

DISS. ETH No. 27017

**Mass Spectrometric quantification
of DNA adducts:
from damage formation to toxicological impacts**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH Zurich

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Susanne Marlene Geisen

Diploma in Food Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology, Germany

born on 22.06.1989

Citizen of

Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Shana J. Sturla

Prof. Dr. Bernd Wollscheid

Assistant Prof. Dr. Maureen McKeague

PD Dr. Beat Bornhauser

2020

Abstract

The structural integrity of nucleobases in DNA dramatically impacts cell viability, and chemical alteration via DNA adduct formation endangers genomic integrity. Exogenous and endogenous alkylating agents react with nucleophilic positions of DNA nucleobases to form DNA adducts. Alkylation of the O^6 -position of guanine results in altered capacity of the nucleobase for hydrogen bonding, and thereby disturbs DNA replication and genomic stability. Several cellular repair mechanisms exist to prevent genotoxic effects, but if left unrepaired, DNA adduct formation is considered a molecular initiating event in cancer development. N-nitroso compounds (NOCs) are known (carboxy)methylating agents inducing O^6 -carboxymethyldeoxyguanosine (O^6 -CMdG) and O^6 -methyldeoxyguanosine (O^6 -MedG). Both exogenous sources and endogenous formation contribute to human exposure to NOCs, associated with colorectal cancer. The work described in here addresses O^6 -guanine adduct formation by NOCs and linking the biological impact of carboxymethylated and methylated O^6 -guanine with the persistence of specific forms of DNA damage.

In *Chapter 1*, current knowledge of NOC-induced DNA adduct formation and its association with colon cancer is summarized. The focus is hereby O^6 -CMdG and O^6 -MedG occurrence and biological consequences. Further, a general introduction into DNA damage formation and cellular DNA damage response is provided. Finally, detection methods for DNA adducts in biological samples are discussed.

In *Chapter 2*, the use of L-azaserine as a model compound to study NOC exposure is highlighted. The chemical mechanism of L-azaserine-induced O^6 -CMdG formation was evaluated. Results indicated that hydrolysis of L-azaserine to L-serine is promoted by acid, and under physiological pH-conditions, L-azaserine is stable. Evidence for the formation of an O^6 -Ser-CMdG intermediate in azaserine-induced O^6 -CMdG formation was demonstrated for the first time. Further, a nano-liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry (nanoLC-hrMS2) method was developed to assess the persistence of O^6 -CMdG and O^6 -MedG in cells upon exposure to L-azaserine. Dose- and time-dependent formation of adducts were established, further characterizing L-azaserine induced O^6 -CMdG and O^6 -MedG formation. Results are anticipated to not only help future study design using L-azaserine to study NOC exposure but also shed light on NOC-induced DNA adduct formation in a biological matrix.

In *Chapter 3*, the impact of the two repair mechanisms, nucleotide excision repair (NER) and O^6 -methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), on O^6 -CMdG-induced mutagenicity was assessed. Exposure of cells to L-azaserine resulted in decreased cell viability, increased mutagenicity and persistence of O^6 -CMdG adduct levels in MGMT-inhibited cells, thereby suggesting MGMT to be involved in mitigating biological consequences upon exposure to carboxymethylating agents. Further, sensitivity towards L-azaserine exposure was also demonstrated in NER-deficient cells. However, preliminary results assessing activity of NER on O^6 -CMdG were contradictory. Persistence of O^6 -CMdG adduct levels was more pronounced in MGMT-inhibited and NER-deficient cells compared to cells lacking activity in only one repair pathway, thereby suggesting that the interplay between NER and MGMT is

important for efficient cellular O^6 -CMdG damage response. Future studies investigating the contribution of NER and MGMT to O^6 -CMdG repair are suggested.

In *Chapter 4*, the involvement of the repair enzyme MGMT in O^6 -CMdG removal is demonstrated. Upon exposure to L-azaserine, cell viability, genotoxicity, and O^6 -MedG and O^6 -CMdG adduct levels were assessed in MGMT-deficient and MGMT-inhibited HCEC cells and compared to Wild type (WT) and MGMT-proficient cells, respectively. As quantified by nanoLC-hrMS², O^6 -MedG and O^6 -CMdG adduct levels persisted in MGMT-deficient and MGMT-inhibited HCEC cells. Further, MGMT-deficient cells revealed decreased cell viability and increased genotoxicity after exposure to L-azaserine compared to WT. Thus, the data support the hypothesis that highly active MGMT in colon epithelial cells confers protection against colorectal carcinogenesis initiated by exposure to methylating and carboxymethylating agents such as NOCs that are present in the diet.

In *Chapter 5*, dose-response relationships were established for O^6 -MeG adduct levels in various biological systems after exposure to increasing concentrations of methylating agents. Different analytical approaches were compared with regard to their sensitivity and specificity for the quantification of O^6 -MedG. A highly sensitive LC-MS/MS approach revealed improved sensitivity and specificity in O^6 -MeG quantification compared to the antibody-based methods immuno-slot blot and immunofluorescence microscopy, thereby allowing for better distinction at low adduct levels. Applying the LC-MS/MS approach, O^6 -MeG adducts could be detected in peripheral blood mononuclear cells exposed to clinically relevant doses of the methylating anticancer drug temozolomide (TMZ). Further, a genotoxic threshold for O^6 -MeG adduct levels was established by applying the LC-MS/MS approach to colonic and hepatic genomic DNA extracted from mice challenged with increasing concentrations of a methylating agent. Interestingly, MGMT-deficient mice revealed a linear dose response, supporting the current mechanistic understanding of the impact of cellular repair status on DNA adduct levels and the onset of carcinogenesis. The data further highlights the usage of LC-MS in DNA adduct quantification for biomonitoring approaches to assess therapeutic efficacy of alkylating agents but also to assess exposure to methylating agents.

In *Chapter 6*, the key findings of the thesis work are summarized and critically evaluated. Future studies are described to further improve the current understanding of NOC-induced DNA adduct formation and biological consequences. Results from these studies are anticipated to address an important gap in genotoxic risk assessment of NOC exposure.

The work presented in *Appendix I-III* is additional findings concerning factors that impact chemotherapy drug function. *Appendix I* summarizes available clinical data of well-studied examples of foods and herbal supplements that lower bioavailability of chemotherapy drugs, thereby suggesting that concomitant use should be avoided. Also, pre-clinical evidence for the anti-cancer activity of an herbal supplement is presented and critically discussed. *Appendix II* provides a broader perspective on clinical herb-drug interactions. Pharmacologically active compounds in foods and herbal supplements are presented and their impact on drug-metabolizing enzymes or transporters discussed with regard to altered drug-bioavailability. Results from clinical studies, combining the use of a single chemotherapy agent with a single herbal supplement and include pharmacokinetic monitoring, are presented. While pre-clinical

data suggest beneficial effects, clinical studies mostly reveal that concomitant use of herbal supplements with chemotherapy drugs results in lowered drug-bioavailability, thereby most likely reducing efficacy. To address the complexity of herb-drug interactions, it was suggested to monitor metabolic biomarkers in clinical studies and to screen for genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzyme. Further, databases summarizing herb-drug interactions are anticipated to become a useful tool to guide decision making in clinical practice.

In *Appendix III*, the underlying mechanism for drug synergy in resistant cases of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ETP-ALL) patient derived xenografts (PDXs) is elucidated. *In vivo* and *in vitro* results confirm synergistic effect of the alkylating agent and clinical pro-drug PR-104A with the antimetabolite clofarabine. The working hypothesis is that clofarabine inhibits the repair of PR-104A-derived interstrand crosslinks (ICLs) and the increased persistence of ICLs results in improved PR-104A activity. Assessing PR-104A derived DNA adducts in PDXs by mass spectrometry suggested candidate structures that persist under sensitive conditions, but the experimental variance associated with addressing individual adducts was high, thereby not allowing for a significant conclusion. Therefore, ICLs were assessed by the alkaline comet assay. Combinatorial treatment resulted in increased DNA damage and delayed ICL repair kinetics in resistant PDXs, further highlighting the potential of clofarabine to preserve PR-104A-induced DNA ICLs as basis for drug synergy. Future studies elucidating the mechanism for clofarabine-mediated suppression of ICL repair are suggested.

Zusammenfassung

Die Zellviabilität wird massgeblich von der strukturellen Integrität der Nukleobasen der DNA beeinflusst und jede chemische Modifizierung der DNA zu einem sogenannten DNA-Addukt stellt eine Gefahr für die genomische Stabilität dar. Exogene und endogene alkylierende Substanzen reagieren mit nukleophilen Positionen der DNA Nukleobasen und bilden DNA-Addukte. Die Alkylierung der O^6 -Position von Guanin verändert das Vermögen dieser Nukleobase, Wasserstoffbrücken auszubilden, und beeinträchtigt damit die DNA-Replikation und die genomische Stabilität. Es existieren verschiedene zelluläre Reparaturmechanismen, um genotoxischen Effekten vorzubeugen. Auf molekularer Ebene gelten nicht reparierte DNA-Addukte als initiiierendes Ereignis in der Krebsentstehung. N-Nitroso-Verbindungen sind bekannt als (carboxy)methylierende Verbindungen und induzieren O^6 -Carboxymethyldeoxyguanosin (O^6 -CMdG) und O^6 -Methyldeoxyguanosin (O^6 -MedG). Darmkrebs steht in Verbindung mit der Exposition von Menschen mit N-Nitroso-Verbindungen, welche sowohl exogenen als auch endogenen Ursprungs sein können. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Bildung von O^6 -CMdG durch N-Nitroso-Verbindungen und verbindet die biologischen Konsequenzen von carboxymethyliertem und methyliertem O^6 -Guanin mit der Persistenz von bestimmten Formen von DNA-Schäden.

In *Kapitel 1* wird das gegenwärtige Wissen über die DNA-Adduktbildung durch N-Nitroso-Verbindungen und deren Assoziierung mit Darmkrebs zusammengefasst. Der Fokus liegt hierbei auf dem Vorkommen von O^6 -CMdG und O^6 -MedG und deren biologischen Konsequenzen. Des Weiteren wird in diesem Kapitel eine allgemeine Einführung in die DNA-Schadensbildung und die zelluläre DNA-Schadensantwort aufgeführt. Zum Schluss werden noch Detektionsmethoden für DNA-Addukte in biologischen Proben erläutert.

In *Kapitel 2* wird die Eignung von L-Azaserin als Musterverbindung, um die Exposition von N-Nitroso-Verbindungen zu studieren, hervorgehoben. Hierfür wurde der chemische Mechanismus der L-Azaserin-induzierten O^6 -CMdG-Bildung untersucht. Die Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass die Hydrolyse von L-Azaserin zu L-Serin säurekatalysiert ist und dass L-Azaserin unter physiologischen pH-Bedingungen stabil ist. Es wurde zum ersten Mal ein O^6 -Ser-CMdG Intermediat in der von Azaserin induzierten O^6 -CMdG Bildung nachgewiesen. Ausserdem wurde eine Methode, die auf der Kopplung der Nano-Flüssigkeitschromatographie mit der hochauflösenden Tandem-Massenspektrometrie (nanoLC-hrMS²) basiert, entwickelt, um die Persistenz von O^6 -CMdG und O^6 -MedG nach der Exponierung von Zellen mit Azaserin bestimmen zu können. Es wurde eine konzentrations- und zeitabhängige Bildung von Addukten bestimmt, welche die durch L-Azaserin induzierte Bildung von O^6 -CMdG und O^6 -MedG näher charakterisieren. Es wird angenommen, dass die Ergebnisse die zukünftige Planung von Studien hinsichtlich der Exponierung mit N-Nitroso-Verbindungen erleichtern und die Bildung von DNA-Addukten durch N-Nitroso-Verbindungen in der biologischen Matrix erklären.

In *Kapitel 3* wird der Einfluss zweier Reparaturmechanismen, namentlich Nukleotid-exzision Reparatur (NER) und O^6 -Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), auf die von O^6 -CMdG induzierte Mutagenität bestimmt. Die Exponierung von Zellen, welche in ihrer MGMT-Aktivität inhibiert waren, mit L-Azaserin resultierte in einer verminderten

Zellviabilität, einer gesteigerten Mutagenität und anhaltenden O^6 -CMdG-Adduktleveln. Diese Ergebnisse legen nahe, dass MGMT darin involviert ist, biologische Konsequenzen, welche sich aus einer Exponierung von carboxymethylierenden Substanzen ergeben, abzumildern. NER-defiziente Zellen waren ebenfalls sensitiv gegenüber einer Exponierung mit carboxymethylierenden Substanzen. Jedoch waren vorläufige Ergebnisse zur NER-Aktivität an O^6 -CMdG widersprüchlich. Verglichen mit Zellen, welche lediglich in einem Reparaturmechanismus defizient waren, war die Persistenz von O^6 -CMdG-Adduktleveln in MGMT-inhibierten und NER-defizienten Zellen stärker ausgeprägt. Diese Ergebnisse deuten an, dass das Zusammenspiel von NER und MGMT für eine effiziente O^6 -CMdG Schadensantwort wichtig ist. Es werden zukünftige Studien diskutiert, die den Beitrag von NER und MGMT zur O^6 -CMdG-Reparatur untersuchen.

In *Kapitel 4* wird aufgezeigt, dass MGMT an der Beseitigung von O^6 -CMdG involviert ist. Nach Exponierung mit L-Azaserin, wurden die Zellviabilität, die Genotoxizität und die Adduktlevel an O^6 -MeG und O^6 -CMdG in MGMT-defizienten und MGMT-inhibierten Darmepithelzellen bestimmt und mit den entsprechenden Daten in Wildtypzellen mit MGMT-Aktivität verglichen. Wie mit der nanoLC-hrMS² bestimmt wurde, sind die O^6 -MeG- und die O^6 -CMdG-Adduktlevel in MGMT-defizienten und MGMT-inhibierten Zellen persistent. Des Weiteren wiesen MGMT-defiziente Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen eine verminderte Zellviabilität und eine gesteigerte Genotoxizität nach der Exponierung mit L-Azaserin auf. Demnach unterstützen die Ergebnisse die Hypothese, dass eine hochaktive MGMT in Darmepithelzellen diesen Schutz gegenüber Darmkrebsentstehung verleiht, welche von methylierenden und carboxymethylierenden Substanzen, darunter N-Nitroso-Verbindungen, welche auch in der Ernährung präsent sind, initiiert wird.

In *Kapitel 5* wurden Dosis-Wirkungs-Beziehungen für O^6 -MeG-Adduktlevel in verschiedenen biologischen Systemen nach deren Exponierung mit einer ansteigenden Konzentration von methylierenden Verbindungen nachgewiesen. Verschiedene analytische Methoden wurden hierbei hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität für die Quantifizierung von O^6 -MeG verglichen. Im Vergleich mit den Antikörper-basierten Methoden Immuno-Slot Blot und Immunofluoreszenz-Mikroskopie zeigte ein hoch sensitiver LC-MS/MS-Ansatz verbesserte Sensitivität und Spezifität für die Quantifizierung von O^6 -MeG auf und ermöglichte damit eine bessere Unterscheidung von niedrigen Adduktleveln. Mit der Verwendung dieses LC-MS/MS-Ansatzes konnten O^6 -MeG-Addukte in peripheren mononukleären Zellen, welche mit klinisch relevanten Dosen des methylierenden Antikrebsmittels Temozolomide (TMZ) exponiert wurden, nachgewiesen werden. Die LC-MS/MS-Methode wurde auch für die Analyse von Darm- und Leber-DNA von Mäusen angewendet, nachdem diese mit verschiedenen Konzentrationen einer methylierenden Substanz behandelt wurden, wobei ein genotoxischer Schwellenwert für O^6 -MeG-Adduktelvel etabliert wurde. Interessanter Weise wiesen Mäuse, welche defizient in MGMT waren, eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung auf, was das derzeitige Verständnis vom Einfluss des zellulären Reparaturstatus auf DNA-Adduktlevel und auf den Beginn der Krebsentstehung befürwortet. Die Daten unterstreichen auch den Einsatz von LC-MS in der DNA-Adduktquantifizierung in Biomonitoring-Ansätzen zur Bestimmung der therapeutischen

Wirksamkeit von alkylierenden Verbindungen und zur Bestimmung der Exponierung mit methylierenden Verbindungen.

In *Kapitel 6* werden die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst und kritisch evaluiert. Es werden zukünftige Studien beschrieben, welche das derzeitige Verständnis der DNA-Adduktbildung durch N-Nitroso-Verbindungen, aber auch die biologischen Konsequenzen dieser Addukte weiter verbessern können. Es wird angenommen, dass die Ergebnisse dieser Studien einen wichtigen Beitrag zur genotoxischen Risikobewertung der Exponierung mit N-Nitroso-Verbindungen leisten.

Die Arbeiten in *Appendix I-III* befassen sich mit zusätzlichen Ergebnissen bezüglich einiger Faktoren, welche die Wirkung von Chemotherapeutika beeinflussen. In *Appendix I* werden verfügbare klinische Daten zu gut erforschten Beispielen an Lebensmitteln und pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln, welche die Bioverfügbarkeit von Chemotherapeutika vermindern, zusammengefasst. Die Daten legen nahe, dass die gleichzeitige Einnahme vermieden werden sollte. Zusätzlich werden präklinische Hinweise auf eine Antikrebsaktivität eines pflanzlichen Nahrungsergänzungsmittels dargelegt und kritisch diskutiert. In *Appendix II* werden klinische Daten zur Wechselwirkung zwischen pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln und Chemotherapeutika umfassender zusammengefasst. Pharmakologisch aktive Bestandteile in Lebensmitteln und pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln werden aufgezeigt und deren Einfluss auf Enzyme, welche für die Metabolisierung und die Aufnahme von Medikamenten verantwortlich sind, diskutiert um darauf aufbauend die veränderte Bioverfügbarkeit der Chemotherapeutika zu erklären. Ergebnisse von klinischen Studien werden präsentiert, welche die Einnahme eines Chemotherapeutikums mit der Einnahme eines einzigen pflanzlichen Nahrungsergänzungsmittel kombinieren und pharmakokinetische Parameter überwachen. Während präklinische Daten förderliche Effekte durch die gleichzeitige Einnahme von pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln vermuten lassen, zeigen klinische Studien größtenteils eine verminderte Bioverfügbarkeit von Chemotherapeutika auf, welche vermutlich wiederum deren Wirksamkeit beeinträchtigt. Um die Komplexität dieser Wechselwirkung präziser zu verstehen, wurde vorgeschlagen, metabolische Biomarker in klinischen Studien zu überwachen und genetische Polymorphismen in metabolisierenden Enzymen zu erfassen. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass Datenbanken, welche relevante Wechselwirkungen zwischen pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln und Chemotherapeutika erfassen, wesentlich zur Entscheidungsfindung in der klinischen Praxis beitragen werden.

In *Appendix III* wird der Mechanismus untersucht, welcher die synergistische Wirkung zweier Chemotherapeutika in resistenten Fällen der akuten lymphoblastischen Leukämie in Patienten-abgeleiteten Xenografts (PDX) bestimmt. *In vivo* und *in vitro* Ergebnisse bestätigen einen synergistischen Effekt zwischen dem alkylierenden Agenz PR-104A und dem Antimetaboliten Clofarabin. Es wird davon ausgegangen, dass Clofarabin die Reparatur von DNA-Interstrand-Crosslinks (ICLs), welche von PR-104A induziert werden, inhibiert und somit über persistente ICL-Level die Aktivität von PR-104A verbessert. Die Untersuchung von PR-104A-induzierten DNA-Addukten in PDX ergab potentielle Kandidaten, welche unter sensitiven Bedingungen persistent sind, jedoch war die experimentelle Varianz zu groß und

erlaubte keine signifikanten Schlüsse. Deshalb wurden ICLs mit dem alkalischen Comet Assay erfasst. Die Kombination der zwei Chemotherapeutika in resistenten PDXs führte zu erhöhten DNA-Schäden und verzögerte ICL-Reparaturkinetiken. Die Ergebnisse unterstreichen das Vermögen von Clofarabin, die Reparatur von PR-104A-induzierten ICLs zu verhindern, und können somit die ermittelte synergistische Wirkung erklären. Es werden weitere Studien vorgeschlagen, welche die Unterdrückung der ICL-Reparatur durch Clofarabin untersuchen.