

## Zusammenfassung

Pyrrrolizidinalkaloide (PA) sind eine Gruppe von Pflanzentoxinen, die wahrscheinlich zu den am weitesten verbreiteten natürlichen Toxinen gehören. Der Mensch ist diesen Substanzen durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel, wie z.B. Tee oder Honig, ausgesetzt. PA besitzen leberschädigende Eigenschaften. Ein charakteristisches Krankheitsbild nach einer PA-Vergiftung ist die sogenannte Lebervenenverschlusskrankheit, bei der eine Schädigung der sinusoidalen Endothelzellen zu einem Verschluss der hepatischen Sinusoide führt. In verschiedenen *in vivo* und *in vitro*-Untersuchungen wurde zudem ein gentoxisches und kanzerogenes Potential von PA gezeigt. Dabei wird angenommen, dass die Toxizität der PA auf ihre Metabolite zurückzuführen ist, die in Biotransformationsreaktionen gebildet werden, die überwiegend in der Leber ablaufen. Die molekularen Wirkmechanismen von PA sind jedoch bis heute nicht vollständig verstanden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die molekularen Wirkmechanismen von PA in Bezug auf die Lebertoxizität weiter aufzuklären.

Um *in vitro* zwischen Metabolismus-unabhängigen und Metabolismus-abhängigen Effekten unterscheiden zu können, war es wichtig, ein geeignetes externes Metabolisierungssystem zu identifizieren. Dazu wurde die Abbaurate des PA-Vertreters Lasiocarpin durch verschiedene Fraktionen eines Leberhomogenats (S9-Fraktion vs. Mikrosomen) unterschiedlicher Spezies (Ratte vs. Mensch) verglichen. Es zeigte sich, dass beide Spezies Lasiocarpin metabolisieren. Enzyme der Cytochrom P450 (CYP) 3A-Familie wurden dabei als bedeutende Enzyme für den Metabolismus von Lasiocarpin identifiziert. Weiterhin wurde gezeigt, dass humanes CYP3A4 in der Lage ist Lasiocarpin zu toxifizieren: Es konnte die Umwandlung in zytotoxische und gentoxische Metabolite nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Lebervenenverschlusskrankheit wurde eine PA-abhängige Beeinflussung der Prostanoidfreisetzung in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) als weit verbreitetem Zellmodell für Endothelzellen nachgewiesen, wobei diese erstmals mit der Regulation spezifischer Enzyme im Prozess der Prostanoidsynthese in Verbindung gebracht wurde. Schließlich haben Untersuchungen in HepG2-Zellen als Zellmodell für Hepatozyten als Hauptzelltyp der Leber eine Sensibilisierung der Leberzellen gegenüber Fas-vermittelter Apoptose als neuen Wirkmechanismus von PA identifiziert.

HUVEC und HepG2 sind beides Zelllinien ohne bzw. mit sehr geringer Fremdstoff-metabolisierender Aktivität. Es war daher möglich, Metabolismus-unabhängige von Metabolismus-abhängigen Effekten zu unterscheiden. Alle nachgewiesenen Effekte wurden jeweils nur für die bioaktivierten PA und nicht für die PA-Muttersubstanzen beobachtet. Dies bestätigt die Metabolismus-abhängige Toxifizierung von PA. Insbesondere der Nachweis gentoxischer Metabolite im humanen System zeigt die Relevanz der gewonnenen Daten für die Risikobewertung beim Menschen.

## **Abstract**

Pyrrolizidine alkaloids (PA) represent a group of phytotoxins that belong probably to the most widely distributed natural toxins. Humans are exposed to these substances via the consumption of contaminated food, such as tea or honey. PA intoxication may lead to severe liver damage. An obstruction of the hepatic sinusoids after destruction of the sinusoidal endothelial cells, namely veno-occlusive disease, is a typical disease after PA intoxication. Furthermore, carcinogenic and genotoxic properties of PA have been described. It is considered that PA are pro-toxins that require hepatic metabolic activation to exert toxicity. However, the molecular mechanisms leading to PA toxicity are still not fully understood. Hence, this work aimed to further investigate the molecular mechanisms of PA toxicity.

Identification of an appropriate external metabolizing system was necessary for differentiating between metabolism-independent and metabolism-dependent effects of PA. Comparison of the metabolic elimination of the PA representative lasiocarpine by different subcellular liver fractions (S9 vs. microsomes) of different species (rat vs. human) showed metabolism in both species. Enzymes of the cytochrome P450 (CYP) 3A family were identified as key enzymes for lasiocarpine metabolism. It was demonstrated that human CYP3A4 is capable of transforming lasiocarpine towards cytotoxic and genotoxic metabolites. Furthermore, PA-dependent alterations in prostanoid release were shown in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in regard to VOD. Changes in the prostanoid release were linked for the first time to distinct alterations of enzymes of prostanoid synthesis at the mRNA and protein levels. Additionally, sensitization toward Fas-mediated apoptosis was identified as a novel mechanism of action in HepG2 cells as a well-known cell model for hepatocytes as the main cell type of the liver.

Since HUVEC and HepG2 are both cell lines with none to only slight xenobiotic-metabolizing activity it was possible to differentiate between metabolism-independent and metabolism-dependent effects. All effects were observed only for metabolized PA but not for the parent compounds, confirming the hypothesis of metabolism-dependent toxification of PA. In particular, the evidence of genotoxicity in a human system demonstrates the relevance of the data obtained for risk assessment in humans.