

Abstract

The marine biotoxin okadaic acid (OA) is one of the main toxins inducing diarrhetic shellfish poisoning (DSP). It is produced by dinoflagellates and able to accumulate in the fatty tissue of filter-feeding shellfish, thereby entering the human food chain. By consuming highly contaminated shellfish, consumers can experience symptoms like diarrhea, stomach pain or vomiting. It has been the aim of research to elucidate the underlying molecular mechanisms of DSP in the intestine. OA is known as a very potent phosphatase inhibitor, especially for protein phosphatase 2A (PP2A). This can heavily affect signaling pathways in the cell. Furthermore, it has been shown *in vivo* that orally taken up OA has an especially high retention time in the liver after being able to pass into the bloodstream. Therefore, a look at the molecular changes in liver is equally important.

In this thesis, OA-induced molecular changes and mechanisms were analyzed *in vitro* in HepaRG cells. The effect of non-cytotoxic concentrations of OA on xenobiotic metabolism in HepaRG cells was evaluated first. Results showed a clear inhibitory effect of OA on xenobiotic metabolism, especially on Cytochrome P450 (CYP) enzymes, whose RNA and protein expression was significantly diminished. OA was further able to inhibit CYP activity. The underlying cause of CYP down-regulation was then identified as an activation of inflammatory signaling through activation of NF- κ B and JAK/STAT. To further elucidate the molecular mechanisms induced by non-cytotoxic concentrations of OA in HepaRG cells, a 2-dimensional gel electrophoresis in combination with mass-spectrometric protein identification was conducted. Findings included a strong effect on energy metabolism, especially on lipid metabolism, induction of oxidative stress and changes in the cytoskeleton. However, this method was limited in the number of proteins identifiable. Therefore, a much broader multi-omics study was conducted. Next generation sequencing was used for a transcriptomics analysis and further combined with liquid chromatography mass spectrometry (LC-MC) proteomics. Both datasets were compared and a Gene Ontology term enrichment analysis was performed, revealing the most down-regulated processes of both datasets to be the xenobiotic metabolism and the lipid metabolism. To find the underlying mechanisms, a phosphoproteomics analysis using LC-MS was conducted and further complemented by a targeted DigiWest approach.

Overall, this thesis for the first time provides an in-depth analysis of the OA-induced changes in human liver. By analyzing the phosphoproteome in HepaRG cells exposed to OA, many of the previously described OA-induced effects could be connected. Furthermore, many of the observed changes could be directly connected and thereby explained to the PP2A inhibition by OA. This thesis will be the basis for future *in vivo* studies, which will be used to reevaluate the risk assessment of OA by including the effects observed in liver.

Zusammenfassung

Das marine Biotoxin Okadasäure (OA) ist der Hauptverursacher der diarrhöischen Muschelvergiftung, welche sich besonders durch Symptome wie Diarrhö, Erbrechen oder Bauchschmerzen auszeichnet. Es wird von Dinoflagellaten produziert und kann durch seinen lipophilen Charakter im Fettgewebe filtrierender Schalentiere akkumulieren, wodurch es in die menschliche Nahrungskette gelangen kann. Es konnte bereits *in vivo* gezeigt werden, dass OA die Darmwand passiert und ins Blut gelangt, wodurch es im gesamten Körper verteilt werden kann. Dabei zeigt es eine besonders lange Retentionszeit in der Leber. OA ist außerdem ein sehr starker Phosphataseinhibitor, vor allem für die Protein Phosphatase 2A, was einen Einfluss auf intrazelluläre Signalwege haben kann. Aus diesen Gründen ist es wichtig, zusätzlich zum Darm, auch die durch die OA verursachten, molekularen Veränderungen in der Leber aufzuklären.

Diese Doktorarbeit wirft nun einen Blick auf diese von OA verursachten Veränderungen *in vitro* in HepaRG Zellen. Es wurde zuerst der Effekt von nicht zytotoxischen Konzentrationen von OA auf die Biotransformation untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Inhibierung der Cytochrom P450 (CYP) Enzyme. Der zugrundeliegende Effekt der CYP Herunterregulierung wurde anschließend als eine Aktivierung von NF- κ B und JAK/STAT durch OA identifiziert. Um weitere, von OA induzierte molekulare Mechanismen aufzuklären, wurde nun eine 2D Elektrophorese in Kombination mit massenspektrometrischer Proteinidentifikation. Die Ergebnisse zeigten einen starken Effekt von OA auf den Energiemetabolismus, vor allem auf den Lipidstoffwechsel, eine Aktivierung von oxidativem Stress und Veränderungen des Zytoskeletts. Diese 2D-Studie war jedoch methodisch limitiert, was die Anzahl der identifizierbaren Proteine angeht. Aus diesem Grund wurde eine multi-omics Studie durchgeführt. Es wurde Next Generation Sequencing verwendet, um Transkriptomik mit LC-MS Proteomik zu kombinieren. Beide Datensätze wurden verglichen und eine GO-Term Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die beiden am meisten herunterregulierten Prozesse in beiden Datensätzen die Biotransformation und der Lipidstoffwechsel waren. Um nun die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären wurde zusätzlich das Phosphoproteom mittels LC-MS analysiert und zur Vervollständigung des Phosphoproteom-Datensatzes eine targeted DigiWest Analyse durchgeführt.

Diese Thesis liefert nun zum ersten Mal eine tiefgehende Analyse der durch OA verursachten Veränderungen in der menschlichen Leber. Durch die Analyse des Phosphoproteoms konnten viele der bereits in vorangegangenen Studien beobachteten Veränderungen in einen Zusammenhang gebracht und viele Effekte auf die Inhibierung der PP2A durch OA zurückverfolgt und damit erklärt werden. Diese Ergebnisse werden die Grundlage für spätere *in vivo* Studien bilden, mit denen das Risiko von OA für den Menschen auch mit Blick auf die Effekte in der Leber neu bewertet werden kann.