation. The individual supernatants were transferred to glass LC vials and evaporated until approximately 50 µL at 45 °C under a gentle stream of nitrogen. Finally, 0.1 mol L⁻¹ ammonium acetate buffer was added to a final volume of 100 µL and then transferred to an insert for analysis. The online solid phase extraction

(SPE) method coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been previously described by Quinete¹⁹ and was carried out using an API 5500 QTrap mass spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany) equipped with electrospray ionization (ESI) interface.

Incubation of PCB 28 with a liver-like CYP-cocktail. Recombinantly expressed CYP-bactosomes (coexpressed with CYP-reductase in *Escherichia coli*) were obtained from Tebu-Bio (Offenbach, Germany) and mixed in the concentrations described^{20,21}. Incubations contained PCB 28 (100 μ M), HEPES buffer (50 mM pH 7.4), $MgCl_2$ (30 mM) and NADPH (1 mM) in a total volume of 500 μ L. Incubations were performed in triplicates and initialized by adding NADPH after 3 min of pre-incubation at 37 °C and terminated after 60 min. Control samples were run in the absence of substrate, in the absence of NADPH or using heat-deactivated enzymes. Analysis was performed using GC/MS and LC/MS as described²².

Detection of cleaved GFP-fragment by Western-blot and flow cytometry. Male flies with pan neural and retinal expression of the caspase biosensor Apoliner were kept on artificial fly food containing increasing concentrations of PCB 28 as indicated. Males elav-GAL4 flies without expression of the caspase sensor served as controls. After 4 h of incubation, vital flies were anaesthetised with CO_2 and the heads prepared. Head lysates were generated in PBS with 2% FCS by mechanical disruption in a shaker with the support of glass beads. Lysates were passed through a cell sieve (70 μ m) and centrifuged up to 12,000 \times g for a few seconds. The supernatant was discarded and the cell pellet was resolved in 250 μ L PBS with 2% FCS for analysis by flow cytometry at FACSCanto II (BD, Franklin Lakes NJ, USA). For Western-blotting, head lysates were generated in RIPA buffer (10 μ l per fly head) by mechanical disruption in a bead ruptor with the support of ceramic beads and subsequent centrifugation of exoskeleton and cell debris. For immune-blotting, proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a 0.2 μ m Trans-Blot Turbo Mini PVDF Membran (BioRad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's specifications. The membrane was blocked with a TBST buffer (200 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 1.5 M NaCl, 1% (v/v) Tween-20, pH 7.5) containing 5% milk powder for 1 h at room temperature and incubated with the primary anti-GFP antibody (Cat. # ab6556, Abcam, Cambridge, UK) diluted 1:5,000 overnight at 4 °C. The membrane was washed three times with a TBST buffer for 15 min and treated with a suitable secondary anti-rabbit IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (Cat. # ab205718, Abcam, Cambridge, UK) diluted 1:10,000 for 1 h at room temperature. β -Actin served as control and was detected with an primary anti- β -Actin antibody (JLA20, DSHB, Iowa, IA, USA) diluted 1:1000 and a suitable secondary anti-mouse IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (Cat. # ab205719, Abcam, Cambridge, UK) diluted 1:1000 for 1 h. Bound antibodies were detected by chemiluminescence using and ECL-kit according to manufacturers instructions (ECL, Merck Millipore, Burlington, MA, USA).

Neurofilament 3 ELISA. Neurofilament 3 content in plasma samples of the HELPCB-Cohort (Kraus et al. 2012) was determined using a commercial ELISA Kit (Human Neurofilament 3 ELISA Kit Elabscience, Houston, TX, USA) according to the manufacturer's specifications. Plasma was diluted 1:5 with sample dilution buffer and subsequently 100 μ L were used for the ELISA. Samples from the same donors were taken at two different time points (2011 and 2015).

Statistical analysis. Results are given as mean values \pm standard deviation of at least three technical replicates or three biological replicates as indicated in the respective figure. In all fly experiments, one biological replica corresponds to 12 flies. All analysis were conducted with the software SAS 9.4²³. We used the GLIMMIX procedure to conduct an ANOVA-test where indicated. The distribution of the dependent variables if metric were observed by histograms, Q-Q-plots and Shapiro-Wilk and Komolgorov-Smirnov tests. A post hoc Tukey-test was applied to account for multiple comparison. If the independent variable was metric, we tested the covariance between the groups and adjusted for inhomogeneous variances if required. Unless otherwise noted, significances in the figures are as * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$; **** $p \leq 0.0001$. Non-significant differences are not indicated.

Results

Bioactivation of PCB 28, PCB 101 and PCB 52 in *Drosophila melanogaster*. We have recently identified more than 20 OH-PCBs congeners in human plasma samples from individuals with high PCB body exposure due to occupational exposure in a transformer recycling company²⁴. Congeners included metabolites of PCB 28: 3-OH-2',4,4'-trichlorobiphenyl (3-OHCB 28), 3'-OH-4',4,6'-trichlorobiphenyl (3'-OHCB 28); metabolites of PCB 101: 3-OH-2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (3-OHCB 101), 4-OH-2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (4-OHCB 101) and one metabolite of PCB 52: 4-OH-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (4-OHCB 52) (Fig. 1A, left panel). In a proof of principle experiment, we determined PCB 28, PCB 101 and PCB 52 metabolization in *Drosophila melanogaster* (Fig. 1A, right panel). After flies were fed for 24 h with PCB congeners (agar concentration 20 μ M), a human-like pattern of respective OH-metabolites was detected in *Drosophila* whole body lysates. Chromatographic retention times of OH-metabolites detected in *Drosophila* showed no difference to internal standards and corresponded to OH-metabolites in human plasma samples (3-OHCB 28: 17.16 vs. 16.89; 3'-OHCB 28: 18.72 vs. 18.39; 3-OHCB 101 19.69 vs. 19.89; 4-OHCB 101: 20.16 vs. 20.12 and 4-OHCB 52: 17.14 vs. 17.23, Fig. 1B), suggesting the formation of identical metabolites in both organisms. By feeding different concentrations of parental PCBs to *Drosophila*, we could demonstrate high mortality at an agar concentration of 100 μ M PCB 28. Interestingly, feeding PCB 101 and PCB 52 at an agar concentration of 100 μ M did not result in lethality (Fig. 1C). As synthetic OH-metabolites of PCB 28-induced cytotoxicity in a model cell culture system³, we conclude that PCB 28 bioactivation by cytochrome p450 (Cyp) enzymes leads to toxicity in *Drosophila*. These

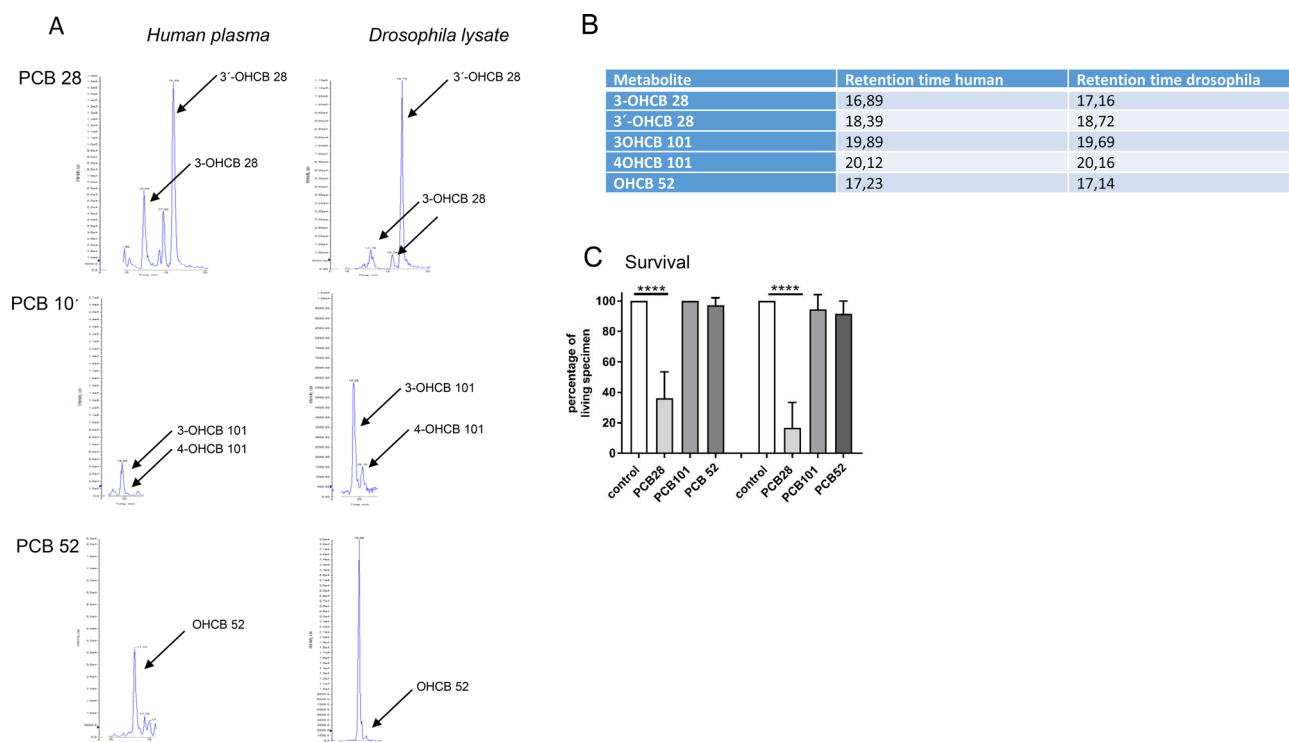


Figure 1. Cytochrome P450 monoxygenase-dependent metabolism of PCB 28, PCB 101 and PCB 52 in humans and in *Drosophila melanogaster*. (A) LC-MS/MS chromatogram of 3-OH-2',4,4'-trichlorobiphenyl (3-OHCB 28), 3'-OH-4',4,6'-trichlorobiphenyl (3'-OHCB 28), 3-OH-2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (3-OHCB 101), 4-OH-2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (4-OHCB 101) and 4-OH-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (4-OHCB 52). Left panel, representative samples from individuals occupationally exposed to high levels of the respective PCB. Right panel, whole fly lysates from *Drosophila melanogaster* which were fed with a low dose (20 μ M) of the respective PCBs for 24 h. One representative sample from several experiments is shown. (B) Corresponding retention times of targeted metabolites in human plasma and *Drosophila melanogaster* as shown in 1A. (C) Survival of *Drosophila melanogaster* fed with a high dose (100 μ M) of PCB 28, PCB 101 and PCB 52 for 48 h and 72 h. Mean \pm SD of 3 different biological experiments each with 3 technical replicates are shown (each technical replicate corresponds to 12 flies). Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test. Statistical differences for PCB 28 versus control (48 h) and for 72 h were $p \leq 0.0001$.

results further suggest that the formation of OH-metabolites from parental PCBs has been partially preserved during evolution and that *Drosophila melanogaster* is an attractive model for the bioactivation of PCBs by Cyp enzymes, providing a useful basis for the development of more accurate bioassays.

PCB 28 metabolism: a targeted genetic screen using flies with RNAi-mediated knockdown of cytochrome p450 enzymes.

In order to identify which dCYP enzymes are involved in the bioactivation of PCB 28, we expressed short hairpin (sh)RNA to induce RNAi-mediated gene silencing of individual CYP coding genes. In total, we knocked down the expression of 19 individual Cyp P450 genes and assayed the effect on PCB 28 metabolite formation (Table 1). The individual dCyp P450 genes were selected based on the presence of human orthologs, the availability of shRNA fly strains and the involvement of the human ortholog in the action of xenobiotics. Emphasis was placed on involving orthologs, which are collectively responsible for the catalysis of almost 75% of all known phase I drug oxidation reactions in humans. Male flies with ubiquitous (driver-) silencing of an individual Cyp P450 gene were fed PCB 28 at low (20 μ M) concentrations for 24 h. Subsequently, fly lysates were analyzed for abundance of PCB 28 metabolites. In 18 knockdowns the uptake of the parental PCB28 was detected on a regular basis (data not shown). One knockdown (CYP303a1, human orthologue CYP2B6) never showed the uptake of PCB 28 and was therefore excluded from further analysis. In addition, the uptake of PCB28 varied widely (up to a logarithmic level) between knockdowns, and this level of variation was not reflected by the amount of metabolites which were produced. We therefore decided to analyse the relative amount of metabolites produced in each knockdown in comparison to a control group. In most of the knockdowns analyzed by LC-MS/MS the relative amount of the metabolite 3-OHCB28 was higher than in the control group (n-13), with only 5 knockdowns showing reduced levels. For the metabolite 3'-OHCB28 only 3 knockdowns showed a higher production than the control group, while 15 knockdowns produced a lower amount of this metabolite (Table 1). To identify knockdowns that were highly likely to be involved in the metabolism of PCB 28, we decided to look for knockdowns that did either not produce any of the main metabolites at all or produced less of both metabolites simultaneously than the control group. Our analysis with LC-MS/MS revealed that silencing of three Cyp genes (Cyp307a2, 18a1 and 312a1) caused a reduced abundance of the

Human CYP	<i>Drosophila</i> orthologue	BDSC ID (* VDRC ID)	3-OHCB 28 (µg/L)	3'-OHCB 28 (µg/L)	3-OHCB 28% of control	3'-OHCB 28% of control
Control	WT Canton-S	64349	0.11	1.88	100	100
CYP19A1, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12	Cyp4ac1 (act-GAL4)	67005	0.23	3.69	209.1	196.2
CYP1A1/ CYP1A2	Cyp307a2 (dag-GAL4)	330647*	Not detected	0.69	0	36.7
CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2, CYP2R1, CYP21A2, CYP2A6, CYP2A13, CYP2C18, CYP2D6, CYP2F1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2E1	Cyp18a1 (act-GAL4)	64923	0.10	0.52	90.9	27.7
CYP3A4, CYP3A43	Cyp9f2 (act-GAL4)	67806	0.10	1.40	95.4	74.5
CYP4F2, CYP4F3	Cyp4d2 (act-GAL4)	42600	0.18	0.70	163.6	37.2
CYP4X1	Cyp4d1 (dag-GAL4)	52979	0.15	1.47	136.4	78.2
CYP4Z1, CYP4B1	Cyp311a1 (act-GAL4)	67792	0.23	1.56	209.1	82.9
CYP51A1	Cyp312a1 (act-GAL4)	101231*	0.10	0.24	90.9	12.7
CYP7A1	Cyp28d2 (act-GAL4)	61282	0.26	1.55	236.4	82.4
CYP7B1	Cyp28d1 (act-GAL4)	53892	0.09	3.97	81.1	211.2
CYP46A1	Cyp4ad1 (act-GAL4)	61745	0.26	1.26	236.4	67
CYP39A1	Cyp4d21 (act-GAL4)	29238	0.25	1.84	227.3	97.9
CYP8A1	Cyp28a5 (act-GAL4)	77405	0.29	1.57	263.4	83.5
CYP26C1	Cyp4d20 (act-GAL4)	77341	0.37	0.31	336.4	16.5
CYP4A22	Cyp4s3 (act-GAL4)	66978	0.17	1.68	154.5	89.4
CYP4V2	Cyp4c3 (act-GAL4)	64213	0.21	1.05	190.9	55.85
CYP3A5	Cyp9b1 (dag-GAL4)	68126	0.19	1.93	172.7	102.6
CYP17A1	Cyp304a1 (dag-GAL4)	67805	0.28	0.29	254.5	15.4
CYP2B6	Cyp303a1 (dag-GAL4)	51716	Not determined	Not determined	Not determined	Not determined

Table 1. PCB 28 metabolism and mortality of adult *Drosophila* wild type (WT) and genotypes with an ubiquitous expression of dsRNA for certain CYP enzymes. Male flies of the respective RNAi strain (UAS-CYP) were paired with virgins of the ubiquitous driver strain act-GAL4 or dag-GAL4 as indicated. For metabolism screening, F1 generations were fed with PCB 28 at low (20 µM) concentrations. After 48 h of incubation the amount of 3-OH-CB28 and 3'-OH-CB28 in flies was determined using LC-MS/MS and a 9-point calibration curve as described²⁴. Mean of 3 technical replicates each with a total of 12 flies per replicate are shown.

both metabolites 3-OHCB 28 and 3'-OHCB 28, respectively (Fig. 2A,B). In flies with RNAi-mediated silencing of Cyp307a2 (human orthologs: CYP1A1 and CYP1A2), the metabolite 3-OHCB 28 was not detected and 3'-OHCB 28 was reduced by more than 70% compared to control levels. When Cyp18a1 (human orthologs: CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2, CYP2R1, CYP21A2, CYP2A6, CYP2D6, CYP2F1, CYP2S1, CYP2U1 and CYP2E1) was silenced, a 10% reduction of 3-OHCB 28 and a 70% reduction of 3'-OHCB 28 was observed compared to control. Similarly, silencing of Cyp312a1 (human orthologue: CYP51A1) resulted in a mild (10%) reduction of 3-OHCB 28 and a strong (90%) reduction of 3'-OHCB 28. At high PCB28 concentrations (agar concentration of 100 µM), RNAi-mediated silencing of Cyp307a2, 18a1 and 312a1 resulted in a low mortality rate (Fig. 2C), while only roughly 15% of the control flies survived. These results suggested, that the knockdown of Cyp307a2, 18a1 and 312a1 in *Drosophila* leads to a lower production of 3'-OHCB 28 and 3-OHCB 28, which might explain the better survival of flies with RNAi-mediated silencing of respective Cyp genes in the presence of PCB 28.

Metabolic activation of PCB 28 by a human liver-like cytochrome P450 cocktail. The CYP enzymes responsible for the metabolism of PCB28 in humans have not yet been described. However, there are indications that these could be CYP enzymes that are expressed in the liver²⁵. Taking these results into account, we decided to subject PCB 28 to in vitro metabolism by a human liver-like cytochrome P450 cocktail (rhCYP cocktail)^{20,21}. This system allowed us to simultaneously test whether the human orthologs of the dCYP enzymes identified within our in vivo screening were also involved in metabolizing PCB 28 (Table 1). The liver-like rhCYP cocktail consists of the main liver enzyme CYP1A2 (drosophila ortholog: Cyp307a2), CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 (drosophila ortholog: Cyp18a1) and CYP3A4 (drosophila ortholog: Cyp9f2) in concentration ranges corresponding to their endogenous abundance in the liver²⁰. When we incubated PCB28 with the rhCYP cocktail, 3-OH-CB28 and 3'-OH-CB28 were readily detected and confirmed that the metabolic activation of PCB 28 in vivo can be reproduced in vitro (Fig. 3A). Next, we divided the rhCYP cocktail into fractions and performed single rhCYP enzyme incubations to see which specific enzymes were responsible for the metabolic activation of PCB 28 in the rhCYP cocktail (Fig. 3B,C). All of the enzymatic activity on PCB 28 was found in the fraction containing CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4 (Fig. 3B). Particularly CYP1A2 as a single

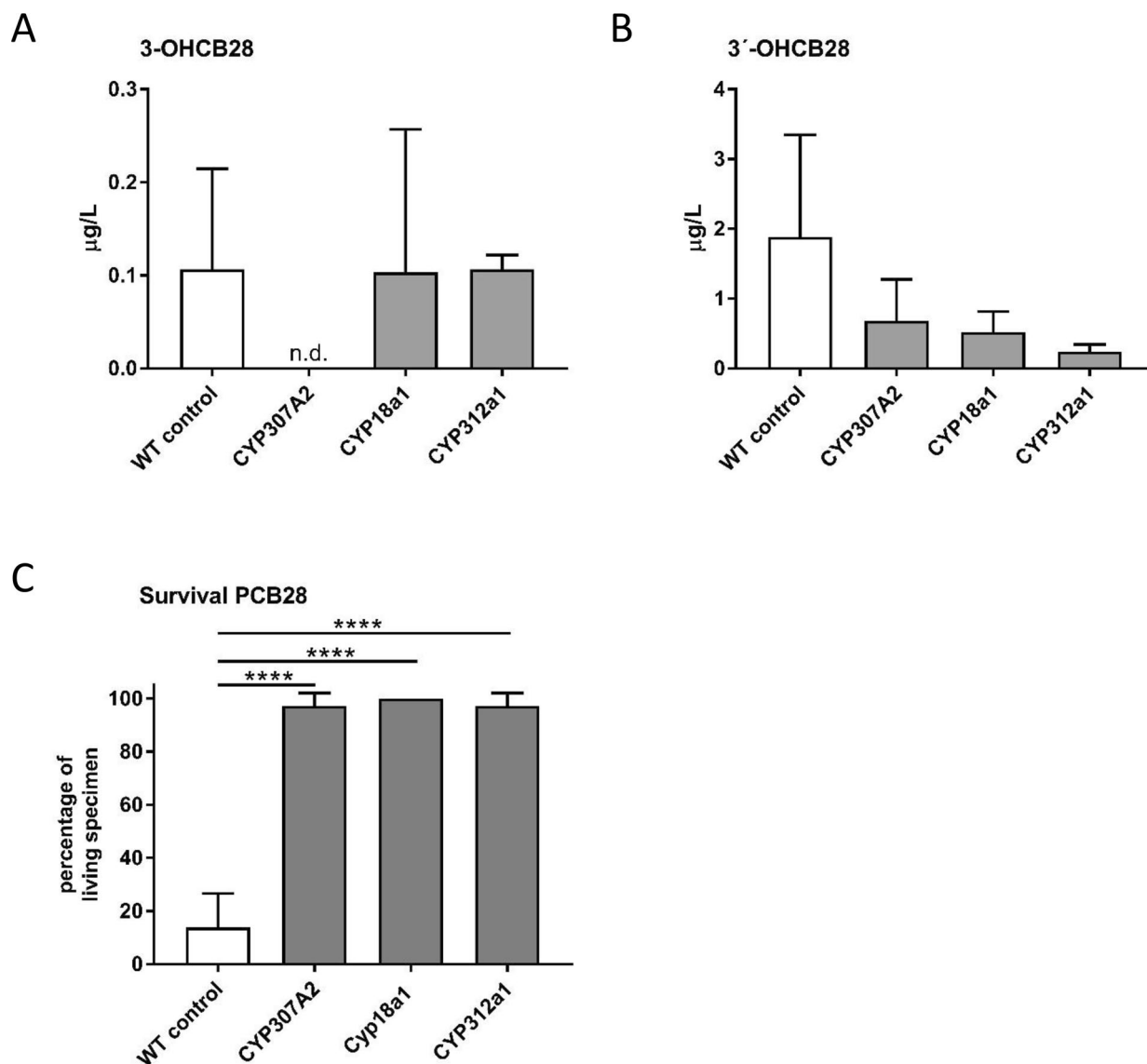


Figure 2. Metabolism of PCB 28 in *Drosophila* pairings with knockdowns in either CYP307a2, 18a1 or 312a1 compared to WT Canton-S. Flies were generated and treated as described in Table 1. The amount of 3-OH-CB28 (A) and 3'-OH-CB28 (B) in WT Canton-S or *Drosophila* with knockdowns of Cyp307a2, Cyp18a1 or Cyp312a1. (C) Survival rate of the respective *Drosophila* specimen at high PCB 28 concentrations. Mean \pm SD of 3 different biological experiments each with 3 technical replicates are shown (each technical replicate corresponds to 12 flies). Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test. (A,B) differences are not significant. Figure C control versus knockdowns of Cyp307a2, Cyp18a1 or Cyp312a1; $p \leq 0.0001$.

enzyme generated high levels of the OH-CB28 metabolites (Fig. 3C)²⁶. This confirmed CYP1A2 as a central CYP in the formation of reactive OH-metabolites from PCB 28. Since CYP1A2 is a human orthologue of *Drosophila* Cyp307a2, these results indicate a conservation at the level of activity against PCB28 between *Drosophila melanogaster* and the human system.

PCB 28 induces caspase activation in fly neurons. Administration of highly doses of PCB 28 induced early mortality in flies. Prior to death, flies displayed phenotypes like abnormal wing posture and reduced locomotion, typically observed in *Drosophila* models of neurodegenerative diseases²⁷. In addition, neurotoxic effects of PCBs have been described in the literature^{28–30}. We therefore focused on the analysis of PCB 28-induced cell death in the neuronal system, which can be executed by caspases. For visualization, we used a caspase-sensitive Apoliner biosensor, which indicates caspase activation. Apoliner consists of a membrane bound fused Red Fluorescent Protein (RFP) fused to an Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) with a nuclear localization signal³¹. RFP and eGFP are separated by a linker, which contains a caspase cleavage site. Accordingly, this biosensor enables quantification of caspase activity as a precursor of apoptosis by detecting separation of GFP and RFP. By subjecting F1 generations to PCB 28, survival rate was reduced starting at a PCB 28 agar concentration

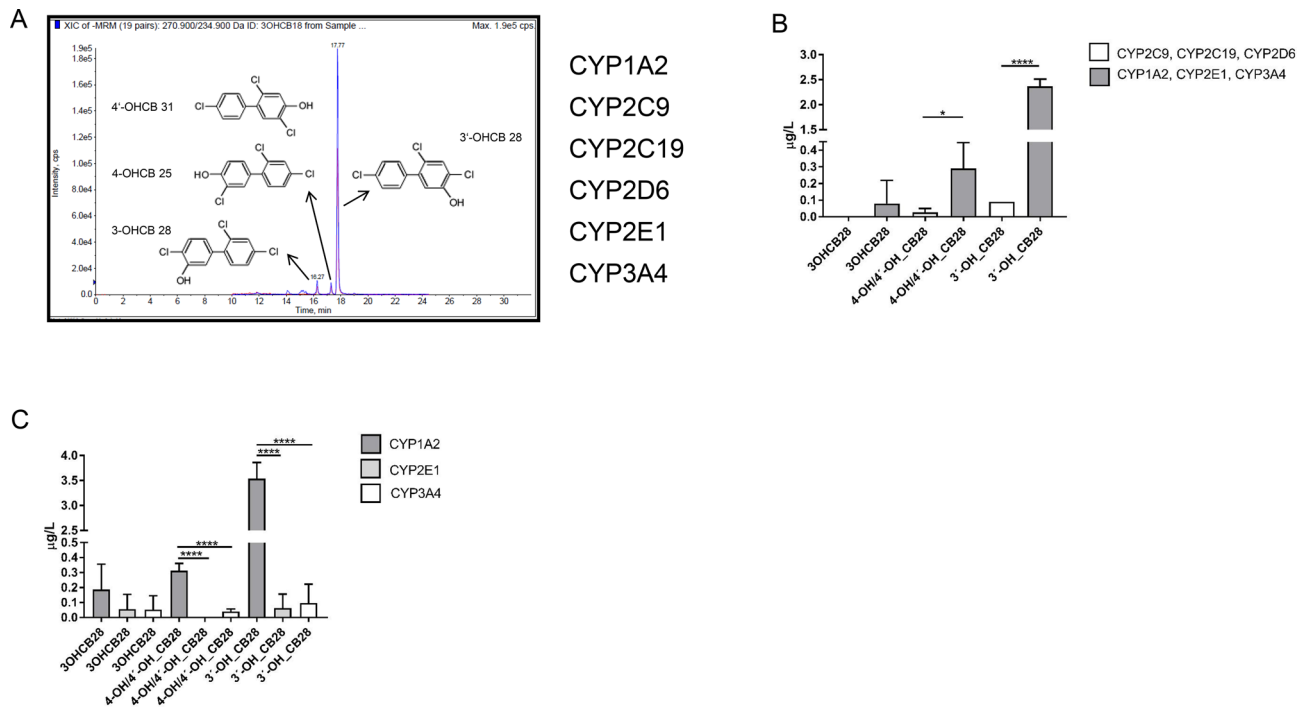


Figure 3. Metabolic activation of PCB 28 in the presence of a recombinant liver-like cytochrome P450 cocktail. **(A)** LC-MS/MS chromatogram of 3-OH-CB28, 3'-OH-CB28 and 4-OH/4'-OH-CB28 after incubation of PCB 28 with recombinantly expressed CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4 (rhCYP cocktail) for 1 h. **(B)** Amounts of 3-OH-CB28, 3'-OH-CB28 and 4-OH/4'-OH-CB28 detected after incubation of PCB 28 with different constituents of the rhCYP cocktail. **(C)** Amounts of OH-CB28 metabolites detected after single incubation of PCB 28 either with CYP1A2, CYP2E1 or CYP3A4. Mean \pm SD of 3 technical replicates are shown. **(B,C)** Results between groups of CYPs were compared by ANOVA and adjusted by posthoc Tukey-test for multiple measures. Statistical differences are as indicated (* $p \leq 0.05$; **** $p \leq 0.0001$).

of 30 μM (Fig. 4A). At an agar concentration of 40 μM only 34.6% of the flies survived on average ($p = 0.026$). In short-term incubations (4 h), PCB 28 induced an increase at the amount of cleaved GFP-containing fragments compared to PCB-free preparations and non-Apoliner strains (Fig. 4B and supplementary Fig. 1). The increase of cleaved GFP-containing fragments was paralleled to the appearance of a strong GFP fluorescent signal that could be analyzed by flow cytometry (Fig. 4C). Remarkably, only a weak GFP signal could be detected in flies not fed with PCB 28. We interpret that quenching by fluorescence resonance energy transfer (FRET) in non-apoptotic cells occurs through the interaction of the membrane-bound GFP and RFP and that the cleavage of the GFP-containing fragment during caspase activation also leads to GFP emitting its characteristic fluorescence. Flow cytometry thus provided an easy and fast way to analyze PCB 28-induced apoptosis in Apoliner strains. We have therefore performed a flow cytometry screening in flies with pan neural and retinal expression of Apoliner kept for 4 h on agar with increasing PCB 28 concentrations (Fig. 4D): flies showed a concentration-dependent increase of the GFP signal up to a PCB 28 concentration of 20 μM (average 15.6%), with a decrease of fluorescence at concentrations of 30 and 40 μM . This result correlated well with the results of the lethality screen (Fig. 4A), since an increase in lethality can be observed from a concentration of 30 μM PCB 28—probably as a consequence of neuronal apoptosis. In summary, we provide evidence that PCB 28 induces lethality in *Drosophila*. This PCB 28 dependent lethality could be a consequence of neuronal decline by apoptosis. Accordingly, PCB 28 exposure may resemble mechanisms of neurodegenerative diseases.

Neurofilament light chain concentrations in PCB exposed individuals. In our recent work within the medical monitoring programme HELPCB (Health Effects in High-Level Exposure to PCBs)³², we were able to establish a correlation between exposure to LC PCBs and the concentrations of the metabolite homovanilic acid (HVA, metabolite of dopamine) in the urine of individuals³³. A high exposure with lower chlorinated PCBs lead to an increase of urinary concentrations of HVA suggesting an impeding effect of LC PCBs on the dopamine neurotransmitter system. The dysfunction of the dopaminergic system is associated with various neurological disorders that are often accompanied by deleterious changes in cellular homeostasis and can lead to different types of regulated cell death in the cerebral tissue. Since our experiments in *Drosophila* suggested a caspase-mediated apoptosis in the nervous system induced by PCBs, we decided to search for signs of neurodegeneration in the HELPCB cohort. Therefore we determined the concentration of the neurofilament light chain (Nfl) in the plasma of PCB exposed individuals. Nfl is a biomarker that is released when axons are damaged or lost and is determined in a variety of neurodegenerative diseases^{34,35}. When incubated with longitudinally collected blood plasma samples, the concentrations of Nfl dropped from its initial level (4.38 ± 0.67 ng/mL) in 2011 to a

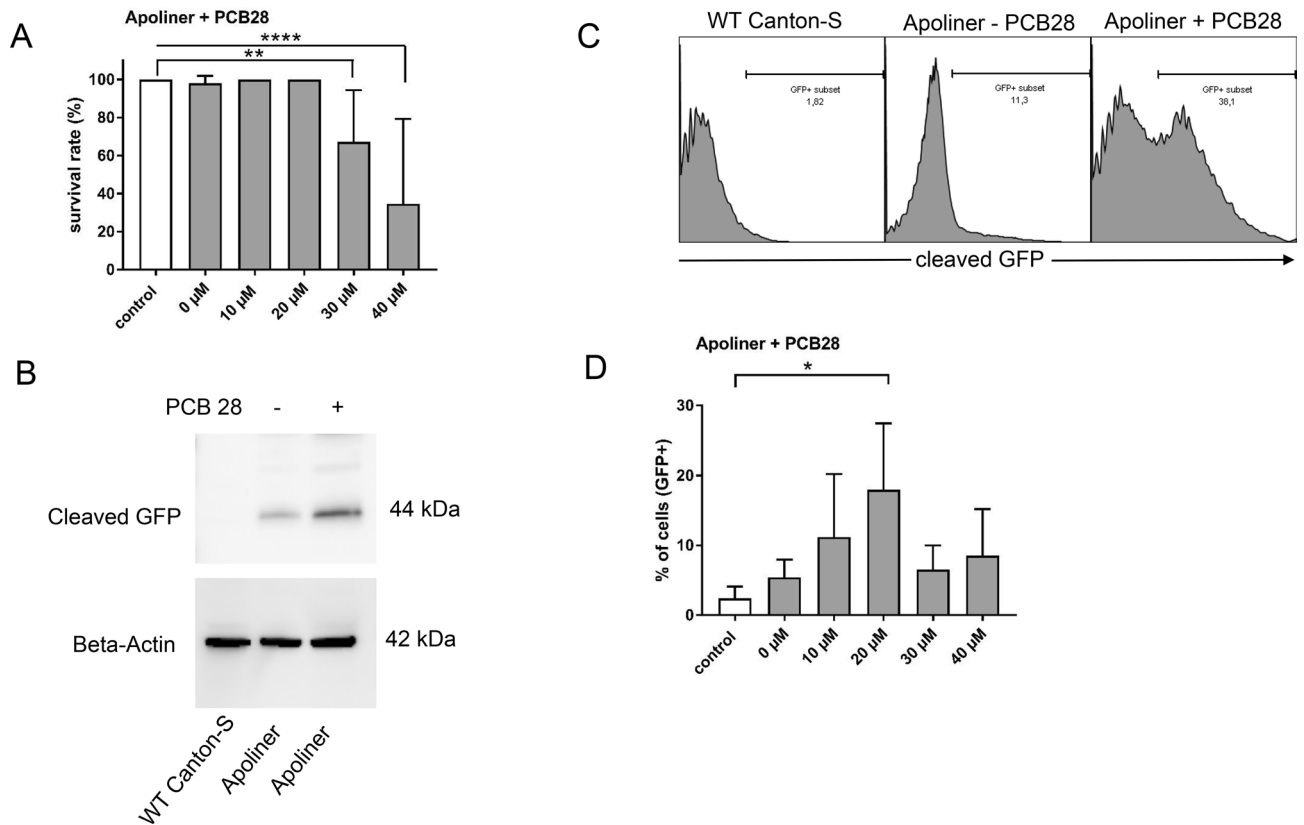


Figure 4. PCB 28 induces neuronal caspase activation prior to cell death and dying in *Drosophila*. **(A)** Wild type Canton-S (control, 0 μM PCB 28) and flies with a neuronal specific expression of the Apoliner biosensor were fed PCB 28 with the subsequent analysis of dead flies 24 h later. Mean ± SD of four different biological replicates each with a total of 12 flies are shown. **(B)** Western blot analysis of an apoptosis indicating GFP-containing fragment at 44 kDa after 4 h of feeding Apoliner expressing flies with PCB 28. Representative result from one experiment out of three is shown. **(C)** Flow cytometry analysis of the same flies which had been used for Western-blotting described in **(B)**. **(D)** Flow cytometric quantification of the GFP signal in controls and carriers of the neuronally expressed biosensor. Mean values and standard deviation of 4 biological replicas, each with a total of 12 flies per replicate are shown. Differences were calculated by ANOVA and adjusted by posthoc Tukey-test for multiple measures. Statistical differences are as indicated (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

lower level (2.38 ± 0.98 ng/mL) in 2015 (Fig. 5A). Corresponding mean plasma levels of longitudinally collected samples of this cohort showed no significant difference in the level of higher chlorinated PCBs (HC PCBs) at two different time points (mean concentration HC PCB 2011 = 16.67 μg/L vs mean concentration HC PCB 2015 = 17.81 μg/L); whereas levels of dioxin-like PCBs (DL PCBs, mean concentration DL PCBs 2011 = 4.65 μg/L vs mean concentration DL PCBs 2015 = 3.5 μg/L) and lower chlorinated PCBs (LC PCBs, mean concentration LC PCBs 2011 = 2.98 μg/L vs mean concentration LC PCBs 2015 = 0.92 μg/L; $p \leq 0.0001$) decreased over time (Fig. 5B). We, therefore, conclude that high LC PCB plasma levels increase axonal degeneration, thereby releasing higher concentrations of Nfl. Axonal degenerations is relieved over time with lower concentrations of Nfl in plasma samples from the HELPCB-Cohort, simultaneously to the decrease in levels LC PCBs. PCBs thus appear to cause irreversible cell damage in the nervous system both in humans and in *Drosophila*. This finding underlines that *Drosophila* has established itself as an interesting model to study PCB-induced neurotoxicity.

Discussion

This study demonstrates that the degradation of PCB 28, PCB 101 and PCB 52 in *Drosophila melanogaster* produces the same pattern of OH-metabolites as the degradation of these lower chlorinated PCBs in humans. Metabolization takes place by cytochrome P450 (CYP) enzymes, which are very well conserved between invertebrates and vertebrates. Selected Cyps in *Drosophila* were specifically knocked down by means of RNA interference (RNAi) in order to subsequently investigate the effects on the conversion of PCB 28 in a metabolism screening. Lysates were produced from vital flies by mechanical and enzymatic digestion to investigate the metabolization rate of PCB 28 into its OH-metabolites using GC/MS and HPLC/MS/MS. Cyp307a2, 18a1 and 312a1 could be identified, whose knockdown caused the toxic metabolites 3-OHCB 28 and 3'-OHCB 28 to disappear and led to survival at high agar concentrations of PCB 28. In vitro, PCB 28 could be converted into all OH-metabolites by the combination of six recombinant human cytochromes (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4), which are strongly expressed in the liver and thus reflect its metabolic properties. This result confirmed CYP1A2 as a central CYP in the formation of reactive OH-metabolites from PCB 28, since CYP1A2 contained in

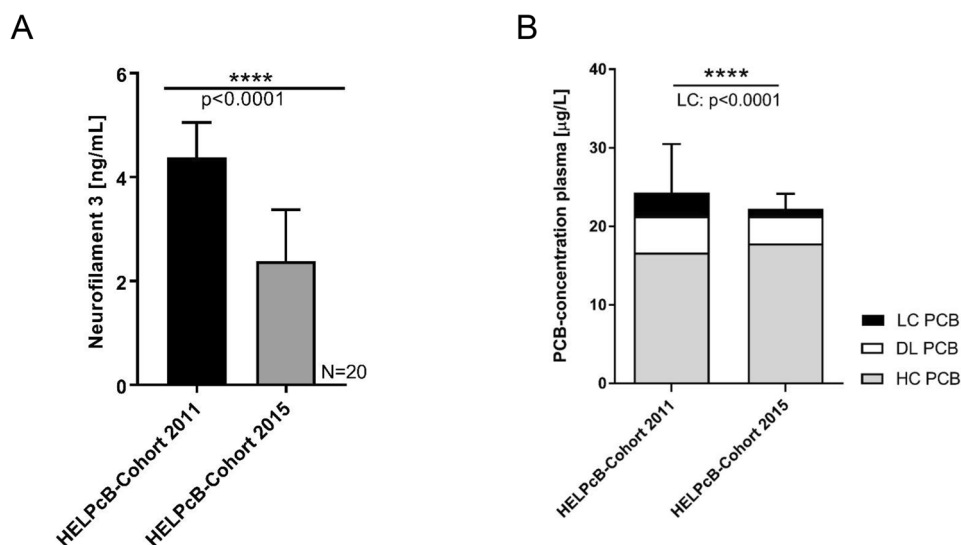


Figure 5. Neurofilament light chain levels in PCB exposed individuals. **(A)** Quantification of the neurofilament light chain in longitudinally collected plasma samples from the HELPCB-Cohort (N=20 per time point; each with two technical replicates). **(B)** Mean plasma levels for Σ higher chlorinated PCBs (grey), Σ dioxin-like PCBs (white) and lower chlorinated PCBs (black) from longitudinally collected samples (HELPCB-Cohort). Differences were calculated by ANOVA and adjusted by posthoc Tukex-test for multiple measures. Statistical differences are as indicated **** $p \leq 0.0001$).

the liver-like rhCYP cocktail is a human orthologue of Cyp307a2 in *Drosophila*²⁶. The feeding of *Drosophila* with PCB 28 led to neurotoxic signs and concentration-dependent lethality. By Western-blotting and flow cytometry this could be attributed to a PCB 28-dependent induction of apoptosis in differentiated neurons.

In recent years, various approaches have been developed in *Drosophila* to characterize the role of CYPs in the metabolism of endogenous and exogenous compounds^{36,37}. In addition, *Drosophila* has been established as a model for human neurodegenerative diseases^{38–41}. These models are used to investigate genetic causes for neurodegenerative processes and the genetic and environmental risk factors associated with Parkinson's disease⁴². In this context, it was found that the basic cell biological signal transduction pathways between invertebrates and vertebrates are surprisingly well preserved. This is also evident when comparing the fully sequenced genomes of both organisms. In addition, established genetics, small body size, short generation time and lifespan characterize *Drosophila* as a model organism, especially for large genetic screens. Our study shows that the similarities between invertebrates and vertebrates could be used to study xenobiotic PCB metabolism as well as PCB-induced neurotoxicity and generate data relevant to humans.

Insect genomes possess about 100 different Cyp isozymes, many of which have no essential endogenous function, which is considered an evolutionary adaptation to the large number of harmful compounds in the insects environment^{37,43}. The *Drosophila* genome codes for apparently functional 90 Cyp genes. More than half of the genes belong to only two families, Cyp4 and Cyp6. The Cyp6 family is insect specific whereas the Cyp4 family includes sequences from vertebrates. Although *Drosophila* does not possess the human CYP enzyme superfamilies 1–3, it nevertheless possesses corresponding genetically related orthologous enzymes from this family. The Cyp307a2 identified in our screen has an essential endogenous function in *Drosophila* and its putative substrate recognition sites are conserved across vertebrate orthologous genes^{37,44}.

The CYP system is at the onset of xenobiotic metabolism and plays a key role in the bioaccumulation and toxicity of PCBs. Feeding experiments on rats with commercially available PCB mixtures such as Aroclor 1254, Fire-Master Bp-6 or individual congeners showed the induction of different CYPs depending on the position of the chlorine atoms on the phenyl ring⁴⁵. Non-orthochlorinated coplanar PCBs such as PCB 126, PCB 169 and PCB 77 induce the expression of CYP1A1 and CYP1A2. Orthochlorinated PCBs such as PCB 128, PCB 153, PCB 155 and PCB 180 induce the expression of CYP2B1. Other structured PCBs such as PCB 118, PCB 138 and PCB 170 induce the expression of both CYP1A1 and CYP2B⁴⁵. Some of these CYPs could be partially confirmed as actual catalysts of hydroxylation of these PCBs in vitro^{46–49}. In addition, the hydroxylation of some tri- and tetrachlorobiphenyls (PCB 20, 22, 52 and 74) by CYP2E1⁵⁰ and the formation of 4-OHCB 101 from PCB 101 by CYP2A6 was detected in vitro⁵¹. The human CYP1A2, identified in this study is capable of oxidizing estradiol, resulting in the production of 2-hydroxy and 4-hydroxy metabolites⁵². Xenobiotic substrates of CYP1A2 include caffeine⁵³, aflatoxin B1⁵⁴ and paracetamol⁵⁵. It has been suggested that the increased function of CYP1A2 may be associated with an increased risk of breast cancer⁵⁶, which could ultimately also be important for the metabolism of PCBs: In individual cases, existing exposure of PCBs in conjunction with genetic polymorphisms in CYP1A2 could lead to an increase in biological efficacy of PCBs (toxicity/mutagenicity), which could also result in an increased risk of disease. Epidemiological results indicate that the cumulative exposure dose is not the only relevant risk measure for the effect of PCBs⁵⁷. Therefore, in further steps, CYP1A2 variants might be identified, that accelerate the metabolism of PCB 28 in humans.

We show here for PCB 28 the concentration-dependent induction of cell death in differentiated neurons *in vivo*. PCBs have also been shown to induce caspase-dependent cell death in embryonic rat hippocampal cells via the ryanodine receptor *in vitro*⁵⁸. Other proposed mechanisms of PCB neurotoxicity include altered neurotransmitters and calcium homeostasis, oxidative stress and effects on the thyroid hormone system⁵⁹. The effects described for PCBs on humans, such as axonal polyneuropathies and effects on memory function and fine motor skills in adults and children, could thus also be due to the loss of neuronal cells^{15–17}.

Our results find a correspondence in the action of rotenone and paraquat, both environmental toxins, which have been used by humans for decades: rotenone and paraquat are able to cause cell loss in the dopaminergic system and are used in models of sporadic Parkinson's disease in *Drosophila*^{27,39,60}. More publications show experimental evidence for paraquat-induced apoptosis by JNK-MAPK-induced caspases^{61,62} and include an increase in oxidative stress triggered by dysfunctional mitochondria. However, we have not found any other insect reports that provide a global picture of CYP-related metabolism and support the neurotoxic effects of industrial solvents. In fact, only one study considers the CYP-dependent metabolism of a xenobiotic compound that leads to its degradation in *Drosophila melanogaster*: After feeding flies with caffeine, Coelho and colleagues identified theobromine, paraxanthin and theophylline, three metabolites derived from *Drosophila* caffeine that also occur in mammals³⁶. Provided that the similarity in metabolism between humans and *Drosophila* can be replicated for other classes of chemicals, this and our study could pave the way to a better understanding of the degradation mechanism and toxicity of xenobiotic compounds in the human body.

Received: 2 May 2020; Accepted: 20 November 2020

Published online: 09 December 2020

References

1. Lauby-Secretan, B. *et al.* Carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. *Lancet Oncol.* **14**, 287–288. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(13\)70104-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(13)70104-9) (2013).
2. Lauby-Secretan, B. *et al.* Use of mechanistic data in the IARC evaluations of the carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and related compounds. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **23**, 2220–2229. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4829-4> (2016).
3. Vasko, T. *et al.* Telomerase gene expression bioassays indicate metabolic activation of genotoxic lower chlorinated polychlorinated biphenyls. *Sci. Rep.* **8**, 16903. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35043-w> (2018).
4. Dallaire, R. *et al.* Thyroid hormone levels of pregnant inuit women and their infants exposed to environmental contaminants. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1014–1020. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800219> (2009).
5. Rylander, L. *et al.* Very high correlations between fresh weight and lipid-adjusted PCB-153 serum concentrations: Irrespective of fasting status, age, body mass index, gender, or exposure distributions. *Chemosphere* **88**, 828–831. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.089> (2012).
6. Ludewig, G., Lehmann, L., Esch, H. & Robertson, L. W. Metabolic activation of PCBs to carcinogens *in vivo*—a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **25**, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.10.029> (2008).
7. Wong, A., Basrur, P. & Safe, S. The metabolically mediated DNA damage and subsequent DNA repair by 4-chlorobiphenyl in Chinese hamster ovary cells. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **24**, 543–550 (1979).
8. McLean, M. R., Robertson, L. W. & Gupta, R. C. Detection of PCB adducts by the 32P-postlabeling technique. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 165–171. <https://doi.org/10.1021/tx9500843> (1996).
9. Quinete, N., Esser, A., Kraus, T. & Schettgen, T. PCB 28 metabolites elimination kinetics in human plasma on a real case scenario: Study of hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB) metabolites of PCB 28 in a highly exposed German Cohort. *Toxicol. Lett.* **276**, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.025> (2017).
10. Grimm, F. A. *et al.* Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls. *Crit. Rev. Toxicol.* **45**, 245–272. <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.999365> (2015).
11. Venkataraman, P. *et al.* Protective role of melatonin on PCB (Aroclor 1,254) induced oxidative stress and changes in acetylcholine esterase and membrane bound ATPases in cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of adult rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **26**, 585–591. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.05.002> (2008).
12. Venkataraman, P. *et al.* PCB (Aroclor 1254) enhances oxidative damage in rat brain regions: Protective role of ascorbic acid. *Neurotoxicology* **28**, 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2006.11.002> (2007).
13. Dreiem, A., Rykken, S., Lehmler, H. J., Robertson, L. W. & Fonnum, F. Hydroxylated polychlorinated biphenyls increase reactive oxygen species formation and induce cell death in cultured cerebellar granule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **240**, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.016> (2009).
14. Mariussen, E., Myhre, O., Reistad, T. & Fonnum, F. The polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1254 induces death of rat cerebellar granule cells: The involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor and reactive oxygen species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **179**, 137–144. <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9353> (2002).
15. Schantz, S. L. *et al.* Impairments of memory and learning in older adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish. *Environ. Health Perspect.* **109**, 605–611. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109605> (2001).
16. Schantz, S. L., Widholm, J. J. & Rice, D. C. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ. Health Perspect.* **111**, 357–576. <https://doi.org/10.1289/ehp.5461> (2003).
17. Lin, K. C., Guo, N. W., Tsai, P. C., Yang, C. Y. & Guo, Y. L. Neurocognitive changes among elderly exposed to PCBs/PCDFs in Taiwan. *Environ. Health Perspect.* **116**, 184–189. <https://doi.org/10.1289/ehp.10134> (2008).
18. Fimm, B. *et al.* Neuropsychological effects of occupational exposure to polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicology* **63**, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.09.011> (2017).
19. Quinete, N. *et al.* Fast determination of hydroxylated polychlorinated biphenyls in human plasma by online solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **888**, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.041> (2015).
20. Hartter, S., Tybring, G., Friedberg, T., Weigmann, H. & Hiemke, C. The N-demethylation of the doxepin isomers is mainly catalyzed by the polymorphic CYP2C19. *Pharm. Res.* **19**, 1034–1037. <https://doi.org/10.1023/a:1016478708902> (2002).
21. Bergstrom, M. A. *et al.* A skin-like cytochrome P450 cocktail activates prohaptens to contact allergenic metabolites. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1145–1153. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700638> (2007).
22. Schettgen, T., Gube, M., Esser, A., Alt, A. & Kraus, T. Plasma polychlorinated biphenyls (PCB) levels of workers in a transformer recycling company, their family members, and employees of surrounding companies. *J. Toxicol. Environ. Health A* **75**, 414–422. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.674905> (2012).
23. SAS 9.4 for Microsoft Windows Workstation for x64 (Cary, NC, USA., 2013).

24. Quinete, N., Esser, A., Kraus, T. & Schettgen, T. Determination of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in human urine in a highly occupationally exposed German cohort: New prospects for urinary biomarkers of PCB exposure. *Environ. Int.* **97**, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.08.028> (2016).
25. Schilderman, P. A. *et al.* Induction of DNA adducts by several polychlorinated biphenyls. *Environ. Mol. Mutagen* **36**, 79–86. [https://doi.org/10.1002/1098-2280\(2000\)36:2%3c79::aid-em1%3e3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1098-2280(2000)36:2%3c79::aid-em1%3e3.0.co;2-e) (2000).
26. Pan, S. T. *et al.* Computational identification of the paralogs and orthologs of human cytochrome P450 superfamily and the implication in drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms17071020> (2016).
27. Chaudhuri, A. *et al.* Interaction of genetic and environmental factors in a Drosophila parkinsonism model. *J. Neurosci.* **27**, 2457–2467. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4239-06.2007> (2007).
28. Hatcher-Martin, J. M. *et al.* Association between polychlorinated biphenyls and Parkinson's disease neuropathology. *Neurotoxicology* **33**, 1298–1304. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.08.002> (2012).
29. Jones, D. C. & Miller, G. W. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 569–581. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.010> (2008).
30. Pessah, I. N., Cherednichenko, G. & Lein, P. J. Minding the calcium store: Ryanodine receptor activation as a convergent mechanism of PCB toxicity. *Pharmacol. Ther.* **125**, 260–285. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.10.009> (2010).
31. Bardet, P. L. *et al.* A fluorescent reporter of caspase activity for live imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 13901–13905. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806983105> (2008).
32. Kraus, T. *et al.* Surveillance program for former PCB-exposed workers of a transformer and capacitor recycling company, family members, employees of surrounding companies, and area residents—executive summary. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A* **75**, 1241–1247. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.709377> (2012).
33. Gaum, P. M. *et al.* Polychlorinated biphenyls and depression: cross-sectional and longitudinal investigation of a dopamine-related Neurochemical path in the German HELPCB surveillance program. *Environ. Health* **16**, 106. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0316-3> (2017).
34. Olsson, B. *et al.* Association of cerebrospinal fluid neurofilament light protein levels with cognition in patients with dementia, motor neuron disease, and movement disorders. *JAMA Neurol.* **76**, 318–325. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.3746> (2019).
35. Disanto, G. *et al.* Serum neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **81**, 857–870. <https://doi.org/10.1002/ana.24954> (2017).
36. Coelho, A. *et al.* Cytochrome P450-dependent metabolism of caffeine in Drosophila melanogaster. *PLoS ONE* **10**, e0117328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117328> (2015).
37. Chung, H. *et al.* Characterization of Drosophila melanogaster cytochrome P450 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5731–5736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812141106> (2009).
38. Wittmann, C. W. *et al.* Tauopathy in Drosophila: Neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* **293**, 711–714. <https://doi.org/10.1126/science.1062382> (2001).
39. Feany, M. B. & Bender, W. W. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* **404**, 394–398. <https://doi.org/10.1038/35006074> (2000).
40. Warrick, J. M. *et al.* Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in Drosophila by the molecular chaperone HSP70. *Nat. Genet.* **23**, 425–428. <https://doi.org/10.1038/70532> (1999).
41. Bilen, J. & Bonini, N. M. Drosophila as a model for human neurodegenerative disease. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 153–171. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095804> (2005).
42. Aryal, B. & Lee, Y. Disease model organism for Parkinson disease: Drosophila melanogaster. *BMB Rep.* **52**, 250–258 (2019).
43. Claudianos, C. *et al.* A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect. Mol. Biol.* **15**, 615–636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x> (2006).
44. Ono, H. *et al.* Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev. Biol.* **298**, 555–570. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.023> (2006).
45. Parkinson, A. *et al.* Differential time course of induction of rat liver microsomal cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase by Aroclor 1254. *Arch. Biochem. Biophys.* **225**, 203–215. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90024-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90024-3) (1983).
46. Lu, Z., Kania-Korwel, I., Lehmler, H. J. & Wong, C. S. Stereoselective formation of mono- and dihydroxylated polychlorinated biphenyls by rat cytochrome P450 2B1. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 12184–12192. <https://doi.org/10.1021/es402838f> (2013).
47. Lu, Z. & Wong, C. S. Factors affecting phase I stereoselective biotransformation of chiral polychlorinated biphenyls by rat cytochrome P-450 2B1 isozyme. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 8298–8305. <https://doi.org/10.1021/es200673q> (2011).
48. Waller, S. C. *et al.* 2,2,3,3',6,6'-hexachlorobiphenyl hydroxylation by active site mutants of cytochrome P450 2B1 and 2B11. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 690–699. <https://doi.org/10.1021/tx990030j> (1999).
49. Warner, N. A., Martin, J. W. & Wong, C. S. Chiral polychlorinated biphenyls are biotransformed enantioselectively by mammalian cytochrome P-450 isozymes to form hydroxylated metabolites. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 114–121. <https://doi.org/10.1021/es802237u> (2009).
50. Liu, Y. *et al.* Potent mutagenicity of some non-planar tri- and tetrachlorinated biphenyls in mammalian cells, human CYP2E1 being a major activating enzyme. *Arch. Toxicol.* **91**, 2663–2676. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1904-7> (2017).
51. McGraw, J. E. Sr. & Waller, D. P. Specific human CYP 450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC# 101). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.122> (2006).
52. Spink, D. C. *et al.* 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1A1: A comparison of the activities induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 cells with those from heterologous expression of the cDNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 342–348. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90404-k](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90404-k) (1992).
53. Butler, M. A., Iwasaki, M., Guengerich, F. P. & Kadlubar, F. F. Human cytochrome P-450A2 (P-450A2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 7696–7700. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.20.7696> (1989).
54. Trottier, Y., Waithe, W. I. & Anderson, A. Kinds of mutations induced by aflatoxin B1 in a shuttle vector replicating in human cells transiently expressing cytochrome P4501A2 cDNA. *Mol. Carcinog.* **6**, 140–147. <https://doi.org/10.1002/mc.2940060209> (1992).
55. Steele, C. M., Masson, H. A., Battershill, J. M., Gibson, G. G. & Ioannides, C. Metabolic activation of paracetamol by highly purified forms of cytochrome P-450. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **40**, 109–119 (1983).
56. Hong, C. C. *et al.* Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity, mammographic density, and oxidative stress: A cross-sectional study. *Breast Cancer Res.* **6**, R338–351. <https://doi.org/10.1186/bcr797> (2004).
57. Colt, J. S. *et al.* Organochlorine exposure, immune gene variation, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **113**, 1899–1905. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-153858> (2009).
58. Howard, A. S., Fitzpatrick, R., Pessah, I., Kostyniak, P. & Lein, P. J. Polychlorinated biphenyls induce caspase-dependent cell death in cultured embryonic rat hippocampal but not cortical neurons via activation of the ryanodine receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **190**, 72–86. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00156-x](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00156-x) (2003).
59. Klocke, C., Sethi, S. & Lein, P. J. The developmental neurotoxicity of legacy vs contemporary polychlorinated biphenyls (PCBs): Similarities and differences. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06723-5> (2019).
60. Coulom, H. & Birman, S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in Drosophila melanogaster. *J. Neurosci.* **24**, 10993–10998. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2993-04.2004> (2004).

61. Peng, J., Mao, X. O., Stevenson, F. F., Hsu, M. & Andersen, J. K. The herbicide paraquat induces dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 32626–32632. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404596200> (2004).
62. Ramachandiran, S., Hansen, J. M., Jones, D. P., Richardson, J. R. & Miller, G. W. Divergent mechanisms of paraquat, MPP+, and rotenone toxicity: Oxidation of thioredoxin and caspase-3 activation. *Toxicol. Sci.* **95**, 163–171. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl125> (2007).

Acknowledgements

Stocks obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (NIH P40OD018537) and Vienna *Drosophila* Resource Center were used in this study. This work was supported by a START-grant (AZ 14/16) of the Faculty of Medicine RWTH Aachen University to P.Z. and an unrestricted grant from the Institution for Statutory Accident Insurance and Prevention in the Energy, Textile, Electrical, and Media Industry (BGETEM), Cologne, Germany (grant number 360328) to the University Hospital Aachen.

Author contributions

T.I. and C.B. performed experiments, collected and analyzed data and contributed to the writing of the manuscript. J.B., N.Q., J.H. and K.F. performed experiments and analyzed data. T.S., A.E., M.B.S., M.L., J.B., A.V. and T.K. analyzed and interpreted the data and contributed to the writing of the manuscript. A.V. designed fly experiments. P.Z. conceived and designed the study, analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78405-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.Z.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Supplementary information to:

Metabolic activation and toxicological evaluation of polychlorinated biphenyls in *Drosophila melanogaster*

Idda T^{1*}, Bonas C^{1*}, Hoffmann J¹, Bertram J¹, Quinete N^{1,2}, Schettgen T¹, Fietkau K³, Esser A¹, Stope MB⁴, Leijns MM³, Baron JM³, Kraus T¹, Voigt A^{5,6}, Ziegler P¹

1. Institute for Occupational, Social and Environmental Medicine, RWTH Aachen University, Aachen, Germany.

2. Department of Chemistry and Biochemistry, Florida International University Florida, Florida, USA.

3. Department of Dermatology and Allergology, RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany.

4. Department of Gynecology and Gynecological Oncology, University Hospital Bonn, Germany

5. Department of Neurology, University Medical Center, RWTH Aachen University, Aachen, 52074, Germany

6. JARA-BRAIN Institute Molecular Neuroscience and Neuroimaging, Forschungszentrum Jülich GmbH and RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany

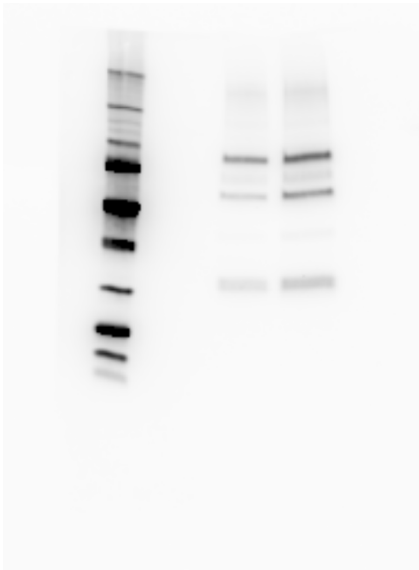
* These authors contributed equally

Correspondence to: pziegler@ukaachen.de

Supplementary Fig. 1: Full-length Western Blot GFP- containing fragments . Exposure time: 30 seconds.

Experiment 1

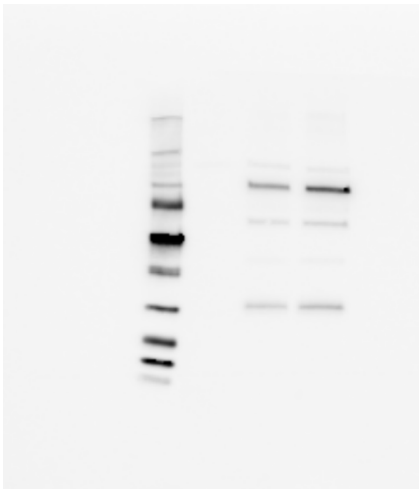
PCB28: - +



- 1: Marker
- 2: WT Canton-S
- 3: Apoliner
- 4: Apoliner

Experiment 2

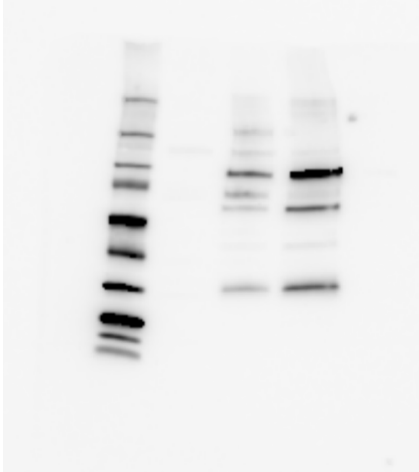
PCB28: - +



- 1: Marker
- 2: WT Canton-S
- 3: Apoliner
- 4: Apoliner

Experiment 3

PCB28: - +



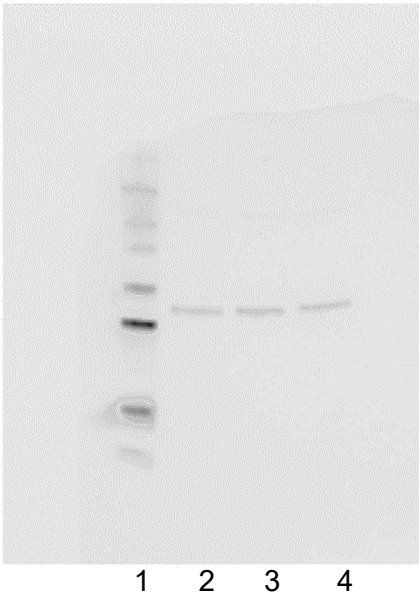
- 1: Marker
- 2: WT Canton-S
- 3: Apoliner
- 4: Apoliner

1 2 3 4

Supplementary Fig. 2 Full-length Western Blot β -Actin (stripped after GFP detection).
Exposure time: 150 seconds.

Experiment 1

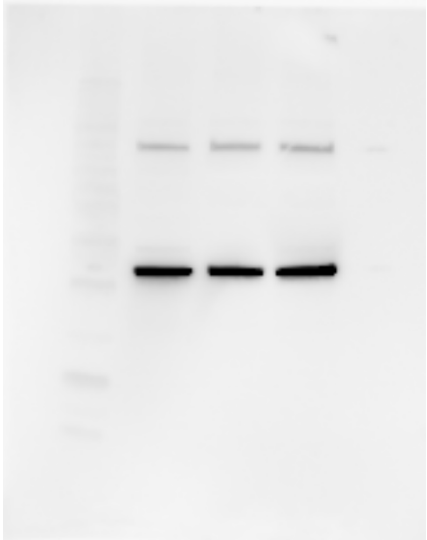
PCB28: - +



- 1: Marker
- 2: WT Canton-S
- 3: Apoliner
- 4: Apoliner

Experiment 2

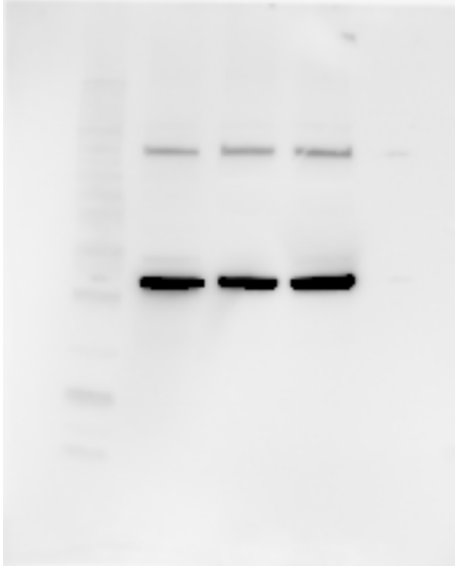
PCB28: - +



- 1: Marker
- 2: WT Canton-S
- 3: Apoliner
- 4: Apoliner

Experiment 3

PCB28: - +



42 kDa

- 1: Marker
- 2: WT Canton-S
- 3: Apoliner
- 4: Apoliner

Supplementary Fig. 3 Results of the statistical analysis

Corresponding Figure 1C (survival) 48h. Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

**Differences of medium Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey**

medium	medium	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t	Adj P
PCB101	PCB28	63.8867	7.3486	8	8.69	<.0001	0.0001
PCB101	PCB52	2.7767	7.3486	8	0.38	0.7154	0.9803
PCB101	control	3.55E-15	7.3486	8	0.00	1.0000	1.0000
PCB28	PCB52	-61.1100	7.3486	8	-8.32	<.0001	0.0002
PCB28	control	-63.8867	7.3486	8	-8.69	<.0001	0.0001
PCB52	control	-2.7767	7.3486	8	-0.38	0.7154	0.9803

Corresponding Figure 1C (survival) 72h. Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

**Differences of medium Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey**

medium	medium	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t	Adj P
PCB101	PCB28	77.7767	8.5618	8	9.08	<.0001	<.0001
PCB101	PCB52	2.7767	8.5618	8	0.32	0.7540	0.9873
PCB101	control	-5.5567	8.5618	8	-0.65	0.5345	0.9130
PCB28	PCB52	-75.0000	8.5618	8	-8.76	<.0001	0.0001
PCB28	control	-83.3333	8.5618	8	-9.73	<.0001	<.0001
PCB52	control	-8.3333	8.5618	8	-0.97	0.3589	0.7679

Corresponding Figure 2A (3-OHCB28). Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

**Differences of FLY Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey**

FLY	FLY	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t 	Adj P
CYP18a1	CYP307A2	0.1033	0.08019	11	1.29	0.2240	0.5880
CYP18a1	CYP312a1	-0.00333	0.08019	11	-0.04	0.9676	1.0000
CYP18a1	WT control	-0.00333	0.08019	11	-0.04	0.9676	1.0000
CYP307A2	CYP312a1	-0.1067	0.09259	11	-1.15	0.2738	0.6671
CYP307A2	WT control	-0.1067	0.09259	11	-1.15	0.2738	0.6671
CYP312a1	WT control	-278E-19	0.09259	11	-0.00	1.0000	1.0000

Corresponding Figure 2B (3'-OHCB28). Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

**Differences of FLY Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer**

FLY	FLY	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t 	Adj P
CYP18a1	CYP307A2	-0.1633	0.4972	11	-0.33	0.7487	0.9871
CYP18a1	CYP312a1	0.2767	0.4972	11	0.56	0.5890	0.9428
CYP18a1	WT control	-1.3633	0.4972	11	-2.74	0.0192	0.0777
CYP307A2	CYP312a1	0.4400	0.5741	11	0.77	0.4596	0.8678
CYP307A2	WT control	-1.2000	0.5741	11	-2.09	0.0606	0.2154
CYP312a1	WT control	-1.6400	0.5741	11	-2.86	0.0156	0.0644

Corresponding Figure 2C (survival). Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

**Differences of FLY Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer**

FLY	FLY	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t	Adj P
CYP18a1	CYP307A2	0.02899	0.09371	7	0.31	0.7660	0.9888
CYP18a1	CYP312a1	0.02899	0.09371	7	0.31	0.7660	0.9888
CYP18a1	WT control	1.5889	0.1048	7	15.17	<.0001	<.0001
CYP307A2	CYP312a1	0	0.09371	7	0.00	1.0000	1.0000
CYP307A2	WT control	1.5599	0.1048	7	14.89	<.0001	<.0001
CYP312a1	WT control	1.5599	0.1048	7	14.89	<.0001	<.0001

Corresponding Figure 3B. Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

3-OH-PCB 28

**Differences of CYP_group Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer**

CYP-group	CYP-group	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t	Adj P
GREY	WHITE	0.08000	0.08000	4	1.00	0.3739	0.3739

4-OH/4'-OH_CB28

**Differences of CYP_group Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer**

CYP-group	CYP-group	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t	Adj P
GREY	WHITE	0.2633	0.09098	4	2.89	0.0444	0.0444

3'-OH_CB28

**Differences of CYP_group Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer**

CYP-group	CYP-group	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t	Adj P
GREY	WHITE	2.2767	0.08333	4	27.32	<.0001	<.0001

Corresponding Figure 3C. Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

3-OH_CB28

**Differences of CYP Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey**

CYP	CYP	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t	Adj P
CYP1A2	CYP2E1	0.1300	0.1020	6	1.27	0.2495	0.4577
CYP1A2	CYP3A4	0.1333	0.1020	6	1.31	0.2389	0.4418
CYP2E1	CYP3A4	0.003333	0.1020	6	0.03	0.9750	0.9994

4-OH/4'-OH_CB28

**Differences of CYP Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey**

CYP	CYP	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t	Adj P
CYP1A2	CYP2E1	0.3133	0.02373	6	13.21	<.0001	<.0001
CYP1A2	CYP3A4	0.2733	0.02373	6	11.52	<.0001	<.0001
CYP2E1	CYP3A4	-0.04000	0.02373	6	-1.69	0.1428	0.2849

3'-OH_CB28

**Differences of CYP Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey**

CYP	CYP	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t	Adj P
CYP1A2	CYP2E1	3.4733	0.1695	6	20.49	<.0001	<.0001
CYP1A2	CYP3A4	3.4400	0.1695	6	20.29	<.0001	<.0001
CYP2E1	CYP3A4	-0.03333	0.1695	6	-0.20	0.8506	0.9790

Corresponding Figure 4A. Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

**Differences of treatment Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey**

treatment	treatment	Estimation	Standard Error	DF	t	Pr > t 	Adj P
0 μM	10 μM	-0.01941	0.07106	18	-0.27	0.7878	0.9998
0 μM	20 μM	-0.01941	0.07106	18	-0.27	0.7878	0.9998
0 μM	30 μM	0.3777	0.07917	18	4.77	0.0002	0.0018
0 μM	40 μM	1.0415	0.09885	18	10.54	<.0001	<.0001
0 μM	control	-0.01941	0.07106	18	-0.27	0.7878	0.9998
10 μM	20 μM	2.67E-17	0.07071	18	0.00	1.0000	1.0000
10 μM	30 μM	0.3971	0.07886	18	5.04	<.0001	0.0010
10 μM	40 μM	1.0609	0.09860	18	10.76	<.0001	<.0001
10 μM	control	2.7E-16	0.07071	18	0.00	1.0000	1.0000
20 μM	30 μM	0.3971	0.07886	18	5.04	<.0001	0.0010
20 μM	40 μM	1.0609	0.09860	18	10.76	<.0001	<.0001
20 μM	control	2.44E-16	0.07071	18	0.00	1.0000	1.0000
30 μM	40 μM	0.6638	0.1046	18	6.35	<.0001	<.0001
30 μM	control	-0.3971	0.07886	18	-5.04	<.0001	0.0010
40 μM	control	-1.0609	0.09860	18	-10.76	<.0001	<.0001

Corresponding Figure 4D. Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

**Differences of treatment Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer**

treatment	treatment	Schätzung	Standard Error	DF	t	Pr > t	Adj P
0 μM	10 μM	-0.7259	0.3024	12	-2.40	0.0335	0.2298
0 μM	20 μM	-1.1999	0.2832	12	-4.24	0.0012	0.0114
0 μM	30 μM	-0.1897	0.3355	12	-0.57	0.5823	0.9916
0 μM	40 μM	-0.4569	0.3172	12	-1.44	0.1754	0.7044
0 μM	control	0.8086	0.4471	12	1.81	0.0956	0.4955
10 μM	20 μM	-0.4740	0.2199	12	-2.16	0.0522	0.3238
10 μM	30 μM	0.5362	0.2842	12	1.89	0.0837	0.4534
10 μM	40 μM	0.2690	0.2624	12	1.03	0.3255	0.9006
10 μM	control	1.5345	0.4100	12	3.74	0.0028	0.0262
20 μM	30 μM	1.0102	0.2637	12	3.83	0.0024	0.0226
20 μM	40 μM	0.7430	0.2400	12	3.10	0.0093	0.0773
20 μM	control	2.0085	0.3961	12	5.07	0.0003	0.0029
30 μM	40 μM	-0.2672	0.3000	12	-0.89	0.3906	0.9416
30 μM	control	0.9983	0.4351	12	2.29	0.0406	0.2674
40 μM	control	1.2655	0.4211	12	3.01	0.0110	0.0898

Corresponding Figure 5A. Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

**Differences of Year Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey**

Year	Year	Estimation	Standard Error	DF	t-	Pr > t	Adj P
HELPCB-Cohort 2011	HELPCB-Cohort 2015	2.0000	0.2665	38	7.50	<.0001	<.0001

Corresponding Figure 5B. Differences were calculated by repeated measurement ANOVA and posthoc Tukey-test

PCB-sum

**Differences of year Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey**

year	year	Estimation	Standard Error	DF	t- Wert	Pr > t	Adj P
HELPCB-Cohort 2011	HELPCB-Cohort 2015	0.1103	0.4352	38	0.25	0.8012	0.8012

HC-PCB

**Differences of year Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey**

year	year	Estimation	Standard Error	DF	t- Wert	Pr > t	Adj P
HELPCB-Cohort 2011	HELPCB-Cohort 2015	-0.05564	0.4303	38	-0.13	0.8978	0.8978

DL-PCB

**Differences of year Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer**

year	year	Estimation	Standard Error	DF	t- Wert	Pr > t	Adj P
HELPCB-Cohort 2011	HELPCB-Cohort 2015	0.2844	0.1583	38	1.80	0.0804	0.0804

LC-PCB

Differences of year Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

year	year	Schätzung	Standard Error	DF	t-Wert	Pr > t 	Adj P
HELPCB-Cohort 2011	HELPCB-Cohort 2015	1.1707	0.2664	38	4.39	<.0001	<.0001



Partial dechlorination of 2,4,4'-trichlorobiphenyl (PCB 28) mediated by recombinant human CYP1A2

Isabella Randerath¹ · Natalia Quinete² · Julian Peter Müller³ · Julia Stingl³ · Jens Bertram¹ · Thomas Schettgen¹ · Thomas Kraus¹ · Patrick Ziegler¹ 

Received: 5 July 2023 / Accepted: 4 October 2023
© The Author(s) 2023

Keywords Polychlorinated biphenyls · PCB28 · Cytochrom p450 Monooxidase · Dechlorination

Introduction

Polychlorinated Biphenyl (PCB) congeners show a long persistence in the human body with elimination half-lives in the range of 1–20 years. Elimination involves xenobiotic-metabolizing Phase I (cytochrome P450, i.e., CYP) and conjugating Phase II enzymes, which can lead to the formation and retention of OH-PCBs, PCB sulfates, PCB glucuronides, and PCB methyl sulfones (MeSO₂-PCBs) (Grimm et al. 2015). Metabolic profiles of PCB degradation are dramatically affected by chlorine substitution patterns with implications for PCB toxicity and elimination half-life. Dechlorination of PCBs is considered to detoxify higher-chlorinated PCBs and has been demonstrated in animal models and in human cell culture (Tulp et al. 1977) (Zhang et al. 2022).

PCB28 is one of the quantitatively most important congeners of industrial PCB mixtures. Together with other lower-chlorinated PCBs (e.g., PCB52 and PCB101), it can be regularly detected in contaminated indoor environments (Schettgen et al. 2012; Kraft et al. 2018) and is found in the recycling of transformers and capacitors (Schettgen et al. 2011). There is experimental evidence from PCB28 that indicates a direct genotoxic effect and thus hints to possibly a direct carcinogenic effect (Vasko et al. 2018). We here

show for the first time the partial dechlorination of PCB 28 to the dichlorinated monohydroxylated metabolite 3-OH-CB15, which is formed by human CYP1A2 from PCB28 in addition to its already known trichlorinated metabolites.

Material and methods

Analytical standards used in this study

The analytical standards of the trichlorinated PCB28 metabolites 2,4,4'-trichloro-5-biphenylol (5-OH-PCB28), 2',3',4-trichloro-4'-biphenylol (4'-OH-PCB25), and 2,4',5-trichloro-4-biphenylol (4-OH-PCB31) were custom synthesized at the Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Facility for Synthetic Chemistry (Göttingen, Germany). The characterization was performed via NMR spectroscopy and mass spectrometry (data not shown). 2,4,4'-trichloro-3'-biphenylol (3'-OH-PCB28) was purchased from Combi-Blocks (San Diego, CA, USA). 4,4'-dichloro-3-biphenylol (3-OH-PCB15) was purchased by Chem Service (West Chester, PA, USA). For quantifications an internal standard of ¹³C₆-3'-OH-PCB28 was custom synthesized and characterized via NMR spectroscopy and mass spectrometry (Göttingen, Germany).

Incubation of PCB28 with recombinant CYP1A2 and CYP1A2 expressing transgenic HEK293 cells

Recombinantly expressed CYP1A2 bacosomes (coexpressed with CYP reductase in *Escherichia coli*) were obtained from Tebu-Bio (Offenbach, Germany) and mixed in the concentrations described. Incubations contained PCB 28 (20 μM), HEPES buffer (50 mM pH 7.4), MgCl₂ (30 mM), NADPH (1 mM), and 5 pmol of bacosomes in

✉ Patrick Ziegler
pziegler@ukaachen.de

¹ Institute for Occupational, Social and Environmental Medicine, Medical Faculty, RWTH Aachen University, Pauwelsstrasse 30, 52074 Aachen, Germany

² Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Environment, Florida International University, 3000 NE 151st Street, North Miami, Florida 33181, USA

³ Institute of Clinical Pharmacology, University Hospital of RWTH, 52074 Aachen, Germany

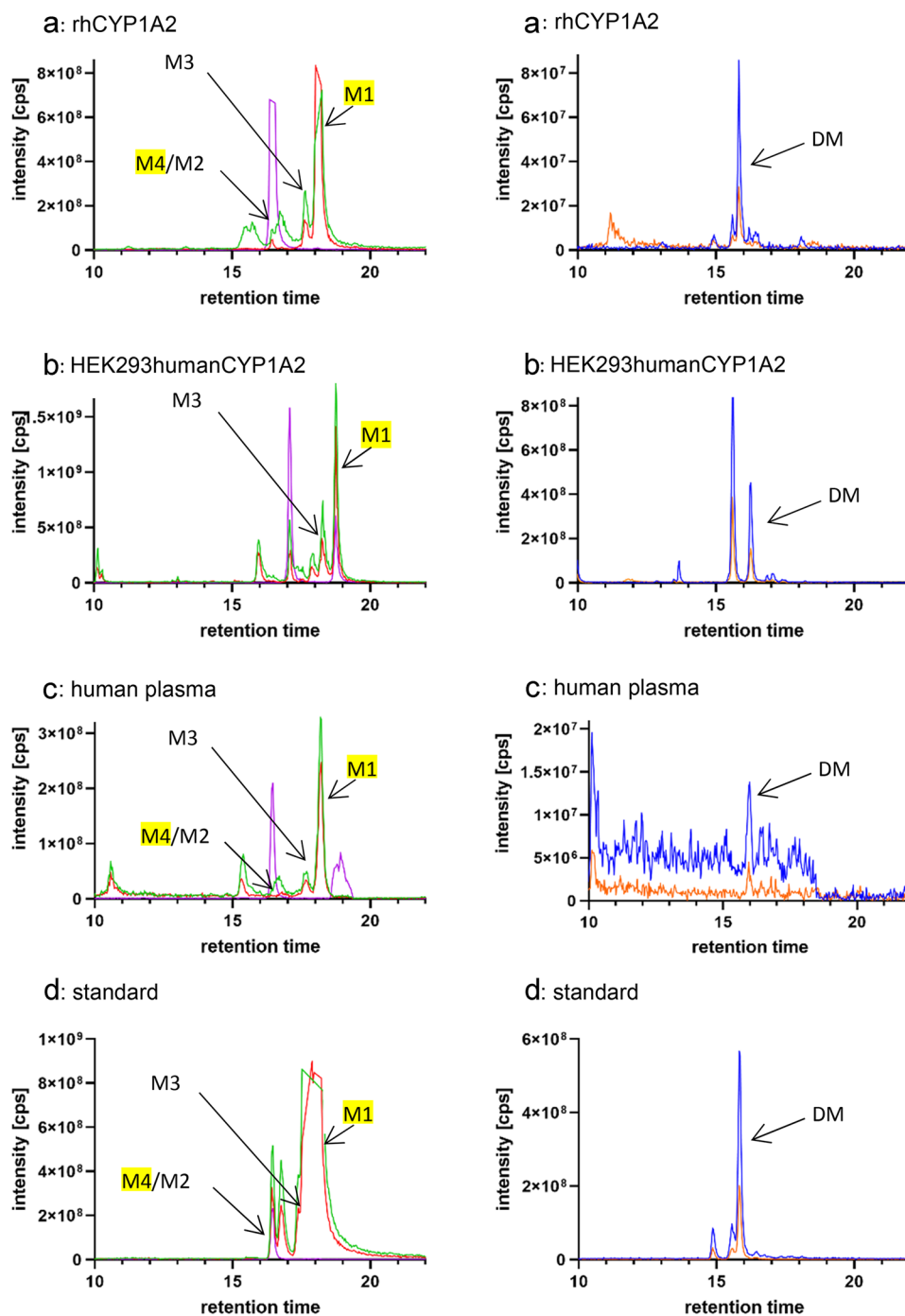
a total volume of 500 μL . Incubations were performed in triplicates and initialized by adding NADPH after 3 min of pre-incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ and terminated after 60 min. Control samples were run in the absence of substrate, in the absence of NADPH or using heat-deactivated enzymes (Idda et al. 2020). For the incubation of PCB28 with CYP1A2 expressing transgenic HEK293 cells, 4×10^5 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (FCS), penicillin

(50 U/mL), and streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in a total volume of 2.5 ml. At a confluence of 80%, PCB 28 (20 μM) was added and cells were incubated for 24 h before harvest. Control samples were run with non-transgenic HEK293 cells.

Analysis of PCB metabolites

Supernatants from bactosome incubations or cell culture experiments were diluted 1:2 with 80 μL acetate buffer

Fig. 1 The extracted ion chromatograms of trichlorinated (left panel) and dichlorinated (right panel) OH metabolites of PCB28. **a** RhCYP1A2 expressed in *E. coli* (bactosomes) was incubated with PCB 28 for 1 h. **b** HEK293human-CYP1A2 cell line was incubated with 20 μM PCB28 for 24 h with subsequent harvest of the supernatant. **c** human plasma sample of a PCB28 exposed individual. **d** Standards. Representative images from 3 different experiments are shown. M (metabolite 1–4), DM (Dichlorinated Metabolite). Mass transitions are related to the following metabolites: trichlorinated 3'-OH-PCB28, 5-OH-PCB28, 4'-OH-PCB25, 4-OH-PCB31 m/z : 271.1 \rightarrow 235.0 green, m/z : 273.2 \rightarrow 237.0 red, m/z : 277.1 \rightarrow 241.0 pink (the last one equalizing the internal standard $^{13}\text{C}_6$ -3'-OH-PCB28); dichlorinated 3-OH-PCB15 m/z : 237.2 \rightarrow 201.0 blue, m/z : 239.2 \rightarrow 202.9 orange (color figure online)



0.1 M (pH = 5.3). 100 μ L of this dilution was further incubated with 100 μ L of ammonium acetate buffer 0.1 M (pH = 5.3) and 5 μ L of β -Glucuronidase/Arylsulfatase enzyme overnight in a drying oven at 37 °C for enzymatic hydrolysis in order to release conjugated compounds. 50 μ L of a mix of internal standards (10 ng mL⁻¹) and 600 μ L of methanol were added to the samples, then mixed by vortexing for 1 min, and centrifuged for 10 min at 4500 rpm. The individual supernatants were transferred to glass LC vials and evaporated to approximately 50 μ L at 45 °C under a gentle stream of nitrogen. Finally, 0.1 mol L⁻¹ ammonium acetate buffer was added to a final volume of 100 μ L and then transferred to an insert for analysis. The online solid phase extraction (SPE) method coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry was carried out using an API 5500 QTrap mass spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany) equipped with electrospray ionization (ESI) interface (Quinete et al. 2015).

Results and discussion

The metabolism of PCB28 was analyzed in vitro using recombinant human (rh)CYP1A2 expressed in E.coli (bactosomes), producing several monohydroxylated trichlorinated metabolites identified as 5-OH-PCB28 (M1, RT 18.76 min), 4-OH-PCB31 (M3, RT 18.28 min), and 3'-OH-PCB28/4'-OH-PCB25 (M4/M2, RT 17.09 min) by comparison with the authentic standards (Fig. 1a and Table 1) and thereby corroborating with the results found in our previous studies. In addition, a prominent ion peak appeared in the chromatogram at a retention time of 16.25 min. A comparison with the standard compounds with the closest retention time suggested that this peak resembled the hydroxylated metabolite of 4,4'-dichlorobiphenyl (3-OH-CB15). To confirm metabolic origin of the above species, control experiments with no NADPH, no PCB28, or with heat inactivated bactosomes were conducted. Indeed, in the control experiments none of the metabolites were detected (Supplemental Fig. 1). These data suggested that CYP1A2 formed a partially dechlorinated hydroxylated metabolite of PCB28 presumably via the classical lower-chlorinated (LC) PCB metabolism pathway including arene oxide intermediate formation (Fig. 2a).

Former studies had shown that bactosomes might catalyze different reactions with different metabolites generated than with the corresponding enzymes expressed in eukaryotic cell cultures (Stiborová et al. 2017). To rule out the possibility that CYP1A2 mediated dechlorination of PCB28 is specific for the prokaryotic expression system, we generated a transgenic HEK293 cell line stably overexpressing the human cDNA of *CYP1A2*. The presence of genomically integrated *CYP1A2* cDNA cell clones was confirmed by polymerase chain reaction analysis (data not shown).

Functional expression of CYP1A2 could be demonstrated by conversion of the common substrate caffeine to the specific paraxanthine product (Supplemental Fig. 2). Incubation of HEK293humanCYP1A2 cells with PCB28 leads to the formation of all 4 known monohydroxylated metabolites of PCB28 as expected, whereas in non-transgenic parental HEK293 cells metabolite formation could not be observed. In addition, HEK293humanCYP1A2 cells formed 3-OH-CB15 from PCB28 (Fig. 1b and Table 1).

To find out whether metabolic formation of 3-OH-PCB15 occurs also in vivo, we examined plasma samples from individuals in a cohort exposed to different PCB Aroclor mixtures (HELPCB cohort) (Kraus et al. 2012) for the presence of 3-OH-CB15. Indeed, we found this metabolite in samples selected for high PCB28 concentrations (Fig. 1c and Table 1). Moreover, the concentration of 3-OH-CB15 correlated mainly with the concentration of the major PCB28 metabolites 4-OH-CB31 and 3'-OH-CB28 (Fig. 2), both resulting from oxidation at the dichlorinated ring of the trichlorobiphenyl structure. In fact, there is indirect evidence (Song et al. 2013) that 3-OH-PCB15 is also produced as a metabolite of PCB15, a potential minor component of commercial PCB mixtures such as various types of Aroclor (Supplemental Table 1). Thus, as composition of Aroclor(s) to which the plasma donors were exposed to was not reported, we cannot completely exclude the possibility that 3-OH-PCB15 in their blood resulted from hydroxylation of PCB15.

We emphasize that—contrary to the general view that dechlorination of PCBs is accompanied by their detoxification—a more differentiated view must be taken in the case

Table 1 Metabolites, experiment, and concentrations for each OH-PCB congener

Metabolite	Experiment	Concentration (μ g/L)
3'-OH-PCB28/ 4'-OH- PCB25 (M4/M2)	HEK293human	0
	HEK293humanCYP1A2	0.21
	rhCYP1A2	0.11
	Human plasma	3.15/2.17
4-OH-PCB31 (M3)	HEK293human	0
	HEK293humanCYP1A2	0.07
	rhCYP1A2	0.12
	Human plasma	2.38
5-OH-PCB28 (M1)	HEK293human	0
	HEK293humanCYP1A2	1.02
	rhCYP1A2	2.14
	Human plasma	16.41
3-OH-PCB15 (DM)	HEK293human	0
	HEK293humanCYP1A2	0.16
	rhCYP1A2	0.10
	Human plasma	2.60

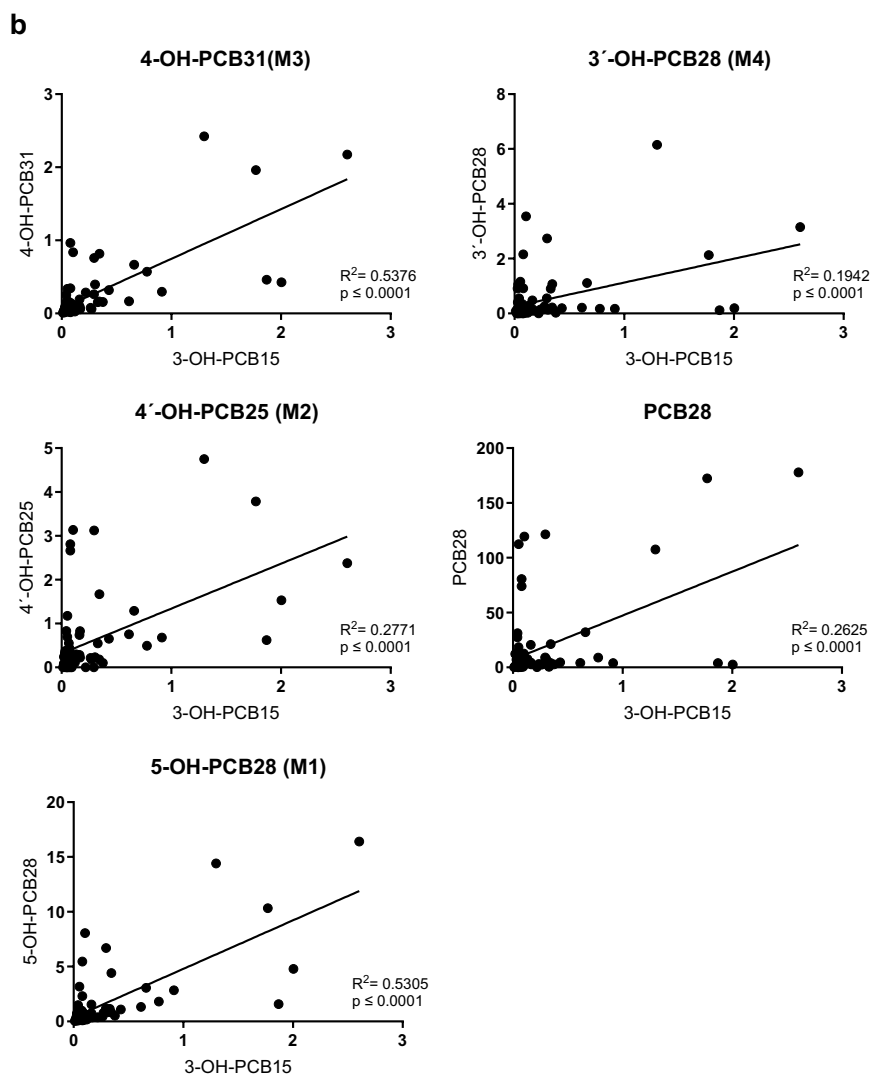
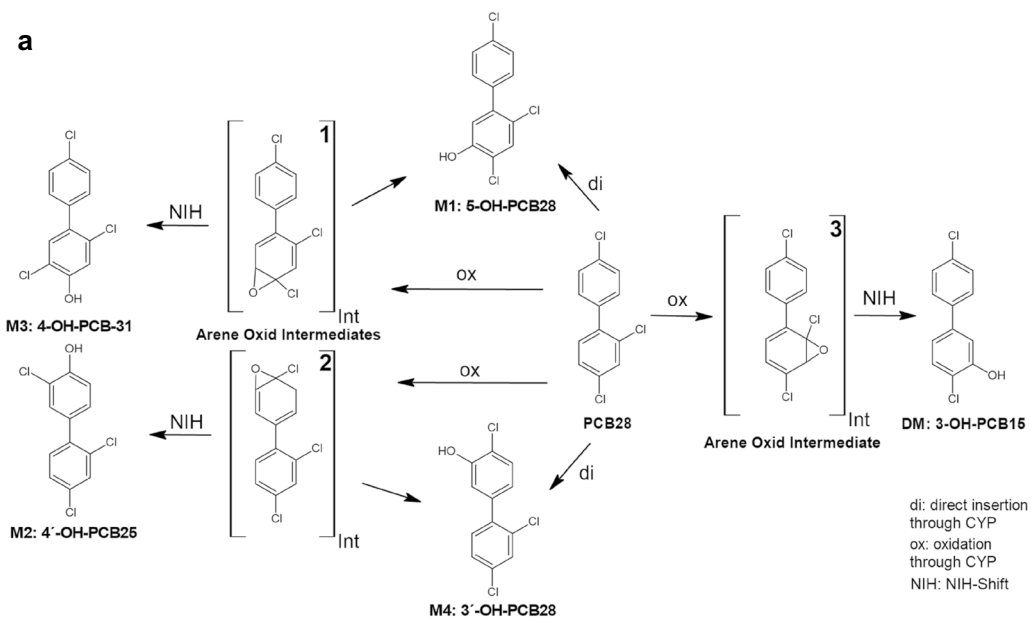


Fig. 2 a Proposed scheme of the PCB28 pathway: transition states 1 and 2 lead to known trichlorinated OH metabolites M1–M4 (Quinete et al.), transition state 3 could lead to dechlorination of PCB28 and formation of 3-OH-PCB15. **b** Linear regression of plasma concentrations ($n=74$; $\mu\text{g/L}$) of PCB28, 5-OH-PCB28, 4-OH-PCB31, 4'-OH-PCB25, and 3'-OHP-PCB28 versus plasma concentrations of 3-OH-PCB15

of the WHO indicator congener PCB28. For PCB15 the formation of a hydroquinone (PCB15-HQ) via dihydroxylated intermediates was clearly demonstrated *in vitro* (Song et al. 2013), and PCB15 also showed a mutagenic effect both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, PCB15 had a tumorigenic effect in an initiation–promotion experiment after a single administration to rats, with a 100-fold higher incidence of preneoplastic foci/cm³ in the liver (Espandiari et al. 2003). Even though its full extent is currently unclear in humans, the metabolism of PCB28 to hydroxylated PCB15 and further downstream hydroquinone metabolites should also be taken into account when assessing the potential risk of PCB mixtures.

Acknowledgements This research work was supported with funds from the German Social Accident Insurance (DGUV) to PZ (grant number FB295). The authors are responsible for the content of this publication.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Data availability All data supporting the findings of this study are available within the paper and its Supplementary Information.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

Espandiari P, Glauert HP, Lehmler HJ, Lee EY, Srinivasan C, Robertson LW (2003) Polychlorinated biphenyls as initiators in liver

carcinogenesis: resistant hepatocyte model. *Toxicol Appl Pharmacol* 186(1):55–62. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(02\)00018-2](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(02)00018-2)

Grimm FA, Hu D, Kania-Korwel I et al (2015) Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls. *Crit Rev Toxicol* 45(3):245–272. <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.999365>

Idda T, Bonas C, Hoffmann J et al (2020) Metabolic activation and toxicological evaluation of polychlorinated biphenyls in *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep* 10(1):21587. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78405-z>

Kraft M, Sievering S, Grün L, Rauchfuss K (2018) Mono-, di- and trichlorinated biphenyls (PCB 1 - PCB 39) in the indoor air of office rooms and their relevance on human blood burden. *Indoor Air* 28(3):441–449

Kraus T, Gube M, Lang J et al (2012) Surveillance program for former PCB-exposed workers of a transformer and capacitor recycling company, family members, employees of surrounding companies, and area residents—executive summary. *J Toxicol Environ Health A* 75(19–20):1241–1247. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.709377>

Quinete N, Kraus T, Belov VN, Aretz C, Esser A, Schettgen T (2015) Fast determination of hydroxylated polychlorinated biphenyls in human plasma by online solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 888:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.041>

Schettgen T, Alt A, Preim D, Keller D, Kraus T (2011) Biological monitoring of indoor exposure to dioxin-like and non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in a public building. *Toxicol Lett* 213(1):116–121

Schettgen T, Gube M, Esser A, Alt A, Kraus T (2012) Plasma polychlorinated biphenyls (PCB) levels of workers in a transformer recycling company, their family members, and employees of surrounding companies. *J Toxicol Environ Health A* 75(8–10):414–422

Song EQ, Ma XY, Tian XG et al (2013) The effect of the structure of polychlorinated biphenyls on their hydroxylation, oxidation, and glutathionyl conjugation reactions. *Biomed Environ Sci* 26(2):138–147. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.02.008>

Stiborová M, Indra R, Moserová M et al (2017) Comparison of human cytochrome P450 1A1-catalysed oxidation of benzo[a]pyrene in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Monatshfte Fur Chemie* 148(11):1959–1969. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-2002-0>

Tulp MT, Bruggeman WA, Hutzinger O (1977) Reductive dechlorination of chlorobiphenyls by rats. *Experientia* 33(9):1134–1136. <https://doi.org/10.1007/bf01922284>

Vasko T, Hoffmann J, Gostek S et al (2018) Telomerase gene expression bioassays indicate metabolic activation og genotoxic lower chlorinated polychlorinated biphenyls. *Sci Rep* 8(1):16903. <https://doi.org/10.1083/s41598-018-35043-e>

Zhang CY, Li X, Flor S et al (2022) Metabolism of 3-chlorobiphenyl (PCB 2) in a human-relevant cell line: evidence of dechlorinated metabolites. *Environ Sci Technol* 56(17):12460–12472. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03687>

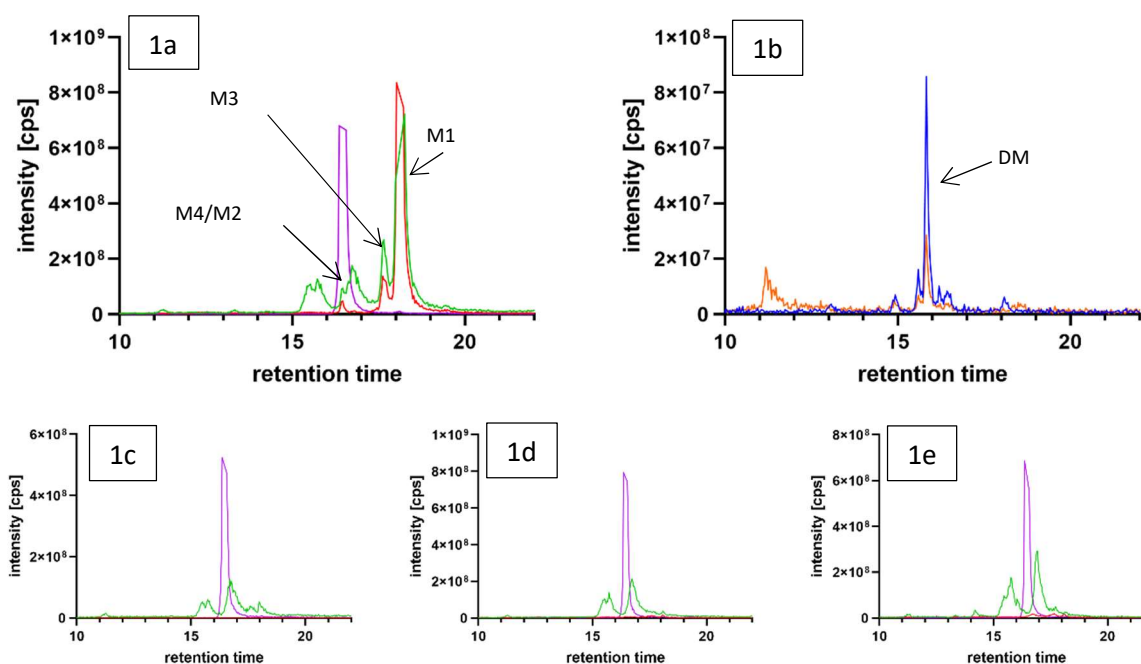
Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplemental Information to: Partial dechlorination of 2,4,4'-trichlorobiphenyl (PCB 28) mediated by recombinant human CYP1A2

Isabella Randerath¹, Natalia Quinete², Julian Peter Müller³, Julia Stingl³, Jens Bertram¹, Thomas Schettgen¹, Thomas Kraus¹ and Patrick Ziegler¹

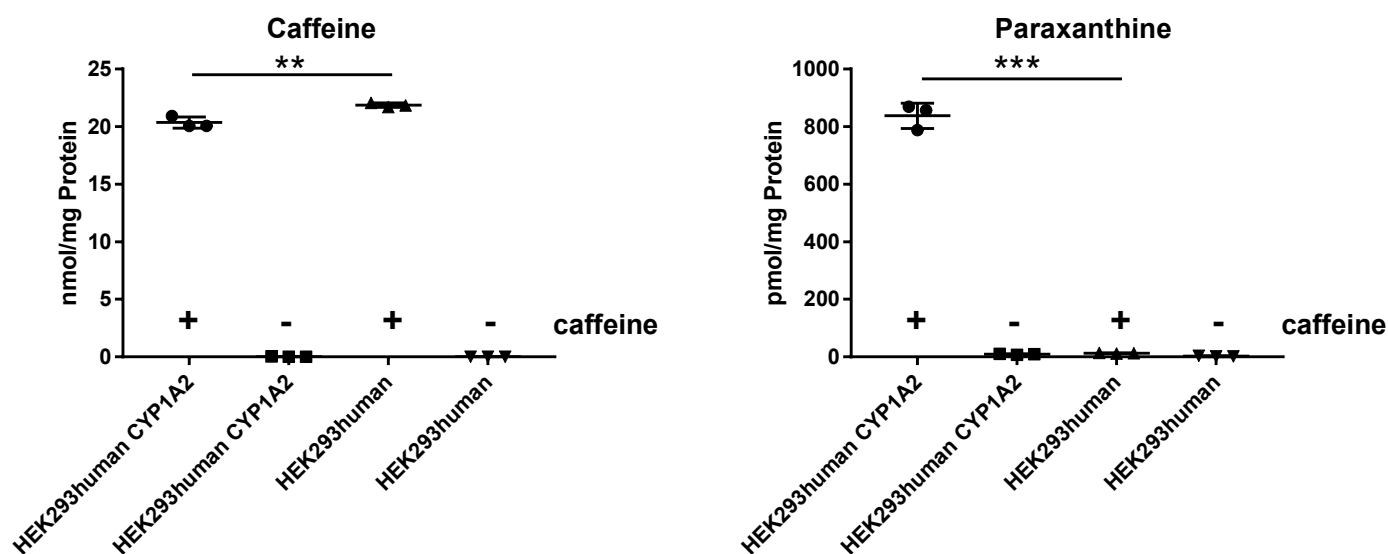
Supplemental Figures

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1: The extracted ion chromatograms of trichlorinated (left panel) and dichlorinated (right panel) OH-metabolites of PCB28. (1a+1b) RhCYP1A2 expressed in E.coli (bactosomes) was incubated with PCB 28 for 1h. (1c) RhCYP1A2 was heat inactivated before the start of the reaction, (1d) no NADPH was added to the reaction (1e) no PCB28 was added to the reaction Mass transitions are related to the following metabolites: trichlorinated 3'-OH-PCB28, 5-OH-PCB28, 4'-OH-PCB25, 4-OH-PCB31 m/z : 271.1 \rightarrow 235.0 green, m/z : 273.2 \rightarrow 237.0 red, m/z : 277.1 \rightarrow 241.0 pink (the last one equalizing the internal standard); dichlorinated 3-OH-PCB15): m/z : 237.2 \rightarrow 201.0 blue, m/z : 239.2 \rightarrow 202.9 orange

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2: Paraxanthine production in HEK293humanCYP1A2 cells. HEK293human CYP1A2 or HEK293 cells were incubated without or with caffeine (10 μ M) for 24h. Supernatant were used for the quantification of caffeine and paraxanthine with LC-MS.

Supplemental Table 1

PCB15 and PCB28 compositions (in Weight Percent) in Arochlors

Arochlors →

Arochlor Type	Chlorine positions	1016 c	1242 d	1248 e	1248 f	1254 g	1254 h	1260 i
PCB15	4,4'	2.40	2.10	0.22	0.06	0.01	0.03	0.01
PBC28	2,4,4'	8.5	6.86	3.59	5.57	0.06	0.19	0.03

Table source: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17-c4.pdf>. C-I represent different LOT-numbers of Arochlors used.

Supplemental Methods

Generating CYP1A2 expressing transgenic HEK293 cells.

Human CYP1A2 was cloned into the pcDNATM3.1/V5-His TOPO® vector using human liver cDNA as a template. The final construct was verified with Sanger DNA sequencing and restriction digestion. Stably expressing HEK293 cells were generated by transfection of the respective CYP1A2-DNA containing vector and subsequent selection by geneticin for 6-8 weeks. Single cell clones were obtained by limiting dilution. Each clone was checked for insertion by PCR using genomic DNA as a template.

Paraxanthine production in HEK293humanCYP1A2 cells.

HEK293 humanCYP1A2 or native HEK293 cells were incubated with or without caffeine (10 μ M) for 24 h. For quantification of caffeine and paraxanthine, 200 μ l cell culture supernatant was protein precipitated with 400 μ l acetonitrile and centrifuged for 5 minutes at 17.000 g. The precipitate was diluted 1 to 10 in 20 % (v/v) acetonitrile in water. 5 μ l were injected for LC-MS measurement onto an Agilent Poroshell 120 Phenyl Hexyl column (2.1 x 50 mm, 2.7 μ m) with A: 0.1 % (v/v) formic acid in water and B: 0.1 % (v/v) formic acid in acetonitrile with a flow rate of 0.6 ml/min. Analytes were separated in a method of 6 minutes, with a gradient from 5 to 95 % B over 3 minutes, 95 % B was kept for 1.4 minutes followed by re-equilibration to 5 % B. Quantification was performed in positive ion mode with the MRM transitions 195 to 138 and 181 to 124 *m/z* for caffeine and paraxanthine, respectively. Analyte concentration was determined with a calibration curve in sample matrix. Concentrations were normalized to protein levels measured with BCA Assay.

Acknowledgements: This research work was supported with funds from the German Social Accident Insurance (DGUV) to PZ (grant number FB295). The authors are responsible for the content of this publication.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.