

Massenspektrometrische Studien von DNA-Addukten mit Terpenoiden**

Wolfgang Schrader,* Sven Döring und Werner Joppek

Das Phänomen des blauen Dunstes (blue haze), der über Waldgebieten auftritt, ist seit den Arbeiten von Went^[1] in den sechziger Jahren bekannt, in denen Pflanzenemissionen für die Bildung von organischen Aerosolen verantwortlich gemacht wurden. Biogen emittierte Verbindungen, besonders Mono- und Sesquiterpene, reagieren leicht mit Oxidationsmitteln, wodurch eine Reihe von Reaktionsprodukten gebildet wird,^[2] die eine Gas-zu-Partikel-Konversion eingehen können und auf diese Weise organische Aerosole bilden. Atmosphärenpartikel verhalten sich anders als die entsprechenden gasförmigen Verbindungen: Sie absorbieren oder brechen die Sonnenstrahlung, dienen als Wachstumskeime für Wolken und sind in Mehrphasenreaktionen in der Atmosphäre eingebunden.^[3]

Man vermutet, dass Terpene und Terpenoide auch eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Pflanzen und Insekten spielen.^[4] Die Terpenemission aus Möbeln in geschlossenen Räumen wurde untersucht,^[5] um ihren Einfluss auf die Atmungsorgane und das daraus resultierende Krebsrisiko, besonders im Falle stärker exponierter Holzarbeiter, aufzuklären.^[6] Auch der Zusammenhang mit der Entstehung chronischer Lungenerkrankungen und akuter Bronchitis wurde untersucht.^[7] Die Auswirkungen auf den menschlichen Organismus sind jedoch noch immer unklar; bisherige pharmakokinetische Daten sind nicht spezifisch, und von systematischen Studien über die Metabolisierung von Terpenen wurde noch nicht berichtet.^[7] Der Einfluss solcher Xenobiotika auf den Organismus kann durch Marker in Form von DNA-Addukten, die theoretisch zur Entwicklung eines Tumors führen können, bestimmt werden.^[8] Allgemein ist die Untersuchung der Zerstörung von DNA-Molekülen durch Verbindungen, die oxidativen Stress auslösen, oder durch andere natürliche Verbindungen von großem wissenschaftlichem Interesse.^[9]

Randerath et al. fanden bei der Untersuchung von DNA-Modifizierungen, die von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen verursacht wurden, mithilfe des ³²P-Postlabeling-Verfahrens eine signifikante Zahl von DNA-Addukten in Kontrollproben nichtbehandelter Tiere.^[10] Die Autoren schlugen vor, dass diese Addukte mit körpereigenen (indigenen) Verbindungen gebildet wurden, und bezeichneten sie demnach als i-Spots. Die Verteilung dieser i-Spots ist abhängig von Zellmaterial, Spezies, Geschlecht und Ernährung,^[11]

wobei sich ihre Zahl mit dem Alter erhöht.^[12] Vor kurzem wurden i-Spots mit der Entstehung von Krebs in Zusammenhang gebracht.^[13] Die Ursachen für ihre Bildung sind noch nicht völlig verstanden. Einige Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass i-Spots zum Teil von Verbindungen, die für den oxidativen Stress verantwortlich sind, verursacht werden,^[9] was allerdings das komplexe Muster der natürlichen DNA-Addukte nicht vollständig erklärt. Daher müssen auch andere Verbindungen als Ursache für diese Läsionen in Betracht gezogen werden. Eine Quelle, die einen substantiellen Einfluss auf das Grundniveau von DNA-Modifikationen haben kann, sind die überall gegenwärtigen biogenen Kohlenwasserstoffe. Der einzige biogene Kohlenwasserstoff, der bisher eingehender im Zusammenhang mit DNA-Addukten untersucht wurde, ist das Ethylen.^[14] Ethylen metabolisiert zu Ethylenoxid, das in Verdacht steht, ein starkes Carcinogen zu sein. Über den Einfluss ungesättigter biogener Kohlenwasserstoffe in Verbindung mit DNA-Addukten gab es bisher noch keine Untersuchungen. Wir berichten hier über eine neue Klasse von Xenobiotika und deren Einfluss auf das Grundniveau von DNA-Modifikationen.

Die Identifizierung von Xenobiotika, die zur Entstehung von i-Spots beitragen, ist wegen der niedrigen Konzentration der gebildeten Addukte schwierig (ca. ein Addukt pro 10⁸ Nucleotide),^[15] und erfordert somit sehr empfindliche Analysemethoden. Die empfindlichste Methode ist das ³²P-Postlabeling-Verfahren, mit dem ein Addukt pro ca. 10⁸–10¹⁰ Basen detektiert werden kann.^[16] Da die Detektion der Addukte cochromatographisch durchgeführt wird, ist ein synthetischer Standard erforderlich; unbekannte Addukte können nicht identifiziert werden.

Wir haben die Reaktivität von Terpenoiden, die als Reaktionsprodukte der Monoterpen-Ozonolyse vorgeschlagen wurden, gegen DNA und DNA-Komponenten in vitro mithilfe eines enzymatischen Abbaus und einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse der Reaktionsprodukte untersucht. Die Massenspektrometrie ist nicht so empfindlich wie das ³²P-Postlabeling, ermöglicht aber ebenfalls die Detektion kleiner Mengen an DNA-Addukten und kann zusätzliche Informationen über die Struktur dieser Moleküle liefern.^[17] Wir verwendeten ein Ionenfallen- und ein Fourier-Transformations-Ionencyclotronenresonanz-Massenspektrometer (FTICR-MS) zur Untersuchung der Reaktion von α -Pinenoxid mit Kalbsthymus-DNA. Während das Ionenfallen-MS einen einfachen Einsatz über einen großen Massenbereich und Fragmentierungsexperimente mittels kollisionsaktivierter Dissoziation (CAD) ermöglicht, ergibt das FTICR-MS hochaufgelöste Spektren, mit deren Hilfe die Summenformeln von Reaktionsprodukten einer komplexen Mischung bestimmt werden können.

Der enzymatische Abbau der DNA ist eine gängige Methode, welche die Untersuchung solcher Makromoleküle überhaupt erst möglich macht. Zum besseren Verständnis der Reaktion wurde die DNA auf zwei unterschiedlichen Wegen abgebaut: zum einen mithilfe des Enzyms Nuclease P1 und zum anderen mit einer Kombination der zwei Enzyme Benzonuclease und alkalische Phosphatase. Während die Nuclease P1 die DNA zu Mononucleotiden abbaut, erzeugt die Benzonase Oligonucleotide unterschiedlicher Kettenlängen.

[*] Dr. W. Schrader, S. Döring, W. Joppek
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim/Ruhr (Deutschland)
Fax: (+49) 208-306-2982
E-mail: wschrader@mpi-muelheim.mpg.de

[**] Die Autoren danken Prof. Dr. A. Fürstner und Dr. J. Geiger für hilfreiche Diskussionen.

ge. Die alkalische Phosphatase entfernt 5'-Phosphate, was zu Oligonucleotiden aus n Nucleosiden und $n-1$ Phosphatgruppen führt.^[17] Weil aus den Spektren nur die Masseninformation erhalten wird, ist keine Aussage über die Abfolge der Nucleotide im Oligomer möglich. Die Kombination beider Methoden liefert jedoch einen Überblick über entstandene DNA-Addukte der Reaktion mit Terpenoiden, indem man dieselbe Reaktion durch zwei unterschiedliche Fenster betrachtet.

Hier werden die ersten Ergebnisse für die Reaktion von DNA mit α -Pinenoxid, einem frühen Oxidationsprodukt von α -Pinen, präsentiert. Epoxide reagieren leicht mit DNA;^[17] ihre Entstehung ist oft der erste metabolische Schritt zur Entfernung unlöslicher Xenobiotika aus dem Organismus mittels enzymatischer Oxidation durch Cytochrom P 450. Auf dem gleichen Weg werden auch einige carcinogene Verbindungen aktiviert.^[18] Zusätzlich zur DNA-Adduktbildung wurden Modellreaktionen der vier Mononucleotide mit α -Pinenoxid untersucht, um die Auswertung durch einen Vergleich der Ergebnisse zu erleichtern.

Die Reaktion von α -Pinenoxid mit DNA führt zu mehreren unterschiedlichen Addukten. Die Menge der gebildeten DNA-Addukte ist eher niedrig, dennoch konnten einige spezifische Addukte detektiert und charakterisiert werden. Nach dem Verdau der DNA durch Nuclease P1 wurden die Mononucleotide detektiert. Dabei wurden nichtalkylierte Mononucleotide, aber auch zwei Addukte beobachtet. Ein Signal bei $m/z = 498$ wurde dem Desoxyguanylmorphosphat (dGMP) und eines bei $m/z = 482$ dem Desoxyadenylmorphosphat (dAMP) zugeordnet. Die beiden anderen Nucleotidbasen bildeten unter diesen Bedingungen keine Addukte. MS/MS-Experimente der Addukte mittels CAD zeigten eine direkte Bindung von α -Pinenoxid an die Nucleobasen. Die Ergebnisse der FTICR-MS-Untersuchungen bestätigten dies und ermöglichten zudem die Bestimmung der Summenformel der entsprechenden Addukte. Erst eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 37 auf 60 °C führte auch zur Bildung von Addukten mit den beiden anderen Basen dCMP und dTMP mit Signalen bei $m/z = 473$ bzw. 458. Bei den Untersuchungen mit den Mononucleotiden wurde dagegen bereits bei 37 °C für alle vier Nucleotide eine Adduktbildung beobachtet.

Die Spektren der Abbauprodukte von DNA mit Benzonase und alkalischer Phosphatase zeigen eine Bildung von Oligonucleotiden unterschiedlicher Kettenlänge. Die intensivsten Signale wurden dabei für die Dinucleotide beobachtet, von denen einige auch Addukte bildeten. Die Charakterisierung gelang von insgesamt sieben unterschiedlichen Addukten mit α -Pinenoxid (Abbildung 1), die zusammen mit den Mononucleotid-Addukten in Tabelle 1 aufgeführt sind. Mithilfe von CAD erhaltene MS/MS- und MS³-Spektren ergaben, dass die Adduktbildung primär an den Purin-Basen der Dinucleotide erfolgt. Es konnte kein Fragment-Ion aus der Reaktion von α -Pinenoxid mit einer Pyrimidin-Base detektiert werden, für Adenin- und Guanin-Addukte wurden dagegen charakteristische Signale von Fragmenten bei $m/z = 286$ und $m/z = 302$ beobachtet. Alle Addukte wurden zusätzlich mittels FTICR-MS charakterisiert, was die Ergebnisse der Ionenfallenmessungen bestätigte. Diese Daten ermöglichen auch die Bestimmung der Summenformeln der Addukte

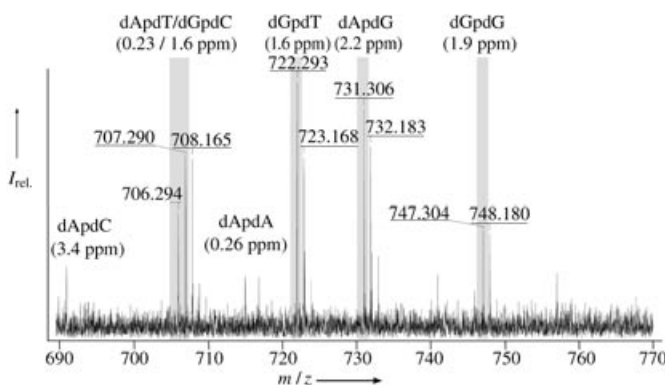


Abbildung 1. FTICR-MS-Spektrum enzymatisch abgebauter DNA. DNA-Addukte von α -Pinenoxid, zu sehen in Form ihrer Dinucleotide; 7 von 10 Dinucleotiden zeigen Alkylierungen. Die exakte Bestimmung der Massen ermöglicht die Berechnung der Summenformeln.

Tabelle 1: DNA-Addukte aus DNA und α -Pinenoxid.

DNA-Addukt	m/z	Summenformel ^[a]	Genauigkeit [ppm]
dAMP	482.18072	C ₂₀ H ₂₉ N ₅ O ₇ P	0.6
dGMP	498.17611	C ₂₀ H ₂₉ N ₅ O ₈ P	0.38
dApdC	691.26342	C ₂₉ H ₄₀ N ₈ O ₁₀ P	3.4
dApdT	706.26088	C ₃₀ H ₄₁ N ₇ O ₁₁ P	0.23
dGpdC	707.25712	C ₂₉ H ₄₀ N ₈ O ₁₁ P	1.6
dApdA	715.27209	C ₃₀ H ₄₀ N ₁₀ O ₉ P	0.26
dGpdT	722.25681	C ₃₀ H ₄₁ N ₇ O ₁₂ P	1.6
dApdG	731.26880	C ₃₀ H ₄₀ N ₁₀ O ₁₀ P	2.2
dGpdG	747.26350	C ₃₀ H ₄₀ N ₁₀ O ₁₁ P	1.9

[a] Berechnete Summenformeln beziehen sich auf die negativ geladenen Ionen $[M-H]^-$.

(siehe Tabelle 1). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass α -Pinenoxid mit der DNA unspezifisch reagiert – die Reaktion scheint jedoch meistens an den Purin-Basen stattzufinden, während Pyrimidin-Basen seltener betroffen sind.

In der DNA scheint neben den exocyclischen Positionen wie den N2- oder O6-Positionen von Guanin die N7-Position besonders reaktiv zu sein. Abbildung 2 zeigt ein Spektrum,

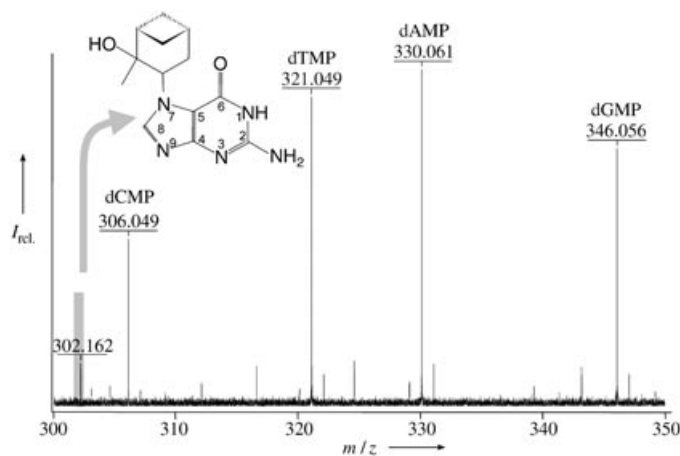


Abbildung 2. FTICR-MS-Spektrum enzymatisch abgebauter DNA zeigt die Mononucleotide und das N7-Guanin-Pinenoxid-Addukt.

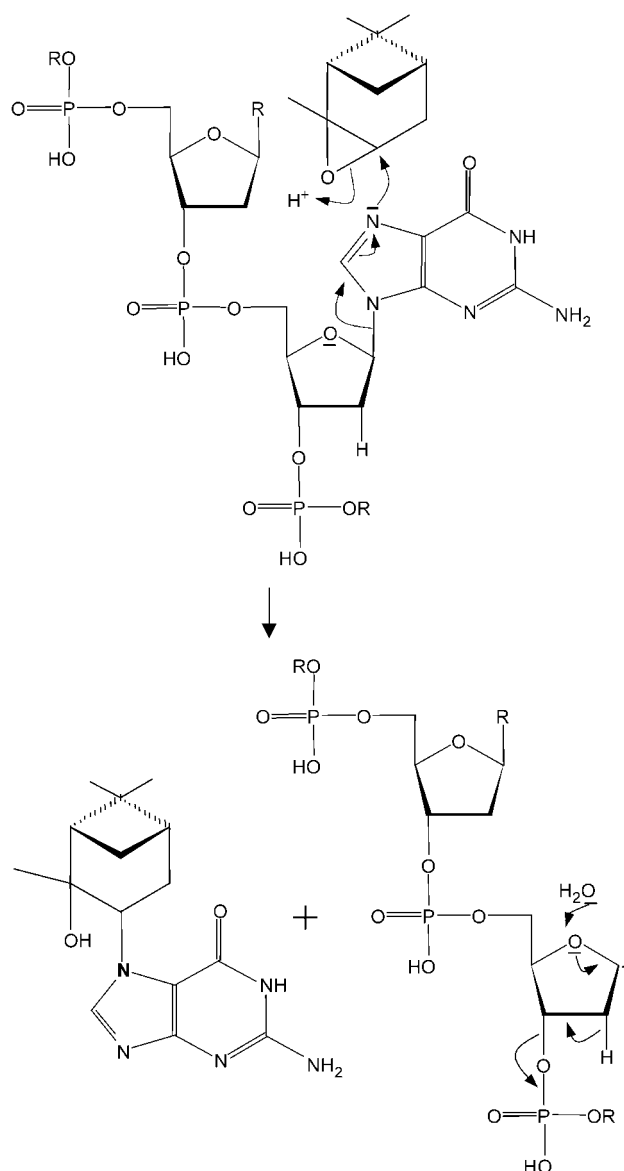
das die vier Mononucleotide sowie ein Guanin-Addukt bei $m/z = 302.16225$ (0.6 ppm) zeigt. Die exakte Massenbestimmung führt zur Summenformel $C_{15}H_{20}N_5O_2$, die mit der des α -Pinenoxid-Guanin-Addukts übereinstimmt. Der hier verwendete, enzymatische Abbau sollte je nach Enzym eigentlich zu Mono- oder Oligonucleotiden führen. Das in Abbildung 2 gezeigte Addukt von α -Pinenoxid mit der Guanin-Nucleobase ist wohl das Ergebnis einer Reaktion an der N7-Position von Guanosin, da eine Alkylierung an dieser Position die N-glycosidische Bindung schwächt, was zunächst zu einer Abspaltung des Guanin-Addukts und anschließend zu einer hydrolytischen Spaltung des DNA-Strangs führt. Dieser Effekt wurde schon bei Untersuchungen zur Styroloxid-Alkylierung beobachtet.^[19] Reaktionen an anderen Positionen von Guanosin hätten nicht den gleichen Effekt, sondern würden nach dem enzymatischen Abbau die jeweiligen Mono- oder Oligonucleotid-Addukte ergeben. Aufgrund der hydrolytischen Spaltung der DNA wird die vorher hoch viskose Reaktionslösung leichtflüssig. Ein möglicher Mechanismus für diese Reaktion ist in Schema 1 vorgeschlagen. Für die hydrolytische Spaltung konnten bisher noch keine Belege in Form von DNA-Bruchstücken gefunden werden. Es wurde auch ein Adenin-Addukt bei $m/z = 286.16733$ (0.46 ppm) gefunden, das entsprechende Signal wies jedoch eine geringere Intensität auf.

Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen eindeutig, dass eine Reaktion von α -Pinenoxid mit der DNA stattfindet. Die eingesetzten Konzentrationen waren zwar höher als die in natürlicher Umgebung vorgefundenen, was aber für unsere Untersuchungen nicht von Belang war. Unser Ziel war es vielmehr, nachzuweisen, dass die Bildung von DNA-Addukten mit Terpenoiden, einer neuen Klasse von Xenobiotika, prinzipiell möglich ist, und Informationen über die Struktur solcher Addukte zu erhalten.

Experimentelles

Reaktion: DNA (4–5 mg) wurde in 1 mL dreifach destilliertem Wasser gelöst, mit α -Pinenoxid (25–100 μ L) versetzt und anschließend bei 37°C für 24–72 Stunden inkubiert. Die Reaktionslösung wurde dann enzymatisch abgebaut mit a) einer Kombination von Benzonase (25 U mg^{-1} DNA; Merck) und alkalischer Phosphatase (1.75 U mg^{-1} DNA; Roche Diagnostics) oder b) Nuclease P1 (6 U mg^{-1} DNA; Roche Diagnostics). Anschließend wurde die Lösung für 24 h bei 37°C inkubiert. Mononucleotide (1 mg mL^{-1}) wurden in 1 mL dreifach destilliertem Wasser gelöst, mit α -Pinenoxid (75 μ L) versetzt und ebenfalls bei 37°C für 24 h inkubiert. Alle Reaktionslösungen wurden ohne weitere Reinigungsschritte analysiert.

Massenspektrometrische Detektion: Für MS-Messungen stand ein Bruker Esquire 3000 Ionenfallen-MS zur Verfügung. Der Massenbereich wurde von $m/z = 50$ –2000 abgefahren, wobei jeweils immer 2 Scans pro Spektrum aufgenommen wurden. Die MS/MS- und MS³-Experimente wurden in der Ionenfalle nach Isolation des gewünschten Ions unter Einsatz von Helium als Kollisionsgas durchgeführt. Die Ionen wurden mit einer Signalbreite von 0.5 Da isoliert. Alle Proben wurden mit der doppelten Menge Acetonitril verdünnt und mittels Direktinfusion bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 $\mu\text{L min}^{-1}$ in das MS eingeleitet. Die Spektren wurden über einen Zeitraum von 2 min aufgenommen und anschließend gemittelt, um ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten. Hochaufgelöste Messungen wurden mit einem Bruker APEX III FTICR-MS, ausge-



Schema 1. Vorgeschlagene Reaktion von α -Pinenoxid mit der N7-Position von Guanosin; führt zu einer Adduktbildung unter Spaltung der N-glycosidischen Bindung.

stattet mit einem 7-T-Magnet und einer Agilent-Elektrospray-Ionenquelle, erhalten. Nach der Ionisation wurden die Ionen in einem Hexapol bei Sammelzeiten von 0.3–0.8 s gesammelt und anschließend in die Cyclotron-Zelle transferiert. Der Massenbereich wurde von $m/z = 80$ –2000 mit einer Datenmenge von 512k abgefahren. Für die Detektion von DNA-Addukten wurden bis zu 100 Scans akkumuliert, um ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten.

Eingegangen am 21. Juni 2004,
veränderte Fassung am 1. September 2004

Stichwörter: DNA · i-Spots · Massenspektrometrie · Terpene

[1] F. W. Went, *Nature* **1960**, 187, 641.

[2] J. Yu, D. R. Crocker III, R. J. Griffin, R. C. Flagan, J. H. Seinfeld, *J. Atmos. Chem.* **1999**, 34, 207; b) H. Hakola, J. Arey, S. M. Aschmann, R. Atkinson, *J. Atmos. Chem.* **1994**, 18, 75;

- c) Y. Yokouchi, Y. Ambe, *Atmos. Environ.* **1985**, *19*, 1271; d) U. Kückelmann, B. Warscheid, T. Hoffmann, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1905; e) W. Schrader, J. Geiger, T. Hoffmann, D. Klockow, E. H. Korte, *J. Chromatogr. A* **1999**, *864*, 299; f) W. Schrader, J. Geiger, M. Godejohann, B. Warscheid, T. Hoffmann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4129; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3998.
- [3] M. O. Andreae, P. J. Crutzen, *Science* **1997**, *276*, 1052; b) A. R. Ravishankara, *Science* **1997**, *276*, 1058.
- [4] J. B. Harborne, *Ökologische Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, **1995**, S. 62.
- [5] a) T. Salthammer, A. Schwarz, F. Fuhrmann, *Atmos. Environ.* **1995**, *33*, 75; b) O. Jann, O. Wilke, D. Brödner, *Proc. of Healthy Buildings/IAQ, Band 3* (Hrsg.: J. E. Woods, D. T. Grimsrud, N. Bosch), **1997**, S. 593; c) T. Salthammer, F. Fuhrmann, *Proc. 7th Int. Conf. on Indoor Air and Climate, Band 3* (Hrsg.: K. Kimura, K. Ikeda, S. Tanabe, I. Iwata), **1996**, S. 607.
- [6] a) M. Ahman, M. Holmstrom, I. Cynkier, E. Soderman, *Occup. Environ. Med.* **1996**, *53*, 112; b) T. P. Kauppinen, T. J. Partanen, S. G. Hernberg, J. I. Nickels, R. A. Luukkonen, T. R. Hakulinen, E. I. Pukkala, *Brit. J. Ind. Med.* **1993**, *50*, 143.
- [7] C. Kohlert, I. van Rensen, R. März, G. Schindler, E. U. Graefe, M. Veit, *Planta Med.* **2000**, *66*, 495.
- [8] A. C. Beach, R. C. Gupta, *Carcinogenesis* **1992**, *13*, 1053.
- [9] L. J. Marnett, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 361.
- [10] K. Randerath, M. Reddy, R. Disher, *Carcinogenesis* **1986**, *7*, 1615.
- [11] a) D. H. Li, K. Randerath, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 3991; b) K. Randerath, K. L. Putman, E. Randerath, T. Zacharewsky, M. Harris, S. Safe, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1990**, *103*, 271.
- [12] D. H. Li, D. C. Xu, K. Randerath, *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 2227.
- [13] a) H. Bartsch, *Mutagenesis* **2002**, *17*, 281; b) B. Bertram, H. Bartsch, *Forum DKG 18*, **2003**, *Spec. Iss. 1/03*, 27.
- [14] a) H. Peter, H. J. Wiegand, H. M. Bolt, H. Greim, G. Walter, M. Berg, J. G. Filser, *Toxicol. Lett.* **1987**, *36*, 9; b) H. M. Bolt, B. Jelitto, *Toxicology* **1996**, *113*, 328; c) R. Kreiling, R. J. Laib, H. M. Bolt, *Toxicol. Lett.* **1986**, *30*, 131.
- [15] D. H. Li, M. Y. Wang, J. G. Liehr, K. Randerath, *Mutat. Res.-Gen. Toxicol.* **1995**, *344*, 117.
- [16] R. C. Gupta, M. V. Reddy, K. Randerath, *Carcinogenesis* **1982**, *3*, 1081.
- [17] W. Schrader, M. Linscheid, *J. Chromatogr. A* **1995**, *717*, 117; b) W. Schrader, M. Linscheid, *Arch. Toxicol.* **1997**, *71*, 588; c) P. Janning, W. Schrader, M. Linscheid, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 1035.
- [18] F. P. Guengerich, *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *409*, 59.
- [19] P. Vodicka, K. Heminki, *Carcinogenesis* **1988**, *9*, 1657.