



Doctoral Thesis

## **DNA adduct analysis strategies for biomarkers of bio-reductive prodrug action**

**Author(s):**

Stornetta, Alessia

**Publication Date:**

2016

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010797864> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 23984

**DNA ADDUCT ANALYSIS STRATEGIES FOR  
BIOMARKERS OF BIOREDUCTIVE PRODRUG ACTION**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH Zurich  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
**ALESSIA STORNETTA**

MSc ETH in Food Science, ETH Zurich, Switzerland

born on 28.04.1988

Citizen of

Sant'Antonino (TI)

Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Shana J. Sturla

Prof. Dr. Silvia Balbo

Prof. Dr. Stephen S. Hecht

Prof. Dr. Bernd Wollscheid

2016

## Abstract

DNA alkylating agents as anticancer drugs were introduced more than 60 years ago, and are still used as first line medication. Drawbacks include extensive side effects and the development of resistance. A strategy proposed to improve the efficacy of DNA alkylating drugs involves monitoring the abundance of drug-derived DNA adducts in tumor or surrogate tissues for use as biomarkers to stratify patients on the basis of drug susceptibility.

The goal of this thesis was to study the DNA adducts induced by the experimental DNA alkylating hypoxia-activated anticancer prodrug PR104A. PR104A is metabolically activated by reductase enzymes to two major cytotoxic metabolites, the hydroxylamine PR104H and the amine PR104M. *In vitro* cell studies identified interstrand crosslinking by PR104H and PR104M as the major mechanism of cytotoxicity, but the structural identity and abundance of the DNA adducts induced by PR104A, PR104H, and PR104M were never assessed. We therefore developed bioanalytical approaches based on liquid chromatography-mass spectrometry for the identification and quantitation of PR104A-derived DNA adducts, and to better investigate the relationship between DNA adducts and PR104A efficacy in biological samples.

Previous studies involving cell lines or cells derived from cancer patients treated with DNA alkylating drugs suggested that there is a correlation between drug-induced DNA adducts and cellular or patient response. DNA adducts from alkylating drugs have therefore the potential to be used as predictive biomarkers of efficacy. In *Chapter 1*, precision medicine in cancer chemotherapy, commonly used DNA adduct quantitation strategies, and a summary of previous studies concerning the relationship between DNA adducts induced by alkylating drugs and biological responses are summarized and discussed.

In *Chapter 2*, the development of a high-resolution/accurate-mass (HRAM) nanoLC-MS<sup>3</sup> DNA adductomic approach for screening DNA adducts in biological samples is presented. So far, DNA adduct screening was performed by neutral loss (NL) monitoring of the 2'-deoxyribose moiety, a structural feature of DNA adducts. In our approach, we added the NL monitoring of one of the four DNA bases (guanine, adenine, cytosine, and thymine) as criterion for DNA adduct detection and MS<sup>3</sup> fragmentation. Adding this feature to the commonly used NL of 2'-deoxyribose broadened the scope of DNA adduct detection by allowing for the detection of all base adducts. Additionally, the use of HRAM instrumentation allowed for increased mass selectivity, whereas the use of nanoflow/nanoelectrospray increased the sensitivity of DNA adduct detection. Another new

characteristic of the approach involved the use of a list of anticipated exact ion masses for PR104A-derived DNA adducts to be used as criterion for triggering MS/MS fragmentation. The inclusion of the list allowed for a targeted analysis that increased sensitivity and selectivity of DNA adduct detection. The approach was tested on screening anticipated PR1014A-derived DNA adducts in purified DNA and in DNA extracted from cells treated with increasing concentrations of PR104A. Several anticipated DNA mono and crosslinked adducts from PR104A or its two metabolites were detected, and a semi-quantitative analysis revealed that adduct formation was dose-dependent. In addition to its application to PR104A, this DNA adductomic approach has the potential to be used for screening for DNA adducts induced by endogenous or exogenous exposures, for supporting the development of new DNA alkylating drugs, and for addressing potentially adverse drug reactions resulting from DNA alkylation.

In *Chapter 3*, a nanoLC-MS/MS DNA adductomic approach for quantitation of PR104A-derived DNA adducts in cells was developed. We pursued an alternative strategy involving a relative, rather than absolute, quantitation approach for comparing adduct levels. The strategy was based on the creation of a stable isotope-labeled adduct mixture (SILAM) that was combined with selected reaction monitoring (SRM) data acquisition targeting 19 PR104A-derived adduct masses. The SILAM was created by reacting isotope-labeled PR104A and purified DNA, and its characterization revealed the presence of 33 isotope-labeled PR104A-derived DNA adducts, to be used together as an internal standard for relative quantitation. The performance of the SILAM for relative quantitation of adducts in cells was validated and used for deriving relative amounts of PR104A-DNA adducts in colon cancer cells preconditioned with the bioactive food compound sulforaphane (SF). SF has been found to up-regulate the PR104A-activating enzyme AKR1C3 and to increase the cytotoxicity of PR104A in colon cancer cells by about 3-fold. We hypothesized that the increased cytotoxicity for PR104A observed in cells preconditioned with SF is induced by an increased level of the DNA adducts induced by the two reduced metabolites, but not PR104A itself. We demonstrated that the SILAM-SRM approach enabled comparing DNA adduct levels in cells under different conditions. We found that preconditioning with SF increased levels of DNA adducts induced by the metabolites of PR104A by ~2.4-fold. These results suggested that DNA adducts induced by PR104A correlate with drug potency, and supported the assertion that PR104A-derived adduct profiles may be used as predictive markers of drug efficacy in patient-derived samples.

In *Chapter 4*, the findings of this thesis are summarized and critically evaluated. Limitations, improvements, and alternative strategies are discussed as well as future direction and preliminary experiments for future applications. In *Appendix A* is an additional publication involving the development of a risk management tool for the prioritization of chemical hazard-food combinations. The work reported in this study is quite distinct from the main goals of the thesis, but involves relevant central themes such as DNA-alkylating chemicals and how the likelihood of adverse biological effects relates to exposure levels.

In conclusion, findings presented in this thesis provide new insights on the DNA alkylation potential of the experimental prodrug PR104A, and support the future development of DNA adduct-based strategies for patient stratification in cancer chemotherapy.

## Sommario

Agenti alchilanti del DNA sono stati introdotti più di 60 anni fa come farmaci antitumorali e sono ancora oggi utilizzati in prima linea durante il trattamento del cancro. Gli svantaggi della terapia più comuni sono effetti collaterali e sviluppo di resistenza al farmaco. Una strategia per migliorarne l'efficacia potrebbe essere la quantificazione degli addotti al DNA formati dal farmaco nel tessuto tumorale o tessuti surrogati, da utilizzare come marcatori per selezionare pazienti sulla base della loro suscettibilità all'agente alchilante.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di studiare gli addotti al DNA introdotti da un agente alchilante sperimentale chiamato PR104A. Dopo essere stato internalizzato nelle cellule, PR104A viene metabolicamente attivato da reduttasi in due metaboliti tossici: l'idrossilammina PR104H e l'ammina PR104M. Studi su cellule identificano la formazione di addotti da parte di PR104H and PR104M tra i due filamenti di DNA come il principale meccanismo d'azione di questo farmaco. Tuttavia le strutture e la quantità degli addotti causati da PR104A e i suoi metaboliti non sono ancora stati studiati. In questa tesi abbiamo sviluppato metodi bioanalitici basati su cromatografia e spettrometria di massa per l'identificazione e la quantificazione degli addotti al DNA causati da PR104A, e per studiare la relazione tra addotti al DNA e l'efficacia del farmaco PR104A in campioni biologici. Questa relazione è stata studiata in precedenza in linee cellulari o in cellule derivate da pazienti affetti da cancro. I risultati suggeriscono che esiste una correlazione tra il livello di addotti del DNA indotti da farmaci alchilanti e la risposta cellulare o del paziente e supportano l'uso di addotti al DNA formati da farmaci alchilanti come biomarcatori predittivi dell'efficacia del farmaco.

Il *Capitolo 1* consiste in un'introduzione alla medicina di precisione nella chemioterapia antitumorale ed ai metodi analitici comunemente utilizzati per quantificare gli addotti al DNA. Tutti i precedenti studi riguardanti la relazione tra addotti al DNA formati da farmaci alchilanti e le risposte biologiche in linee cellulari o biopsie sono riassunti.

Nel *Capitolo 2* è riportato un metodo adduttomico che utilizza cromatografia liquida ad alta prestazione e spettrometria di massa ad alta risoluzione e precisione (HPLC-HRAM-MS) per investigare gli addotti al DNA formati da PR104A in campioni biologici. Il metodo comunemente utilizzato per identificare gli addotti in studi di adduttomica si basa sul monitoraggio della massa corrispondente alla perdita neutrale del 2'-deossiribosio. Nel nostro approccio, abbiamo aggiunto al monitoraggio del 2'-deossiribosio, anche quello di una delle quattro basi del DNA (guanina, adenine, citosina e timina). L'aggiunta di questo criterio al

metodo consente di identificare tutti gli addotti, anche quelli che durante la preparazione dei campioni perdono il 2'-deossiribosio. Il metodo sviluppato utilizza uno strumento ad alta risoluzione e precisione di massa, che aumenta significativamente la selettività nell'identificazione di addotti. Un'altra caratteristica del metodo è l'utilizzo di nanoflusso/nanospray, il quale aumenta notevolmente la sensibilità d'identificazione degli addotti. Per aumentare ulteriormente la selettività e la sensibilità, un'analisi più mirata è stata eseguita introducendo una lista delle masse esatte corrispondenti a possibili addotti formati da PR104A, PR104H e PR104M come criterio per la frammentazione MS/MS. Questo metodo è stato utilizzato per identificare gli addotti al DNA estratto da cellule esposte a concentrazioni crescenti di PR104A. Lo screening ha rivelato la formazione di monoaddotti e addotti bifunzionali formati da PR104A o dai due metaboliti. Inoltre un'analisi semi-quantitativa ha rivelato che la formazione degli addotti aumenta con l'aumentare della concentrazione di PR104A. Questo metodo adduttomico può essere universalmente utilizzato per identificare gli addotti al DNA formati da esposizioni endogene, per lo sviluppo di nuovi farmaci e per identificare possibili interazioni tra il DNA ed agenti endogeni ed esogeni.

Nel *Capitolo 3* un approccio adduttomico basato sulla cromatografia liquida e spettrometria di massa (HPLC-MS) e sull'impiego di nanoflusso/nanospray è stato sviluppato per la quantificazione degli addotti al DNA formati da PR104A nelle cellule. La strategia che abbiamo deciso di perseguire è un'alternativa alla quantificazione assoluta degli addotti, ovvero una quantificazione relativa per paragonare i livelli di addotti in diversi campioni. Quest'approccio è basato sulla creazione di una miscela di addotti marcati con un isotopo stabile (SILAM, dall'inglese *stable isotope-labeled adduct mixture*) e l'acquisizione di spettrometria di massa che si avvale di reazioni selezionate (SRM, dall'inglese *selected reaction monitoring*) per 19 masse di addotti formati da PR104A, PR104H e PR104M. Il SILAM è costituito da 33 addotti al DNA contenenti isotopi marcati e derivati da PR104A, i quali possono essere usati come standard interno per una quantificazione relativa degli addotti. SILAM è stato usato per quantificare gli addotti formati da PR104A nelle cellule tumorali del colon precedentemente esposte al composto appartenente alla famiglia degli isotiocianati sulforafano (SF). È stato trovato in precedenza che SF è in grado di aumentare l'espressione dell'enzima AKR1C3, uno degli enzimi responsabili per l'attivazione di PR104A in PR104H e PR104M. L'esposizione delle cellule tumorali del colon ad una dose non tossica di SF e poi a PR104A ha dimostrato un aumento della citotossicità pari a tre volte rispetto a quella misurata nelle cellule non esposte a SF. L'ipotesi è che l'aumento della citotossicità sia indotto da un aumento del livello degli addotti formati dai due metaboliti. L'applicazione dell'approccio SILAM-SRM ha dimostrato che l'esposizione delle cellule a

SF aumenta il livello degli addotti formati dai metaboliti di circa 2,4 volte, suggerendo come gli addotti del DNA formati da PR104A possano correlare con la potenza del farmaco nelle cellule. Questi risultati supportano l'uso degli addotti come marcatori dell'effetto di PR104A.

Nel *Capitolo 4* i risultati di questa tesi sono riassunti e discussi in modo critico. Limiti, margini di miglioramento e strategie alternative sono discussi, così come esperimenti preliminari per applicazioni future. L'*Appendice A* riporta una pubblicazione aggiuntiva riguardante lo sviluppo di uno strumento di gestione del rischio per definire priorità di analisi in ambito alimentare sulla base della tossicità del composto presente nel cibo e della quantità di assunzione dell'alimento in questione.

In conclusione, i risultati presentati in questa tesi forniscono nuove informazioni sul potenziale di alchilazione del farmaco sperimentale PR104A, e supportano lo sviluppo di strategie future basate sull'uso degli addotti del DNA per stratificare pazienti sulla base della loro suscettibilità a PR104A.