

DISS. ETH No. 20793

**PERSISTENCE OF NUCLEIC ACID ALKYLATION AND
SELENOPROTEIN INHIBITION BY MYCOTOXINS**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences (Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

KATHRYN ELIZABETH PIETSCH

M.S. Medicinal Chemistry, University of Minnesota, Twin Cities

born on 26.01.1984

citizen of the United States of America

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Shana J. Sturla, examiner

Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, co-examiner

Prof. Dr. Muriel Cuendet, co-examiner

2012

Abstract

Alkylating agents are commonly used to treat cancers but suffer from lack of selectivity for target cells over healthy cells. The illudins and acylfulvenes (AFs) are a unique pair of structurally related compounds that display differences in selective toxicity toward cancer cells. AFs are derived from the sesquiterpene illudane natural products, some of which are mycotoxins produced by and isolated from *Omphalotus* basidiomycetes. Both AFs and illudins are alkylating agents that target important biomacromolecules, like DNA and proteins. While the differences in their chemical structures are apparently subtle, the differences in their cytotoxicity profiles are significant. With an overarching goal to better understand chemical and biochemical factors that dictate selectivity of cytotoxicity, illudin S and AFs were studied in terms of their reactivity with redox-regulating proteins and DNA, as a basis for this thesis.

The ability of illudin S and AFs to inhibit the selenocysteine-containing redox-regulating enzyme glutathione peroxidase was determined and contrasted with results concerning the interactions of these molecules with the analogous enzyme thioredoxin reductase. DNA alkylation by illudin S and AFs was studied in the context of whether cellular bioactivating capacity influences the toxicity of these compounds. It has been demonstrated previously that the cytotoxicity of AFs is correlated with levels of prostaglandin reductase 1 (PTGR1), an enzyme involved in the activation of AFs to cytotoxic reactive intermediates. However, the relative influence of PTGR1 on illudin S versus AF cytotoxicity or whether reductions in sensitivity are associated with a concomitant decrease in abasic site formation have not been determined. As part of a strategy to address these questions, depurinating DNA adducts resulting from treating cells with illudin S or AF were quantified in cancer cells engineered to overexpress

ABSTRACT

PTGR1, and correlated with cytotoxicity. Finally, the cellular by-products of adduct depurination are abasic sites, however, the relative importance of initial adduct formation versus abasic site accumulation in AF cytotoxicity is not understood. Research described in this thesis involves preliminary steps toward the development of a suitable analytical strategy for cell-based studies. These studies would aim to compare abasic site and alkylation adduct accumulation in mammalian cancer cells, potentially as a function of DNA repair capacity. Together, the studies described in this thesis provide further understanding of biochemical factors contributing to the selective toxicity of AFs, including redox-mediating cellular enzymes and the integrity of DNA.

Zusammenfassung

Alkylierende Stoffe werden häufig zur Behandlung von Krebs eingesetzt, obwohl ihre Selektivität bezüglich Krebszellen gegenüber gesunden Zellen gering ist. Illudine und Acylfulvene (AFs) sind ein einzigartiges Paar von strukturell verwandten Verbindungen mit deutlichen Unterschieden in selektiver Toxizität bezüglich Krebszellen. Illudine sind natürliche Sesquiterpene, die als Mykotoxine von *Omphalotus* Basidiomyceten produziert werden. Aus den isolierten Illudinen können dann AFs gewonnen werden. Sowohl AFs als auch Illudine sind alkylierende Stoffe, die wichtige Biomakromoleküle, wie DNA oder Proteine, angreifen. Während die strukturellen Unterschiede vordergründig gering erscheinen, sind die Unterschiede in ihren Zytotoxizität-Profilen signifikant. Mit dem übergreifenden Ziel, die chemischen und biochemischen Faktoren zu verstehen, welche die Selektivität der Zytotoxizität bestimmen, untersuchten wir Illudin S und AFs bezüglich ihrer Reaktivität mit Redox-regulierenden Proteinen und DNA.

Wir bestimmten die Fähigkeit von Illudin S und AFs die Redox-regulierenden Enzyme Glutathion Peroxidase und Thioredoxin Reduktase, welche beide eine Selenocystein enthalten, zu hemmen und verglichen die entsprechenden Resultate miteinander. Zudem wurde untersucht, ob die zelluläre Bioaktivierung von Illudin S und AFs einen Einfluss hat auf die Toxizität dieser Substanzen hat und ob dies die Kapazität DNA zu alkylieren verändert. Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass die Zytotoxizität von AFs mit dem Gehalt der Prostaglandin Reduktase 1 (PTGR1) korreliert, einem Enzym, das AFs zu zytotoxisch reaktiven Zwischenprodukten aktiviert. Der relative Einfluss von PTGR 1 auf die Zytotoxizität von Illudin S verglichen mit AFs, oder ob die Sensitivitätsreduktion mit einer gleichzeitigen Abnahme der Bildung von abasic

sites in der DNA zusammenhängt wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Um diese Fragen zu beantworten, wurden depurinierte DNA Addukte, welche auf Grund einer Behandlung mit Illudin S oder AF gebildet wurden, in Zellen quantifiziert, die genetisch so verändert wurden, dass sie PTGR1 überexprimieren. Die gemessenen Addukte wurden dann mit der entsprechenden Zytotoxizität korreliert. Zelluläre Nebenprodukte der Addukt-Depurinierung sind abasic sites, aber der relative Bedeutung der initialen Bildung von Addukten und der Akkumulierung von abasic sites in der DNA für die Zytotoxizität von AF konnte bis jetzt nicht bestimmt werden. Die vorliegende Forschungsarbeit beschreibt erste Schritte für die Entwicklung einer Analysestrategie, die zukünftige zellbasierte Studien ermöglicht, welche den obengenannten relativen Einfluss von abasic sites in der DNA und der Bildung von Addukten auf die Zytotoxizität untersuchen und zusätzlich einen möglichen Zusammenhang mit der Kapazität DNA zu reparieren herstellen zu können. Zusammenfassend liefert die vorliegende Doktorarbeit neue Erkenntnisse zu biochemischen Faktoren, wie Redox-regulierenden zellulären Enzymen und die Integrität der DNA, welche zu der selektiven Toxizität von AFs beitragen.