

# Klassifizierung der genotoxischen Potenz von Pyrrolizidinalkaloiden mittels einer *in vitro* Genotoxizitätsbatterie und Einfluss der OCT1-vermittelten Aufnahme in menschlichen Leberzellen

M. Haas<sup>§</sup>, K. Wirachowski<sup>§</sup>, L. Thibol<sup>§</sup>, J.-H. Küpper<sup>#</sup>, D. Schrenk<sup>§</sup>, J. Fahrner<sup>§</sup>

<sup>§</sup> Fachgebiet der Lebensmittelchemie und Toxikologie, Fachbereich der Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Deutschland

<sup>#</sup> Fachgebiet der Molekulare Zellbiologie, Fachbereich der Umwelt und Naturwissenschaft, Brandenburg Universität für Technologie Cottbus-Senftenberg, Deutschland

Kontakt: Prof. Dr. Jörg Fahrner; +49 631 205 2974; [fahrner@chemie.uni-kl.de](mailto:fahrner@chemie.uni-kl.de)

**Einleitung:** Pyrrolizidinalkaloide (PAs) sind bekannte Kontaminanten in verschiedenen pflanzenbasierten Lebensmitteln wie Kräutertee und Nahrungsergänzungsmitteln. CYP450 Enzyme sind essentiell für die metabolische Aktivierung der PAs und Bildung von reaktiven DNA-Metaboliten. Es ist bekannt, dass PAs genotoxisch sind, hepatotoxisch wirken und Leberkrebs auslösen können. Neueste Daten legen nahe, dass das genotoxische und zytotoxische Potential der PAs strukturabhängig ist.

**Zielsetzung:** Das Ziel der Studie war die Bestimmung des relativen genotoxischen Potenzen von 11 strukturell unterschiedlichen PAs in metabolisch kompetenten Leberzellen mittels *in vitro* Genotoxbatterie und die Untersuchung des Einflusses einer OCT1-abhängigen Aufnahme.

**Material und Methoden:** HepG2 Zellen mit CYP3A4 Überexpression wurden als Zellmodell verwendet. Die Genotoxizität wurde mittels Western-Blot Analysen der DNA-Schadensmarker  $\gamma$ H2AX und p53 sowie dem alkalischen Comet-Assay untersucht. Die Daten wurden mittels PROAST-Software einer BMD-Modellierung unterzogen, um BMDL-Werte für die Bewertung der relativen Genotoxizität abzuleiten. Die Auswirkungen von OCT1 auf die Aufnahme wurden mit Hilfe von pan-OCT und OCT1-spezifischen Inhibitoren untersucht. Als Endpunkte wurden die Zellviabilität und Genotoxizität erfasst.

**Ergebnisse:** Allgemein zeigten Monoester wie Lycopsamin die schwächsten und zyklische Diester wie Retrorsin die stärksten genotoxischen Effekte innerhalb der Genotoxbatterie. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse aller genotoxischen Tests eine strukturabhängige Genotoxizität der PAs und die gleiche Korrelation hinsichtlich der Potenzeinstufung auf der Grundlage der BMDL-Werte. Die niedrigsten BMDL-Werte zwischen 0,1 und 0,8  $\mu$ M wurden für zyklische und offene Diester wie Retrorsin und Lasiocarpin ermittelt, während Monocrotalin und Lycopsamin die höchsten BMDL-Werte aufwiesen. Nach OCT1-Hemmung wurde eine starke Verringerung der PA-induzierten Genotoxizität als auch der Zytotoxizität nachgewiesen.

**Fazit:** Unsere Ergebnisse zeigen eine konzentrations- und strukturabhängige Toxizität, die auf dem Grad der Veresterung beruht. Die Ergebnisse des alkalischen Comet-Assays stehen in perfekter Übereinstimmung mit denen der Western-Blot-Experimenten. Unsere Daten unterstützen die Vorstellung, dass PAs nach ihrer relativen genotoxischen und zytotoxischen Potenz eingestuft werden können. Darüber hinaus zeigten die OCT-Studien, dass Heliotrin, Lasiocarpin und Riddelliin im Allgemeinen durch OCT1 transportiert werden.

**Potency ranking of PAs in human liver cells using an *in vitro* genotoxicity battery and impact of OCT1-mediated uptake**

*M. Haas*<sup>1</sup>, *K. Wirachowski*<sup>1</sup>, *J. H. Küpper*<sup>2</sup>, *D. Schrenk*<sup>1</sup>, *J. Fahrner*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Technical University of Kaiserslautern, Food Chemistry and Toxicology, Kaiserslautern, Germany

<sup>2</sup>Brandenburg University of Technology Cottbus-Senftenberg, Molecular Cell Biology, Brandenburg, Germany

**Introduction:** Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are known contaminants in numerous plant-based foods like herbal teas and dietary supplements. CYP450 enzymes are necessary for metabolic activation of PAs and formation of DNA reactive metabolites. It is well known that PAs are genotoxic, hepatotoxic and can cause liver cancer. Recent data provide evidence that the genotoxic and cytotoxic potential of PAs is largely structure-dependent.

**Objectives:** The aim of the study was to analyse the relative genotoxic potential of eleven structurally different PAs in metabolically competent human liver cells using an *in vitro* genotoxicity battery and to detail the impact of OCT1-mediated uptake.

**Material & Methods:** HepG2 cells with CYP3A4 overexpression were used as cell model, which were incubated with eleven different PAs for up to 24 h. The genotoxic potential was investigated using western-blot analysis of the DNA damage markers  $\gamma$ H2AX and p53 as well as the alkaline comet assay. Data were subject to BMD modelling via PROAST software to derive BMDL values for assessing the relative genotoxicity. The impact of OCT1 on PA uptake was studied using pan-OCT and OCT1-specific inhibitors. As endpoints, cell viability and genotoxicity markers were included.

**Results:** Overall, monoesters such as lycopsamine show the lowest and cyclic di-esters including retrorsine the strongest genotoxic effects within our test battery. Furthermore, the results of all genotoxic assays demonstrate a structure-dependent genotoxicity of the PAs and the same correlation regarding the potency ranking based on BMDL values. The lowest BMDL values ranging from 0.1 – 0.8  $\mu$ M were obtained for cyclic and open di-ester such as retrorsine and lasiocarpine, whereas monocrotaline and lycopsamine showed the highest BMDL values. After OCT1 inhibition, a strong reduction in both genotoxicity and cytotoxicity induced by lasiocarpin was determined.

**Conclusion:** Our findings show a concentration- and structure-dependent toxicity based on the degree of esterification. The alkaline comet assay results are perfectly in line with the western blot experiments. Our data strongly supports the notion that PAs can be ranked according to their relative genotoxic and cytotoxic potencies. Furthermore, the OCT inhibition studies displayed that heliotrine, lasiocarpine and riddelliine are generally transported by OCT1, which is currently validated by genetic knockdown studies.