

Untersuchungen zum genotoxischen  
Wirkmechanismus des Mykotoxins Patulin:  
Reaktivität gegenüber DNA-Basen unter dem  
Einfluss von Glutathion



**DISSERTATION**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Staat. gepr. Lebensmittelchemikerin  
**Carolin Pfenning**  
aus Wertheim

Würzburg 2014

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

\_\_\_\_\_

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: \_\_\_\_\_

2. Gutachter: \_\_\_\_\_

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: \_\_\_\_\_

2. Prüfer: \_\_\_\_\_

3. Prüfer: \_\_\_\_\_

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

\_\_\_\_\_

Für Zuri

Mit dem Wissen von heute,  
hätte ich gestern andere Fehler gemacht.

Autor: unbekannt

# DANKSAGUNG

---

Mein Dank gilt:

Frau Prof. Dr. Leane Lehmann für die Überlassung des interessanten Themas, das Vertrauen in mich und meine Arbeit, sowie wertvolle Diskussionen und Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herr Dr. Harald Esch für Anregungen und Diskussionen, sowie für jegliche Unterstützung meiner Arbeit und der daraus entstandenen Publikation.

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe des Lehrstuhls für Pharmazeutische Chemie für die Nutzung des Tandem-Massenspektrometers.

Frau Dr. Agnes Fekete von der *Metabolomics Core Facility* der Universität Würzburg für die Durchführung der genauen Massenmessungen.

Einen großen Dankeschön an die WAAsis Monika Hohmann, Lydia Blum, Elena Schaefer, Daniela Veiz, Lisa Kastner und Sarah Adler, die mich im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit engagiert und erfolgreich unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Susanne Futh, Annette Albrecht und Anne Scheffler für die Freundschaft, Motivation und Unterstützung in den letzten Jahren.

Bei allen „alten“ und aktuellen Doktoranden des Arbeitskreises des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie (Daniela Martínez Jaramillo, Sabrina Jäger, Katja Schmalbach, Jan Fuchs, Daniela Pemp, Maryam Mahdiani, Benjamin Spielmann, Rene Hauptstein und Miriam Macziol) für die gute Zusammenarbeit, für die Hilfe bei fachlichen und sonstigen Fragen und natürlich für die schönen Momente im Laboralltag und darüber hinaus.

Nicht zuletzt gilt der Dank meiner Familie, die mich stets unterstützt und gefördert, und darüberhinaus immer an mich geglaubt hat.

Einen großen Dank gilt meiner Hündin Zuri, die mich zuhause stets - nach guten und schlechten Tagen - freudig empfing und die mir in Spaziergängen und Kuscheleinheiten neue Motivation gab.

Von ganzem Herzen danke ich Axel, für das unermessliche Verständnis und die mentale Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit, sowie für die notwendigen Ablenkungen, um mal wieder den Kopf frei zu bekommen.



# INHALTSVERZEICHNIS

---

|            |   |    |
|------------|---|----|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG</b> .....   | 1  |
| <b>1.1</b> | <b>Patulin</b> .....  | 2  |
| 1.1.1      | Kontaminationen von Patulin in Lebensmitteln .....  | 2  |
| 1.1.2      | Reaktivität von Patulin gegenüber Nukleophilen.....   | 4  |
| 1.1.3      | Genotoxizität von Patulin .....   | 7  |
| <b>1.2</b> | <b>Exogene DNA-Addukte</b> .....  | 9  |
| 1.2.1      | Vielfalt der DNA-Modifikationen .....   | 10 |
| 1.2.2      | Reparatur und Konsequenzen von DNA-Addukten .....   | 11 |
| 1.2.3      | Analyse von DNA-Addukten .....  | 13 |
| <b>2</b>   | <b>PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....  | 16 |
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....  | 18 |
| <b>3.1</b> | <b>Reaktivität von Patulin gegenüber DNA-Basen</b> .....  | 18 |
| 3.1.1      | Reaktionsprodukte von Patulin mit Adenin in An- und Abwesenheit<br>von Glutathion.....                    | 19 |
| 3.1.1.1    | Reaktionsprodukte von Patulin mit Adenin .....  | 20 |
| 3.1.1.2    | Reaktionsprodukte von Patulin mit Adenin in Anwesenheit von<br>Glutathion .....                           | 31 |
| 3.1.1.2.1  | <i>Addukte von Patulin mit Adenin</i> .....   | 31 |
| 3.1.1.2.2  | <i>Addukte von Patulin mit Glutathion</i> .....   | 33 |
| 3.1.1.2.3  | <i>Addukte von Patulin mit Adenin und Glutathion</i> .....  | 48 |
| 3.1.2      | Reaktionsmechanismus der Bildung von (Glutathion-)Patulin(-<br>Adenin)-Addukten .....                     | 62 |
| 3.1.3      | Physiologische Einflussfaktoren auf die Bildung von (Glutathion-<br>)Patulin-Adenin-Addukten .....        | 70 |
| 3.1.3.1    | Bildung von (Glutathion-)Patulin-Adenin-Addukten in Abhängigkeit von<br>der Glutathionkonzentration ..... | 70 |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 3.1.3.2    | Einfluss der Glutathion-S-Transferase auf die Bildung von (Glutathion-) Patulin-Adenin-Addukten .....                                   | 74         |
| 3.1.4      | Charakterisierung der an der Adduktbildung mit Patulin beteiligten Stickstoffatome von Adenin .....                                     | 77         |
| 3.1.4.1    | Beteiligte Stickstoffatome in Glutathion-Patulin-Adenin-Addukten .....  | 78         |
| 3.1.4.2    | Beteiligte Stickstoffatome in Patulin-Adenin-Addukten .....   | 80         |
| 3.1.5      | Reaktionsprodukte von Patulin mit weiteren DNA-Basen und 2'-Deoxynukleosiden .....  | 83         |
| 3.1.5.1    | Bildung von gemischten Glutathion-Patulin-DNA-Basen-Addukten .....  | 83         |
| 3.1.5.2    | Bildung von Patulin-DNA-Basen-Addukten .....  | 87         |
| 3.1.5.3    | Reaktionsprodukte mit 2'-Deoxynukleosiden.....  | 90         |
| 3.1.6      | DNA-Basen-Addukte als mögliche genotoxische Wirkungsweise von Patulin.....  | 93         |
| <b>3.2</b> | <b>Reaktivität von Patulin gegenüber genomischer DNA .....</b>  | <b>95</b>  |
| 3.2.1      | Entwicklung von Methoden zur Hydrolyse, Anreicherung und Detektion der potentiellen (Glutathion-)Patulin-DNA-Basen-Addukte .....        | 95         |
| 3.2.1.1    | DNA-Hydrolyse .....   | 95         |
| 3.2.1.1.1  | <i>Auswahl von geeigneten Hydrolysebedingungen mithilfe von Stabilitätsuntersuchungen an (Glutathion-)Patulin-Adenin-Addukten .....</i> | <i>96</i>  |
| 3.2.1.1.2  | <i>Optimierung der thermischen Hydrolysen mit Säuren unter milden Bedingungen .....</i>   | <i>101</i> |
| 3.2.1.2    | Anreicherung der Addukte mittels Festphasenextraktion.....  | 106        |
| 3.2.1.2.1  | <i>Festphasenextraktion an einer starken Anionenaustauscherphase ....</i>   | <i>106</i> |
| 3.2.1.2.2  | <i>Festphasenextraktion an einer starken Anionenaustauscher-Mischphase .....</i>  | <i>110</i> |
| 3.2.1.2.3  | <i>Zweidimensionale Festphasenextraktion zur Anreicherung der (Glutathion-)Patulin-DNA-Basen-Addukte.....</i>                           | <i>112</i> |
| 3.2.1.3    | LC-MS/MS-Methode im multiple reaction monitoring-Modus.....   | 117        |
| 3.2.1.3.1  | <i>Bestimmung von substanzspezifischen Detektionsparametern sowie der intensivsten Vorläufer- und Fragmentionen .....</i>               | <i>118</i> |
| 3.2.1.3.2  | <i>Bestimmung der quellenspezifischen Detektionsparameter .....</i>   | <i>119</i> |



|            |   |     |
|------------|---|-----|
| 3.2.1.3.3  | <i>Zusammenstellung der MRM-Methode</i> .....   | 121 |
| 3.2.2      | Nachweis möglicher Addukte von Patulin mit DNA.....                                   | 123 |
| 3.2.2.1    | Erstellen eines Protokolls für den Nachweis von Addukten von Patulin<br>mit DNA ..... | 123 |
| 3.2.2.2    | Wiederfindung der Addukte.....  | 127 |
| 3.2.2.3    | Identifizierung von Addukten aus DNA.....   | 129 |
| 3.2.2.3.1  | <i>Patulin-DNA-Basen-Addukte in Abwesenheit von Glutathion</i> .....                  | 129 |
| 3.2.2.3.2  | <i>(Glutathion-)Patulin-DNA-Basen-Addukte in Anwesenheit von<br/>Glutathion</i> ..... | 134 |
| <b>4</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....  | 144 |
| <b>5</b>   | <b>SUMMARY</b> .....  | 148 |
| <b>6</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....  | 151 |
| <b>6.1</b> | <b>Geräte, Chemikalien und Lösungen</b> .....   | 151 |
| 6.1.1      | Geräte und Hilfsmittel .....  | 151 |
| 6.1.2      | Verbrauchsmaterialien .....   | 153 |
| 6.1.3      | Chemikalien .....   | 154 |
| 6.1.4      | Biologisches Material.....  | 157 |
| 6.1.5      | Verwendet Zelllinie und Kultivierung.....   | 157 |
| 6.1.6      | Puffer und Lösungen .....   | 157 |
| 6.1.6.1    | Puffer .....  | 157 |
| 6.1.6.2    | Fließmittel für die Flüssigchromatographie.....                                       | 159 |
| 6.1.6.3    | Lösungen für die Festphasenextraktion.....  | 160 |
| 6.1.6.4    | Sonstige Lösungen .....   | 160 |
| <b>6.2</b> | <b>Methoden</b> .....   | 161 |
| 6.2.1      | Analytik .....  | 161 |
| 6.2.1.1    | HPLC-UV/VIS .....   | 161 |
| 6.2.1.2    | Semipräparative HPLC-UV/VIS.....  | 162 |
| 6.2.1.3    | HPLC-ESI-MS/MS .....  | 163 |
| 6.2.1.4    | ESI-MS/MS .....   | 165 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 6.2.1.5 | UHPLC-ESI-MS/MS .....   | 165 |
| 6.2.1.6 | UPLC-ESI-qTOF .....   | 167 |
| 6.2.2   | Charakterisierung eines Rattenlebercytosol .....  | 168 |
| 6.2.2.1 | Glutathion-Quantifizierung nach Ellmann .....   | 168 |
| 6.2.2.2 | Aktivitätsbestimmung der Glutathion-S-Transferase in<br>Rattenlebercytosol .....              | 168 |
| 6.2.3   | Inkubationen mit Patulin.....   | 169 |
| 6.2.3.1 | Inkubationen von Patulin mit Adenin und Glutathion oder $\gamma$ -Glutamyl-L-<br>Cystein..... | 169 |
| 6.2.3.2 | Inkubationen von Patulin und Adenin mit variierenden<br>Glutathionkonzentrationen .....       | 170 |
| 6.2.3.3 | Inkubation von Patulin mit weiteren DNA-Basen .....   | 171 |
| 6.2.3.4 | Inkubation von Patulin mit 2'-Deoxynukleosiden .....  | 172 |
| 6.2.3.5 | Inkubation von Patulin mit allen DNA-Basen in Anwesenheit von<br>Glutathion .....             | 173 |
| 6.2.3.6 | Inkubation von Patulin mit Adenin in Gegenwart von Rattenlebercytosol ...                     | 174 |
| 6.2.4   | Isolierung von Addukten mit Patulin.....  | 174 |
| 6.2.4.1 | Inkubationen zur Generierung von (Glutathion-)Patulin-Adenin-<br>Addukten.....                | 174 |
| 6.2.4.2 | Inkubationen zur Generierung von Glutathion-Patulin-Addukten .....                            | 175 |
| 6.2.4.3 | Isolierung der generierten Addukte .....  | 176 |
| 6.2.5   | Methylierung isolierter Addukte mit Diazomethan .....   | 178 |
| 6.2.6   | Thermolyse der Reaktionsmischung von Patulin mit 2'-<br>Deoxyadenosin und Glutathion.....     | 178 |
| 6.2.7   | DNA-Isolation und -Quantifizierung .....  | 179 |
| 6.2.7.1 | Chloroform-Isopropanol-Extraktion.....  | 179 |
| 6.2.7.2 | DNA-Quantifizierung .....   | 180 |
| 6.2.8   | DNA-Hydrolysen .....  | 181 |
| 6.2.8.1 | Kalibriergeraden für die thermischen Hydrolysen mit Säuren bei milden<br>Temperaturen .....   | 181 |
| 6.2.8.2 | Thermische Hydrolyse mit Trifluoressigsäure bei milden Temperaturen.....                      | 181 |
| 6.2.8.3 | Thermische Hydrolyse mit Salzsäure bei milden Temperaturen.....                               | 182 |
| 6.2.8.4 | Thermische Hydrolyse mit Ameisensäure bei milden Temperaturen .....                           | 183 |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 6.2.9    | Stabilitätsuntersuchungen.....  | 184        |
| 6.2.9.1  | Untersuchung in wässrigen Medien .....  | 184        |
| 6.2.9.2  | Untersuchung in organischen Medien .....  | 186        |
| 6.2.9.3  | Einfluss der DNA-Hydrolysen.....  | 186        |
| 6.2.10   | Festphasenextraktionen.....   | 188        |
| 6.2.10.1 | Festphasenextraktion mit einer SAX-Phase .....  | 188        |
| 6.2.10.2 | Festphasenextraktion mit einer X-A-Phase .....  | 188        |
| 6.2.10.3 | Zweidimensionale Festphasenextraktion mit einer SAX- und X-A-Phase ...  | 189        |
| 6.2.11   | Inkubationen von Patulin mit genomischer DNA.....   | 191        |
| 6.2.11.1 | Vorversuche zur Extraktion von Patulin mit Ethylacetat.....   | 191        |
| 6.2.11.2 | Bestimmung der Wiederfindungen der (Glutathion-)Patulin-Adenin-<br>Addukte während der DNA-Aufarbeitung ..... | 192        |
| 6.2.11.3 | Inkubation von Patulin mit DNA in An- und Abwesenheit von Glutathion....                                      | 193        |
| <b>7</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>  | <b>IX</b>  |
| <b>8</b> | <b>ANHANG .....</b>   | <b>XVI</b> |



# Abkürzungsverzeichnis

|                        |  |
|------------------------|--|
| Abb.                   | Abbildung  |
| BER                    | Basenexzisionsreparatur  |
| CDNB                   | Chlordinitrobenzol   |
| CE                     | Kollisionsenergie  |
| CUR                    | <i>Curtain Gas</i>   |
| CXP                    | <i>Cell Exit Potential</i>   |
| Da                     | Dalton   |
| dA                     | 2'-Deoxyadenosin   |
| dC                     | 2'-Deoxycytidin  |
| dest. Wasser           | Destilliertes Wasser   |
| dG                     | 2'-Deoxyguanosin   |
| DMSO                   | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                    | Desoxyribonukleinsäure   |
| DP                     | <i>Declustering Potential</i>  |
| dT                     | 2'-Deoxythymidin   |
| DTNB                   | 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure   |
| EDTA                   | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| ESI                    | Elektrospray-Ionisation  |
| EtOH                   | Ethanol  |
| FA                     | Ameisensäure   |
| GSH                    | Glutathion   |
| GSH-PAT-Addukte        | Addukte von Patulin mit Glutathion   |
| GSH-PAT-Adenin-Addukte | Addukte von Patulin mit Adenin und Glutathion  |
| GSH-PAT-dA-Addukte     | Addukte von Patulin mit 2'-Deoxyadenosin und Glutathion                                    |
| GST                    | Glutathion-S-Transferase   |
| h                      | Stunde   |
| HCl                    | Salzsäure  |
| HPLC                   | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ) |
| HPRT                   | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase   |
| IARC                   | <i>International Agency for Research on Cancer</i>   |
| JECFA                  | Gemeinsamen Sachverständigenausschuss für Lebensmittel-zusatzstoffe                        |
| M                      | molar (Einheit mol/l)  |
| VI                     |  |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| MeOH                  | Methanol  |
| MgSO <sub>4</sub>     | Magnesiumsulfat   |
| min                   | Minute  |
| MRM                   | <i>Multiple Reaction Monitoring</i>   |
| MS                    | Massenspektrometrie   |
| MW                    | Mittelwert  |
| MWCO                  | Trenngrenze von Größenausschlussmembranen ( <i>Molecular Weight Cut Off</i> )   |
| <i>m/z</i>            | Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( <i>mass-to-charge ratio</i> )   |
| NaCl                  | Natriumchlorid  |
| NaOAc                 | Natriumacetat   |
| NER                   | Nukleotidexzisionsreparatur   |
| PAT                   | Patulin   |
| PAT-Adenin/dA-Addukte | Addukte von Patulin mit Adenin oder 2'-Deoxyadenosin  |
| PBS(-CMF)             | Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )<br>(ohne Calcium und Magnesium ( <i>calcium magnesium free</i> )) |
| PFV                   | Peakflächenverhältnis   |
| QTrap                 | ABSciex 5500 QTrap Hybrid-System aus Tripel-Quadrupol und linearer Ionenfalle   |
| qTOF                  | Waters SYNAPT GS HDMS Hybrid Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer  |
| Rt                    | Retentionszeit  |
| SPE                   | Festphasenextraktion ( <i>solid phase extraction</i> )  |
| Stabw                 | Standardabweichung  |
| Tab.                  | Tabelle   |
| TEM                   | Temperatur  |
| TFA                   | Trifluoressigsäure  |
| TCA                   | Trichloressigsäure  |
| TK                    | Thymidinkinase  |
| Tris                  | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| UHPLC                 | Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> )                                |
| UV                    | Ultraviolett  |
| WHO                   | Weltgesundheitsorganisation   |
| λ                     | Wellenlänge   |



## 1 EINLEITUNG

Krebs ist eine der weltweit häufigsten Todesursachen. Während etwa 5-10% aller Krebserkrankungen durch genetische Defekte verursacht werden, sind die restlichen 90-95% auf lebensstil- und umweltassoziierte Faktoren, wie u.a. Ernährung (30-35%), Rauchen (25-30%) und Alkoholkonsum (4-6%) zurückzuführen (zusammengefasst in Anand et al., 2008; zusammengefasst in Sutandyo, 2010).

Die Ernährung trägt folglich zu einem hohen Prozentsatz zum Krebsrisiko des Menschen bei. Neben der falschen Ernährungsweise (einseitige Ernährung, übermäßige Kalorien- oder Fettaufnahme), wird dies insbesondere durch die in der Nahrung vorkommenden Mutagene und Kanzerogene verursacht (zusammengefasst in Sutandyo, 2010). Diese Nahrungsmittelinhaltsstoffe sind entweder Kontaminationen von Substanzen natürlichen Ursprungs, Verunreinigungen mit synthetischen Verbindungen oder im Nahrungsmittel infolge des Kochens oder Erhitzens entstanden (zusammengefasst in Sugimura, 2000).

Mykotoxine gehören als Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen zu den als Kanzerogene diskutierten Lebensmittelinhaltsstoffen natürlichen Ursprungs, welche als Kontaminationen in Lebensmittelgrundstoffen oder verarbeiteten Lebensmitteln vorkommen (zusammengefasst in Bennett und Klich, 2003). Die *International Agency for Research in Cancer* (IARC) hat einige Mykotoxine als Humankanzerogene (beispielsweise Aflatoxine) oder mögliche Humankanzerogene (beispielsweise Fumonisin B1, Ochratoxin A) eingestuft (IARC, 1986; IARC, 1993; IARC, 2002).

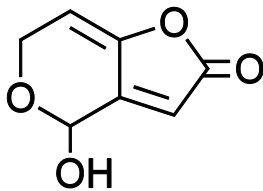
Für das Mykotoxin Patulin (PAT, Kapitel 1.1) hingegen ist, trotz seines ubiquitären Vorkommens, die Datenlage für eine Bewertung der Kanzerogenität in Tier und Mensch bis heute nicht ausreichend (IARC, 1986; Puel et al., 2010). Die ausgeprägte Reaktivität von PAT gegenüber zahlreichen Nukleophilen und die uneinheitlich interpretierten Ergebnisse aus positiven *in vitro*-Genotoxizitätstests ließen bisher keine eindeutige Aussage zu, ob als molekularer Wirkmechanismus der genotoxischen Wirkung von PAT eher die unmittelbare Genotoxizität (direkte DNA-Schädigung) oder die mittelbare Genotoxizität (Hemmung von Enzymen, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies) in Frage kommt. Fehlende Informationen zum molekularen Wirkmechanismus der genotoxischen Wirkung *in vitro* erschweren die Übertragung auf die Situation *in vivo* und folglich die Sicherheitsbewertung von PAT.



Für die Bewertung von Genotoxinen ist es insbesondere wichtig, ob diese über direkte oder indirekte Wirkmechanismen zu DNA-Schädigungen führen, da bei unmittelbaren Genotoxinen ein einzelnes DNA-schädigendes Ereignis, wie die Bildung von DNA-Addukten (Kapitel 1.2), zur Mutation und unter *worst-case* Bedingungen zum Tumor führt.

## 1.1 Patulin

Das Mykotoxin Patulin (4-Hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-on, **Abb. 1**) ist ein sekundäres Stoffwechselprodukt, welches von verschiedenen Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* oder *Byssochlamys* gebildet wird (zusammengefasst in McKinley und Carlton, 1991; zusammengefasst in Puel et al., 2010).



**Abb. 1:** Strukturformel von PAT.

Nach der ersten Isolierung von PAT in den 1940er Jahren (Birkinshaw et al., 1943), befassten sich eine Reihe von Studien zunächst mit der Nutzung seiner antibiotischen Aktivität. Erst einige Jahre später wurde deutlich, dass sich PAT, neben der für Bakterien toxischen Wirkung, auch als toxisch für höhere Organismen erwies. In den 1960er Jahren wurde PAT schließlich als Mykotoxin eingestuft und galt somit als potentielle Kontamination von Nahrungsmitteln (zusammengefasst in Ciegler, 1977; zusammengefasst in Bennett und Klich, 2003). Sowohl auf die Belastungssituation von PAT in Lebensmitteln (Kapitel 1.1.1), auf dessen ausgeprägte Reaktivität gegenüber Nukleophilen (Kapitel 1.1.2), als auch auf die PAT-induzierte Genotoxizität (Kapitel 1.1.3) wird im Folgenden näher eingegangen.

### 1.1.1 Kontaminationen von Patulin in Lebensmitteln

Kontaminationen von PAT kommen hauptsächlich in von Schimmelpilzen befallenem (meist *Penicillium expansum*) Obst und Gemüse, sowie daraus hergestellten Verarbeitungsprodukten, insbesondere in Säften und Mus, vor (zusammengefasst in Drusch und Ragab, 2003; Majerus und Kapp, 2002). Die wichtigste Kontaminationsquelle sind dabei Äpfel und Apfelerzeugnisse (zusammengefasst in Drusch und Ragab, 2003;

zusammengefasst in Yang et al, 2014). Während in den braunfaulen Stellen von Äpfeln Maximalgehalte bis zu 1 g/kg gefunden wurden (Frank et al., 1976), ist die Diffusion in das angrenzende Gewebe mit Restgehalten von <2% der Menge des braunfaulen Gewebes gering (Rychlik und Schieberle, 2001).

In Säften und anderen Lebensmitteln mit saurem pH-Wert ist PAT über mehrere Wochen stabil und zudem temperaturbeständig, so dass eine Kurzzeit-Hitzebehandlung (Pasteurisierung) nur zu einer Verringerung der Patulinkonzentration führt (zusammengefasst in Harrison, 1989). Durch die Vergärung von Fruchtsäften kommt es jedoch zur Reduktion der PAT-Menge um 99% (Stinson et al., 1978). Weiterhin kann durch Alkalisierung, Schwefelung, sowie Aktivkohle- oder Ascorbinsäurezusatz eine Inaktivierung bzw. die Entfernung des Mykotoxins erreicht werden (zusammengefasst in Harrison, 1989). Daneben kann durch Aussortieren und Ausschneiden von kontaminierten Früchten auf Grundlage der „guten Herstellungspraxis“ die PAT-Kontamination des Verarbeitungsproduktes reduziert werden (EU-Kommission, 2003).

Die Sicherheitsbewertung von PAT erfolgte erstmalig im Jahre 1990 durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und den Gemeinsamen Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe (JECFA) und wurde 1995 erneuert (zusammengefasst in Speijers, 2004). Basierend auf einer Studie über die kombinierten Effekte von Patulin auf die Reproduktion, Langzeit-Toxizität und -Kanzerogenität in Ratten (Becci et al., 1981) wurde die Aufnahme von 43 µg/kg Körpergewicht pro Tag als harmlos eingestuft. Auf der Grundlage dieser Arbeit und unter Berücksichtigung einer Resorptionsstudie in Ratten (Dailey et al., 1977), die zeigte, dass aufgenommenes PAT zum größten Teil bereits innerhalb von 48 Stunden und ca. 98% des PAT in sieben Tagen eliminiert werden, wurde eine maximal tolerierbare tägliche Aufnahme (PMTDI) von 0,4 µg/kg Körpergewicht vorgeschlagen (Wouters und Speijers, 1996). Unter Einbeziehung der üblichen Verzehrsmengen von potentiell mit PAT belasteten Lebensmitteln gelten somit 50 ppb PAT als sicher. Auf Grundlage dessen wurden von der EU mit der Verordnung (EG) Nr.1881/2006 europaweit Höchstmengen für PAT von 50 µg/kg in flüssigen Obsterzeugnissen, 25 µg/kg in festen Apfelerzeugnissen und 10 µg/kg in Apfelprodukten und Beikost für Säuglinge und Kleinkinder eingeführt. Die PAT-Gehalte in europäischen Apfelprodukten aus dem Handel liegen im Bereich von 0,5 - 23,1 µg/kg für Apfelsaft und 1,6 - 10 µg/kg für Apfelmus (Majerus und Kapp, 2002) und somit unterhalb der festgelegten Grenzwerte. Höhere PAT-Gehalte, als es die Grenzwerte in der EU erlauben, waren in Apfelprodukten aus dem nicht-europäischen Ausland zu finden (zusammengefasst in Yang et al., 2014).

Als häufigste Methode zur Analyse von Patulin aus Lebensmitteln wird die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gekoppelt mit UV-Detektion eingesetzt. Mittels

Isotopenverdünnungsanalyse können Nachweisgrenzen von wenigen ng/l erzielt werden, wodurch PAT in geringen Mengen in nahezu allen handelsüblichen Apfel- und Traubensäften nachgewiesen werden kann (Rychlik und Schieberle, 1999).

### 1.1.2 Reaktivität von Patulin gegenüber Nukleophilen

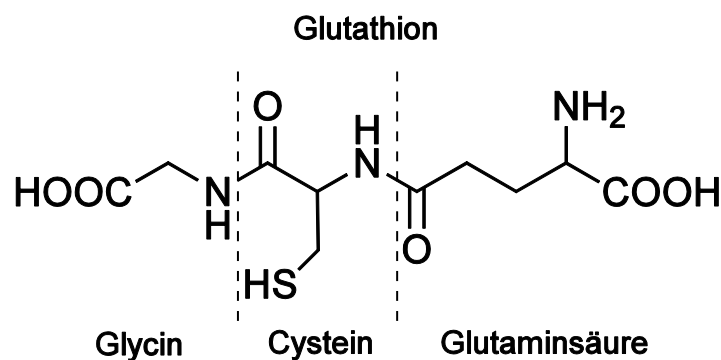
Aufgrund der  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Lacton-Struktur von PAT sind ausgeprägte elektrophile Eigenschaften zu erwarten. Es ist seit langem bekannt, dass PAT *in vitro* spontan mit thiolgruppenhaltigen Nukleophilen reagiert. Die Reaktion von PAT und anderen ungesättigten Lactonen mit der Thiolgruppe der Aminosäure Cystein, und daraus abgeleitet die Reaktivität gegenüber essentiellen Thiolgruppen von bakteriellen Enzymen oder Metaboliten, wurde als mögliche Wirkweise der antibiotischen Wirkung von PAT und anderen ungesättigten Lactonen diskutiert (Cavallito und Haskell, 1945; Geiger und Conn, 1945). Ungesättigte Lactone, darunter PAT, die *in vitro* schnell mit Cystein reagierten, wiesen zudem ein hohes kanzerogenes Potential in männlichen Ratten auf, weshalb ein Zusammenhang von chemischer Reaktivität und kanzerogener Aktivität vermutet wurde (Dickens und Jones, 1961; Dickens und Cooke, 1965). Die toxischen Effekte von PAT in Mäusen wurden nicht durch PAT-Cystein-Addukte hervorgerufen und ließen somit auf einer Inaktivierung des PAT durch die Reaktion mit Cystein schließen (Ciegler et al., 1976). Wohingegen die Zugabe von Cystein im Überschuss zu PAT die antibiotische Wirkung gegenüber einiger Gram-positiver und -negativer Bakterien (Geiger und Conn, 1945) sowie die Hemmung des Enzyms Aldolase (Ashoor und Chu, 1973) nicht vollständig aufhob.

Im Allgemeinen verläuft die Reaktion von ungesättigten Lactonen mit Thiolgruppen über eine Michael-Addition an die Doppelbindung (Cavallito und Haskell, 1945; Jones und Young, 1968). Neben der Thiolreaktivität reagieren ungesättigte Lactone auch mit der primären Aminogruppe von Modell-Aminen (Jones und Young, 1966) oder Cystein (Cavallito und Haskell, 1945). Bei der Reaktion mit Modell-Aminen war es unter anderem von der Position der Doppelbindung innerhalb der Lacton-Struktur abhängig, ob Michael-Additionsprodukte ( $\alpha,\beta$ -Position) oder, durch nukleophilen Angriff an der Carbonylgruppe, Amidderivate ( $\beta,\gamma$ -Position) gebildet wurden. Die primäre Aminogruppe von Cystein reagierte mit  $\beta,\gamma$ -Angelicalacton erst nach vorangegangener Addition der Thiolgruppe an die  $\gamma$ -Position der Doppelbindung mit dem Carbonyl-C des Lactons unter intramolekularer Cyclisierung.

Dass auch PAT sowohl mit Thiol- als auch mit Aminogruppen reagierte, wurde zuerst anhand der Interaktion von PAT mit den Cystein- bzw. Lysinseitenketten des Enzyms Aldolase gezeigt (Ashoor und Chu, 1973).

Die Reaktivität gegenüber Proteinen wurde auch durch die Interaktion von PAT mit Thiolkomponenten von Mikrotubulinproteinen (Pfeiffer et al., 1998) sowie durch die intra- und intermolekulare Quervernetzung von Proteinen unter Beteiligung von Cystein-, Lysin- und Histidinseitenketten sowie der  $\alpha$ -Aminogruppen (Fliege und Metzler, 1999) beschrieben. Dabei waren sowohl homo- (Thiol-Thiol, Amin-Amin) als auch heterobifunktionale Quervernetzung (Thiol-Amin) zu beobachten.

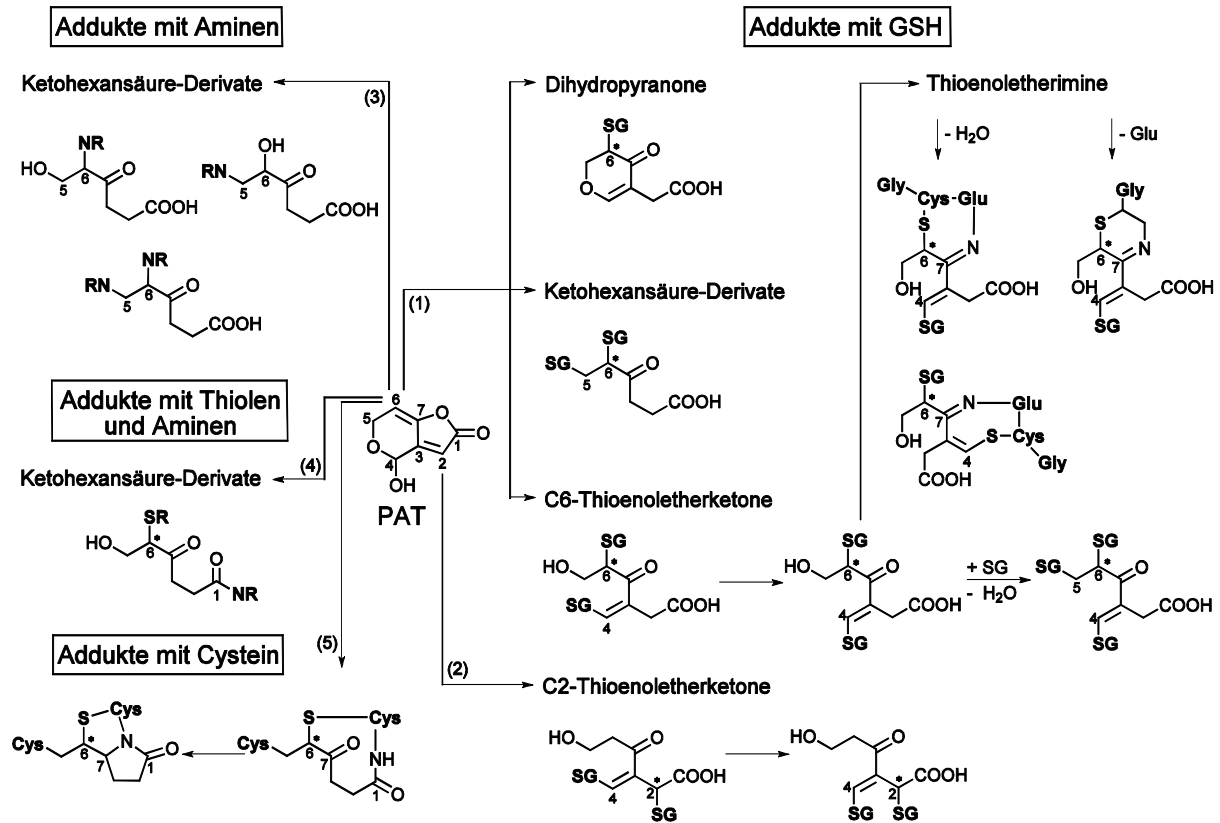
Die der Reaktion von PAT mit Thiolen und Aminen zugrunde liegenden Mechanismen wurden von Fliege und Metzler (2000a) aufgeklärt, sowie erstmals die zellfrei generierten Reaktionsprodukte mit dem intrazellulär vorkommenden Tripeptid Glutathion ( $\gamma$ -Glutamyl-L-cysteinyl-glycin, GSH, **Abb. 2**) und N-Acetyl-L-cystein isoliert und charakterisiert (Fliege und Metzler, 2000b; **Abb. 3**).



**Abb. 2:** Strukturformel von Glutathion, einem Tripeptid aus Glycin, Cystein und Glutaminsäure.

Der initiale nukleophile Angriff der Thiolgruppe erfolgt entweder durch Michael-analoge 1,6-Addition an C6 oder 1,4-Addition an C2 von PAT unter Ausbildung eines GSH-PAT-Intermediats, welches sich durch Reaktion mit weiteren Nukleophilen zu Di- und Triaddukten stabilisierte (Fliege und Metzler, 2000a,b). Die Hauptreaktionsprodukte wurden in vier Strukturklassen eingeteilt: C6-thiolsubstituierte Thioenoletherketone (TEEK), Dihydropyranone (DHP) und Ketohehexansäure-Derivate (KHA) sowie C2-substituierte TEEK (**Abb. 3**). Bei allen Addukten entsteht an C6 oder C2 von PAT ein neues chirales Zentrum, so dass von jedem GSH-Addukt stets zwei Diastereomere gebildet wurden.

Fliege und Metzler (2000a) zeigten ebenso das Potential von PAT auf, mit Aminogruppen von Modell-Aminen (Ethanolamin, 4-Bromanilin) zu reagieren, wobei im Vergleich zu Thiolgruppen eine verminderte Reaktivität von PAT gegenüber Aminogruppen festgestellt wurde. Addukte von PAT mit Modell-Aminen gehörten dem Strukturtyp der KHA an (**Abb. 3**), welche bis zu zwei Aminokomponenten an C5 und/oder C6 von PAT gebunden haben können (Fliege und Metzler, 2000a).



**Abb. 3:** Durch Fliege und Metzler (2000a,b) identifizierte Reaktionsprodukte von PAT mit GSH (SG), mit Modell-Aminen (NR), sowie Mischaddukte aus Modell-Thiolen (SR) und -Aminen. (1) initiale Addition von SG an C6 von PAT und Reaktion mit bis zu zwei weiteren GSH-Molekülen. (2) initiale Addition von SG an C2 von PAT und Reaktion mit einem weiteren GSH-Molekül. Cyclisierte GSH-Moleküle sind durch die einzelnen Aminosäuren dargestellt. (3) initiale Addition einer Aminogruppe an C6 von PAT und mögliche Reaktion mit einem weiteren Amin. (4) initiale Addition einer Thiolgruppe and C6 von PAT und weitere Reaktion einer Aminogruppe mit dem Carbonyl-C1 von PAT. (5) initiale Addition der Cystein (Cys)-Thiol-Gruppe an C6 und Aminolyse des Lactonrings mit der Cystein- $\alpha$ -Aminogruppe, sowie anschließende Reaktion des sekundären Amids mit der C7-Carbonylgruppe. Gly, Glycin; Glu, Glutaminsäure. \*, neu entstandenes chirales Zentrum an C2 oder C6 von PAT.

Zudem reagierte PAT nach initialer Reaktion mit Modell-Thiolen an C6 mit einem weiteren Nucleophil mit Aminogruppe, was zur Ausbildung von gemischten Thiol-PAT-Amin-Addukten führte (Fliege und Metzler, 2000a). Bei diesen Mischaddukten mit KHA-Struktur lag die Aminokomponente, nach Hydrolyse des Lactonrings, am Carbonyl-C1 als Amid gebunden vor (Abb. 3). Die aufeinanderfolgende Reaktion von PAT mit einer Thiol- und Aminogruppe wurde auch mit der Aminosäure Cystein beschrieben (Fliege und Metzler, 2000b): Die primäre Aminogruppe von Cystein reagierte dabei erst nach vorangegangener Addition der Thiolgruppe an die  $\delta$ -Position (C6) des konjugierten Doppelbindungssystems mit dem Carbonyl-C1 des Lactons unter intramolekularer Cyclisierung (Abb. 3).

Neben der Reaktivität von PAT gegenüber Aminogruppen von Modell-Aminen und Aminosäuren, wurden auf zellfreier Ebene nur durch den Einsatz millimolarer PAT-Konzentrationen und langer Inkubationszeiten ein Einfluss von PAT auf das DNA-Basenmuster nach DNA-Ameisensäureaufschluss und HPLC-UV-Detektion demonstriert, sowie DNA-DNA-Quervernetzungen mittels Agarose-Gelelektrophorese generiert (Fliege, 1999). In der Literatur wurden bisher noch keine DNA-Addukte von PAT identifiziert.

### 1.1.3 Genotoxizität von Patulin

PAT wies *in vitro* bereits ab submikromolaren Konzentrationen (0,3  $\mu\text{M}$ ) mutagenes Potential im *hprt*- und im *tk*-Lokus von kultivierten Säugerzellen auf (Schumacher et al., 2005a; Schumacher et al., 2005b). Während im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Test Genmutationen als Ursache für die Art des mutagenen Schadens in Frage kommen, wurden im Thymidinkinase (TK)-Test neben Punktmutationen insbesondere bei höheren Konzentrationen auch Deletionen als Ursache der PAT-induzierten Mutagenität identifiziert (Schumacher et al., 2005b). Mittels modifizierter alkalischer Filterelution konnten alkalilabile Stellen, infolge von DNA-Strangbrüchen und depurinierenden DNA-Addukten, als Ursache für die Mutationen im submikromolaren Bereich ausgeschlossen werden (Schumacher et al., 2006). Stattdessen scheinen die im gleichen Konzentrationsbereich induzierten DNA-DNA-Quervernetzungen einen möglichen Mechanismus für die genotoxische und mutagene Wirkung von PAT darzustellen (Schumacher et al., 2006).

Das DNA-schädigende Potential von PAT in submikromolaren Konzentrationen (bis 2,5  $\mu\text{M}$ ) wurde zudem *in vitro* durch die Induktion von Mikrokernen (Pfeiffer et al., 1998; Alves et al., 2000; Zhou et al., 2009; Yang et al., 2011; Glaser und Stopper, 2012) sowie die Induktion von Chromosomenaberrationen (Alves et al., 2000) gezeigt. PAT wies dabei sowohl aneugenes (numerische Chromosomenaberrationen) sowie klastogenes (strukturelle Chromosomenaberrationen) Potential auf (Pfeiffer et al., 1998; Alves et al., 2000). Bei Inkubation von kultivierten Säugerzellen mit höheren PAT-Konzentrationen (ab 15  $\mu\text{M}$ ) wurden im Comet Assay DNA-Strangbrüche detektiert (Liu et al., 2003; Zhou et al., 2010; Yang et al., 2011; Ayed-Boussema et al., 2013). Weiterhin wurden *in vivo* PAT-induzierte DNA-Strangbrüche und/oder alkalilabilen Stellen, als auch die Induktion von Chromosomenaberrationen beschrieben (zusammengefasst in Wouters und Speijers, 1996; de Melo et al., 2012).

Da PAT unter zellfreien Bedingungen eine ausgeprägte Reaktivität gegenüber dem Nukleophil GSH zeigte (Fliege und Metzler, 2000b), war es nicht verwunderlich, dass die

Induktion von Genmutationen, sowie von Mikrokernen, DNA-Strangbrüchen und/oder alkalilabilen Stellen und DNA-DNA-Quervernetzungen invers mit dem intrazellulären GSH-Spiegel korrelierten (Schumacher et al., 2005a; Schumacher et al., 2005b; Zhou et al., 2009; de Melo et al., 2012) bzw. sich durch dessen Erniedrigung nach Vorbehandlung mit Buthioninsulfoximin modulieren ließen (Zhou et al., 2010; Glaser und Stopper, 2012).

Eine intrazelluläre Erniedrigung des GSH-Spiegels wurde in kultivierten Säugerzellen mit PAT-Konzentrationen von 1-1000  $\mu\text{M}$  induziert, wohingegen Marker für daraus resultierenden oxidativen Stress erst ab einer PAT-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  detektiert wurden (Barhouni und Burghardt, 1996). Wenn DNA-Schäden und oxidativer Stress unter den gleichen Bedingungen untersucht wurden, waren mindestens 5  $\mu\text{M}$  PAT erforderlich um sowohl Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase-empfindlichen Stellen, DNA-Strangbrüche und/oder alkalilabile Stellen, als auch einen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (Schumacher et al., 2006; Yang et al., 2011; Ayed-Boussema et al., 2013) und Marker für oxidative DNA-Schäden (Zhou et al., 2010; Yang et al., 2011) zu induzieren. Auch im Gehirn von männlichen CF-1-Mäusen, wurden DNA-Strangbrüche (nachgewiesen durch den alkalischen Comet Assay) zusammen mit einer Erniedrigung des GSH-Spiegels und Lipidperoxidation bei intraperitoneal verabreichten Dosis von 50% des LD50-Werts nachgewiesen (de Melo et al., 2012).

Dahingegen wurden bei der PAT-Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$ , die bereits eine signifikante Erhöhung der Mutationen im *hprt*-Lokus von kultivierten V79-Hamsterzellen verursachte, weder eine Abnahme des intrazellulären GSH-Spiegels (Schumacher et al., 2005a) noch oxidative DNA-Basenmodifikationen beobachtet (Schumacher et al., 2006). Somit war die Induktion von oxidativem Stress infolge intrazellulärer GSH-Depletion als mittelbarer genotoxischer Wirkmechanismus von PAT für die unter diesen Bedingungen beobachteten Genmutationen auszuschließen.

Wie für andere  $\alpha,\beta(\gamma,\delta)$ -ungesättigte Carbonylverbindung beschrieben (zusammengefasst in Witz, 1986; Eder und Hoffman, 1993), kommt als weiterer mutagener Wirkmechanismus von PAT auch die direkte DNA-Modifikation (unmittelbare Genotoxizität) in Frage. Hinweise auf die Reaktivität von PAT gegenüber DNA-Basen lieferten zum einen die durch PAT-induzierten DNA-DNA-Quervernetzungen in kultivierten V79-Zellen (Schumacher et al., 2006), welche unter den gleichen Bedingungen verursacht wurden wie die PAT-induzierten Genmutationen im HPRT-Test (Schumacher et al., 2005a). Zum anderen wurde eine PAT-induzierte Veränderung in der Schnittstelle von Restriktionsenzymen bei nackter Lambdaphagen-DNA beschrieben (Lee, 1991). Die bifunktionelle Reaktivität von PAT gegenüber Nukleophilen mit Aminogruppen könnte somit zur Quervernetzung von DNA führen. Weiterhin könnten PAT-DNA-Addukte sowohl Basenpaarsubstitutionen als auch

Basenrastermutationen verursachen, welche als Genmutationen im HPRT-Test erfassbar sind. Entsprechende Addukte von PAT mit DNA-Basen, die eine direkte DNA-Reaktivität bestätigen würden, wurden bislang jedoch nicht identifiziert.

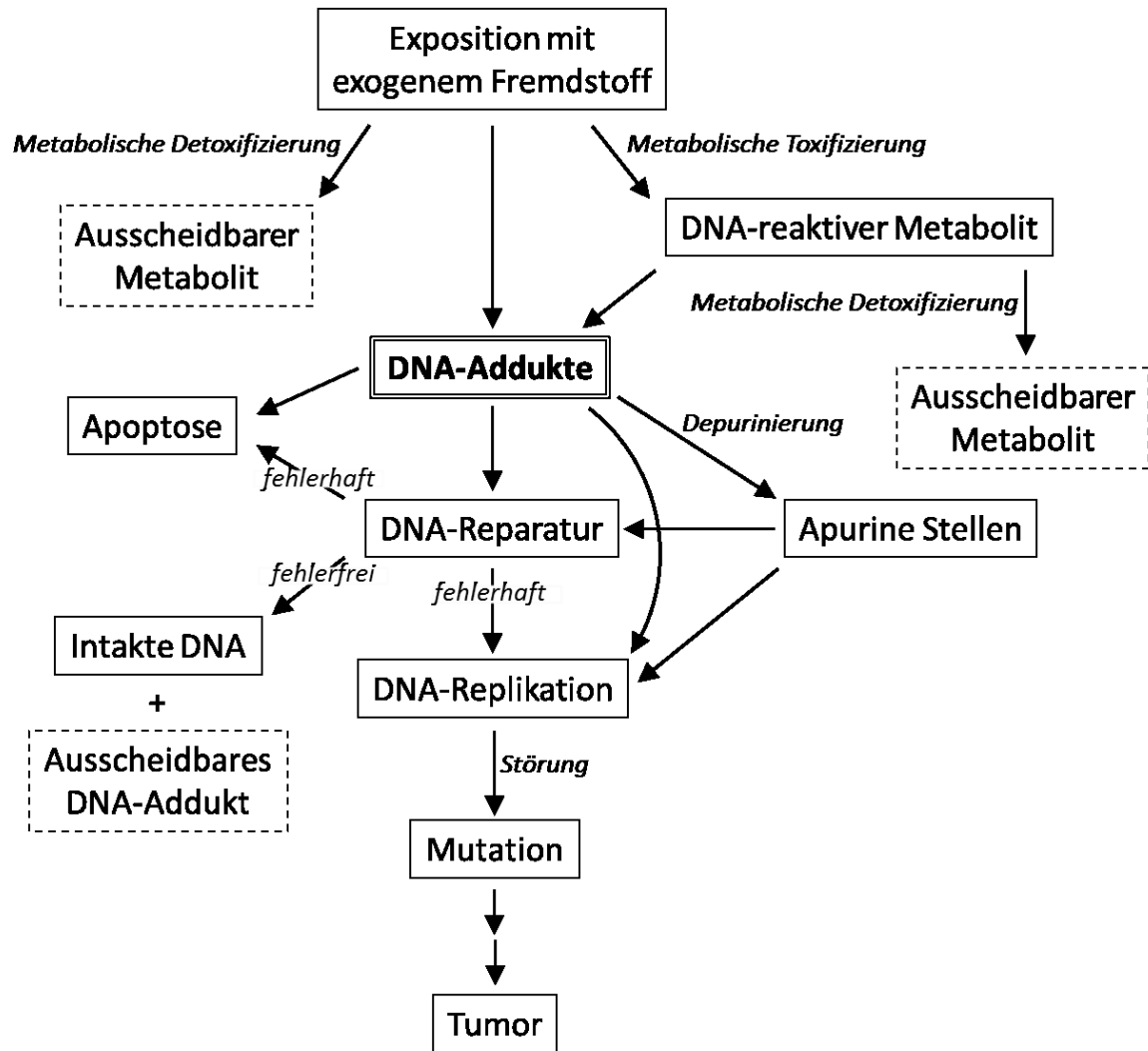
## 1.2 Exogene DNA-Addukte

Elektrophile Substanzen sind in der Lage direkt mit der DNA zu interagieren und durch kovalente Bindung DNA-Addukte zu bilden.

Neben DNA-Addukten endogenen Ursprungs (z.B. oxidative DNA-Modifikationen durch oxidativen Stress und Lipidperoxidation) können viele Fremdstoffe aufgrund ihrer elektrophiler Struktur direkt (z.B.  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonyle) oder nach metabolischer Aktivierung zu elektrophilen Spezies (z.B. Benzo(a)pyren, Aflatoxin B<sub>1</sub>), mit der DNA reagieren, unter Bildung sogenannter exogener DNA-Addukte (**Abb. 4**, zusammengefasst in Hemminki, 1983; van Duuren, 1988).

Da es innerhalb des DNA-Strangs zahlreiche nukleophile Stellen gibt, ist die DNA anfällig für Modifikationen durch Elektrophile (Kapitel 1.2.1). Die DNA-Adduktbildung stellt eine primäre DNA-Läsion dar, welche infolge fehlender oder fehlerhafter DNA-Reparatur zu vererbaren Veränderungen des Erbguts (Mutationen, **Abb. 4**) führen kann (Kapitel 1.2.2). Um die genotoxischen Aktivität von Substanzen zu identifizieren, müssen die potentiellen DNA-Addukte zunächst charakterisiert werden, um diese anschließend mit analytischen Methoden *in vitro* und *in vivo* nachzuweisen und zu quantifizieren (Kapitel 1.2.3). Für bestimmte kanzerogene Substanzen, wurde eine Korrelation zwischen den gebildeten DNA-Addukten und der Entstehung von Tumoren festgestellt (Rundle, 2006). DNA-Addukte können somit als Biomarker der Exposition betrachtet werden (zusammengefasst in Jarabek et al., 2009).



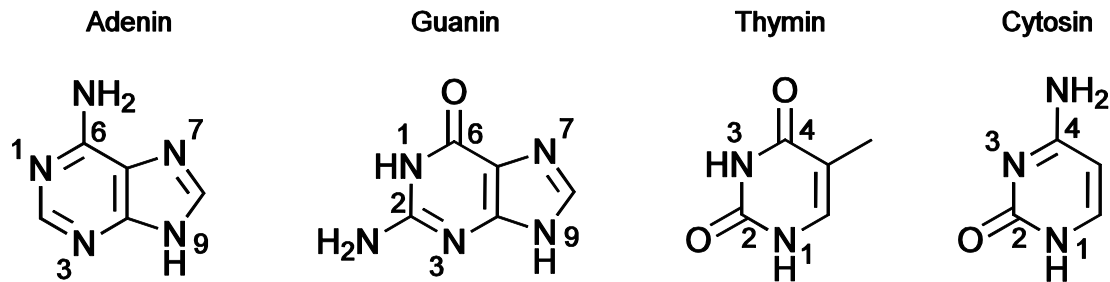


**Abb. 4:** Schematische Darstellung, der zentralen Rolle von exogenen DNA-Addukten in der chemischen Kanzerogenese. Modifiziert nach Singh und Farmer (2006).

### 1.2.1 Vielfalt der DNA-Modifikationen

Die DNA-Modifikation findet vorwiegend an den nukleophilen Zentren von DNA-Basen, den Stickstoff- und Sauerstoffatomen, statt (**Abb. 5**). Die N<sup>7</sup>-Position von Guanin ist die nukleophilste Stelle innerhalb der heterozyklischen DNA-Basen (zusammengefasst in Gates, 2004). Durch Adduktierung an der N<sup>7</sup>-Position wird der Guanin-Ring formal positiv geladen und folglich die N-glykosidische Bindung von N<sup>9</sup> zur 2'-Deoxyribose geschwächt. Das labile DNA-Addukt stabilisiert sich durch spontane Abspaltung des Zuckers von der adduktierten Base (Depurinierung), was auf zellfreier Ebene zur Bildung von apurinen Stellen führt. Ebenso gehören die DNA-Addukte an N<sup>3</sup>-Guanin, N<sup>7</sup>-Adenin oder N<sup>3</sup>-Adenin (**Abb. 5**) zu den labilen, depurinierenden Addukten (zusammengefasst in Gates, 2009). Im weiteren Sinne ebenso als labile Addukte zu bezeichnen sind die Addukte an der N<sup>1</sup>-Position von Adenin, die sich infolge einer Ringöffnung durch die sogenannte Dimroth-Umlagerung in N<sup>6</sup>-Adenin-

Addukte umlagern können. Die Adduktbildung an der N<sup>3</sup>-Position von Cytosin führt bevorzugt zur Deaminierung, jedoch kann es dadurch auch zu einer erleichterten Deglykosilierung kommen (zusammengefasst in Gates, 2009). Die Reaktion von Elektrophilen an den exocyclischen Stickstoffatomen (N<sup>2</sup>-Guanin, N<sup>6</sup>-Adenin, N<sup>4</sup>-Cytosin), den amidischen Stickstoffatomen (N<sup>1</sup>-Guanin, N<sup>1</sup>-Thymin) sowie den Sauerstoffatomen (O<sup>6</sup>-Guanin, O<sup>4</sup>-Thymin, **Abb. 5**) führt zur Bildung sogenannter chemisch stabiler Addukte.



**Abb. 5:** Strukturformeln der Purinbasen Adenin und Guanin und der Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin, sowie die Nummerierung der nukleophilen Positionen.

Monofunktionelle Substanzen bilden auf diese Weise N- bzw. O-substituierte DNA-Addukte (zusammengefasst in van Duuren, 1988). Bifunktionelle Substanzen, mit zwei reaktiven Gruppen im Molekül, sind zudem in der Lage an zwei Positionen innerhalb einer DNA-Base zu reagieren und hierdurch sogenannte cyclische Addukte zu bilden (z.B. Acrolein, Eder und Hoffman, 1993), sowie durch Reaktion mit zwei DNA-Basen zu Inter- oder Intrastrang-DNA-DNA-Quervernetzungen zu führen (z.B. Mitomycin C, Bizanek et al., 1992; trans-4-Hydroxynonenal, Huang et al., 2010; Crotonaldehyd, Acrolein, Stone et al., 2008). Weiterhin gibt es viele genotoxische Verbindungen, die auch mit den Sauerstoffatomen der internukleotidischen Phosphodiesterbindungen des DNA-Rückgrats zu Phosphotriester-Addukte reagieren (zusammengefasst in Jones et al., 2010).

### 1.2.2 Reparatur und Konsequenzen von DNA-Addukten

DNA-Addukte sind primäre DNA-Läsionen und somit als potentielle Vorstufen von Mutationen zu betrachten. Ob sich ein DNA-Addukt in einer Mutation manifestiert, hängt von mehreren Faktoren ab: Stabilität des DNA-Addukts, Anzahl der Addukte, Position des Addukts an der DNA-Base, Position des DNA-Addukts innerhalb des DNA Strangs, Zelltyp und Effizienz der Reparatur (zusammengefasst in Jarabek et al., 2009).

Ausdifferenzierte Zellen reagieren auf einen DNA-Schaden durch DNA-Reparaturmechanismen. Die Induktion von DNA-Läsionen in sich teilenden Zellen führt zur

Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints und dadurch zum Anhalten des Zellzyklus, um die DNA-Schäden zu reparieren (zusammengefasst in Houtgraaf et al., 2006). Die wichtigsten Reparaturmechanismen beim Menschen sind Basenexzisionsreparatur (BER), Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Basenfehlpaarungs (*Mismatch*)-Reparatur, Methyltransferase-vermittelte Reparatur und Rekombinationsreparatur (zusammengefasst in Jarabek et al., 2009). BER und NER sind hauptsächlich dafür verantwortlich beschädigte DNA-Basen, infolge von DNA-Addukten, zu entfernen (zusammengefasst in Houtgraaf et al., 2006). Welches dieser Reparatursysteme aktiviert wird, hängt u.a. von der Art der modifizierten Base, der Position des Adduktes an der Base und der Lokalisation des Adduktes innerhalb der DNA ab, sowie in welchem Gewebe oder Zelltyp das Addukt gebildet wurde (zusammengefasst in Jarabek et al., 2009). Nach Beendigung der DNA-Reparatur, kann die Zelle den Zellzyklus fortsetzen.

Wenn der Schaden nicht repariert werden kann, oder wenn das Ausmaß des Schadens die Kapazität des DNA-Reparatursystems übersteigt, wird der Zellzyklus dauerhaft blockiert, was entweder zu einer seneszenten Zelle oder zur Induktion von Apoptose führen kann (zusammengefasst in Houtgraaf et al., 2006). Wenn DNA-Addukte, sowie nach Depurinierung entstandene apurine Stellen, unentdeckt bzw. unrepariert bleiben, können diese zu Störungen und Ablesefehlern bei der Replikation führen und dadurch eine vererbare DNA-Veränderung (Mutationen) erzeugen (**Abb. 4**, zusammengefasst in Houtgraaf et al., 2006). Darüber hinaus können DNA-Addukte während der Replikation durch sogenannte schadenstolerante Polymerasen umgangen werden, was häufig ebenso zu fehlerhafter Replikation führen kann (zusammengefasst in Jarabek et al., 2009). Nach Fixierung der durch DNA-Addukte generierten Replikationsfehler (z.B. Fehlpaarung, Deletion) können Genmutationen wie Basenpaarsubstitutionen oder Leserasterverschiebungen entstehen.

Andererseits können DNA-Addukte, infolge der Bildung von apurinen Stellen oder einer unvollständigen Exzisionsreparatur, auch die Stabilität und Integrität der DNA direkt beeinträchtigen und hierdurch DNA-Strangbrüche auslösen (zusammengefasst in Jarabek et al., 2009).

Eine Mutation in einem Proto-Onkogen oder einem Tumorsuppressorgen könnte als Initiationsereignis den ersten Schritt im mehrstufigen Prozess der Kanzerogenese darstellen.

Nicht alle DNA-Addukte führen gleich effizient zu Mutationen, sondern unterscheiden sich in ihrer mutagene Potenz und Effizienz der Reparatur: i) sterisch anspruchsvolle Addukte (*bulky adducts*) stören die Helix-Struktur der DNA und werden dadurch ggf. einfacher durch das DNA-Reparatur-System (NER) erkannt (zusammengefasst in Jarabek et al., 2009); ii) depurinierende Addukte werden durch BER repariert, jedoch führen unentdeckte Läsionen

oder solche, die während der S-Phase gebildet werden, oft zu Basenpaarsubstitutionen, wobei gegenüber der apurinen Stelle bevorzugt 2'-Deoxyadenosin eingebaut wird (Loeb und Preston, 1986; Obeid et al., 2010); iii) zahlreiche DNA-Läsionen, darunter stabile Addukte, werden durch NER repariert, dessen Mechanismus langsam und biochemisch komplex und daher anfällig für Fehler ist (zusammengefasst in Houtgraaf et al., 2006); iv) durch Addukte an den Basenpaar-Bindungsstellen (N<sup>1</sup>-, N<sup>6</sup>-Adenin; N<sup>3</sup>-, O<sup>4</sup>- Thymin; N<sup>1</sup>-, N<sup>2</sup>-, O<sup>6</sup>-Guanin; N<sup>3</sup>-, N<sup>4</sup>-, O<sup>6</sup>-Cytosin) können aufgrund veränderter Wechselwirkungen Basentransversion resultieren (Kunz et al., 2009).

### 1.2.3 Analyse von DNA-Addukten

Die Mengen an chemisch induzierten DNA-Addukten in tierischen und menschlichen Geweben liegen im Bereich von 0,01-10 Addukte pro 10<sup>8</sup> normale Nukleotide und sind somit relativ gering. Daher müssen sehr sensitive, genaue und spezifische analytische Methoden zur Detektion und Quantifizierung von DNA-Addukten eingesetzt werden, so dass diese auch in Gegenwart eines großen molaren Überschusses an nicht-adduktierten Nukleosiden erfasst werden können (zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013).

Für den Nachweis von DNA-Addukten stehen verschiedene Methoden zur Verfügung wie beispielsweise Immunassays (RIA, ELISA), <sup>32</sup>P-Postlabelling, HPLC-ECD oder Fluoreszenz, Beschleuniger-Massenspektrometrie (MS, *Accelerator Mass Spectrometry*), GC-MS sowie HPLC-MS/MS (zusammengefasst in Himmelstein et al., 2009).

Durch die jüngsten Entwicklungen auf dem Gebiet der Massenspektrometrie gewann die HPLC-MS/MS-Analyse von DNA-Addukten zunehmend an Bedeutung, da mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie sowohl die Adduktstruktur charakterisiert werden kann, sowie die DNA-Addukte, in Kombination mit stabilisotopen-markierten internen Standards, mit hoher Spezifität, Empfindlichkeit und Genauigkeit quantifiziert werden können (zusammengefasst in Singh und Farmer, 2006; zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013). Der Addukt detektion voran gehen im Allgemeinen die drei Schritte der DNA-Isolierung, Abtrennung und Anreicherung der Addukte:

#### DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA aus Zellen oder Gewebe erfolgt traditionell mittels Chloroform-Extraktion oder mit Hilfe spezieller DNA-Isolierungskits. Als benötigte DNA-Menge für die Detektion und Quantifizierung von DNA-Addukten mittels HPLC-MS/MS werden zwischen

10-100 µg angegeben (zusammengefasst in Farmer et al., 2005; zusammengefasst in Himmelstein et al., 2009).

#### Abtrennung der Addukte vom DNA-Rückgrat

Die Freisetzung von chemisch stabilen Addukten aus dem DNA-Strang kann durch dessen enzymatischen Verdau mittels Endo- und Exonukleasen zu den entsprechenden 2'-Deoxyribonukleotiden oder -nukleosiden erfolgen. Durch die saure Thermolyse bei milden Temperaturen (60-80°C) wird, nach Protonierung des tertiären Stickstoffatoms der Purinbasen Adenin und Guanin, deren N-glycosidische Bindung zum Desoxyribose ring gespalten und somit selektiv die Purinbasen aus dem DNA-Strang freigesetzt. Für die saure Thermolyse der N-glykosidischen Bindung der Pyrimidinbasen sind höhere Temperaturen (>100°C) nötig. Da bei diesen Abtrennungsmethoden immer auch die nicht-adduktieren Nukleotide, Nukleoside oder Nukleobasen freigesetzt werden, ist anschließend noch ein Anreicherungsschritt der DNA-Addukte notwendig (zusammengefasst in Singh und Farmer, 2006; zusammengefasst in Himmelstein et al., 2009).

Ein Sonderfall sind die DNA-Addukte an der N<sup>3</sup>- oder N<sup>7</sup>-Position von Guanin oder Adenin, welche aufgrund der Destabilisierung der N-glykosidischen Bindung sogenannte labile Addukte darstellen. Diese können bereits intrazellulär durch spontane Depurinierung freigesetzt werden, was zur Bildung apuriner Stellen führt (zusammengefasst in Gates, 2009). Zur Freisetzung der labilen Addukte aus isolierter DNA ist lediglich Erhitzen in neutralem Milieu erforderlich (zusammengefasst in Singh und Farmer, 2006; zusammengefasst in Tarun und Rusling, 2005). Da unter diesen Bedingungen selektiv nur die labilen Addukte abgespalten werden, muss auf die Hydrolyse kein Anreicherungsschritt mehr folgen, so dass die Lösung nach der Hydrolyse direkt per HPLC-MS/MS analysierbar ist.

#### Anreicherung der DNA-Addukte

Die Anreicherung der DNA-Addukte kann mittels Festphasenextraktion, durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einem geeigneten Lösungsmittel, durch HPLC-Auftrennung oder durch Immunoaffinitätsaufreinigung erfolgen. Mittels Ultrafiltration durch einen Molekularfilter (3-10 kDa) können Reste des DNA-Rückgrats nach saurer Hydrolyse, sowie Proteine nach enzymatischer Hydrolyse abgetrennt werden. Wie bei den vorangegangenen Aufarbeitungsschritten ist es hierbei zu beachten, dass keine Artefakte gebildet werden oder größere Verluste aufgrund der Instabilität der Addukte unter den angewandten Aufarbeitungsbedingungen zu verzeichnen sind (zusammengefasst in Himmelstein et al., 2009; zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013).

### HPLC-MS/MS-Analyse der DNA-Addukte

Als Ionisierungsverfahren für die HPLC-MS/MS-Analysen wird meist die Elektrospray-Ionisation (ESI) oder die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) angewandt. Dabei werden in der Regel positive Ionen ( $[M+H]^+$ ) erzeugt, da sich die modifizierten Basen aufgrund der vielen Stickstoffatome leicht protonieren lassen (zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013).

Unbekannte Addukte werden zunächst im Vollscan-Modus nachgewiesen und anschließend durch MS/MS-Fragmentierung (Produktionenscan) weiter charakterisiert, um strukturelle Information zu erhalten. Addukte mit Nucleobasen fragmentieren unter Spaltung der Bindung zur Base, so dass diese als protoniertes Fragmentation mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs ( $m/z$ )-Verhältnis im Produktionen-Massenspektrum enthalten ist ( $m/z$  152 für  $[Guanin+H]^+$ ;  $m/z$  136 für  $[Adenin+H]^+$ ;  $m/z$  127 für  $[Thymin+H]^+$ ;  $m/z$  112 für  $[Cytosin+H]^+$ ; zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013). Weiterhin können durch weitere charakteristische Fragmente der Nucleobasen Hinweise auf die Position der Bindung in der Base erhalten werden: das Fragmentation mit  $m/z$  135 ( $[Guanin+H-NH_3]^+$ ) tritt charakteristisch bei N<sup>7</sup>-Methylguanin auf oder das Fragmentation mit  $m/z$  148 ( $[Adenin-CH_2+H]^+$ ), welches auf eine Adenin-N<sup>6</sup>-Adduktierung hindeutet (Tretyakova et al., 1998).

Bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung von Addukten mit 2'-Deoxynucleosiden tritt schon bei kleinen Kollisionsenergien der charakteristische Neutralverlust (116 Da) der 2'-Deoxyribose auf (zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013). Dieses charakteristische Fragmentierungsverhalten von Nucleosid-Addukten wird angewandt, um im Neutralverlustscan (*Neutral loss scan*)-Modus auf unbekannt Addukte zu screenen. Bei diesem Experiment werden alle Moleküle detektiert, welche zwischen dem Quadrupol 1 und Quadrupol 3 eine Massendifferenz von 116 Da aufweisen. Die anschließende Durchführung von Produktionenscans auf die detektierten Molekülmassen der potentiellen Addukte liefert dann Informationen über die adduktivierte DNA-Base.

Für die Quantifizierung von DNA-Addukten aus verschiedenen Matrices wird der *multiple-reaction-monitoring* (MRM)-Modus angewandt, der die parallele Messung von mehreren Massenübergängen von verschiedenen Addukten ermöglicht. Durch die Zugabe von stabilisotopen-markierten Analogen der Addukte als interne Standards werden Verluste infolge der Aufarbeitung und Ionensuppression in der Ionenquelle kompensiert und somit die Reproduzierbarkeit und die Genauigkeit der Quantifizierung erhöht (zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013).

## 2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Falsche Ernährungsweise sowie Nahrungsmittelinhaltsstoffe mit kanzerogenem und mutagenem Potential sind zwei wichtige Faktoren, die zum Krebsrisiko des Menschen beitragen. Kontaminationen von Nahrungsmitteln mit Toxinen von Schimmelpilzen führen insbesondere im Bereich Getreide, Obst und Gemüse zur Belastung von Lebensmittelgrundstoffen oder daraus verarbeiteten Lebensmitteln.

Das Mykotoxin Patulin ist als Sekundärmetabolit verschiedener Schimmelpilze vorrangig in braunfaulen Äpfeln und deren Verarbeitungsprodukten zu finden. Aufgrund seiner  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Lacton-Struktur besitzt Patulin ausgeprägte elektrophile Eigenschaften, wie die Reaktivität gegenüber Thiol- und Aminogruppen. Das genotoxische Potential von Patulin wurde in zahlreichen *in vitro*-Genotoxizitätsstudien nachgewiesen, wobei der zugrundeliegende molekulare Wirkmechanismus bislang noch unklar ist. Wie aufgrund der Reaktivität von Patulin gegenüber Thiolgruppen erwartet, wird die Mutagenität von Patulin vom intrazellulären Glutathion-Spiegel invers beeinflusst. Basierend auf der mutagenen Wirkungsweise von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylen wird eine mittelbare DNA-Schädigung durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies infolge von Glutathion-Depletion oder die direkte DNA-Schädigung durch Modifikation von DNA-Basen diskutiert. Da bei submikromolaren Patulin-Konzentrationen oxidative DNA-Schäden als Ursache für die beobachteten Genmutationen ausgeschlossen wurden und Patulin zudem DNA-DNA-Interstrang-quervernetzendes Potential aufwies, scheint die direkte Reaktion von Patulin mit DNA-Basen einen möglichen Mechanismus für die genotoxische Wirkung von Patulin darzustellen.

Um die direkte DNA-Reaktivität von Patulin zu untersuchen und Hinweise auf die mechanistische Wirkweise der Genotoxizität von Patulin zu erhalten, soll im ersten Teil der Arbeit die Reaktion von Patulin mit DNA-Basen unter zellfreien Bedingungen instrumentell-analytisch untersucht werden.

Hierfür soll Patulin zunächst mit der DNA-Base Adenin inkubiert und die potentiellen Addukte mittels (U)HPLC-massenspektrometrischer Methoden detektiert, sowie charakterisiert werden. Mit Hilfe der in der Literatur beschriebenen Adduktstrukturen von Patulin mit Modell-Aminen soll die Struktur möglicher Patulin-Adenin-Addukte postuliert werden. Der Einfluss von Glutathion auf die Reaktivität von Patulin gegenüber Adenin soll anschließend durch Inkubation in Anwesenheit von Glutathion überprüft werden.

Da im zellulären Kontext die Mutagenität von Patulin sowohl durch dessen Konzentrationen als auch durch den intrazellulären Glutathion-Spiegel beeinflusst wird, soll weiterhin die Reaktivität von Patulin gegenüber Adenin bei verschiedenen Glutathion/Patulin-Verhältnissen betrachtet werden. Eine mögliche Katalyse der Glutathion-Konjugation durch das Enzym Glutathion-S-Transferase und eine dadurch bedingte Verhinderung der Adduktbildung mit Adenin soll durch Inkubation in Anwesenheit des cytosolischen Glutathion-konjugierenden Enzyms untersucht werden. Um für eine Beurteilung zur Bedeutung und Relevanz der potentiellen Patulin-Adenin-Addukte auch die zellulären Aspekte zu berücksichtigen, soll ebenso die Reaktivität gegenüber 2'-Deoxyadenosin, als eigentlicher nukleophiler Zielstruktur des DNA-Strangs, untersucht werden. Das Spektrum an Nukleophilen soll dann um weitere Nukleobasen und 2'-Deoxynukleoside ergänzt werden.

Aufbauend auf den zur Adduktbildung von Patulin mit DNA-Basen gewonnenen Erkenntnissen soll im zweiten Teil der Arbeit die Adduktbildung nach Reaktion von Patulin mit genomischer DNA untersucht werden.

Hierfür soll zunächst eine geeignete Hydrolysemethode zur Freisetzung der potentiellen Addukte vom DNA-Rückgrat entwickelt und durch Variation der Hydrolyseart, -zeit und -temperatur hinsichtlich der Ausbeute an Spaltprodukten, sowie der Stabilität der Addukte unter den Hydrolysebedingungen optimiert werden. Weiterhin soll eine Methode zur Anreicherung der Addukte und Abtrennung der nicht-adduktierten DNA-Bausteine, sowie für die anschließende Detektion der DNA-Addukte eine empfindliche und spezifische UHPLC-massenspektrometrische Methode entwickelt werden. Durch die Anwendung der entwickelten Methoden soll anschließend das Adduktbildungspotential von Patulin nach Inkubation mit genomischer DNA in An- und Abwesenheit von Glutathion untersucht werden.



### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

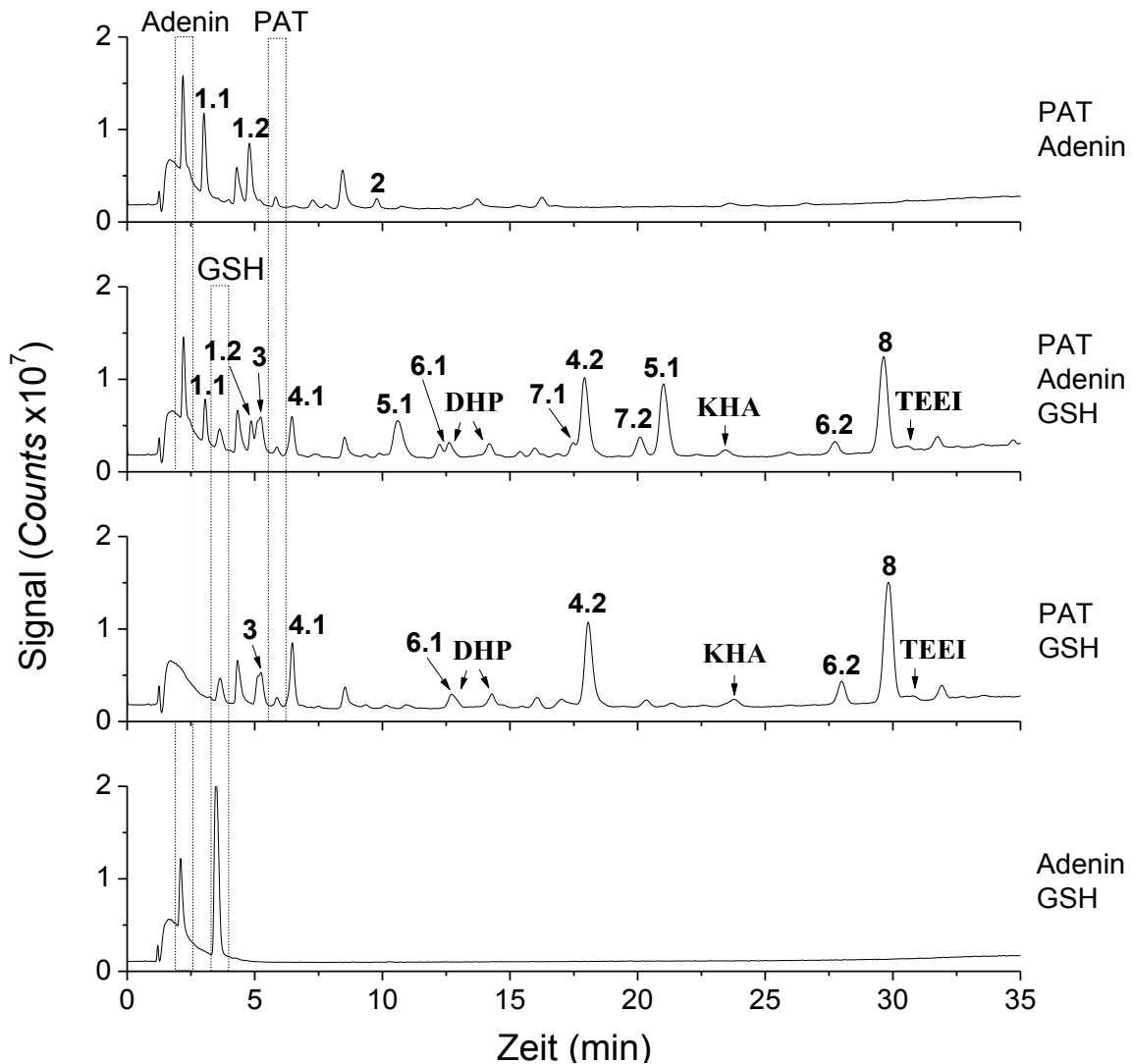
Für das genotoxisch wirkende PAT wurde bislang nur die Reaktivität gegenüber Modell-Nukleophilen, sowie GSH und einigen Aminosäuren beschrieben (Kapitel 1.1.2). Die PAT-induzierten Genmutationen könnten jedoch insbesondere durch Basensubstitutionen, infolge der Adduktbildung mit DNA-Basen, verursacht worden sein. Im Folgenden wurde deshalb zunächst die Reaktivität von PAT gegenüber DNA-Basen untersucht, um potentielle Addukte zu identifizieren und charakterisieren (Kapitel 3.1). Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Adduktbildungspotential von PAT mit DNA betrachtet, wofür zunächst die Entwicklung von Methoden zur Freisetzung und Detektion potentieller Addukte notwendig war (Kapitel 3.2).

#### 3.1 Reaktivität von Patulin gegenüber DNA-Basen

Die Reaktivität von PAT gegenüber DNA-Basen wurde zunächst unter zellfreien Bedingungen durch die Adduktbildung von PAT mit der Purinbase Adenin (**Abb. 5**) untersucht. Da GSH (**Abb. 2**) als mengenmäßig häufigstes Nichtproteinthiol in Säugerzellen die PAT-induzierten Genmutationen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beeinflusste (Kapitel 1.1.3), wurden alle Inkubationen in An- und Abwesenheit von GSH durchgeführt (Kapitel 3.1.1). Für die Adduktbildung von PAT mit Adenin und/oder GSH wurde ein Reaktionsmechanismus hergeleitet (Kapitel 3.1.2). Zudem wurde durch Inkubation von PAT mit Adenin bei unterschiedlichen GSH-Konzentrationen und mit cytosolischer GSH-S-Transferase (GST), die Adduktbildung unter zellulär angepassten Bedingungen untersucht (Kapitel 3.1.3). Durch die Inkubation von PAT mit 2'-Deoxyadenosin wurden die an der Adduktbildung beteiligten Stickstoffatome von Adenin charakterisiert (Kapitel 3.1.4). Das Spektrum an Nukleophilen wurde dann noch um weitere Nukleobasen und 2'-Deoxynukleoside ergänzt (Kapitel 3.1.5). Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen wurde die Adduktbildung mit DNA-Basen als möglicher Wirkmechanismus der unmittelbaren Genotoxizität von PAT diskutiert (Kapitel 3.1.6).

### 3.1.1 Reaktionsprodukte von Patulin mit Adenin in An- und Abwesenheit von Glutathion

Um die Reaktivität von PAT gegenüber DNA-Basen zu untersuchen, wurde Adenin (0,8 mM) mit einem Überschuss an PAT (1,6 mM) für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktionsprodukte nach saurem Abstoppen der Reaktion mittels HPLC-MS(/MS) analysiert (Abb. 6, Kapitel 3.1.1.1).

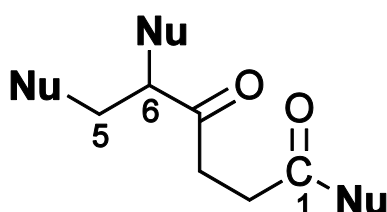


**Abb. 6:** Totalionenstromchromatogramm (TIC) des Vollscans (ESI pos.,  $m/z$  100-1000) der Reaktionsprodukte nach Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit Adenin (0,8 mM) in Abwesenheit und Anwesenheit von GSH (0,8 mM) und der Kontroll-Inkubationen PAT + GSH und GSH + Adenin (Kapitel 6.2.3.1). HPLC-MS Methode Kapitel 6.2.1.3. Bereits publizierte GSH-PAT-Addukte (Fliege und Metzler, 2000b): DHP, Dihydropyronon; KHA, Ketohehexansäure-Derivat; TEEI, Thioenoletherimin (Abb. 3). Die arabischen Zahlen markieren bisher unbekannte PAT-Adenin- (1 und 2), GSH-PAT- (3, 4.1, 4.2, 6 und 8) und gemischte GSH-PAT-Adenin-Addukte (5 und 7). Dezimalzahlen wurden verwendet, wenn mehr als ein Peak das gleiche Molekülion- $m/z$  aufwies. 1,  $m/z$  280; 2,  $m/z$  397; 3,  $m/z$  452; 4,  $m/z$  434; 5,  $m/z$  551; 6,  $m/z$  723; 7,  $m/z$  569; 8,  $m/z$  853.

Um den Einfluss von GSH auf die Reaktivität von PAT zu untersuchen, wurde PAT mit Adenin zudem in Anwesenheit von GSH (0,8 mM) wie oben beschrieben inkubiert und anschließend analysiert (**Abb. 6**, Kapitel 3.1.1.2). Als Kontroll-Inkubationen wurden auf die gleiche Weise und mit gleichen Endkonzentrationen PAT mit GSH und Adenin mit GSH inkubiert.

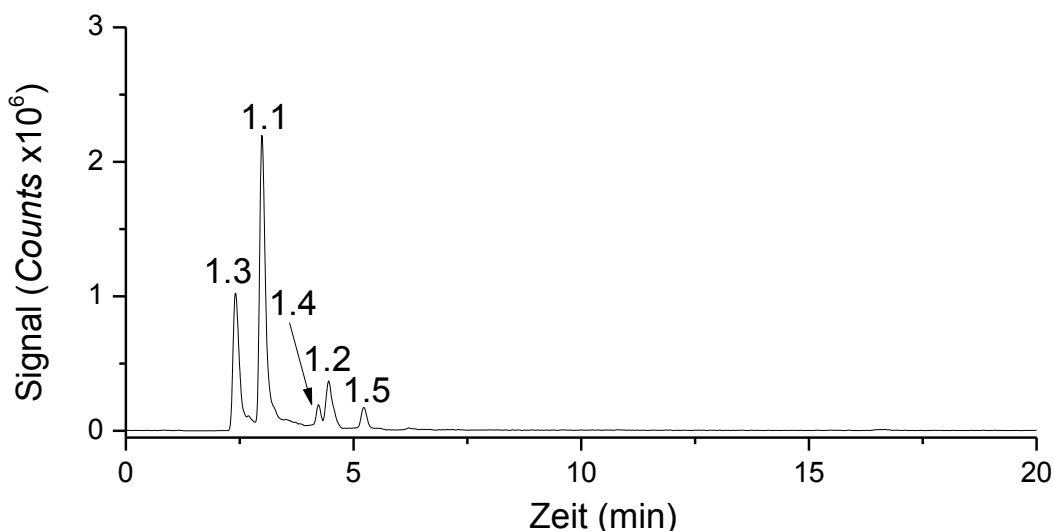
### 3.1.1.1 Reaktionsprodukte von Patulin mit Adenin

Die Vollscan-Analyse des Reaktionsgemisches von PAT mit Adenin zeigte neben den Peaks von Adenin und PAT vier intensive zusätzliche Peaks (**Abb. 6**). Zwei dieser Peaks (1.1 und 1.2) waren nur nach Analyse der Inkubationsansätze detektierbar, die sowohl PAT als auch Adenin enthielten und stellten somit potentielle Reaktionsprodukte von PAT mit Adenin dar. Beide Peaks wiesen als putatives Molekülion das  $m/z$  280 auf. Unter Berücksichtigung aller zuvor beschriebenen Adduktstrukturen (**Abb. 3**) von PAT mit Modell-Aminen (Ethanolamin, 4-Bromanilin, Fliege und Metzler, 2000a) und GSH (Fliege und Metzler, 2000b), war nur die PAT-Gerüststruktur des KHA-Typs mit einem Molekül Adenin gebunden an C6, C5 oder C1 von PAT und zwei Hydroxylgruppen an den verbleibenden anderen Positionen (**Abb. 7**), vereinbar mit dem  $m/z$ -Verhältnis des beobachteten Molekülions.



**Abb. 7:** Keto-hexansäure-Derivat-Adduktstruktur von PAT mit bis zu drei gebunden Nucleophilen (Nu) an C1, C5 oder C6 von PAT. Das  $m/z$ -Verhältnis von 280 trifft für Adduktstrukturen zu, welche Adenin an einer der möglichen Positionen für Nucleophile tragen und an den verbleibenden Positionen jeweils eine Hydroxylgruppe gebunden ist.

Um weitere, weniger intensive Peaks dieser potentiellen PAT-Adenin-Addukte in dem Reaktionsgemisch auffindig zu machen, wurden die Vollscan-Daten auf das  $m/z$ -Verhältnis der Addukte extrahiert. Das resultierende extrahierte Ionenchromatogramm (*extracted ion chromatogram*, EIC) zeigte drei zusätzliche Peaks (Peak 1.3, 1.4 und 1.5; **Abb. 8**).

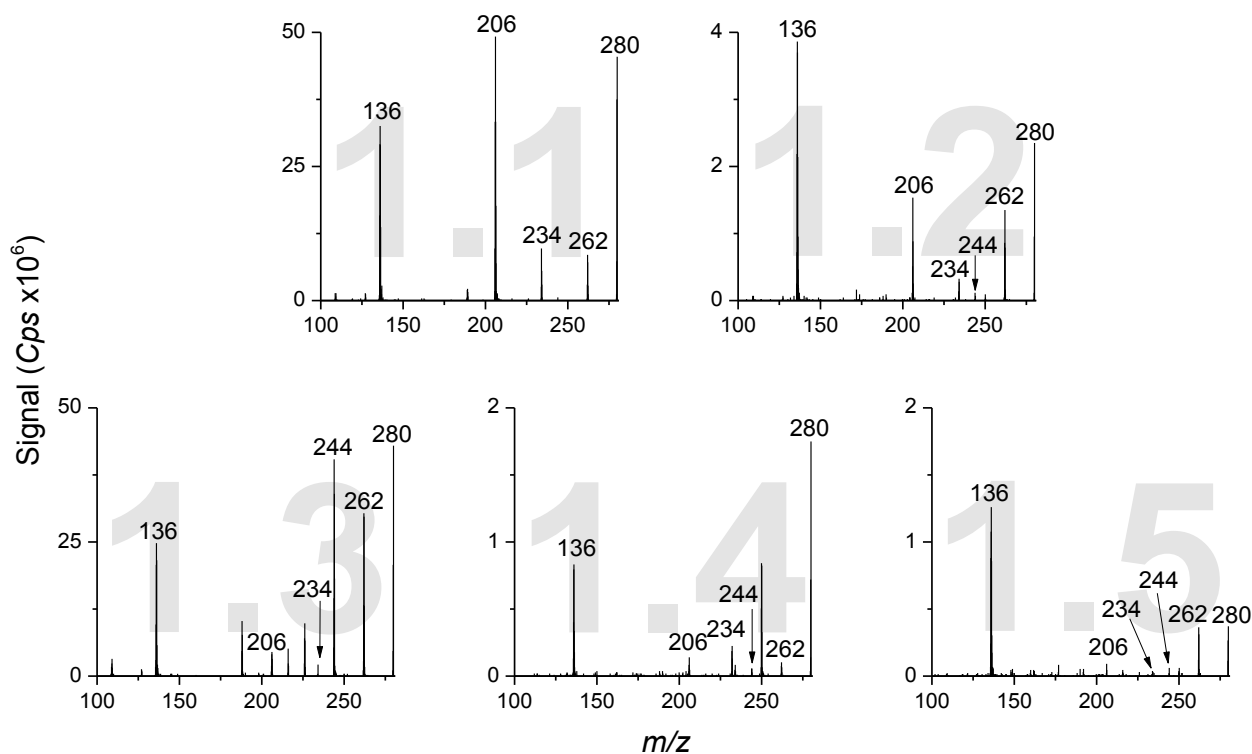


**Abb. 8:** EIC mit  $m/z$  280 der PAT-Adenin-Reaktionsprodukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit Adenin (0,8 mM) gebildet wurden (Kapitel 6.2.3.1). Extraktion aus den Vollscan-Daten (**Abb. 6**). Die Peaknummern 1.1 und 1.2 entsprechen denen von **Abb. 6**. Die weiteren Peaks wurden mit den Nummern 1.3, 1.4 und 1.5 gekennzeichnet um die Nummerierung von **Abb. 6** beizubehalten.

Der intensive Peak 1.3 war im TIC des Vollscans (**Abb. 6**) nicht sichtbar, da er mit Adenin co-eluierte. Peak 1.2 erschien im EIC mit  $m/z$  280 des Vollscans (**Abb. 8**) deutlich kleiner als im TIC des Vollscans, was darauf zurückzuführen ist, dass im TIC des Vollscans zur gleichen Zeit noch weitere Substanzen mit anderen  $m/z$ -Verhältnissen eluieren und somit der Peak aus der Summe dieser Ionenströme intensiver ist.

Die Charakterisierung der potentiellen PAT-Adenin-Addukte durch kollisionsinduzierte Fragmentierung im *enhanced* Produktionscan-Modus bei einer Kollisionsenergie (CE) von 20 V lieferte weitere Strukturinformationen:

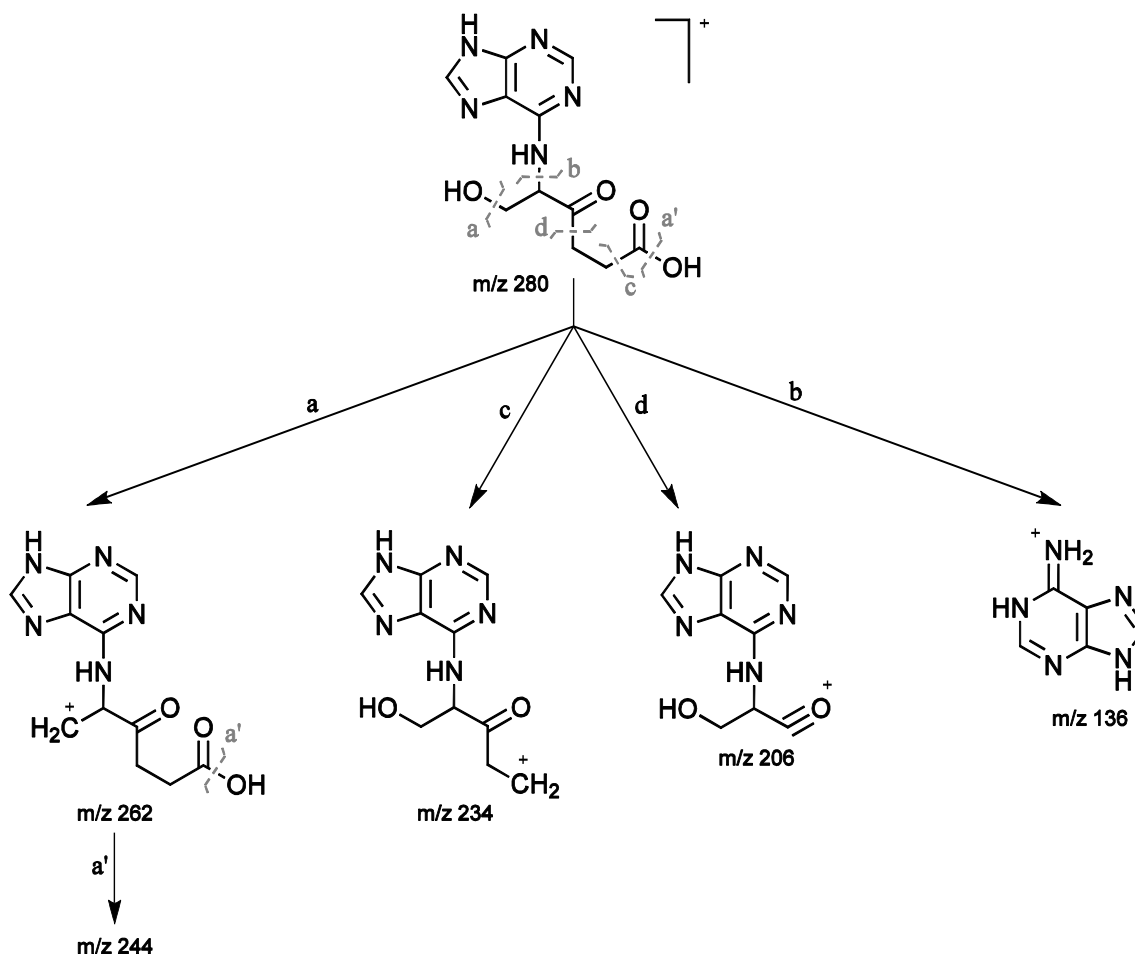
Zum einen zeigten die Massenspektren alle ein Fragmention mit dem  $m/z$ -Verhältnis des abgespaltenen, protonierten Adenin-Moleküls ( $m/z$  136; **Abb. 9**), welches ein charakteristisches Fragmentierungsprodukt von Addukten mit Adenin darstellt (zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013). Weiterhin wiesen die Massenspektren aller Reaktionsprodukte Fragmentionen auf, die auf den Verlust einer Carboxylgruppe ( $m/z$  234) und die Abspaltung von bis zu zwei Wassermolekülen ( $m/z$  262,  $m/z$  244) zurückzuführen waren. Ein weiteres Fragmention ( $m/z$  206), welches insbesondere bei den Reaktionsprodukten 1.1 und 1.2 sehr intensiv war, war durch die Abspaltung eines Propansäure-Restes vom Molekülion zu erklären (**Abb. 9**).



**Abb. 9:** Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions der PAT-Adenin Reaktionsprodukte 1.1 - 1.5 (grau) mit  $m/z$  280 (*enhanced* Produktionscan, CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Die Peaknummern entsprechen denen von **Abb. 6** bzw. **Abb. 8**. Fragmentationen:  $m/z$  262  $[M + H - H_2O]^+$ ,  $m/z$  244  $[M + H - 2H_2O]^+$ ,  $m/z$  234  $[M + H - COOH]^+$ ,  $m/z$  206  $[M + H - CH_2CH_2COOH]^+$ ,  $m/z$  136  $[Adenin + H]^+$ . Cps, Counts per second.

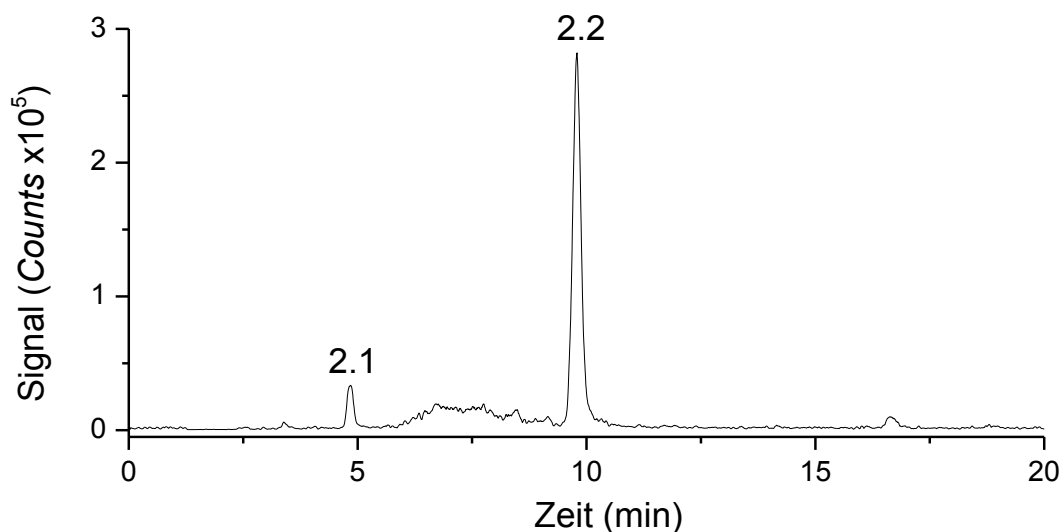
Die Reaktionsprodukte zeigten somit qualitativ gleichwertige Fragmentierungsmuster, was auf eine ähnliche Adduktstruktur hindeutete. Alle beobachteten Fragmentierungen waren vereinbar mit der postulierten KHA-Adduktstruktur (**Abb. 10**). Die Fragmentierungen der Addukte unter Abspaltung einer Carboxylgruppe ( $m/z$  234, Spaltposition c in **Abb. 10**) oder eines Propansäure-Restes ( $m/z$  206, Spaltposition d in **Abb. 10**) deuteten darauf hin, dass an C1 von PAT eine freie Carboxylgruppe vorliegt und folglich die Base Adenin an C5 oder C6 von PAT gebunden ist.

Anhand der massenspektrometrischen Daten konnte nicht aufgeklärt werden, welche nukleophile Aminogruppe in Adenin an der Bindung zu PAT an C5 oder C6 beteiligt ist. Die fünf PAT-Adenin Reaktionsprodukte unterscheiden sich folglich in der Bindung zu Adenin und stellen somit Regioisomere dar.



**Abb. 10:** Fragmentierungsmuster der PAT-Adenin-Addukte ( $m/z$  280) nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (**Abb. 9**). In der dargestellten PAT-Adenin-Adduktstruktur ist Adenin an C6 von PAT über die exocyclische Aminogruppe ( $N^6$ -Adenin) gebunden. Jedoch ist sowohl eine Bindung von Adenin an C5 von PAT als auch die Beteiligung einer endozyklischen Aminogruppe an der Bindung von Adenin mechanistisch möglich und war durch die vorhanden massenspektrometrischen Daten nicht auszuschließen.

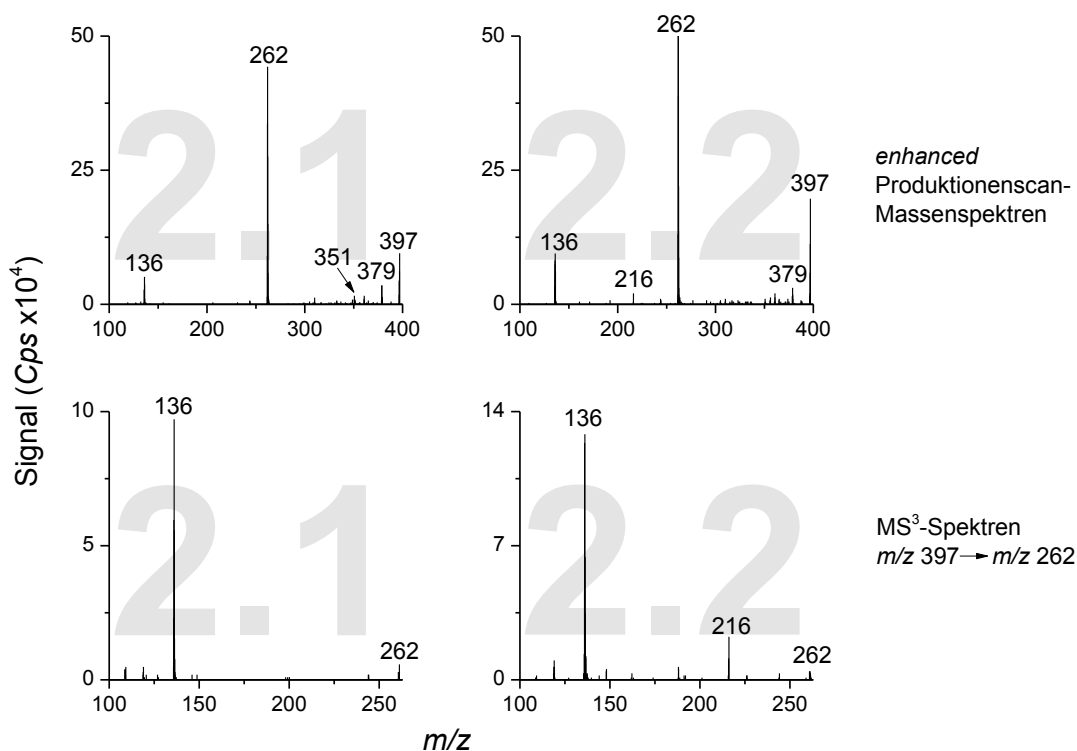
Basierend auf der Reaktivität von PAT gegenüber Modell-Aminen (Fliege und Metzler, 2000a) und der Reaktivität der  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Aldehyden gegenüber Nucleophilen (zusammengefasst in Witz, 1986), war eine Reaktion von PAT mit einem weiteren Nucleophil unter Bildung von disubstituierten Addukten möglich. Folglich waren auch disubstituierte Addukte von PAT mit zwei Adenin-Molekülen zu erwarten. Durch Extraktion der Vollscandaten auf das entsprechende  $m/z$ -Verhältnis (397) wurden zwei Peaks (Peak 2.1 und 2.2) ausfindig gemacht (**Abb. 11**), wobei der intensiver der beiden bereits im TIC des Vollscans sichtbar war (**Abb. 6**, markiert als Peak 2).



**Abb. 11:** EIC mit  $m/z$  397 der potentiellen Reaktionsprodukte von PAT mit zwei Molekülen Adenin, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit Adenin (0,8 mM) gebildet wurden (Kapitel 6.2.3.1). Extraktion aus den Vollscan-Daten (**Abb. 6**).

Die Produktionen-Massenspektren dieser PAT-Adenin-Reaktionsprodukte enthielten wiederum das charakteristische Fragmentation des abgespaltenen, protonierten Adenin-Moleküls ( $m/z$  136; **Abb. 12**). Ein weiteres intensives Fragmentation ließ sich auf die Abspaltung eines Adenin-Moleküls zurückführen ( $m/z$  262  $[M+H-Adenin]^+$ ).

Um zu untersuchen, ob sich aus dem Fragmentation, welches durch die Abspaltung von Adenin entstanden war, noch ein weiteres Adenin-Molekül abspalten lässt, wurde ein MS<sup>3</sup>-Experiment durchgeführt, bei dem das Molekülion des potentiellen PAT-Adenin-Diaddukts in Q2 fragmentiert wurde und das erhaltene Fragmentation mit  $m/z$  262 anschließend in der Ionenfalle (Q3) isoliert und weiter fragmentiert wurde. Die resultierenden MS<sup>3</sup>-Spektren der Reaktionsprodukte 2.1 und 2.2 wiesen ein intensives sekundäres Fragmentation bei  $m/z$  136 auf (**Abb. 12**), bei dem es sich um ein abgespaltenes, protoniertes Adenin-Molekül handelte. Die Abspaltung eines weiteren Adenin-Moleküls aus dem Fragmentation, welches selbst durch eine Adenin-Abspaltung entstanden ist ( $m/z$  262), bestätigte die Anwesenheit von zwei Molekülen Adenin innerhalb der Reaktionsprodukte 2.1 und 2.2. Folglich handelt es sich bei diesen Produkten um disubstituierte PAT-Adenin-Addukte.

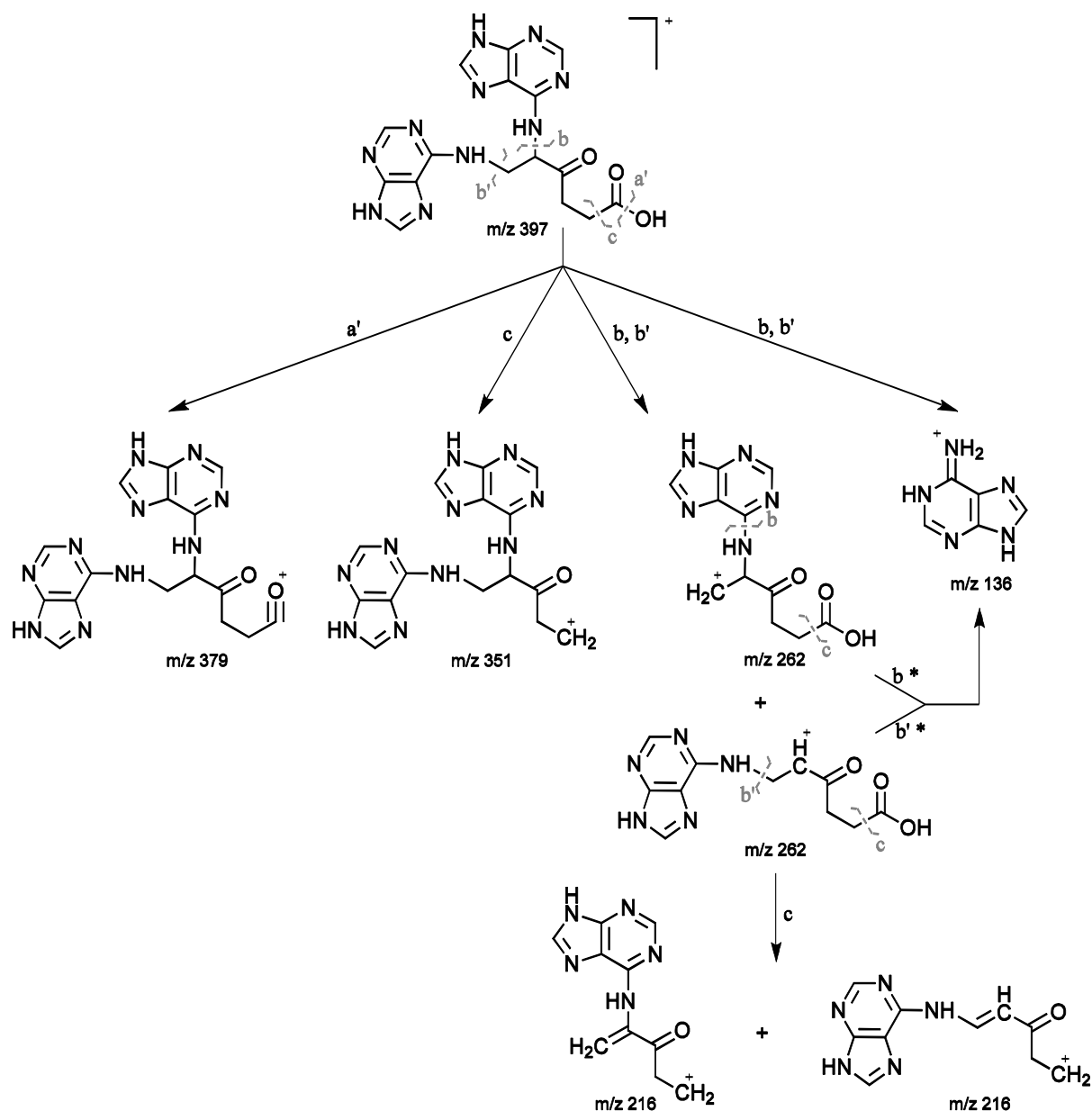


**Abb. 12:** Oben: Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions der PAT-Adenin-Reaktionsprodukte 2.1 und 2.2 (grau, **Abb. 11**) mit  $m/z$  397 (*enhanced* Produktionscan, CE 10 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Fragmentationen:  $m/z$  379 [ $M + H - H_2O$ ]<sup>+</sup>,  $m/z$  251 [ $M + H - COOH$ ]<sup>+</sup>,  $m/z$  262 [ $M + H - Adenin$ ]<sup>+</sup>,  $m/z$  216 [ $M + H - Adenin - COOH$ ]<sup>+</sup>,  $m/z$  136 [Adenin + H]<sup>+</sup>.

Unten: MS<sup>3</sup>-Spektren der PAT-Adenin Reaktionsprodukte 2.1 und 2.2 (grau, **Abb. 11**) mit  $m/z$  397 →  $m/z$  262 (MS<sup>3</sup>-Experiment, CE 15 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Aus dem primären Fragmentation  $m/z$  262 [ $M + H - Adenin$ ]<sup>+</sup> sind die sekundären Fragmentationen  $m/z$  216 [ $M + H - Adenin - COOH$ ]<sup>+</sup> und/oder  $m/z$  136 [Adenin + H]<sup>+</sup> entstanden.

Das Fragmentation mit  $m/z$  351 im Fragmentierungsmuster des PAT-Adenin-Addukts 2.1 geht aus der Abspaltung einer Carboxylgruppe hervor, was ein Indiz für eine frei vorliegende Carboxylgruppe an C1 von PAT darstellt (**Abb. 12**). Auch das PAT-Adenin-Addukt 2.2 wies in den Massenspektren des Produktionscans und des MS<sup>3</sup>-Experiments ein Fragmentation auf, welches auf den Verlust von einem Molekül Adenin und einer Carboxylgruppe ( $m/z$  216) zurückzuführen war. Die Abspaltung eines Moleküls Wasser aus dem Molekülion führt zu den Fragmentationen mit  $m/z$  379. Beide Reaktionsprodukte zeigten somit ein qualitativ gleichwertiges Fragmentierungsschema, welches zu einer KHA-Adduktstruktur mit zwei substituierten Adenin-Molekülen passte (**Abb. 13**). Die Fragmentierung der Addukte unter Abspaltung einer Carboxylgruppe ( $m/z$  351 bzw.  $m/z$  216, Spaltposition c in **Abb. 13**) deutete auch bei den Diaddukten darauf hin, dass an C1 von PAT eine freie Carboxylgruppe vorliegt und folglich je ein Adenin-Molekül an C6 und an C5 gebunden ist.





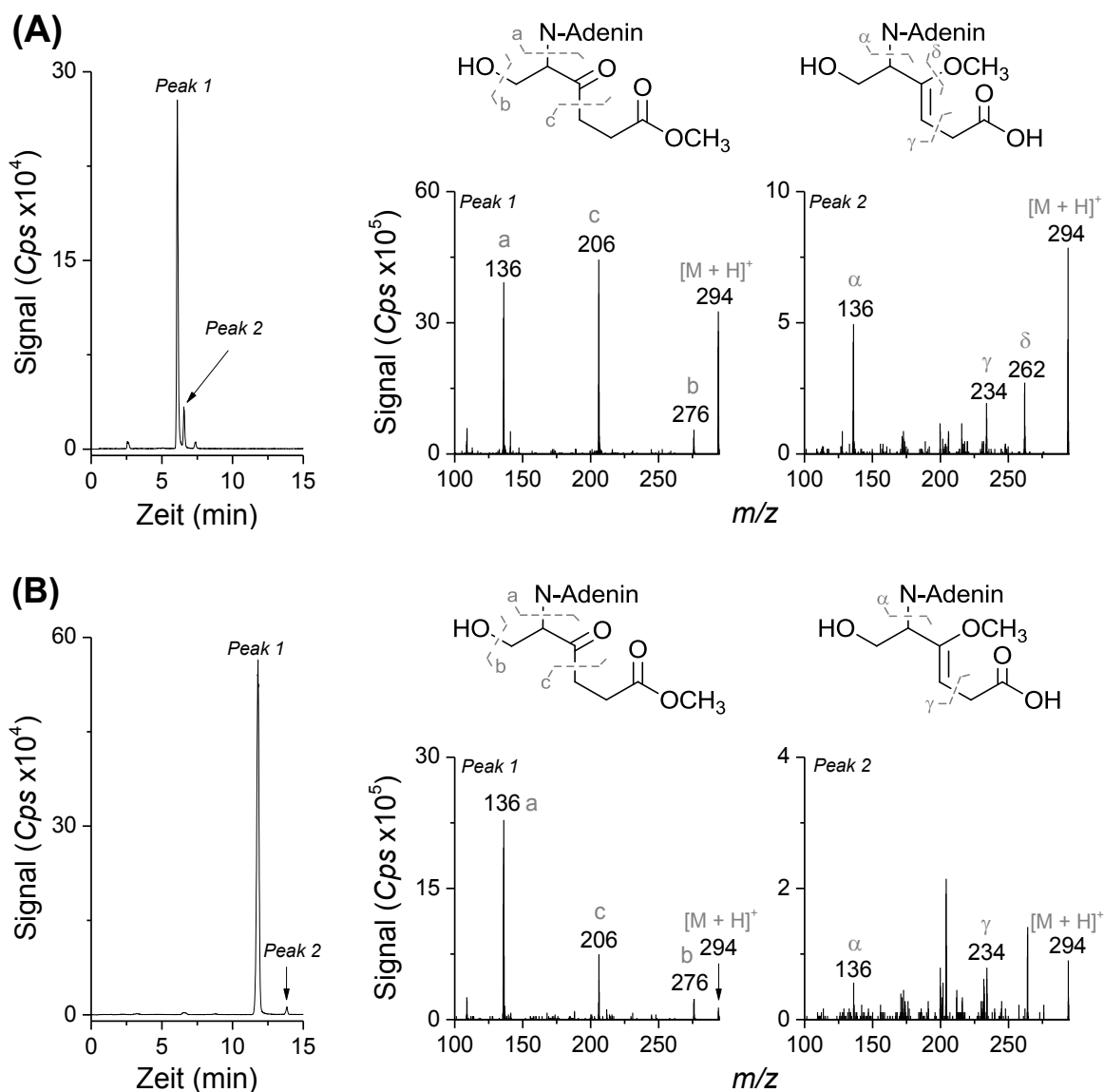
**Abb. 13:** Fragmentierungsmuster der PAT-Adenin-Diaddukte ( $m/z$  397) nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (**Abb. 12**). In der dargestellten PAT-Adenin-Adduktstruktur ist Adenin jeweils über die exocyclische Aminogruppe ( $N^6$ -Adenin) gebunden. Jedoch ist auch die Beteiligung einer endozyklischen Aminogruppe an der Bindung von Adenin mechanistisch möglich und durch die vorhandenen massenspektrometrischen Daten nicht auszuschließen. \*, Abspaltung eines weiteren Adenin-Moleküls aus dem Primärfragmention, welches selbst durch Abspaltung eines Adenin-Moleküls entstanden ist, wurde durch ein  $MS^3$ -Experiment bestätigt.

Die Bestimmung der exakten Massen der mono- und disubstituierten PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2, 1.3 und 2.1 ( $C_{11}H_{14}N_5O_4$  bzw.  $C_{16}H_{17}N_{10}O_3$ ; Anhang A1.1) mittels hochauflösender *Quadrupole Time-of-Flight* (qTOF)-MS bestätigten die Summenformeln der postulierten Strukturen der PAT-Addukte, substituiert mit einem oder zwei Adenin-Molekülen. Die genauen Bindungsstellen von Adenin an PAT waren dadurch jedoch nicht verifizierbar. Bei

Addukten von PAT mit dem Modell-Amin Bromanilin war die Amino-Komponente an C6 und/oder C5 von PAT gebunden und C1 nach Öffnung des Lactonring solvolysiert (Fliege und Metzler, 2000a). Im Gegensatz dazu entstehen (cyclische) DNA-Addukte von  $\alpha$ ,  $\beta$  ( $\gamma$ ,  $\delta$ )-ungesättigten Aldehyden und Ketonen zunächst durch Addition des Nukleophils am Michael-reaktiven Kohlenstoffatom am Ende des konjugierten Systems und anschließend durch Reaktion am elektrophilen Carbonyl-Kohlenstoffatom (zusammengefasst in Witz, 1986; Eder und Hoffman, 1993), was C6 und C1 von PAT entspräche. Die Anwesenheit einer Carboxylgruppe an C1 war durch deren Methylierung und anschließender MS(/MS)-Analyse zur Bestimmung der  $m/z$ -Verhältnisse von Molekül- und Fragmentationen zugänglich. Da auch Ketone mit  $\alpha$ -Protonen, die leicht enolisieren, durch Diazomethan methyliert werden können (Gutsche, 1954), war auch die Keto-Gruppe an C7 der PAT-Adenin-Addukte durch Methylierung modifizierbar. Folglich würde eine zweifache Methylierung der Addukte und somit ein Erhöhung des  $m/z$ -Verhältnis der Molekülonen um 28 Da die Anwesenheit einer freien Carboxyl-Gruppe an C1 bestätigen.

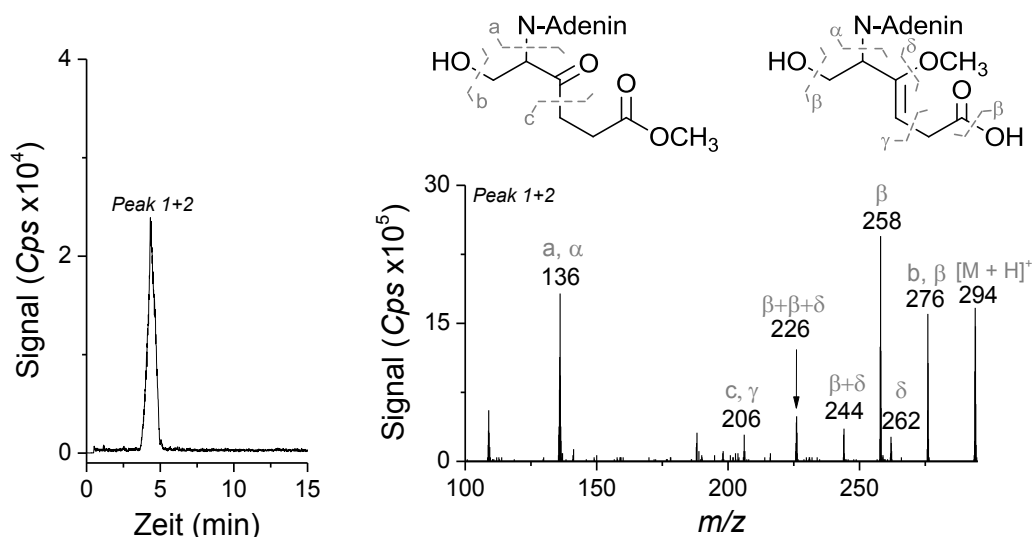
Die mittels semi-präparativer HPLC isolierbaren PAT-Adenin-Monoaddukte 1.1, 1.2 und 1.3 (Kapitel 6.2.4) sowie ein Inkubationsansatz von PAT mit Adenin (Kapitel 6.2.3.1) mit den PAT-Adenin Diaddukten 2.1 und 2.2 wurden mit Diazomethan methyliert (Kapitel 6.2.5) und anschließend mittels MS(/MS) im MRM- oder *enhanced* Produktionenscan-Modus analysiert.

Die MRM-Chromatogramme der methylierten Monoaddukte 1.1 (**Abb. 14 A**) und 1.2 (**Abb. 14 B**) wiesen, neben Resten an nicht-methylierten Addukten, jeweils zwei, unterschiedlich intensive, Peaks für einfach-methylierte Addukte mit einem um 14 Da erhöhten Molekülion ( $m/z$  294) auf. Folglich weisen diese Addukte zwei methylierbare Gruppen auf, deren Methylierung zu je einem Peak führte. Der intensivere der beiden Peaks der methylierten Monoaddukte 1.1 und 1.2 wies nach Fragmentierung ein intensives Fragmentation auf ( $m/z$  206, **Abb. 14**), welches auf die Abspaltung eines methylierten Propansäure-Restes zurückzuführen war. Da diese Fragmentierung nur auftreten kann wenn die C1-Carboxylgruppe methyliert ist, wurde der intensivere Peak dem Monoaddukt mit methylierter Carboxylgruppe zugeordnet. Die Produktionenscan-Massenspektren der weniger intensiven Peaks der methylierten Addukte 1.1 und 1.2 enthielt hingegen ein Fragmentation nach Abspaltung eines Ethansäure-Restes (**Abb. 14**). Dieser Verlust ist nur durch die Methylierung der C7-Ketogruppe erklärbar.



**Abb. 14:** MRM-Chromatogramme (links,  $m/z$  294  $[M + H]^+ > 136$   $[Adenin + H]^+$ , CE 35 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1) und die Fragmentierungsmuster (Mitte und rechts, *enhanced* Produktionsenscan, CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1) der einfach-methylierten PAT-Adenin-Addukte 1.1 (A) und 1.2 (B). Die lateinischen (a-c) und griechischen ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) Buchstaben kennzeichnen die Spaltstellen der methylierten PAT-Adenin-Adduktstruktur und die daraus resultierenden Fragmentationen. Die Struktur enthält aus Gründen der besseren Darstellung das Adeninmolekül an C6 gebunden. Die Bindung von Adenin an C5 ergibt jedoch das gleiche Fragmentierungsmuster.

Das MRM-Chromatogramm des einfach-methylierten Monoaddukt 1.3 enthielt nur einen breiten Peak, der nach Fragmentierung sowohl spezifische Fragmentationen des Monoadduktes mit methylierter Carboxylgruppe ( $m/z$  206), als auch mit methylierter Ketogruppe aufwies ( $m/z$  276 und  $m/z$  258: Abspaltung von bis zu zwei Molekülen Wasser, **Abb. 15**). Folglich war von einer Co-Elution der beiden einfach-methylierten Addukte auszugehen.



**Abb. 15:** MRM-Chromatogramm (links,  $m/z$  294  $[M + H]^+$  > 136  $[\text{Adenin} + H]^+$ , CE 35 V) und die Fragmentierungsmuster (Mitte und rechts, *enhanced* Produktionscan, CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1) des einfach-methylierten PAT-Adenin Addukts 1.3. Die lateinischen (a-c) und griechischen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) Buchstaben kennzeichnen die Spaltstellen der methylierten PAT-Adenin Adduktstruktur und die daraus resultierenden Fragmentationen. Die Struktur enthält aus Gründen der besseren Darstellung das Adeninmolekül an C6 gebunden. Die Bindung von Adenin an C5 ergibt jedoch das gleiche Fragmentierungsmuster.

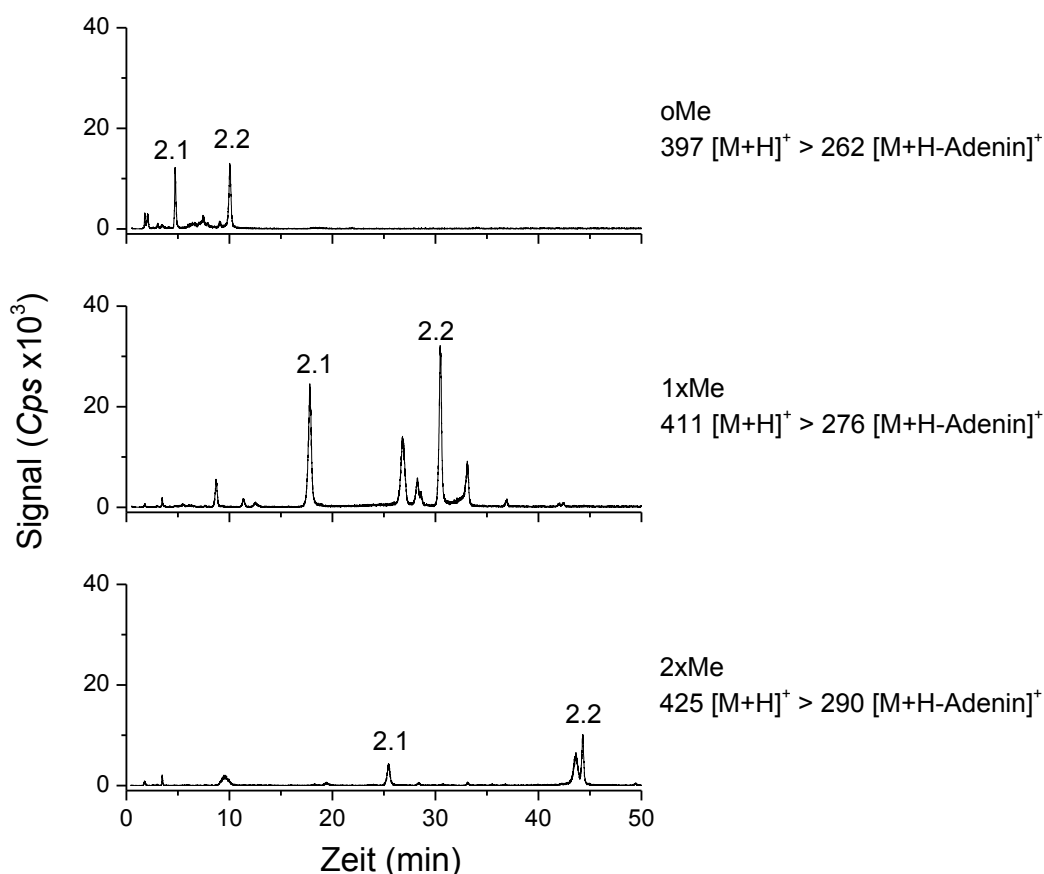
Daneben wiesen alle Monoaddukte nach Methylierung einen Peak mit einem um 28 Da erhöhten Molekülion auf (Tab. 1, MRM-Chromatogramme in Anhang A1.2). Die Erhöhung des Molekülions der Addukte ( $m/z$  308) und die Fragmentationen ließen auf eine zweifache Methylierung der Addukte schließen (Tab. 1, Anhang A1.3).

**Tab. 1:** Molekülionen ( $[M + H]^+$ ) und Fragmentationen der methylierten PAT-Adenin-Monoaddukte (PA) 1.1, 1.2 und 1.3 nach Methylierung mit Diazomethan und HPLC-MS/MS Analyse im *enhanced* Produktionscan-Modus (CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Produktions-Massenspektren in Anhang A1.3.

| Molekül-/Fragmentationen | $m/z$  |        |        |
|--------------------------|--------|--------|--------|
|                          | PA 1.1 | PA 1.2 | PA 1.3 |
| $[M + H]^+$              | 308    | 308    | 308    |
| $[- H_2O]^+$             | 290    | 290    | 290    |
| $[- OCH_3]^+$            | 276    | 276    | 276    |
| $[- H_2O - OCH_3]^+$     | -      | -      | 258    |
| $[- OCH_3 - CO]^+$       | -      | 248    | -      |
| $[- 2OCH_3]^+$           | 244    | 244    | 244    |
| $[- H_2O - 2OCH_3]^+$    | -      | -      | 226    |
| $[- 2OCH_3 - CO]^+$      | 216    | 216    | 216    |
| $[\text{Adenin} + H]^+$  | 136    | 136    | 136    |

Die Methylierung der C7-Ketogruppe und der C1-Carboxylgruppe zeigte, dass die C1-Carboxylgruppe in den PAT-Adenin-Monoaddukten 1.1, 1.2 und 1.3 frei vorliegt und bestätigte somit den Strukturvorschlag der anhand der Fragmentierungsmuster aufgestellt wurde (**Abb. 10**). Da auch die Minor-Addukte 1.4 und 1.5 in den Fragmentierungsmustern die Abspaltung einer freien Carboxylgruppe zeigten (**Abb. 9**), wurde vermutet, dass auch diese Addukte Adenin an C5 oder C6 gebunden haben. Jedoch ließ sich durch die Methylierung nicht aufklären, ob die Monoaddukte Adenin an C5 oder C6 tragen. Die Tatsache, dass die C6-Position von PAT die initiale Position für einen nukleophilen Angriff darstellt, spricht für die Bindung von Adenin an C6 von PAT.

Nach Methylierung der PAT-Adenin-Diaddukte 2.1 und 2.2 waren in den MRM-Chromatogrammen Peaks bei den Masseübergängen des nicht-methylierten und des einfach-methylierten Moleküliions ( $m/z$  397 bzw. 411) auf die Fragmentationen nach Abspaltung von Adenin ( $m/z$  262 bzw. 276) enthalten (**Abb. 16**).



**Abb. 16:** MRM-Chromatogramme der nicht-methylierten (oMe,  $m/z$  397>262 CE 17 V), einfach-methylierten (1xMe,  $m/z$  411>276 CE 15 V) und zweifach-methylierten (2xMe,  $m/z$  425>290 CE 15 V) disubstituierten PAT-Adenin-Addukte 2.1 und 2.2 nach Methylierung eines Inkubationsansatzes von PAT (1,6 mM) mit Adenin (0,8 mM). HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1. Die nicht-zugeordneten Peaks stellen weitere Minor-PAT-Adenin-Diaddukte dar.

Die Fragmentierungsmuster der einfach-methylierten Addukte enthielten neben dem Fragmentation nach Abspaltung von Adenin, noch das Fragmentation des protonierten Adenin-Moleküls ( $m/z$  136; Anhang A1.4). Weiterhin zeigte die Anwesenheit von zwei intensiven Peaks in der MRM-Spur des um 28 Da erhöhten Molekülions ( $m/z$  425) auf das Fragmentation nach Abspaltung von Adenin ( $m/z$  290, **Abb. 16**), dass auch bei den Diaddukten eine zweifache Methylierung möglich war. Aufgrund der geringen Intensität der Peaks der zweifach-methylierten Addukte, ließen sich jedoch keine Produktions-Massenspektren generieren.

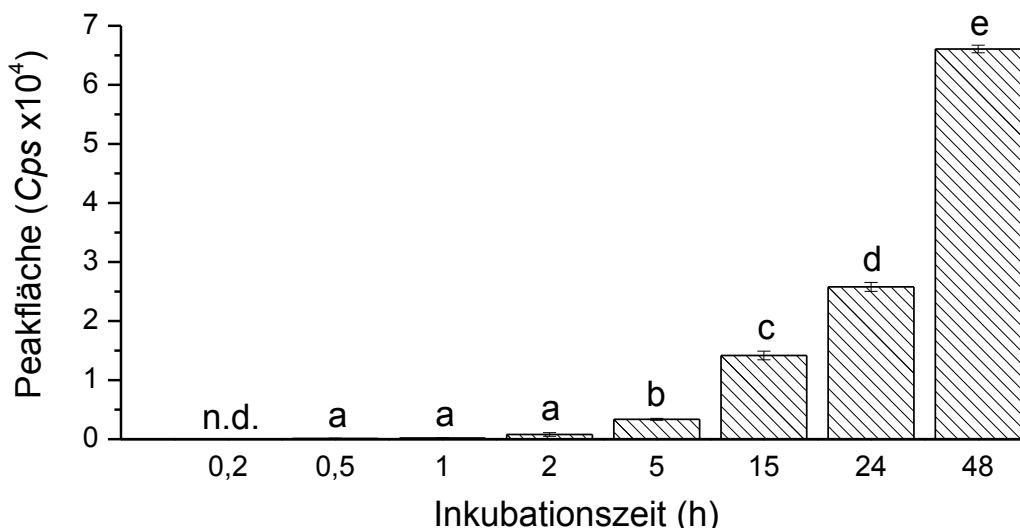
Aufgrund der Verfügbarkeit der C1-Carboxylgruppe für die Methylierung mit Diazomethan liegt diese auch in den PAT-Adenin Diaddukten frei vor und ist nicht an der Bindung zum Adenin beteiligt. Der anhand der Fragmentierungsmuster (**Abb. 13**) aufgestellte Strukturvorschlag mit Bindung von je einem Molekül Adenin an C6 und C5 von PAT wurde somit bestätigt.

### **3.1.1.2 Reaktionsprodukte von Patulin mit Adenin in Anwesenheit von Glutathion**

Nach der Identifizierung und Charakterisierung der PAT-Adenin-Monoaddukte und -Diaddukte wurde nun durch die Zugabe von GSH in einer zu Adenin äquimolaren Konzentration der Einfluss von GSH auf die Reaktivität von PAT gegenüber Adenin untersucht (**Abb. 6**).

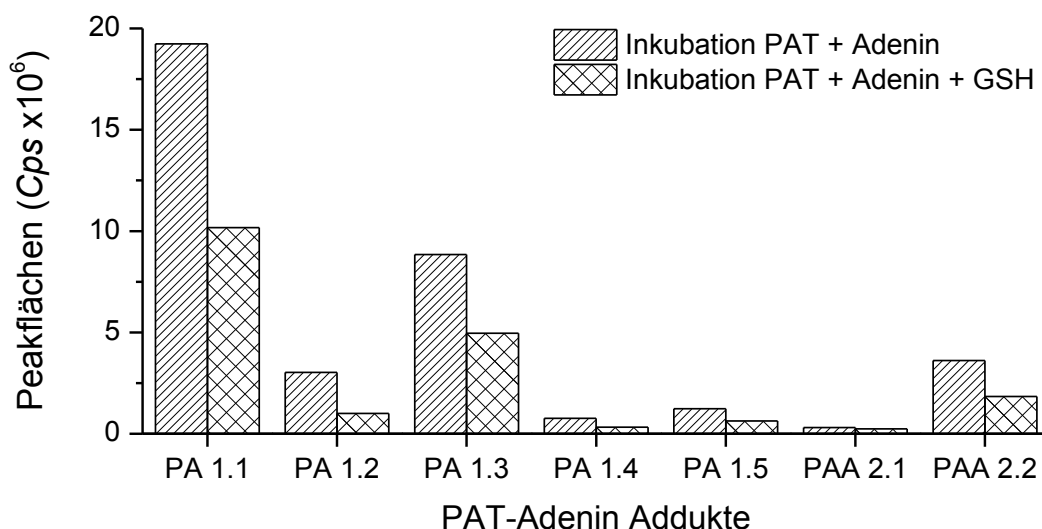
#### **3.1.1.2.1 Addukte von Patulin mit Adenin**

Obwohl bei der Inkubation von PAT mit Modell-Aminen (4-Bromanilin, Ethanolamin) in Gegenwart von Mercaptoethanol oder Bromthiophenol keine PAT-Amin Addukte beobachtet wurden (Fliege und Metzler, 2000a), waren in der Reaktionsmischung von PAT mit Adenin und GSH nach drei Tagen die gleichen PAT-Adenin-Monoaddukte und -Diaddukte wie in Abwesenheit von GSH identifizierbar (**Abb. 6**, Peak 1.1 und 1.2 im zweiten Chromatogramm von oben; EIC im Anhang A1.5 A/B). Die Peaks der Monoaddukte waren in dem Ansatz PAT+Adenin+GSH (Kapitel 6.2.3.1) bereits nach 30 min detektierbar und deren Peakflächen erhöhten sich kontinuierlich über die Zeit (**Abb. 17**). PAT war auch nach 48-stündiger Inkubation noch im Inkubationsansatz nachweisbar.



**Abb. 17:** Zeitabhängige Bildung der PAT-Adenin-Monoaddukte in einem Reaktionsansatz von PAT (1,6 mM) mit Adenin und GSH (je 0,8 mM), welcher über 48 h inkubiert wurde (RT, pH 7,4; Kapitel 6.2.3.1). Die Addukte wurden mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus ( $m/z$  280>136, CE 15 V, HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.3) erfasst und die Peakflächen aller Monoaddukte aufsummiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Tukey Test). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben (a-e) unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant bei  $p < 0,05$ . n.d., kein Adduktpeak detektierbar. Rohdaten: Anhang A1.6.

Die dreitägige Inkubation von PAT mit Adenin in Anwesenheit von GSH lieferte jedoch PAT-Adenin-Addukte deren Peakflächen um ca. die Hälfte bis ein Drittel kleiner waren als die Peakflächen der PAT-Adenin-Addukte die in Abwesenheit von GSH gebildet wurden (**Abb. 18**). Bei Anwesenheit einer zu Adenin äquimolaren Konzentration von GSH im Reaktionsansatz und der doppelten PAT-Konzentration konkurrieren somit die beiden Nukleophile GSH und Adenin um die Reaktion mit PAT, jedoch wurde in Anwesenheit der Thiolkomponente die Reaktivität von PAT gegenüber Adenin nicht verhindert. Die Reaktivität von PAT gegenüber den nukleophilen Stickstoffatomen von Adenin scheint somit ausgeprägter zu sein, als gegenüber den Modell-Aminen 4-Bromanilin und Ethanolamin, bei denen die Anwesenheit einer Thiolkomponente die Bildung von reinen PAT-Amin Addukten verhinderte (Fliege und Metzler, 2000a).



**Abb. 18:** Vergleich der Peakflächen der PAT-Adenin-Monoaddukte (PA) und PAT-Adenin-Diaddukte (PAA), welche nach dreitägiger Inkubation (RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit Adenin (0,8 mM) in Abwesenheit oder Anwesenheit von GSH (0,8 mM) gebildet wurden (Kapitel 6.2.3.1). Die Addukte wurden mittels HPLC-MS im Vollscan (HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.3) erfasst und die Peakflächen der Addukte aus den extrahierten Ionenspuren (PA  $m/z$  280, PAA  $m/z$  397) entnommen. Rohdaten: Anhang A1.7.

### 3.1.1.2.2 Addukte von Patulin mit Glutathion

Mithilfe von Referenzsubstanzen der in der Studie von Fliege und Metzler (2000b) identifizierten GSH-PAT-Addukte (Kapitel 6.1.3), wurden deren Retentionszeiten und  $m/z$ -Verhältnisse der Molekülonen (Anhang A1.8) bestimmt und diese Addukte im Reaktionsgemisch durch die Extraktion von Ionenchromatogrammen identifiziert (Anhang A1.9). Auf diese Weise wurden elf Peaks als GSH-PAT-Addukte zugeordnet, darunter vier Peaks die bereits im TIC des Vollscans sichtbar waren. Der Vergleich der verbleibenden unbekannt Peaks 3-8 (**Abb. 6**) mit dem Peak-Muster nach Inkubation von PAT mit GSH, zeigte, dass auch die Peaks 3, 4, 6 und 8 Addukte von PAT mit GSH sein könnten.

#### Glutathion-Patulin-Reaktionsprodukt 6

Die Peaks 6.1 und 6.2 wiesen beide ein Molekülion mit einem  $m/z$ -Verhältnis (723) auf, welches um 18 Da kleiner war als das  $m/z$ -Verhältnis des Molekülions des KHA-Addukts von PAT mit zwei Molekülen GSH ( $m/z$  741, KHA-Struktur in **Abb. 3**), was auf einen intramolekularen Verlust von einem Molekül Wasser hindeutet.

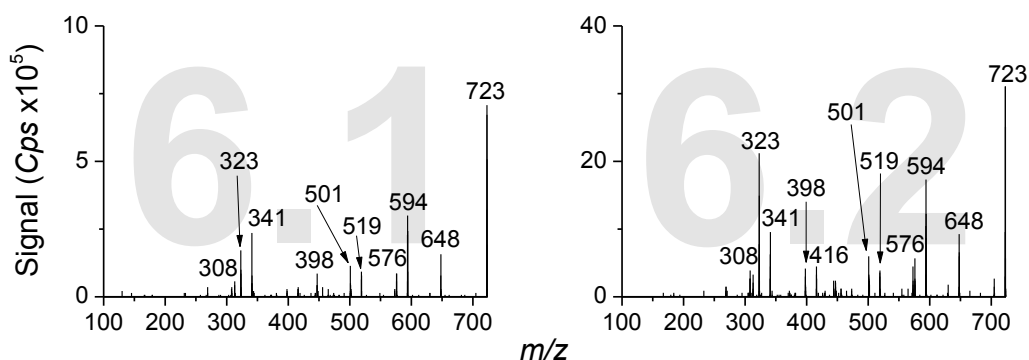
Der Verlust von Wasser wurde auch bei disubstituierten GSH-PAT-Addukten mit C6-TEEK-Struktur (Fliege und Metzler, 2000b) aufgrund intramolekularer Cyclisierung zu einer Thioetherimin-Struktur (TEEI, **Abb. 3**) beobachtet. Hierbei reagierte die  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutaminsäurerestes eines bereits an PAT (C6 oder C4) gebundenen GSH-Moleküls, mit der C7-Carbonylgruppe von PAT unter Bildung eines Imins (6,7- bzw. 4,7-Cyclisierung eines



GSH-Moleküls). Das zweite gebunden GSH-Molekül (an C6 oder C4) lag hingegen linear vor (**Abb. 3**).

Zudem wäre es vorstellbar, dass während der Genese der KHA-Struktur, die  $\alpha$ -Aminogruppe des GSH-Moleküls, welches initial über die Thiolgruppe an C6 addiert wurde, mit dem Carbonyl-C des Lactonrings (C1 von PAT) reagiert und es nach Ringöffnung zu einer intramolekularen Amidbindung kommt (6,1-Cyclisierung eines GSH-Moleküls). Das zweite GSH-Molekül des disubstituierten KHA-Addukt (**Abb. 3**), welches als letztes Nucleophil an PAT addiert wird, liegt in offener Form an C5 von PAT gebunden vor. Die Öffnung des Lactonrings durch Reaktion mit der Aminogruppe eines Moleküls, welches bereits über eine Thioetherbindung an C6 von PAT gebunden ist, wurde auch schon für die Reaktion der Aminosäure Cystein mit PAT postuliert (Fliege und Metzler, 2000b). Zudem wurde diese Art der Cyclisierung für die Reaktion von  $\beta,\gamma$ -Angelicalacton mit Cystein beschrieben (Cavallito und Haskell, 1945).

Für weitere Informationen zur cyclischen Struktur des Addukts 6, wurde ein *enhanced* Produktionscan durchgeführt. Die Fragmentierungsmuster der Adduktpeaks 6.1 und 6.2 weisen Ähnlichkeiten auf zu einem GSH-PAT-Addukt, welches von Schebb et al. (2009) beschrieben wurde (**Abb. 19**). Da die Massenspektren der beiden Reaktionsprodukte qualitativ die gleichen Fragmentationen enthalten, handelte es sich bei 6.1 und 6.2 vermutlich um Diastereomere.

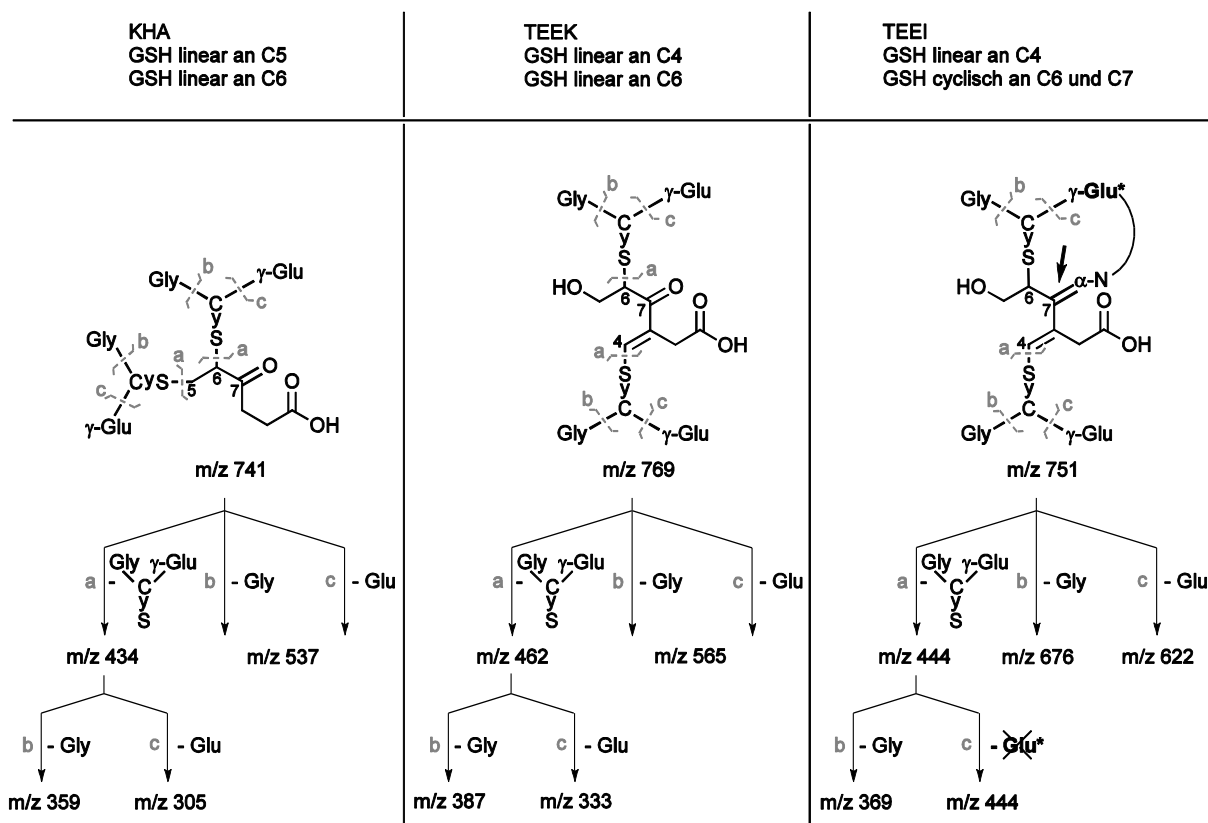


**Abb. 19:** Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions der disubstituierten GSH-PAT-Reaktionsprodukte 6.1 und 6.2 mit  $m/z$  723 (*enhanced* Produktionscan, CE 25 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Nachfolgende fett markierte  $m/z$ -Verhältnisse der Produktionen stimmen mit den Fragmentationen des bisher uncharakterisierten GSH-PAT-Addukts überein, welches von Schebb et al. (2009) beschrieben wurde. Fragmentationen:  $m/z$  **648**  $[M + H - Gly]^+$ ;  $m/z$  **594**  $[M + H - Glu]^+$ ;  $m/z$  **576**  $[M + H - Glu - H_2O]^+$ ;  $m/z$  **519**  $[M + H - Glu - Gly]^+$ ;  $m/z$  **501**  $[M + H - Glu - Gly - H_2O]^+$ ;  $m/z$  **416**  $[M + H - GSH]^+$ ;  $m/z$  **398**  $[M + H - GSH - H_2O]^+$ ;  $m/z$  **341**  $[M + H - GSH - Gly]^+$ ;  $m/z$  **323**  $[M + H - GSH - Gly - H_2O]^+$ ;  $m/z$  308  $[GSH + H]^+$ .

Die Massenspektren der GSH-PAT-Addukte 6.1 und 6.2 enthielten Fragmentationen nach Abspaltung von Glycin ( $m/z$  648), des Neutralverlusts von Glutaminsäure als Pyroglutamat ( $m/z$  594) und der Abspaltung des gesamten GSH-Moleküls ( $m/z$  416 bzw. 308) sowie einige Kombinationen dieser Abspaltungen und zusätzliche Neutralverluste an Wassermolekülen (**Abb. 19**). Während in den Massenspektren Fragmentationen nach Abspaltung von je einem Molekül GSH und Glycin ( $m/z$  341,  $[M + H - GSH - Gly]^+$ ) auftraten, waren jedoch keine Fragmentationen nach Abspaltung von je einem Molekül GSH und Glutaminsäure ( $m/z$  287,  $[M + H - GSH - Glu]^+$ ) vorhanden.

Ein generelles Fragmentierungsschema von GSH-konjugierten Metaboliten ist die Abspaltung von Glycin, der charakteristische Neutralverlust von 129 Da (Pyroglutamat) infolge der Spaltung der  $\gamma$ -Glu-Cys-Bindung und der für aliphatische Thioether-typischen Abspaltung des gesamten GSH-Moleküls (zusammengefasst in Baillie und Davis, 1993). Sowohl die bereits bekannten monosubstituierten GSH-PAT-Addukte mit DHP-Struktur, als auch die disubstituierten GSH-PAT-Addukte mit KHA- und TEEK bzw. TEEI-Struktur zeigten nach kollisionsinduzierter Fragmentierung diese charakteristischen Fragmentationen (Anhang A1.8). Die Produktions-Massenspektren der disubstituierten GSH-PAT-Addukte mit KHA- und TEEK-Struktur enthielten zudem alle auch Kombinationen dieser GSH-charakteristischen Fragmentierungen, wie die Abspaltung von je einem Molekül GSH und Glutaminsäure ( $[M + H - GSH - Glu]^+$ ) bzw. Glycin ( $[M + H - GSH - Gly]^+$ , **Abb. 20**). Im Gegensatz dazu war in den Produktions-Massenspektren der 6,7- bzw. 4,7-cyclischen disubstituierten GSH-PAT-Addukte mit TEEI-Struktur keine Fragmentation nach Abspaltung von je einem Molekül GSH und Glutaminsäure ( $[M + H - GSH - Glu]^+$ ) enthalten (**Abb. 20**, Anhang A1.8). Da die Iminbindung keine Spaltstelle für die kollisionsinduzierte Fragmentierungen darstellt (Pfeil in TEEI-Struktur in **Abb. 20**), kann aus dem cyclisch gebundenen GSH-Molekül (6,7- oder 4,7-cyclisch) kein Glutaminsäure-Rest abgespalten werden. Folglich kann nach vorangegangener Abspaltung des linearen GSH-Moleküls keine weitere Abspaltung des Glutaminsäure-Restes aus einem über eine Imin-Bindung cyclisch gebundenen GSH-Molekül erfolgen.

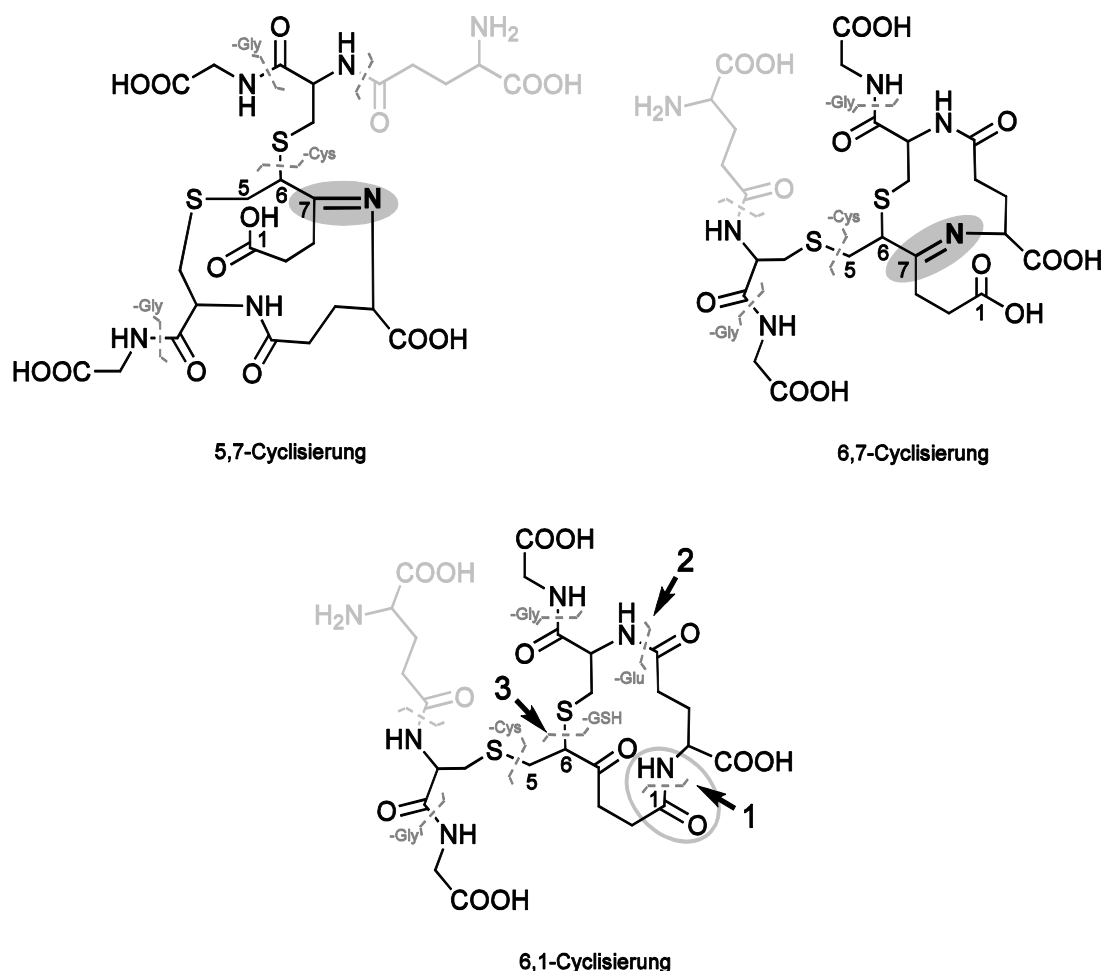
Das Fehlen dieses Fragmentions ( $[M + H - GSH - Glu]^+$ ) im Fragmentierungsmuster der disubstituierten KHA-Addukte 6 deutete somit auf eine intramolekulare Iminbindung hin. Hierbei kann sowohl der Glutaminsäure-Rest des an C6 oder an C5 von PAT gebundenen GSH-Molekül an der Cyclisierungsreaktion beteiligt ist (6,7-cyclisch oder 5,7-cyclisch).



**Abb. 20:** Fragmentierungsschema von GSH-PAT-Addukten mit KHA- und TEEK-Struktur mit je zwei linear gebundenen GSH-Molekülen und des 6,7-cyclischen GSH-PAT-Addukts mit TEEI-Struktur mit einem linear gebundenen und einem cyclisch gebundenen GSH-Molekül. Aufgrund der, neben der Thioetherbindung, zusätzlichen Fixierung des GSH-Moleküls über die Iminbindung der  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutaminsäure-Restes an C7 von PAT (markiert durch den Pfeil), kann der Glutaminsäure-Rest (\*) im cyclisch gebundenen GSH-Molekül nicht abgespalten werden. Dies wäre ebenso für ein 4,7-cyclisches GSH-PAT-Addukt mit TEEI-Struktur zu erwarten.

Um die cyclische Imin-Struktur der GSH-PAT-Addukte 6.1 und 6.2 zu bestätigen und die 6,1-cyclische Amid-Struktur auszuschließen, wurde ein MS<sup>3</sup>-Experiment durchgeführt, wobei das Molekülion im ersten Schritt zunächst zum Fragmention nach Abspaltung des Glutaminsäurerestes ( $m/z$  594) fragmentiert wurde, welches dann in der Ionenfalle zu Sekundärfragmentionen fragmentiert wurde.

Wenn die Addukte 6.1 und 6.2 ein bereits über eine Thioetherbindung gebundenes GSH-Molekül enthält, welches zudem über eine Iminbindung der Glutaminsäure an C7 von PAT fixiert ist, waren als Sekundärfragmente keine Produktionen zu erwarten, die auf die Abspaltung eines weiteren Glutaminsäurerestes oder des ganzen GSH-Moleküls zurückzuführen sind (**Abb. 21**). Bei den 6,1-cyclischen Addukten erfolgt die Bindung der Glutaminsäure über eine Amidbindung, welche leicht durch kollisionsinduzierte Fragmentierungen gespalten werden kann. Deshalb würden Sekundärfragmentionen, die auf die Abspaltung von einem weiteren Glutaminsäurerestes oder des ganzen GSH-Moleküls zurückzuführen sind, für eine 6,1-cyclische Struktur sprechen (**Abb. 21**).



**Abb. 21:** Mögliche Cyclisierungsvarianten der disubstituierten GSH-PAT-Addukte 6.1 und 6.2. PAT liegt als KHA-Struktur vor und hat je ein Molekül GSH an C6 und C5 gebunden. Bei den ersten beiden Varianten (oben) liegt die  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutaminsäurerestes des an C5- oder C6-gebundenen GSH-Moleküls infolge einer intramolekularen Cyclisierung an C7 (Iminbindung, grau hinterlegt) von PAT gebunden vor. Bei der dritten Variante (unten) liegt die  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutaminsäurerestes des C6-gebundenen GSH-Moleküls infolge einer intramolekularen Cyclisierung an C1 (Amidbindung, grau umkreist) von PAT gebunden vor. Dargestellt sind die möglichen Spaltstellen (---) in den GSH-Molekülen, welche, nach Abspaltung eines Glutaminsäurerestes infolge der ersten Fragmentierung (in grau dargestellt), noch für eine zweite Fragmentierung zu erwarten sind. Die im 6,1-cyclischen Addukt mit Pfeilen gekennzeichneten Spaltstellen 1 und 2 führen zu einer weiteren Glutaminsäureabspaltung, die Spaltstellen 1 und 3 zu einer GSH-Abspaltung. Diese beiden Abspaltungen sind im 5,7- und 6,7-cyclischen Addukt aufgrund der Fixierung der Glutaminsäure über eine Iminbindung nicht zu erwarten.

Die Fragmentierungsmuster des MS<sup>3</sup>-Experimentes beider Reaktionsprodukte 6.1 und 6.2 enthielten nur sekundäre Fragmentationen nach Abspaltung von einem oder zwei Molekülen Glycin, sowie einem Cystein-Molekül und zusätzlichen Abspaltungen von Wasser, CO oder einer Säuregruppe (Tab. 2). Aus dem primären Fragmentation ( $F_1$ ;  $m/z$  594  $[M + H - \text{Glu}]^+$ ) entstanden weder Fragmente, die auf eine weitere Pyroglutamatabspaltung (u.a.  $m/z$  465  $[F_1 - \text{Glu}]^+$ ;  $m/z$  130  $[\text{Pyroglutamtat} + \text{H}]^+$ ) noch auf eine Abspaltung eines ganzen GSH-Moleküls (u.a.  $m/z$  287  $[F_1 - \text{GSH}]^+$ ;  $m/z$  308  $[\text{GSH} + \text{H}]^+$ ) zurückzuführen waren. Somit handelte es

sich bei den GSH-PAT-Addukten 6.1 und 6.2 um cyclische KHA-Addukte mit Imin-Struktur (**Abb. 21**, links), wobei eine Cyclisierung des an C5- oder C6-gebundenen GSH-Moleküls erfolgen kann.

**Tab. 2:** Molekülion, primäres Fragmentation ( $F_1$ ) sowie sekundäre Fragmentationen der GSH-PAT-Addukte 6.1 und 6.2, die infolge einer zweiten Fragmentierung gebildet wurden. HPLC-MS/MS-Analyse im  $MS^3$ -Modus (CE 25 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC- Methode 1).

| $m/z$ Molekülion | $m/z$ primäres Fragmentation    | $m/z$ sekundäre Fragmentationen             |
|------------------|---------------------------------|---|
| 723              | 594 $[M + H - Glu]^+$ ( $F_1$ ) | 576 $[F_1 + H - H_2O]^+$                    |
|                  |                                 | 519 $[F_1 + H - Gly]^+$                     |
|                  |                                 | 501 $[F_1 + H - Gly - H_2O]^+$              |
|                  |                                 | 473 $[F_1 + H - Gly - H_2O - CO]^+$         |
|                  |                                 | 416 $[F_1 + H - Gly - Cys]^+$               |
|                  |                                 | 341 $[F_1 + H - 2Gly - Cys]^+$              |
|                  |                                 | 323 $[F_1 + H - 2Gly - Cys - H_2O]^+$       |
|                  |                                 | 313 $[F_1 + H - 2Gly - Cys - CO]^+$         |
|                  |                                 | 295 $[F_1 + H - 2Gly - Cys - CO - H_2O]^+$  |
|                  |                                 | 277 $[F_1 + H - 2Gly - Cys - CO - 2H_2O]^+$ |

Die Peaks 3, 4 und 7 waren weder den bereits publizierten GSH-PAT-Addukten zuzuordnen, noch waren ihre Molekülionen auf einen Wasserverlust zurückzuführen. Folglich könnte es sich hier um neuartige GSH-PAT-Addukte handeln, die weiter charakterisiert werden sollten.

#### Glutathion-Patulin-Reaktionsprodukt 8

Das Reaktionsprodukt 8 (**Abb. 6**) besaß ein Molekülion mit  $m/z$  853, welches auf ein PAT Addukt mit zwei GSH-Molekülen (je 307 g/mol) hinwies.

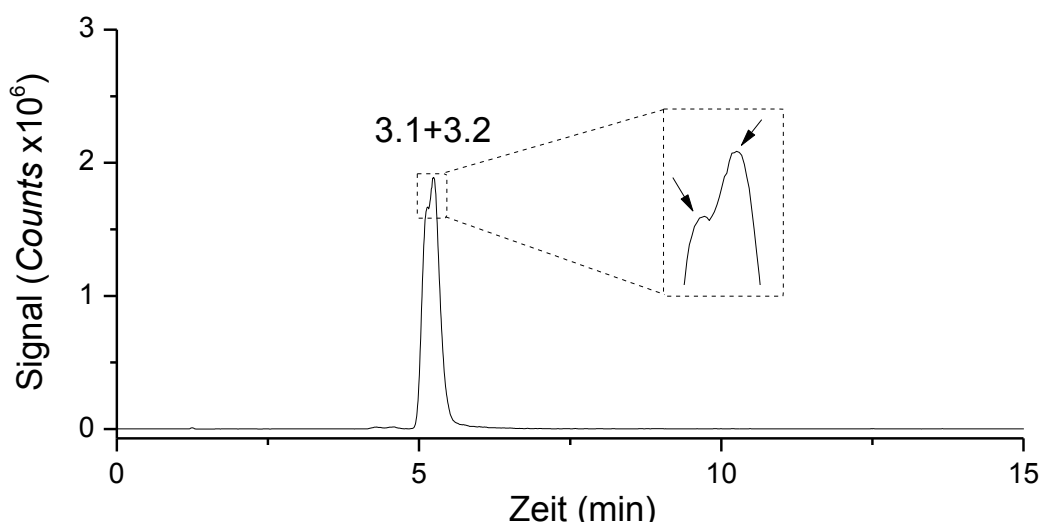
Das Produktionenscan-Massenspektrum enthielt nur ein Fragmentation mit  $m/z$  438, was einer Abspaltung von 415 Da entspräche (Anhang A1.10). Einige der Sekundärfragmentationen, welche mittels  $MS^3$  aus dem Primärfragmentation mit  $m/z$  438 erhaltenen wurden, waren auf die Abspaltung von Glycin zurückzuführen (Anhang A1.10). Weitere Strukturinformationen wurden durch die kollisionsinduzierte Fragmentierung nicht erhalten.

Um die Anwesenheit von zwei Molekülen GSH im Reaktionsprodukt 8 zu bestätigen, wurde PAT mit  $\gamma$ -Glutamyl-L-Cystein ( $\gamma$ -Glu-Cys) anstatt mit GSH inkubiert (Kapitel 6.2.3.1) und das im Vollscan erhaltene Molekülionen mit dem nach Inkubation mit GSH verglichen. Das entsprechende  $\gamma$ -Glu-Cys-PAT-Addukt wies ein um 114 Da erniedrigtes Molekülion ( $m/z$  739) auf (Anhang A1.11). Die entsprechenden  $\gamma$ -Glu-Cys-PAT-Addukte des disubstituierten KHA-Addukts und des 6,7- bzw. 5,7-cyclischen Adduktes 6.1 und 6.2 wiesen die gleiche Differenz der Molekülionen auf. Die Differenz zwischen dem Molekülion des monosubstituierten GSH-PAT-Addukt mit DHP-Struktur zu dem entsprechenden  $\gamma$ -Glu-Cys-PAT-Addukt betrug

hingegen nur 57 Da. Somit wurde die Anwesenheit von zwei Molekülen GSH im Reaktionsprodukt 8 bestätigt. Ein Addukt von PAT mit zwei GSH-Molekülen weist jedoch nur eine Masse von ca. 740 g/mol (KHA-Struktur) oder 768 g/mol (TEEK-Struktur) auf. Es wäre somit möglich, dass zusätzlich zu den zwei GSH-Molekülen entweder Lösungsmittelkomponenten mit PAT reagiert haben oder dass ein monosubstituiertes GSH-PAT-Intermediat mit sich selbst unter Dimerisierung reagiert hat. Jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit die Struktur des potentiellen GSH-PAT-Addukts nicht näher aufgeklärt.

### Glutathion-Patulin-Reaktionsprodukt 3

Das Reaktionsprodukt 3 (**Abb. 6**) besaß ein Molekülion mit  $m/z$  452, was auf ein Addukt von PAT (154 g/mol) mit einem Molekül GSH (307 g/mol) hindeutete. Das UV-Spektrum des isolierten Reaktionsprodukts wies zwei Absorptionsmaxima bei 230 und 290 nm auf (Anhang A1.12). Diese Spektrenform ist charakteristisch für GSH-PAT-Addukte mit einer KHA-Struktur (Fliege und Metzler, 2000b). Weitere infrage kommende Strukturtypen mit nur einem gebundenen GSH-Molekül, wie TEEK bzw. TEEI wurden aufgrund von anderen  $m/z$ -Verhältnissen ausgeschlossen. Obwohl GSH-PAT-Addukte mit KHA-Struktur aufgrund der Addition der Thiolgruppe an C6 von PAT als Diastereomere vorliegen (Fliege und Metzler, 2000b), war sowohl im Vollscan-Chromatogramm (**Abb. 6**) als auch im daraus extrahierten EIC mit  $m/z$  452 nur ein Peak enthalten (**Abb. 22**). Jedoch war der Peak zum einen sehr breit und zum anderen wies er zwei Peakspitzen auf (**Abb. 22**). Somit war von einer Co-Elution des Diastereomerenpaares des GSH-PAT-Addukts 3 auszugehen.

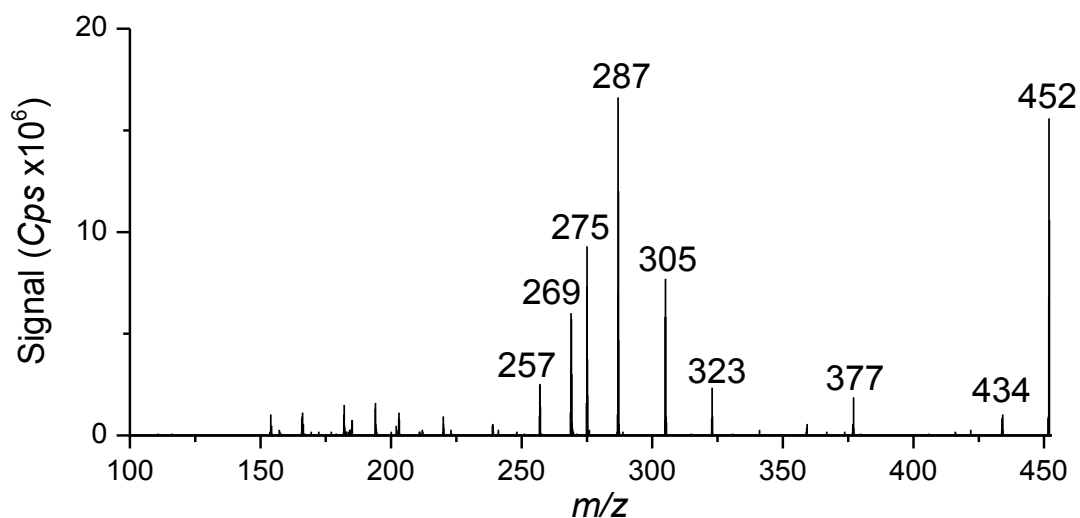


**Abb. 22:** EIC mit  $m/z$  452 des GSH-PAT-Reaktionsprodukts, welches durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit GSH (0,8 mM) gebildet wurde. Extraktion aus den Vollscan-Daten (**Abb. 6**). Die Peaknummer 3 entspricht der von **Abb. 6**. In gestrichelten Linien vergrößert dargestellt ist das Maximum des Peaks mit zwei erkennbaren Peakspitzen (Pfeile). Die Buchstaben 3.1+3.2 kennzeichnen das Diastereomerenpaar, welches co-eluiert.

Das Massenspektrum nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (*enhanced* Produktionenscan) des potentiellen GSH-PAT-Monoaddukts enthielt die charakteristischen Fragmentationen für GSH-Konjugate: ein Fragmentation ( $m/z$  377) nach Abspaltung eines Moleküls Glycin und ein Fragmentation ( $m/z$  323) nach Neutralverlust von Pyroglutamat (**Abb. 23**). Diese Abspaltungen waren auch im Fragmentierungsmuster des GSH-PAT-Monoaddukts mit DHP-Struktur vorhanden (Anhang A1.8).

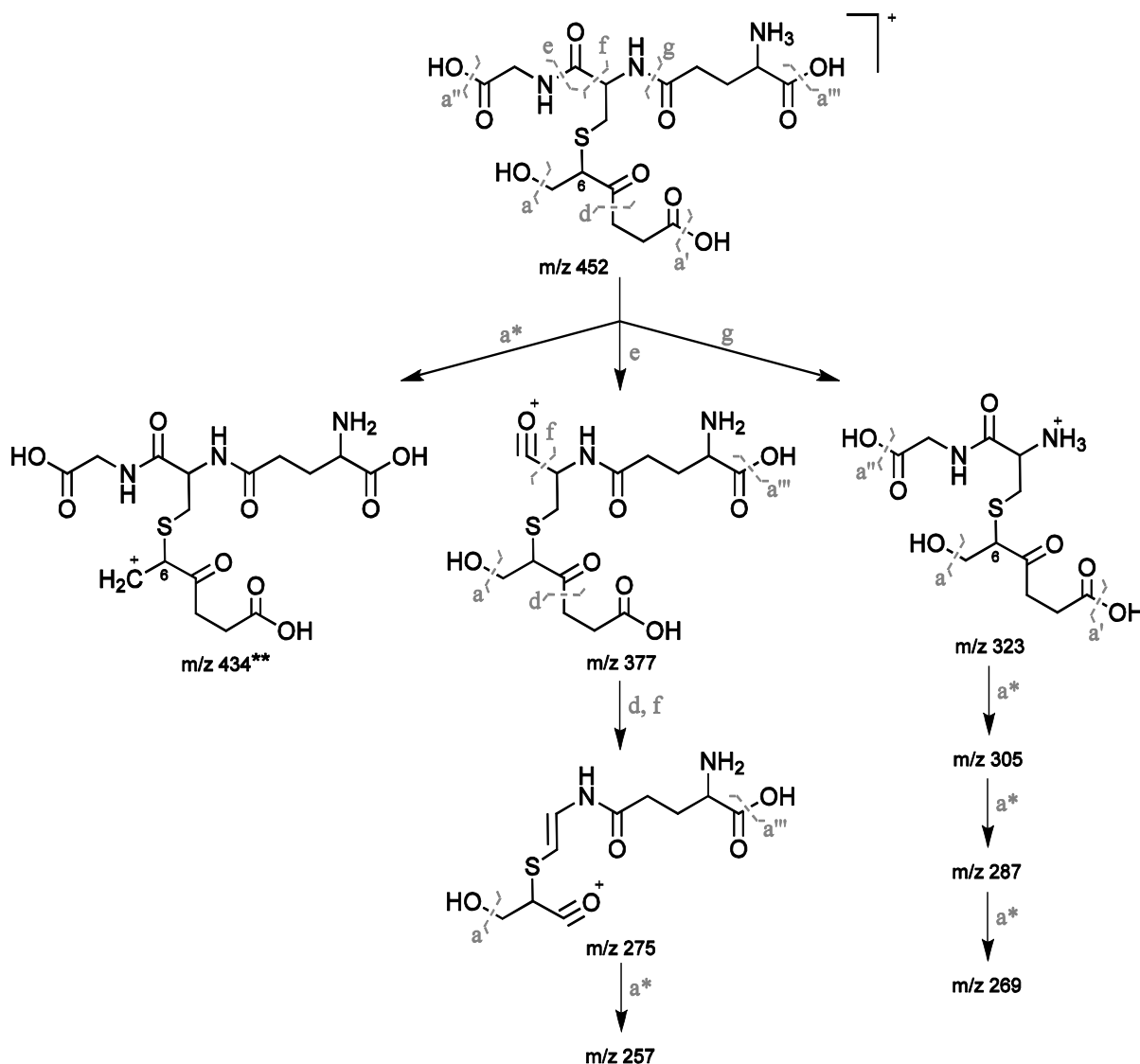
Die Fragmentationen mit  $m/z$  305, 287 und 269 gingen aus dem nach Pyroglutamat-Abspaltung gebildeten Fragmentation ( $m/z$  323) durch den Neutralverlust von einem, zwei bzw. drei Wasser-Molekülen hervor. Die Abspaltung eines Propansäure- und eines CO-Restes nach Glycinabspaltung führte zu dem Fragmentation mit  $m/z$  275 und nach weiterem Verlust von Wasser zu dem Fragmentation mit  $m/z$  257. Weiterhin führte die Abspaltung eines Moleküls Wasser aus dem Molekülion zu dem Fragmentation mit  $m/z$  434 (**Abb. 23**).

All diese Fragmentierungen waren vereinbar mit einem GSH-PAT-Monoaddukt mit KHA-Struktur, wobei das GSH-Molekül nur über die Thiolgruppe mit C6 von PAT verknüpft ist und somit linear vorliegt (**Abb. 24**). Die Abspaltung des Propansäure-Restes (Spaltposition d in **Abb. 24**) bestätigte zudem die KHA-Struktur des Adduktes.



**Abb. 23:** Massenspektrum nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions des GSH-PAT-Reaktionsprodukts 3 mit  $m/z$  452 (*enhanced* Produktionenscan, CE 15 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC- Methode 1). Fragmentationen:  $m/z$  434  $[M + H - H_2O]^+$ ,  $m/z$  377  $[M + H - Glycin]^+$ ,  $m/z$  323  $[M + H - Pyroglutamat]^+$ ,  $m/z$  305  $[M + H - Pyroglutamat - H_2O]^+$ ,  $m/z$  287  $[M + H - Pyroglutamat - 2H_2O]^+$ ,  $m/z$  275  $[M + H - Glycin - CO - C_2H_4COOH]^+$ ,  $m/z$  269  $[M + H - Pyroglutamat - 3H_2O]^+$ ,  $m/z$  257  $[M + H - Glycin - CO - C_2H_4COOH - H_2O]^+$ .

Die mittels hochauflösender qTOF-MS bestimmte exakte Masse des Reaktionsproduktes 3 ( $C_{16}H_{26}N_3O_{10}S$ ; Anhang A1.1) bestätigte die Summenformel des postulierten GSH-PAT-Monoaddukts.



**Abb. 24:** Postulierte Struktur für das lineare GSH-PAT-Monoaddukt 3 und Fragmentierungsmuster nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (**Abb. 23**). Das GSH-Molekül ist an C6 von PAT infolge einer Addition gebunden und liegt linear vor. \*, für die Abspaltung von Wasser kommen die Positionen  $a/a'/a''/a'''$  in Frage. \*\*, die Struktur des Fragmentions mit  $m/z$  434 resultiert nach Wasserabspaltung an Position  $a$ , Wasserabspaltung an den Positionen  $a'$ ,  $a''$  und  $a'''$  führen zum gleichen  $m/z$ -Verhältnis aber zu anderen Fragmention-Strukturen, welche nicht gezeigt sind.

Die Anwesenheit von vier methylierbaren Gruppen (drei Carboxylgruppen und eine Ketogruppe) in der postulierten Struktur des GSH-PAT-Monoaddukts 3 wurde mittels Methylierung mit Diazomethan (Kapitel 6.2.5) und anschließender HPLC-MS/MS-Analyse bestimmt. Durch die Methylierung wurden insgesamt vier Positionen des isolierten Addukts 3 modifiziert (Anhang A1.15), was sich zudem mittels kollisionsinduzierter Fragmentierung bestätigen lässt (Anhang A1.16). Durch die Verwendung von starken Basen (KOH) bei der Methylierung können als Nebenreaktion auch Aminogruppen von Aminosäuren methyliert werden (Liebich und Forst, 1985). In den entsprechenden MRM-Übergängen für die

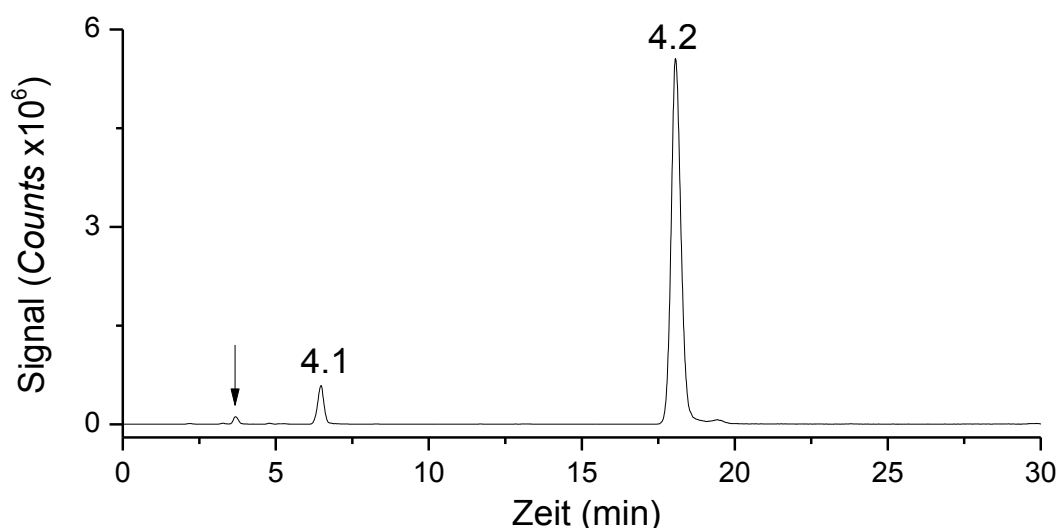


Methylierung von vier funktionellen Gruppen (z.B. einer weiteren im Molekül vorhandenen Carboxyl- oder Ketogruppe bzw. die Modifizierung der Aminogruppen im GSH-Molekül) wurden keine Peaks detektiert.

#### Glutathion-Patulin-Reaktionsprodukte 4.1 und 4.2

Die  $m/z$ -Verhältnisse (434) der Molekülionen der GSH-PAT-Reaktionsprodukte 4.1 und 4.2 waren im Vergleich zum  $m/z$ -Verhältnis des Molekülions des GSH-PAT-Monoaddukts 3 um 18 Da kleiner, was auf den Verlust von einem Molekül Wasser hindeutete. Es könnte sich somit bei diesen Reaktionsprodukten ebenfalls um GSH-PAT-Monoaddukte mit KHA-Struktur handeln, wobei durch eine intramolekulare Cyclisierungsreaktion ein Molekül Wasser abgespalten wurde. Die UV-Spektren der Reaktionsprodukte 4.1 und 4.2 wiesen die typische Spektrenform der GSH-PAT-Addukte mit KHA-Struktur, charakterisiert durch zwei Absorptionsmaxima bei 230 und 290 nm, auf (Anhang A1.12).

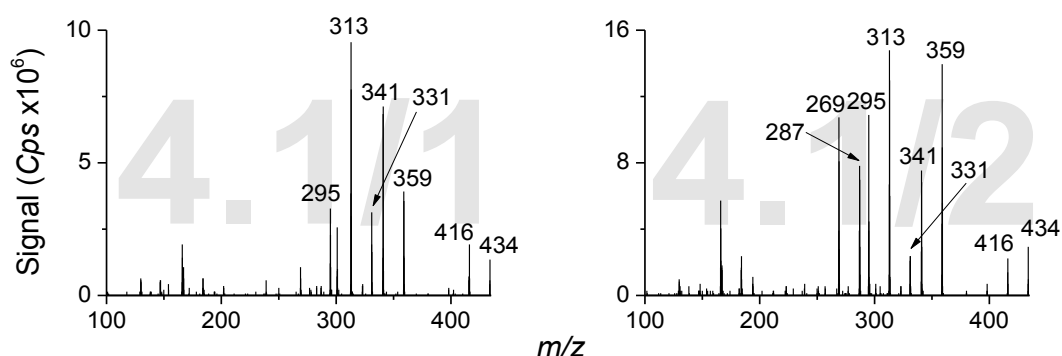
Das aus den Vollscan-Daten extrahierte EIC mit  $m/z$  434 (**Abb. 25**) zeigte die zwei Peaks der Reaktionsprodukte 4.1 und 4.2, wobei der Peak von 4.1 im Vergleich zu 4.2 weniger intensiv war als er im Vollscan-Chromatogramm (**Abb. 6**) erschien. Dies lag daran, dass im Vollscan-Massenspektrum von 4.1 neben dem Molekülion mit  $m/z$  434 noch das Kaliumaddukt des Molekülions ( $[M + K]^+$ ) mit  $m/z$  472 enthalten war, welches in fünffach höherer Intensität vorlag (Anhang A1.13). Im Gegensatz dazu war das  $m/z$  434 im Vollscan-Massenspektrum von 4.2 achtfach intensiver als das entsprechende  $m/z$ -Verhältnis des Kaliumaddukts.



**Abb. 25:** EIC mit  $m/z$  434 der GSH-PAT-Reaktionsprodukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit GSH (0,8 mM) gebildet wurden. Extraktion aus den Vollscan-Daten (**Abb. 6**). Die Peaknummer 4.1 und 4.2 entsprechen denen von **Abb. 6**. Der mit dem Pfeil gekennzeichnete Peak ist ein weiteres Reaktionsprodukt mit  $m/z$  434, welches im Vollscan-Chromatogramm nicht sichtbar war.

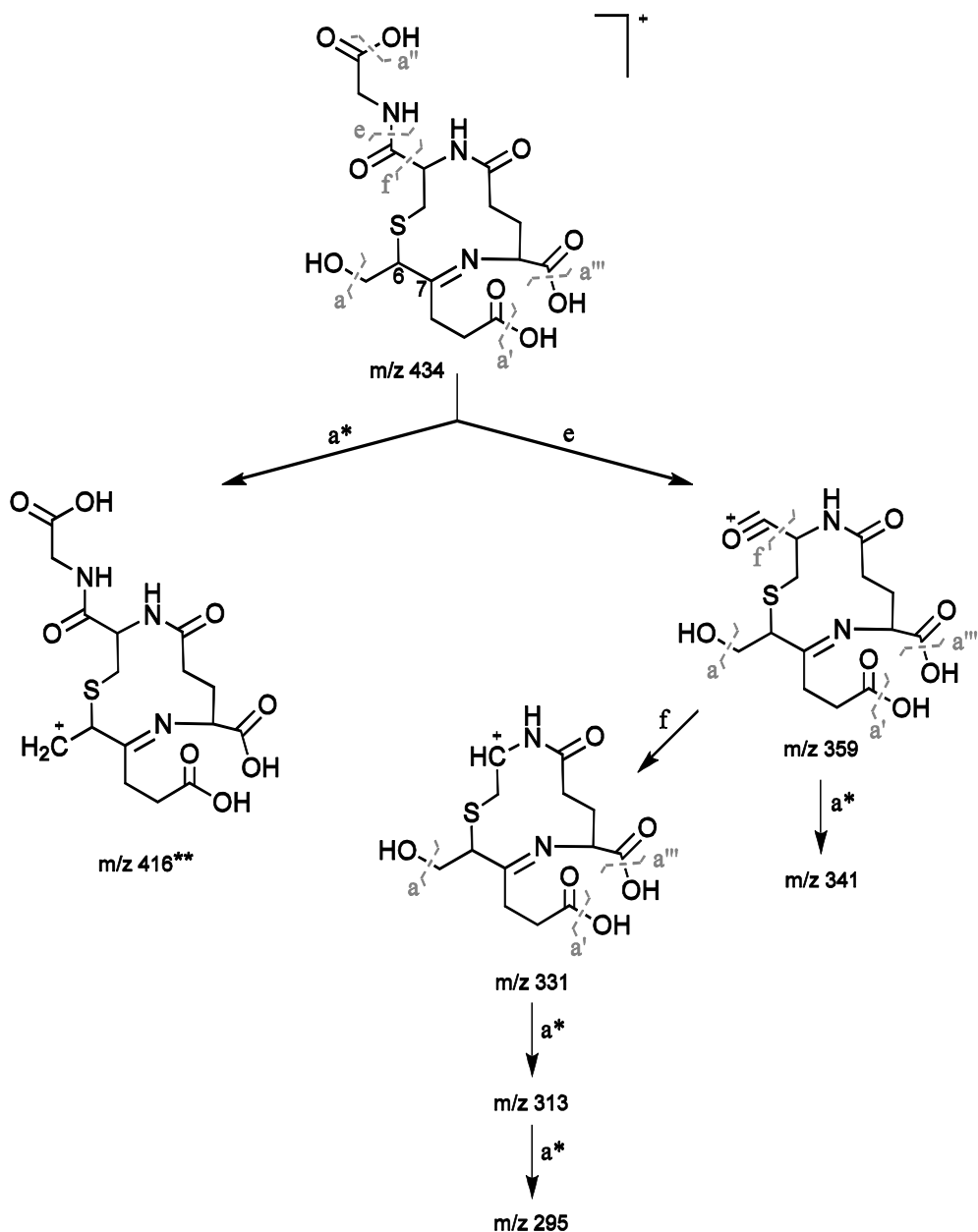
Zudem war im EIC mit  $m/z$  434 noch ein dritter Peak sichtbar (**Abb. 25**), welcher jedoch deutlich kleiner war als 4.1 und 4.2. Das Vollscan-Massenspektrum dieses Reaktionsprodukts wies, wie das Reaktionsprodukt 4.1, das Kaliumaddukt des Moleküls mit  $m/z$  472 in neunfach höherer Intensität auf als das Molekülion mit  $m/z$  434. Im EIC mit  $m/z$  472 waren folglich diese beiden Reaktionsprodukte in höherer Intensität vorhanden (Anhang A1.14). Die mittels Produktionenscan generierten Fragmentierungsmuster dieser beiden Reaktionsprodukte wiesen qualitativ die gleichen Fragmentationen auf (**Abb. 26**), weswegen es sich bei den beiden Reaktionsprodukten um Diastereomere handeln könnte (fortan gekennzeichnet durch 4.1/1 und 4.1/2).

Die Produktionenscan-Massenspektren der Produkte 4.1/1 und 4.1/2 wiesen Fragmentationen auf, die auf die Abspaltung eines Moleküls Glycin ( $m/z$  359) sowie weiteren Abspaltungen aus diesem Fragmentation, wie der Neutralverlust von bis zu zwei Molekülen Wasser und/oder einem CO-Molekül ( $m/z$  341, 331, 313 und 295), zurückzuführen waren (**Abb. 26**). Die Fragmentationen mit  $m/z$  287 und 269, die nur bei Addukt 4.1/2 entstanden sind, konnten keiner Abspaltung zugeordnet werden. Jedoch waren in den Massenspektren der GSH-PAT-Reaktionsprodukte 4.1/1 und 4.1/2 keine Fragmente des charakteristischen Neutralverlusts von 129 Da (Pyroglutamat) infolge der Spaltung der  $\gamma$ -Glu-Cys-Bindung oder nach Abspaltung des gesamten GSH-Moleküls enthalten (**Abb. 26**). Diese Abspaltungen werden verhindert, wenn das GSH-Molekül an C6 zusätzlich noch an C7 von PAT über eine Iminbindung fixiert ist (vgl. GSH-PAT-Addukt 6).



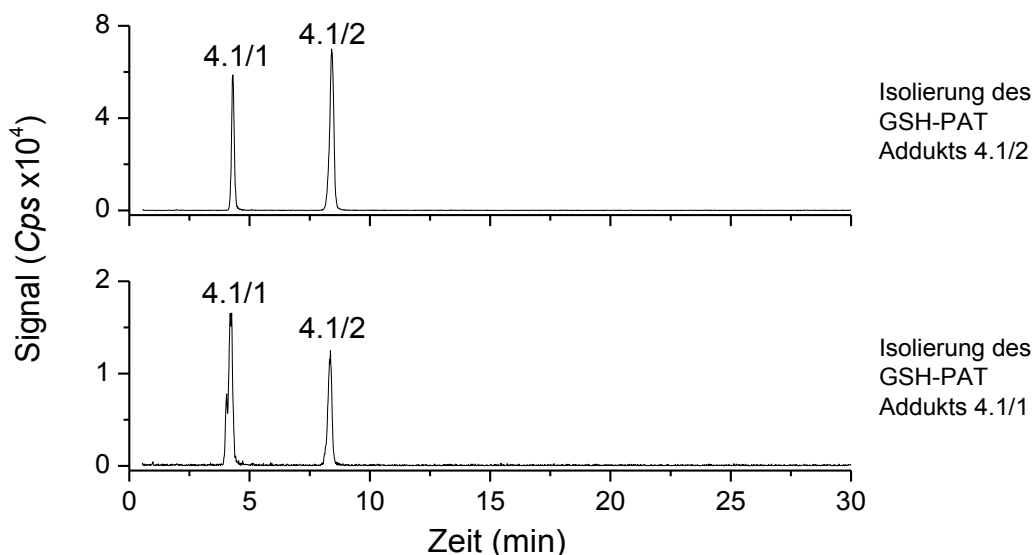
**Abb. 26:** Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Moleküls der GSH-PAT-Reaktionsprodukte 4.1/1 und 4.1/2 mit  $m/z$  434 (*enhanced* Produktionenscan, CE 15 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC- 1). Fragmentationen:  $m/z$  416  $[M + H - H_2O]^+$ ,  $m/z$  359  $[M + H - Glycin]^+$ ,  $m/z$  341  $[M + H - Glycin - H_2O]^+$ ,  $m/z$  331  $[M + H - Glycin - CO]^+$ ,  $m/z$  313  $[M + H - Glycin - CO - H_2O]^+$ ,  $m/z$  295  $[M + H - Glycin - CO - 2H_2O]^+$ ,  $m/z$  287 und  $m/z$  269 kein Fragment zugeordnet.

All diese Fragmentierungen waren vereinbar mit einem GSH-PAT-Monoaddukt mit KHA-Struktur, wobei das GSH-Molekül an 6,7-cyclisch an PAT gebunden ist. (**Abb. 27**).



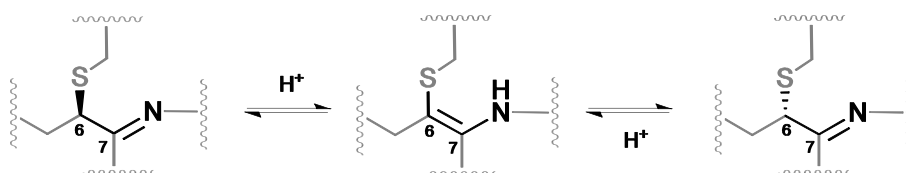
**Abb. 27:** Postulierte Struktur der diastereomeren 6,7-cyclischen GSH-PAT-Monoaddukte 4.1/1 und 4.1/2 und deren Fragmentierungsschema nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (**Abb. 26**). Das GSH-Molekül ist an C6 von PAT infolge einer Addition gebunden. Cyclisierung durch Reaktion der Glutaminsäure- $\alpha$ -Aminogruppe mit der C7-Carbonylfunktion unter Bildung einer Iminbindung an C7. \*, für die Abspaltung von Wasser kommen die Positionen  $a/a'/a''/a'''$  in Frage. \*\*, die Struktur des Fragmentions mit  $m/z$  416 resultiert nach Wasserabspaltung an Position  $a$ , Wasserabspaltung an den Positionen  $a'$ ,  $a''$  und  $a'''$  führen zum gleichen  $m/z$  aber zu anderen Fragmention-Strukturen, welche nicht gezeigt sind.

Bei der Isolierung des Peaks von jeweils einem GSH-PAT-Diastereomer 4.1/1 bzw. 4.1/2 (Kapitel 6.2.4.3) und anschließender HPLC-MS/MS Analyse im MRM-Modus fiel auf, dass die MRM-Chromatogrammen immer beide Peaks der diastereomeren Addukten 4.1/1 und 4.1/2 aufwiesen (**Abb. 28**). Somit kam es nach Isolierung eines Diastereomers zur Umlagerung in das jeweils andere Diastereomer.



**Abb. 28:** MRM-Chromatogramme ( $m/z$  434  $[M + H]^+ > 359 [M + H - \text{Glycin}]^+$ , CE 25 V; Kapitel 6.2.1.5 UHPLC- 1) der GSH-PAT-Addukte 4.1/2 (oben) und 4.1/1 (unten) nach jeweils zweifacher Isolierung mittels semi-präparativer HPLC-UV (Kapitel 6.2.4). Isolierung des GSH-PAT-Addukts 4.1/1 bzw. 4.1/2 nach semi-präparativer Trennung (Retentionszeit 17 min bzw. 30 min), anschließender Gefrierdrying und Resuspension in 1 ml Wasser führte zur Bildung des anderen Diastereomers 4.1/2 bzw. 4.1/1.

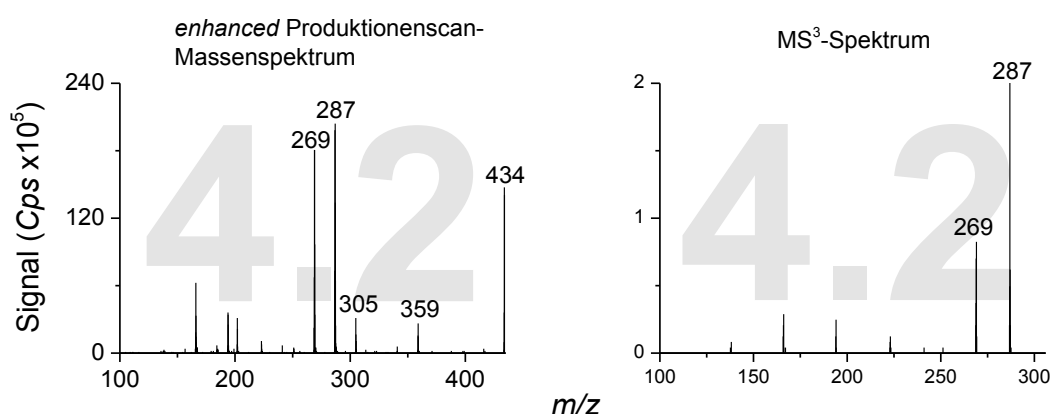
Imine mit einem chiralen tertiären Kohlenstoffatom in  $\alpha$ -Position sind dafür bekannt durch Imin/Enamin-Tautomerisierung eine Racemisierungsreaktion von Diastereomeren (Diastereomerisierung) zu verursachen (Wolf, 2008). In direkter Nähe zu der Iminbindung an C7 von PAT liegt das infolge der Thiol-Addition neu gebildeten Stereozentrum an C6 (**Abb. 27**). Es handelte sich somit bei den GSH-PAT-Addukten 4.1/1 und 4.1/2 tatsächlich um Diastereomere, die durch das neu entstandene Stereozentrum an C6 gebildet wurden und die sich aufgrund der Iminbindung in direkter Nachbarschaft zum chiralen Zentrum durch Tautomerisierungsreaktionen ineinander umlagern können (**Abb. 29**). Die Diastereomerisierung der GSH-PAT-Addukte 4.1/1 und 4.1/2 bestätigt die postulierte Adduktstruktur nach der das GSH-Molekül sowohl über eine Thioetherbindung an C6 von PAT und über eine Iminbindung an C7 von PAT cyclisch gebunden vorliegt.



**Abb. 29:** Verkürzt dargestellte Diastereomerisierung der GSH-PAT-Addukte 4.1/1 und 4.1/2 ineinander. Aufgrund der  $\alpha$ -Position des chiralen tertiären Kohlenstoffatoms an C6 zur Iminbindung an C7 kommt es durch Imin/Enamin-Tautomerisierung zu einer Racemisierungsreaktion der Diastereomere.

Im Gegensatz zu den Produktionenscan-Massenspektren der diastereomeren GSH-PAT-Addukte 4.1/1 und 4.1/2 wies das Reaktionsprodukt 4.2 sowohl Fragmentationen nach Abspaltung eines Moleküls Glycin ( $m/z$  359) als auch nach Neutralverlust von Pyroglutamat ( $m/z$  305) auf (**Abb. 30**). Die beiden Hauptfragmentationen mit  $m/z$  287 und 269 resultierten aus der Abspaltung von Pyroglutamat und einem bzw. zwei Wasser-Molekülen. Um dies zu bestätigen wurde zusätzlich ein  $MS^3$ -Experiment durchgeführt, bei dem das Molekülion mit  $m/z$  434 in Q2 fragmentiert und das erhaltene Fragmentation mit  $m/z$  305 anschließend in der Ionenfalle (Q3) isoliert und weiter fragmentiert wurde. Das resultierende  $MS^3$ -Spektrum wies intensive sekundäre Fragmentationen mit  $m/z$  287 und 269 auf (**Abb. 30**), welche folglich Folgefragmente nach Pyroglutamat-Abspaltung darstellten.

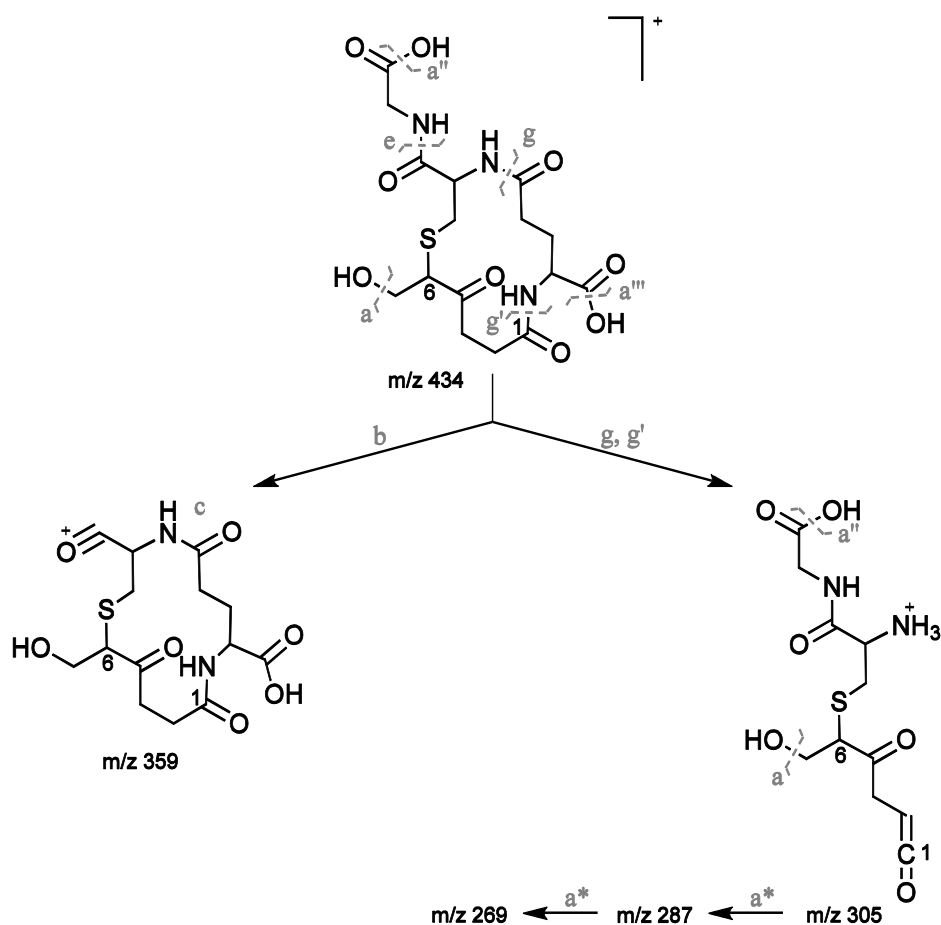
Das Fragmentierungsverhalten des GSH-PAT-Reaktionsproduktes 4.2 zeigte die charakteristischen Abspaltungen für GSH-Konjugate und unterschied sich somit, trotz gleichem  $m/z$ -Verhältnis des Molekülions, von dem limitierten Fragmentierungsmuster des 6,7-cyclischen GSH-PAT Monoaddukten 4.1/1 und 4.1/2. Aufgrund des um 18 Da niedrigeren  $m/z$ -Verhältnis des Molekülions im Vergleich zum GSH-PAT-Monoaddukt 3 mit linearem GSH-Molekül, musste es aber dennoch zu einer intramolekularen Cyclisierung unter Wasserverlust gekommen sein. Deswegen kam nur eine 6,1-Cyclisierung durch Reaktion der  $\alpha$ -Aminogruppe des an C6 gebundenen GSH-Moleküls mit C1 von PAT unter Ausbildung einer Amidbindung, in Frage. Die Amidbindung lässt sich durch kollisionsinduzierte Fragmentierung leicht spalten, wodurch Abspaltungen des Glutaminsäure-Restes möglich sind.



**Abb. 30:** Links: Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions des GSH-PAT-Reaktionsproduktes 4.2 mit  $m/z$  434 (*enhanced* Produktionenscan, CE 15 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC- Methode 1). Fragmentationen:  $m/z$  359 [M + H - Glycin]<sup>+</sup>,  $m/z$  305 [M + H - Pyroglutamat]<sup>+</sup>,  $m/z$  287 [M + H - Pyroglutamat - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>,  $m/z$  269 [M + H - Pyroglutamat - 2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

Rechts:  $MS^3$ -Spektren des GSH-PAT-Reaktionsproduktes 4.2 mit  $m/z$  434 →  $m/z$  305 ( $MS^3$ -Experiment, CE 15 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC- 1). Aus dem primären Fragmentation  $m/z$  305 [M + H - Pyroglutamat]<sup>+</sup> sind die sekundären Fragmentationen  $m/z$  287 [M + H - Pyroglutamat - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> und  $m/z$  269 [M + H - Pyroglutamat - 2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> entstanden.

Die Fragmentierungen stimmen somit mit der postulierten 6,1-cyclische GSH-PAT-Adduktstruktur überein (**Abb. 31**).



**Abb. 31:** Postulierte Struktur des 6,1-cyclischen GSH-PAT-Monoaddukt 4.2 und Fragmentierungsschema nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (**Abb. 30**). Das GSH-Molekül ist an C6 von PAT infolge einer Addition gebunden. Cyclisierung infolge einer Aminolyse des Lactonrings durch die Glutaminsäure- $\alpha$ -Aminogruppe unter Bildung einer Amidbindung an C1. \*, für die Abspaltung von Wasser kommen die Positionen a/a''/a''' in Frage.

Die mittels hochauflösender qTOF-MS bestimmten exakten Massen der GSH-PAT-Reaktionsprodukte 4.1/2 und 4.2 (beide C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S; Anhang A1.1) bestätigten die Summenformel des postulierten 6,7- bzw. 6,1- cyclischen GSH-PAT-Monoaddukts.

Die Anwesenheit von drei methylierbaren Gruppen (6,7-cyclisch: drei Carboxylgruppen bzw. 6,1-cyclisch: zwei Carboxylgruppen und eine Ketogruppe) in den postulierten Strukturen der GSH-PAT-Addukts 4.1 und 4.2 wurde mittels Methylierung mit Diazomethan (Kapitel 6.2.5) und anschließender HPLC-MS/MS-Analyse bestimmt. Durch die Methylierung wurden jeweils insgesamt drei Positionen der isolierten Addukts modifiziert (Anhang A1.17 und A1.19), was sich zudem mittels kollisions-induzierter Fragmentierung bestätigen lässt (Anhang

A1.18 und A1.20). In den entsprechenden MRM-Übergängen für die Methylierung von vier funktionellen Gruppen, z.B. in Folge der Methylierung einer weiteren im Molekül vorhandenen Carboxyl- oder Ketogruppe bzw. die Modifizierung der Aminogruppen im GSH-Molekül als Nebenreaktion, wurden keine Peaks detektiert.

### 3.1.1.2.3 Addukte von Patulin mit Adenin und Glutathion

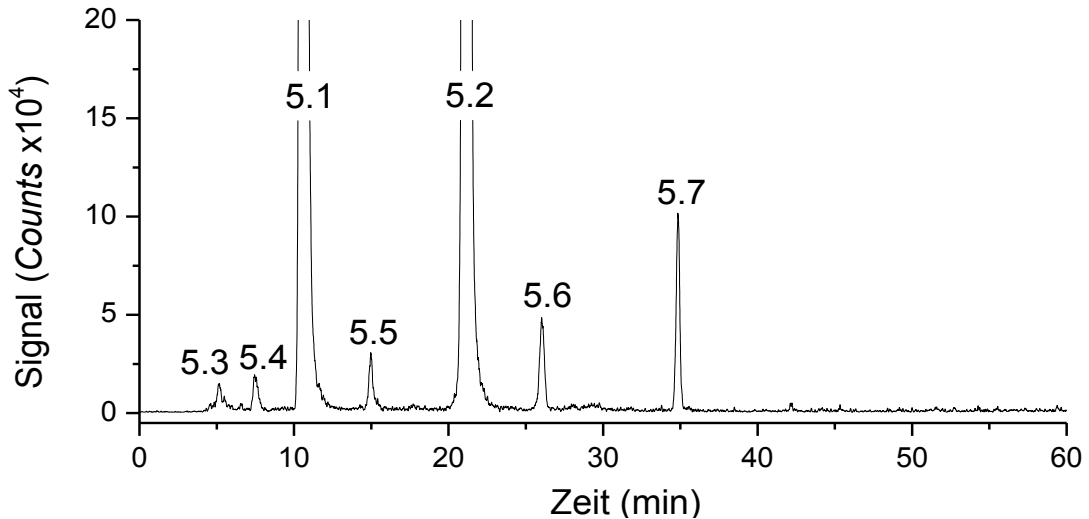
Interessanterweise waren im Vollscan-Chromatogramm der Reaktionsprodukte nach Inkubation von PAT mit Adenin und GSH zwei sehr intensive und zwei weniger intensive Peaks auszumachen, welche bei keinem anderen Inkubationsansatz entstanden sind (Peak 5.1 und 5.2 bzw. Peak 7.1 und 7.2 im **Abb. 6** zweites Chromatogramm von oben) und somit nur bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Nukleophilkomponenten im Inkubationsansatz gebildet wurden. Dies deutete darauf hin, dass es sich bei diesen Reaktionsprodukten um gemischte Addukte aus PAT, Adenin und GSH handeln könnte.

Die Bildung von Mischaddukten von PAT mit Modell-Thiolen (4-Bromthiophenol, Mercaptoethanol) und Modell-Aminen (4-Bromanilin, Ethanolamin) wurde bereits bei Fliege und Metzler (2000a) beschrieben, wobei zu deren Generierung ein Überschuss der Amino-Komponente und erhöhte Inkubationstemperaturen (37°C bzw. 60°C) nötig waren. Diese Mischaddukte gehörten dem Strukturtyp der KHA-Derivate an und hatten die Thiol-Komponente an C6 von PAT, die Amino-Komponente über eine Amidbindung an C1 von PAT gebunden (**Abb. 3**).

#### Cyclische Glutathion-Patulin-Adenin-Addukte

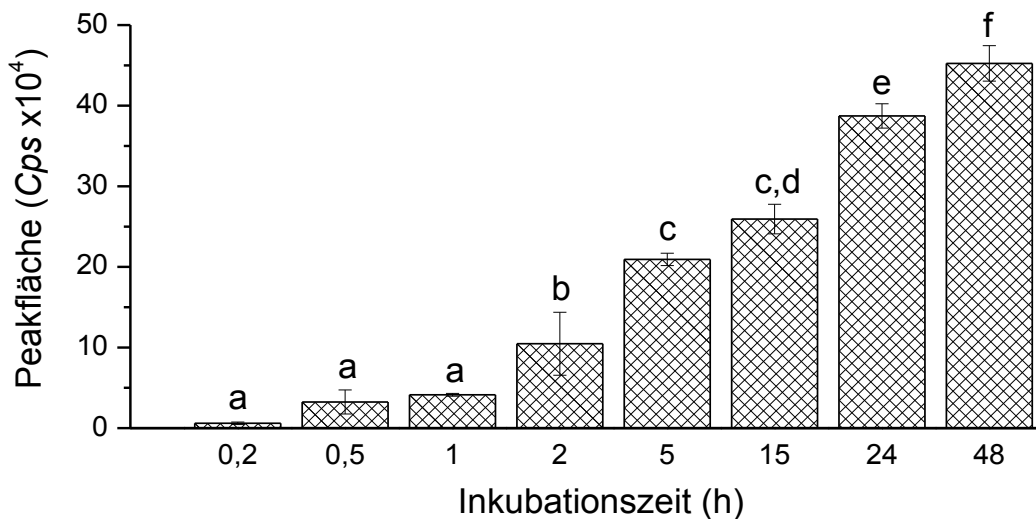
Die beiden intensiveren Reaktionsprodukte 5.1 und 5.2 wiesen ein Molekülion mit  $m/z$  551 auf, welches nur zu einem PAT-Addukt mit KHA-Struktur und je ein einem Molekül GSH und Adenin passte. Andere PAT-Strukturtypen, die mehrere Nukleophil-Moleküle gebunden haben können, wie z.B. die C2- oder C6-substituierten TEEK oder TEEI (**Abb. 3**), wurden aufgrund der fehlenden Übereinstimmung mit den kalkulierten Molekülionen ( $m/z$  597 bzw.  $m/z$  579) ausgeschlossen.

Das aus den Vollscan-Daten extrahierte EIC mit  $m/z$  551 lieferte fünf zusätzliche Peaks (5.3-5.7), welche jedoch deutlich weniger intensiv waren wie die beiden Hauptprodukte (**Abb. 32**).



**Abb. 32:** EIC mit  $m/z$  551 der GSH-PAT-Adenin-Reaktionsprodukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit Adenin und GSH (je 0,8 mM) gebildet wurden. Extraktion aus den Vollscan-Daten (**Abb. 6**). Die Signalintensität von Peak 5.1 beträgt  $1,3 \times 10^5$  counts, die von Peak 5.2 beträgt  $2,4 \times 10^5$  counts. Die Peaknummern 5.1 und 5.2 entsprechen denen von **Abb. 6**. Die weiteren Peaks wurden mit den Nummern 5.3-5.7 gekennzeichnet um die Nummerierung von **Abb. 8** und **Abb. 11** beizubehalten.

Trotz der Anwesenheit von GSH waren die potentiellen GSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 schon nach einer Inkubationszeit von 10 min detektierbar, wobei sich deren Peakflächen kontinuierlich über die Zeit erhöhten (**Abb. 33**).



**Abb. 33:** Zeitabhängige Bildung der GSH-PAT-Adenin-Reaktionsprodukte 5.1 und 5.2 in einem Reaktionsansatz von PAT (1,6 mM) mit Adenin und GSH (je 0,8 mM) welcher über 48 h inkubiert wurde (RT, pH 7,4). Die Addukte wurden mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus ( $m/z$  551>136, CE 20 V, HPLC-MS/MS Methode Kapitel 6.2.1.3) erfasst und die Peakflächen von 5.1 und 5.2 aufsummiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Tukey Test). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben (a-e) unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant bei  $p < 0,05$ . Rohdaten: Anhang A1.21.



Gemischte GSH-DNA-Basen-Addukte wurden bisher weder für PAT noch für andere  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Carbonyle identifiziert. Bislang wurde die DNA-Reaktivität von Elektrophilen nach Konjugation mit GSH ausschließlich für 1,2-Dihaloalkane (zusammengefasst in Guengerich, 2003) und Butadien-Diepoxid (Cho und Guengerich, 2012) beschrieben.

Die Charakterisierung dieser potentiellen GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte hinsichtlich weiterer Strukturinformationen erfolgte durch kollisionsinduzierte Fragmentierung im *enhanced* Produktionenscan-Modus.

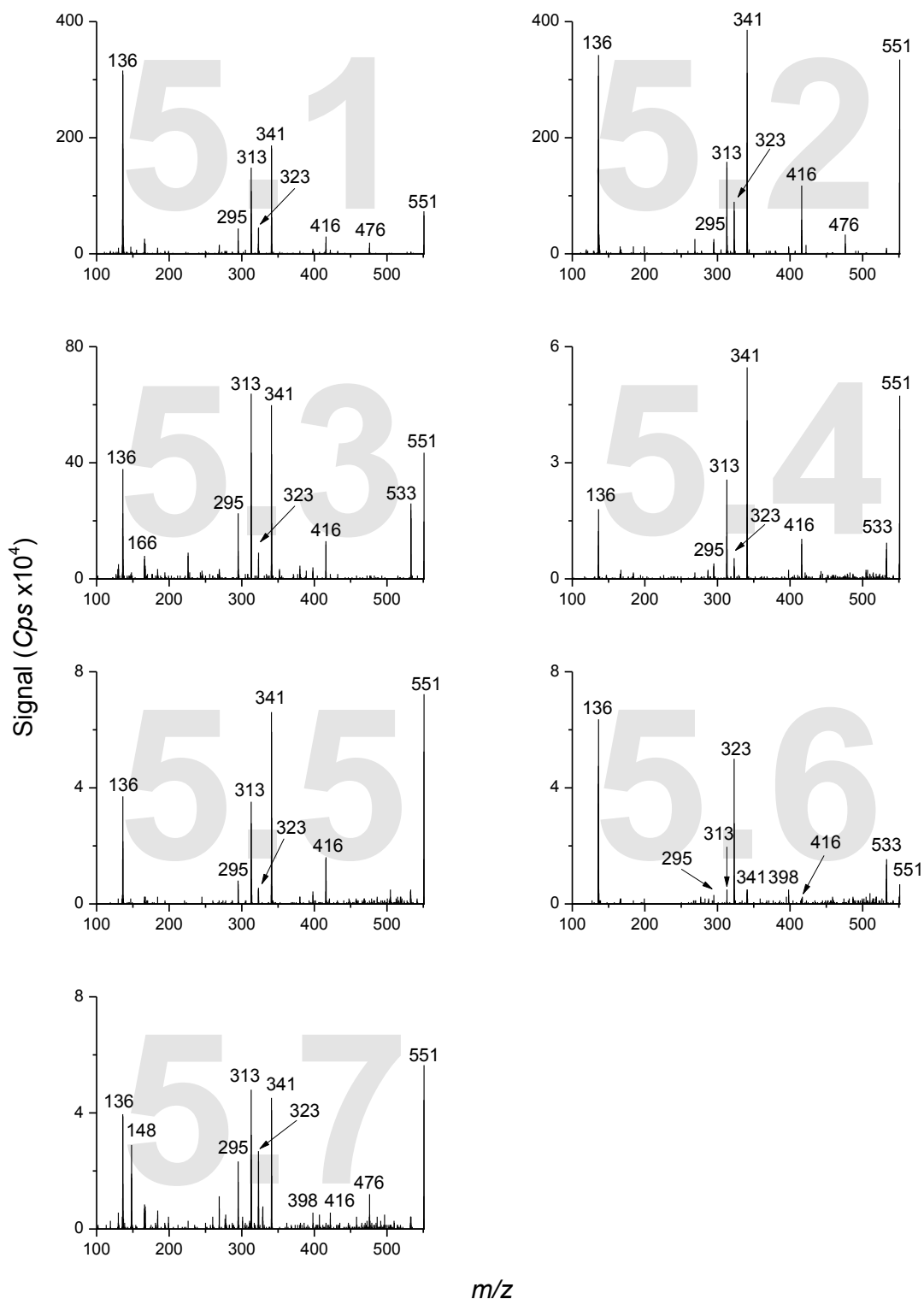
### *Adenin als Teil der Adduktstruktur*

Wie schon bei den PAT-Adenin-Monoaddukten und -Diaddukten beobachtet (Kapitel 3.1.1.1), war in den Massenspektren aller Haupt- und Minoraddukte ein meist sehr intensives Fragmentation mit dem  $m/z$ -Verhältnis des abgespaltenen, protonierten Adenin-Moleküls vorhanden ( $m/z$  136, **Abb. 34**). Weiterhin war auch das verbleibende Fragmentation nach Abspaltung eines Adenin-Moleküls ( $m/z$  416) bzw. eines Adenin- und eines Wasser-Moleküls ( $m/z$  398, Addukt 5.6 und 5.7) in den Massenspektren enthalten.

Das Addukt 5.7 wies zudem noch ein Fragmentation mit  $m/z$  148 auf (**Abb. 34** und **Abb. 36**). Dieses aromatische Adenin-Fragmentation entstand bei 3,4-Epoxy-1-buten-Adenin-Addukten zusätzlich zu dem nicht-aromatisch Fragmentation mit  $m/z$  136, wenn 3,4-Epoxy-1-buten über das exocyclische Stickstoffatom ( $N^6$ ) mit Adenin verknüpft war (Tretyakova et al., 1998). Somit war dieses Fragmentation ein Hinweis auf ein  $N6$ -verknüpftes GSH-PAT-Adenin-Mischaddukt.

### *Informationen zum GSH-Molekül*

Weiterhin wiesen die Produktionen-Massenspektren aller Haupt- und Minoraddukte Fragmentationen auf, die auf das GSH-Molekül zurückzuführen waren: i) ein Fragmentation ( $m/z$  476) nach Abspaltung eines Moleküls Glycin und ii) ein intensives Fragmentation mit  $m/z$  341, welches durch die Abspaltung eines Moleküls Adenin und Glycin entstanden ist (**Abb. 34**). Die Abspaltung von Glycin durch kollisionsinduzierte Fragmentierung ist eine charakteristische Fragmentierung für GSH-konjugierte Metabolite (zusammengefasst in Baillie und Davis, 1993). Interessanterweise, waren jedoch in den Massenspektren weder Fragmentationen der ebenso charakteristischen Fragmentierungen nach Neutralverlust des Glutaminsäure-Restes als Pyroglutamat oder der Abspaltung des gesamten GSH-Moleküls enthalten.



**Abb. 34:** Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions der potentiellen GSH-PAT-Adenin-Reaktionsprodukte 5.1 (CE 25 V), 5.2 (CE 20 V), 5.3 (CE 25 V), 5.4 (CE 20 V), 5.5 (CE 20 V), 5.6 (CE 20 V) und 5.7 (CE 25 V) mit  $m/z$  551 (*enhanced* Produktionsenscan, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Die Peaknummern (grau) entsprechen denen von **Abb. 6** bzw. **Abb. 32**. Fragmentationen:  $m/z$  533  $[M + H - H_2O]^+$ ,  $m/z$  476  $[M + H - Glycin]^+$ ,  $m/z$  416  $[M + H - Adenin]^+$ ,  $m/z$  398  $[M + H - Adenin - H_2O]^+$ ,  $m/z$  341  $[M + H - Adenin - Glycin]^+$ ,  $m/z$  323  $[M + H - Adenin - Glycin - H_2O]^+$ ,  $m/z$  313  $[M + H - Adenin - Glycin - CO]^+$ ,  $m/z$  295  $[M + H - Adenin - Glycin - H_2O - CO]^+$ ,  $m/z$  148  $[CH_2\text{-Adenin} + H]^+$ ,  $m/z$  136  $[Adenin + H]^+$ .

Die restlichen Fragmentationen gingen aus Fragmentierungen des nach Abspaltung von Adenin und Glycin gebildeten Fragmentions ( $m/z$  341) hervor: der Verlust eines Moleküls Wasser ( $m/z$  323), eines CO-Restes ( $m/z$  313) oder einer Kombination aus beidem ( $m/z$  295). Die Abspaltung eines Moleküls Wasser aus dem Molekülion führte zu dem Fragmentation mit  $m/z$  533 (**Abb. 34**).

Die  $\delta$ -Position (C6) des  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Systems von PAT stellt die initiale Position für einen nukleophilen Angriff dar. Zudem wurde die Reaktivität von PAT gegenüber Thiolen höher eingestuft, als gegenüber Nucleophilen mit Aminogruppen (Fliege und Metzler, 2000a). Es war folglich davon auszugehen, dass GSH innerhalb der Mischadduktstruktur an C6 von PAT addiert ist.

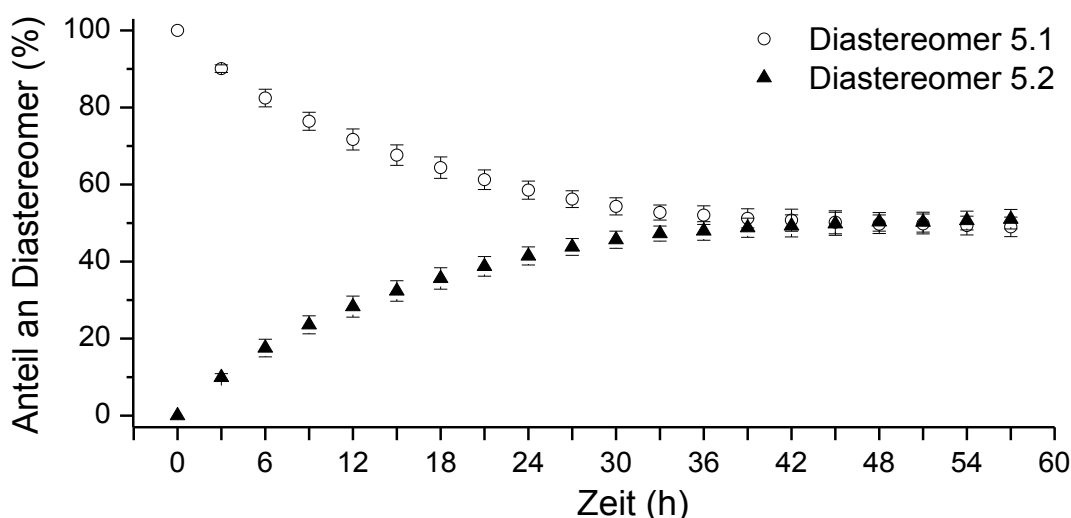
Aufgrund der limitierten Fragmentierungen des GSH-Moleküls in den Produktions-Massenspektren aller Haupt- und Minoraddukte wurde eine intramolekulare 6,7-Cyclisierung durch Reaktion der  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutaminsäurerestes mit der C7-Cabonylgruppe unter Ausbildung einer Iminbindung vermutet, wie für die GSH-PAT-Addukte des KHA-Typs mit einem (Addukt 4.1/1 und 4.1/2, **Abb. 27**) bzw. zwei GSH-Molekülen (Addukt 6.1 und 6.2, **Abb. 21**) bereits beschrieben wurde. Eine 6,1-Cyclisierung unter Ausbildung einer Amidbindung wurde aus dem gleichen Grund für alle beobachteten cyclischen GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte 5.1-5.7 ausgeschlossen.

Bei den Mischaddukten von PAT mit einem Molekül GSH und Adenin war somit das GSH-Molekül 6,7-cyclisch an PAT gebunden (cGSH-PAT-Adenin-Addukte).

### *Diastereomerisierung als Bestätigung der 6,7-cyclischen Struktur*

Bei der Isolierung des cGSH-PAT-Adenin-Mischaddukte 5.1 mittels semi-präparativer HPLC (Kapitel 6.2.4) fiel auf, dass die Lagerung von Produkt 5.1 in dem Fließmittelgemisch aus Wasser, MeOH und FA bei Raumtemperatur zu einer zeitabhängigen Bildung von Produktpeak 5.2 unter gleichzeitiger Abnahme des Peaks von 5.1 führte. Nach 36 h lagen die Peakflächen der Produkte 5.1 und 5.2 in einem 1:1-Verhältnis vor (**Abb. 35**).

Bei den 6,7-cyclischen GSH-PAT-Monoaddukten 4.1/1 und 4.1/2 wurde zuvor, aufgrund der Nachbarschaft der Iminbindung an C7 zum chiralen Centrum an C6, ebenfalls eine Umlagerung der beiden Diastereomere ineinander beobachtet (Kapitel 3.1.1.2.2). Aufgrund der gleichen 6,7-cyclischen GSH-PAT-Struktur war eine Diastereomerisierung auch bei den cGSH-PAT-Adenin-Mischaddukten möglich. Bei den cGSH-PAT-Adenin-Addukten 5.1 und 5.2 handelte es sich somit um Diastereomere, die sich somit aufgrund der Iminbindung in direkter Nachbarschaft zum chiralen Zentrum durch Tautomerisierungsreaktionen ineinander umlagerten. Dies bekräftigte die postulierte Adduktstruktur mit 6,7-cyclisch gebundenem GSH-Molekül.



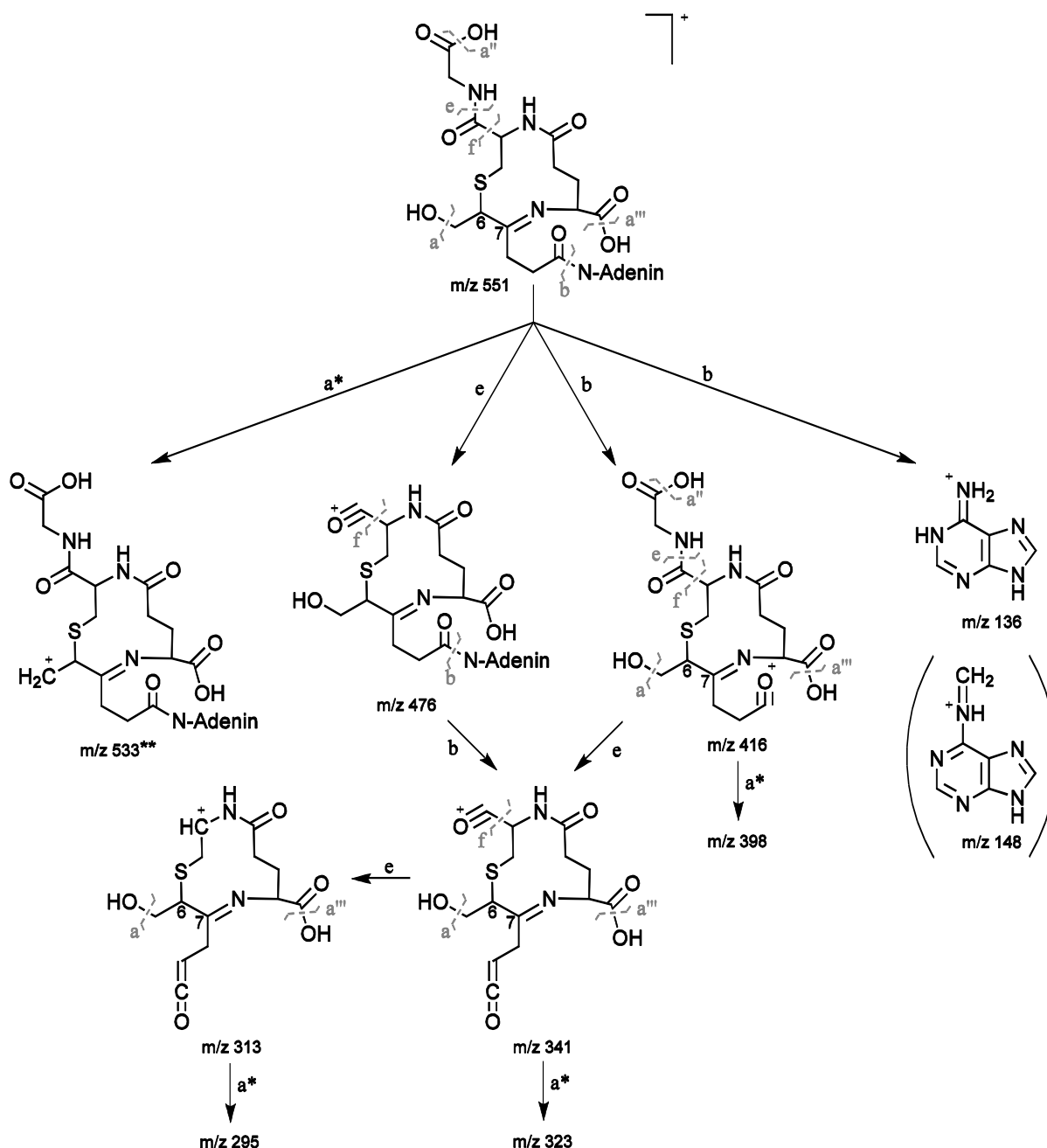
**Abb. 35:** Umwandlung des isolierten cGSH-PAT-Adenin-Reaktionsproduktes 5.1 in 5.2 nach HPLC-Isolierung des Produktes 5.1 und Lagerung im Fließmittelgemisch aus Wasser, MeOH und FA bei Raumtemperatur. Die HPLC-Analyse der frisch isolierten Fraktion erfolgte über einen Zeitraum von 57 h in 3-stündigen Intervallen, wobei durch den Autosampler vor jeder Injektion 20  $\mu$ l der Fraktion mit 20  $\mu$ l internem Standard (wässrige Coffeinelösung 10 mg/l) gemischt wurden. HPLC-UV-Methode 4 Kapitel 6.2.1.1. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Änderung der prozentualen Anteile der Peakfläche der Reaktionsprodukt 5.1 und 5.2 an der addierten Gesamt-Peakfläche von drei unabhängigen Bestimmungen. Rohdaten: Anhang A1.27.

Nach Isolierung des Minoraddukts 5.7 nach UHPLC-Trennung (Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1) wurde im MRM-Chromatogramm ein weiterer Peak detektiert, welcher die gleiche Retentionszeit wie das Mischaddukt 5.2 hatte (Anhang A1.23). Um zu Überprüfen ob es sich um das Mischaddukt 5.2 oder das Diastereomer von Addukt 5.7 handelte, wurde die Peakflächenverhältnisse (PFV) zweier intensiver MRM-Übergänge der diastereomeren Addukte 5.1 und 5.2 sowie von Addukt 5.7 und dem unbekanntem Peak verglichen. Während die Addukte 5.1 und 5.2 ein PFV von  $>4$  aufwiesen (**Tab. 10**), lag das PFV des Addukts 5.7 bei 2,0 und des unbekanntem Peaks bei 1,9. Folglich handelte es sich bei dem unbekanntem Peak nicht um das Addukt 5.2, sondern vermutlich um das Diastereomer von 5.7, welches sich nach Isolierung von 5.7 infolge der Diastereomerisierung bildete.

#### *Bestimmung der Position von Adenin innerhalb der Adduktstruktur*

Aufgrund der zuvor postulierten KHA-Struktur der Mischaddukte mit C6-substituiertem GSH-Molekül, waren nur noch die Position C1 und C5 zur Bindung von Adenin vorhanden (**Abb. 7**). Da nach Inkubation von Adenin mit GSH keine Produktpeaks erhalten wurden (**Abb. 6**), wurde eine Reaktion von Adenin am GSH-Molekül ausgeschlossen. Die in Gegenwart von Modell-Thiolen und -Aminen gebildeten Mischaddukte von PAT wiesen eine C6-Thiol-substituierte KHA-Struktur auf, wobei das Amin über eine Amidbindung an C1 von PAT gebunden war (Fliege und Metzler, 2000a; **Abb. 3**). Die entsprechende Struktur eines 6,7-

cGSH-PAT-Adenin-Mischaddukts mit Adenin über eine Amidbindung an C1 verknüpft, war vereinbar mit allen beobachteten Fragmentierungen (**Abb. 36**).



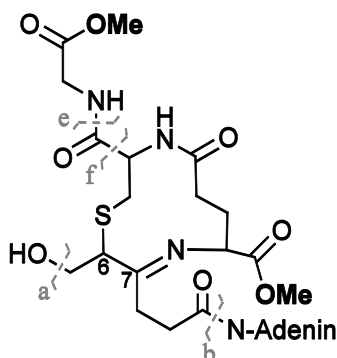
**Abb. 36:** Postulierte Struktur der 6,7-cyclischen GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte und Fragmentierungsschema nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (**Abb. 33**). Das GSH-Molekül ist an C6 von PAT infolge einer Addition gebunden. Cyclisierung durch Reaktion der Glutaminsäure- $\alpha$ -Aminogruppe mit der C7-Carbonylfunktion unter Bildung einer Iminbindung an C7. Das Adenin-Molekül ist an C1 von PAT über eine Amidbindung gebunden. \*, für die Abspaltung von Wasser kommen die Positionen  $a/a''/a'''$  in Frage. \*\*, die Struktur des Fragmentions mit  $m/z$  533 resultiert nach Wasserabspaltung an Position  $a$ , Wasserabspaltung an den Positionen  $a''$  und  $a'''$  führen zum gleichen  $m/z$ -Verhältnis aber zu anderen Fragmention-Strukturen, welche nicht gezeigt sind. (), Das Fragmention mit  $m/z$  148 ist nur im Produktionen-Massenspektrum von Addukt 5.7 vorhanden.

Jedoch ließ sich aus keinem der Fragmentierungsmuster der Haupt- und Minoraddukte ableiten, ob das Adenin-Molekül an C1 oder C5 von PAT gebunden ist. Bei Bindung von Adenin an C1 von PAT wäre die ursprüngliche C1-Carboxylgruppe nicht mehr für eine Modifizierung mit Diazomethan zugänglich (**Abb. 36**). Die ebenso methylierbare Ketogruppe an C7 war durch die Iminbindung infolge der 6,7-Cyclisierung ebenso nicht mehr methylierbar. In dieser Struktur wären somit nur zwei freie Carboxylgruppen für eine Methylierung vorhanden, die zum GSH-Molekül gehören. Im Gegensatz dazu würde die Bindung von Adenin an einer anderen Position als an der C1-Carboxylgruppe zu einem Produkt mit drei methylierbaren Carboxylgruppen führen.

Für die Bestimmung der Anzahl der im Molekül vorhandenen Carboxylgruppen wurden deshalb die Hauptreaktionsprodukte 5.1 und 5.2 isoliert (Kapitel 6.2.4), anschließend mit Diazomethan methyliert (Kapitel 6.2.5) und mittels HPLC-MS(/MS) analysiert.

Das TIC der Vollscan-Analyse der methylierten Mischaddukte 5.1 und 5.2 zeigte zwei Peaks, deren Molekülion ein um 28 Da erhöhtes  $m/z$ -Verhältnis (579) aufwies (**Tab. 3**; Anhang A1.22) und welches somit auf zwei zusätzliche Methylgruppen im Addukt schließen ließ.

**Tab. 3:** Molekülionen ( $[M + H]^+$ ) und Fragmentationen der nicht-methylierten (ohne Me) cGSH-PAT-Adenin-Mischaddukte 5.1 und 5.2 und nach Methylierung mit Diazomethan (mit Me). HPLC-MS(/MS)-Analyse im Vollscan- bzw. Produktionsenscan-Modus (HPLC-MS-Methode Kapitel 6.2.1.3). Ein Unterschied ( $\Delta$ ) im  $m/z$ -Verhältnis um 14 oder 28 Da weist auf eine bzw. zwei methylierte funktionelle Gruppen in den Molekül- oder Fragmentationen hin. Produktions-Massenspektren der methylierten Addukte im Anhang A1.22. Gly, Glycin.



| Spaltposition | Molekül-/Fragmentationen    | $m/z$   |        | $\Delta$ (Da) |
|---------------|-----------------------------|---------|--------|---------------|
|               |                             | ohne Me | mit Me |               |
| ---           | $[M + H]^+$                 | 551     | 579    | 28            |
| e             | $[- Gly]^+$                 | 476     | 490    | 14            |
| b             | $[- Adenin]^+$              | 416     | 444    | 28            |
| b+a           | $[- Adenin - H_2O]^+$       | 398     | 426    | 28            |
| b+e           | $[- Adenin - Gly]^+$        | 341     | 355    | 14            |
| b+e+a         | $[- Adenin - Gly - H_2O]^+$ | 323     | 337    | 14            |
| b+e+f         | $[- Adenin - Gly - CO]^+$   | 313     | 327    | 14            |
| b             | $[Adenin + H]^+$            | 136     | 136    | -             |

Auch die in den Produktionenscan-Massenspektren beobachteten Fragmentionen waren um 14 bzw. 28 Da erhöht (Tab. 3; Anhang A1.22). Somit wurde das Vorhandensein von nur zwei Carboxylgruppen innerhalb der diastereomeren Addukte 5.1 und 5.2 verifiziert, was die Bindung von Adenin über eine Amidbindung an C1 von PAT bestätigte (Abb. 36).

Ebenso wurde das Minoraddukt 5.7 nach UHPLC-Trennung isoliert und mit Diazomethan methyliert (Kapitel 6.2.5). Auch dieses Addukt ließ sich durch die Methylierung an zwei Positionen modifizieren, was für die Bindung von Adenin an C1 von PAT sprach (Anhang A1.23). Das Fragmentierungsmuster des methylierten Adduktes wies die gleichen Fragmentionen wie die methylierten Addukte 5.1 und 5.2 auf (Anhang A1.24).

Durch die Methylierung mit Diazomethan werden alle Carboxylgruppen und acide Ketogruppen im Molekül, sowie als Nebenreaktion auch Aminogruppen methyliert. Bei der Analyse der methylierten Lösung wurde deshalb auch auf das Vorhandensein von drei- oder vierfach methylierten Molekülonen ( $m/z$  593 bzw.  $m/z$  607) geachtet. Für entsprechenden EIC bzw. MRM-Spuren wiesen jedoch keine Peaks in ähnlicher Intensität zu den zweifach methylierten Addukten auf (Anhang A1.23 und A1.25).

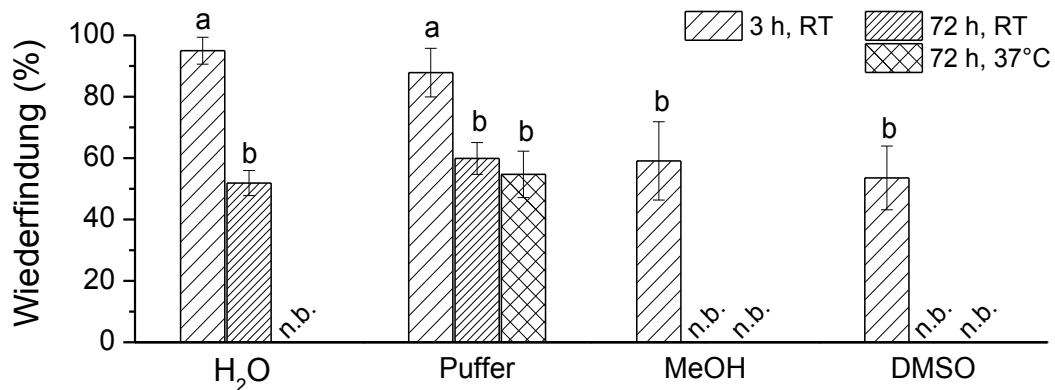
Die Minoraddukte 5.3-5.6 waren nicht in ausreichender Menge für eine Methylierung isolierbar, so dass für diese Addukte keine Bestimmung der genauen Position von Adenin in der Adduktstruktur erfolgen konnte. Aufgrund der qualitativ gleichwertigen Fragmentierungsmuster handelte es sich ebenso um cGSH-PAT-Adenin-Addukte. Die Unterschiede im Elutionsverhalten und der Signalintensität im Vergleich zu den Hauptaddukten 5.1 und 5.2 könnten z.B. durch die Bindung an andere nukleophile Stickstoffatome von Adenin zustande kommen. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Addukten um cGSH-PAT-Adenin-Addukte handelt, die Adenin an C5 von PAT gebunden haben.

Die Bestimmung der exakten Masse des cGSH-PAT-Adenin-Addukts 5.1 ( $C_{21}H_{27}N_8O_8S$ ; Anhang A1.1) mittels hochauflösender qTOF-MS bestätigte die Summenformel der postulierten Mischadduktstruktur von PAT mit je einem GSH- und einem Adenin-Molekül.

#### *Stabilität der Mischaddukte in verschiedenen Medien*

Bei der Umwandlung von Addukt 5.1 in Addukt 5.2 war zu beobachten, dass die Gesamtpeakfläche von Peak 5.1 und 5.2 nach 57 h um ca. 17% abgenommen hatte und im HPLC-UV-Chromatogramm ein Peak entstanden war, der Adenin zugeordnet wurde (Anhang A1.26). Ein Teil der Mischaddukte war folglich unter Spaltung der Amidbindung und Freisetzung von Adenin zerfallen. Für die Untersuchung der Stabilität der Mischaddukte, wurde die Wiederfindung der isolierten Addukte 5.1 und 5.2 nach Inkubation in verschiedenen Medien und bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen bestimmt (Kapitel 6.2.9.1 und 6.2.9.2).

Nach 3-stündiger Inkubation in wässrigen Lösungen bei RT betragen die Wiederfindungen der cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 95% (Wasser) bzw. 88% (Puffer) (**Abb. 37**). Die Wiederfindungen in wässrigen Lösungen nach 72-stündiger Inkubation bei RT waren mit 52% (Wasser) bzw. 60% (Puffer) signifikant niedriger als bei kurzer Inkubationszeit. Eine Erhöhung der Temperatur führte zu keiner signifikanten Änderung der Wiederfindung in Puffer bei 72 h. Die Wiederfindung der 3-stündigen Inkubation in organischen Medien bei RT war mit 59% (MeOH) bzw. 54% (DMSO) signifikant niedriger als in den wässrigen Lösungen nach 3 h und vergleichbar mit der Wiederfindungen in wässrigen Lösungen nach 72-stündiger Inkubation (**Abb. 37**).



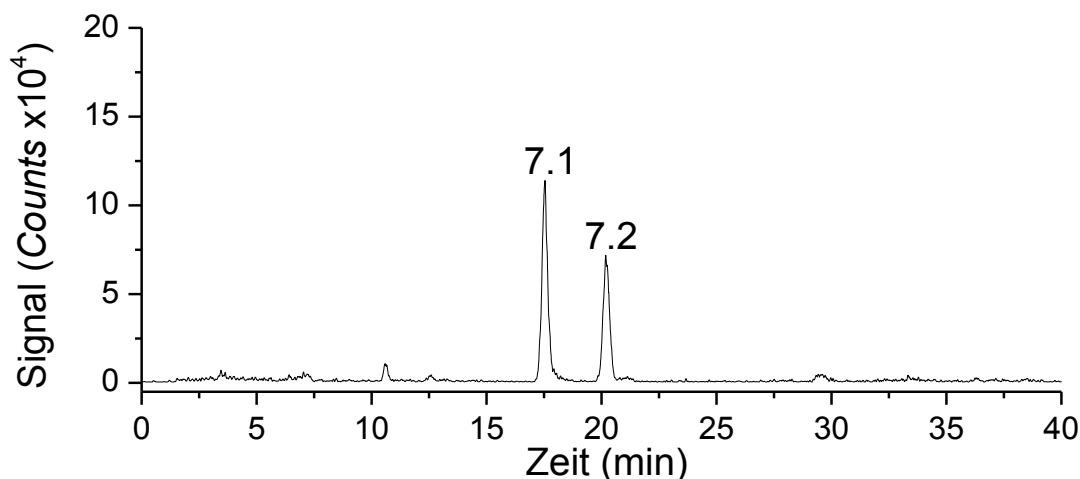
**Abb. 37:** Wiederfindung der cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 (Gesamtpeakfläche) nach Inkubation in den Medien Wasser, Kaliumphosphatpuffer 1 M pH 7,4, MeOH und DMSO bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (3h, 72 h) und -temperaturen (RT, 37°C) und anschließender Messung mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 4). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Tukey Test,  $p < 0,05$ ). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. n.b., nicht bestimmt. Rohdaten: Anhang A1.28 und A1.29.

In den organischen Medien waren schon nach 3-stündiger Inkubation ca. die Hälfte der Addukte zerfallen und somit nicht stabil. In wässrigen Medien, bei pH 7,4 und 37°C hingegen waren erst nach drei Tagen ca. die Hälfte der Addukte zerfallen. Da eine Amidbindung zwischen dem Elektrophil und der Nukleobase für andere DNA-Addukte bisher nicht beschrieben wurde, zeigten diese Stabilitätsuntersuchungen die Relevanz der neuartigen GSH-PAT-DNA-Basen-Mischaddukte unter physiologischen Bedingungen.

#### Lineare Glutathion-Patulin-Adenin-Addukte

Die beiden weniger intensiven GSH-PAT-Adenin-Reaktionsprodukte 7.1 und 7.2 (**Abb. 6** zweites Chromatogramm von oben) wiesen ein Molekülion mit  $m/z$  569 auf, welches somit um 18 Da höher war als das Molekülion der cGSH-PAT-Adenin-Addukte. Das aus den Vollscan-Daten extrahierte EIC mit  $m/z$  569 wies zwei Peaks auf (**Abb. 38**).

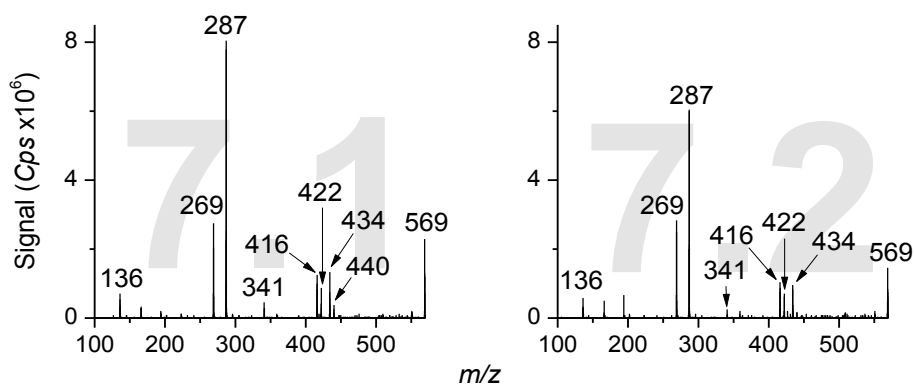




**Abb. 38:** EIC mit  $m/z$  569 der GSH-PAT-Adenin-Reaktionsprodukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit Adenin und GSH (je 0,8 mM) gebildet wurden. Extraktion aus den Vollscan-Daten (**Abb. 6**).

#### Charakterisierung der Addukte mittels kollisionsinduzierter Fragmentierung

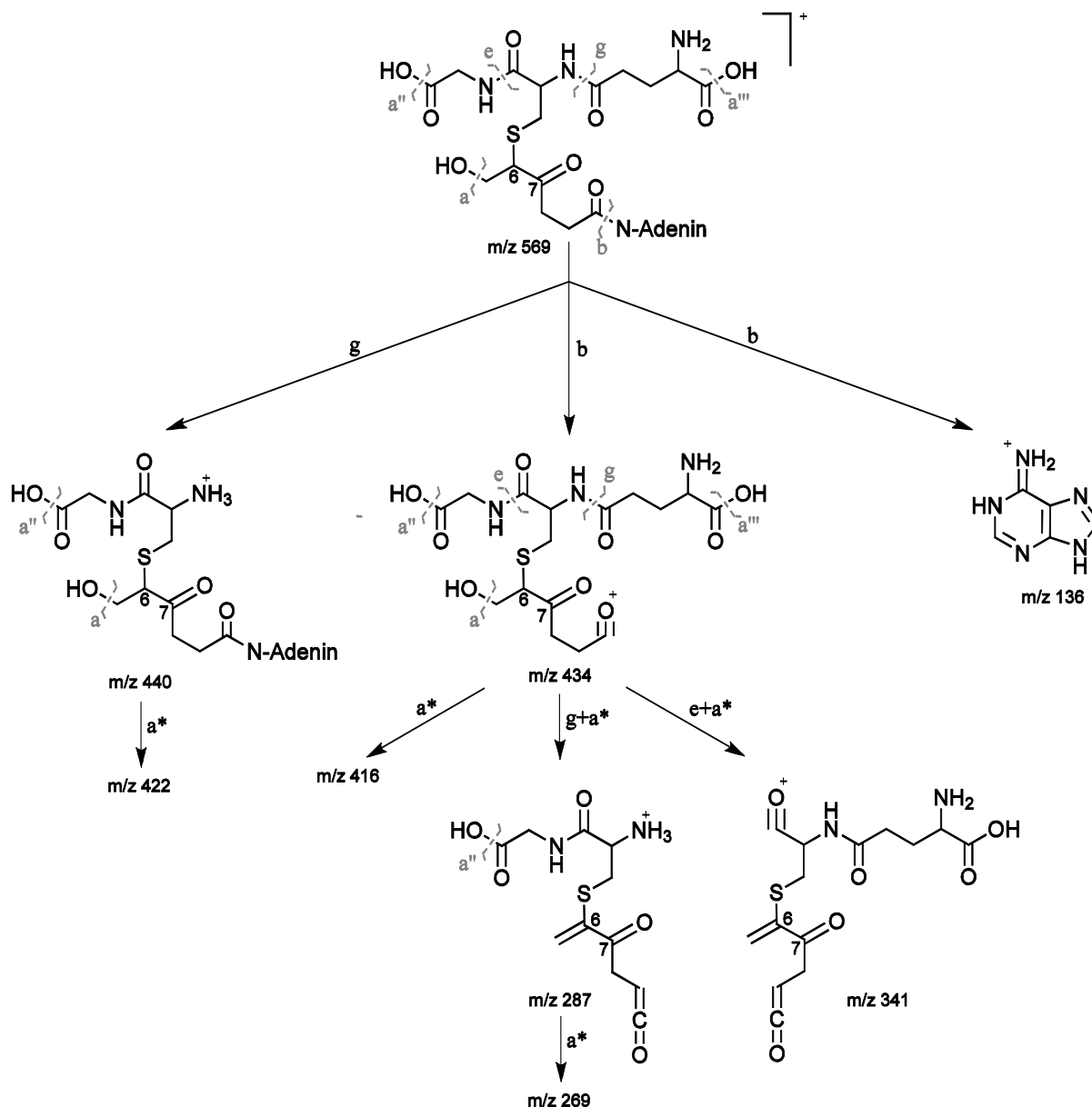
Die Produktions-Massenspektren dieser potentiell linearen GSH-PAT-Adenin-Addukte enthielten Fragmentationen nach Abspaltung von Glycin ( $m/z$  341) und Adenin ( $m/z$  434, 416 und 136; **Abb. 39**). Im Gegensatz zu den cyclischen Mischaddukten waren Fragmentationen enthalten die u.a. durch den charakteristischen Neutralverlust von 129 Da (Pyro-glutamat) infolge der Spaltung der  $\gamma$ -Glu-Cys-Bindung resultierten ( $m/z$  440, 422, 287 und 269).



**Abb. 39:** Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions der GSH-PAT-Adenin-Reaktionsprodukte 7.1 und 7.2 mit  $m/z$  569 (*enhanced* Produktionsscan, CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Die Peaknummern (grau) entsprechen denen von **Abb. 38**. Fragmentationen:  $m/z$  440  $[M + H - \text{Pyroglutamat}]^+$ ,  $m/z$  434  $[M + H - \text{Adenin}]^+$ ,  $m/z$  422  $[M + H - \text{Pyroglutamat} - \text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  416  $[M + H - \text{Adenin} - \text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  341  $[M + H - \text{Glycin} - \text{Adenin} - \text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  287  $[M + H - \text{Pyroglutamat} - \text{Adenin} - \text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  269  $[M + H - \text{Pyroglutamat} - \text{Adenin} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  136  $[\text{Adenin} + \text{H}]^+$ .

Folglich waren die Massenspektren gekennzeichnet durch die für GSH-Konjugate typischen Abspaltungen sowohl des Glycin- als auch des Glutaminsäure-Rests des GSH-Moleküls. Da das Molekülium um 18 Da höher lag als das der cGSH-PAT-Adenin-Addukte war eine 6,1-58

cyclische Struktur auszuschließen. Somit war das GSH-Molekül nur über eine Thioetherbindung mit C6 von PAT verknüpft und lag somit linear vor (**Abb. 40**). Alle beobachteten Fragmentierungen (**Abb. 39**) waren vereinbar mit der postulierten Struktur der linearen GSH-PAT-Adenin Addukte (/GSH-PAT-Adenin Addukt; **Abb. 40**).



**Abb. 40:** Postulierte Struktur und Fragmentierungsschema nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (**Abb. 39**) für die diastereomeren linearen GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte 7.1 und 7.2. Das GSH-Molekül ist an C6 von PAT infolge einer Addition gebunden und liegt entgegen des cyclischen Mischadduktes linear vor. Das Adenin-Molekül ist an C1 von PAT über eine Amidbindung gebunden. \*, für die Abspaltung von Wasser kommen die Positionen a/a"/a"" in Frage. \*\*, die Struktur der Fragmentierungen resultieren nach Wasserabspaltung an Position a, Wasserabspaltung an den Positionen a" bzw. a"" führen zum gleichen m/z-Verhältnis aber zu anderen Fragmentierungsstrukturen, welche nicht gezeigt sind.

*Lineare Vorstufen der cyclischen Mischaddukte*

Nach Isolierung der beiden linearen Mischaddukte mittels semi-präparativer HPLC (Kapitel 6.2.4) und anschließender HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus waren die beiden cyclischen Mischaddukte 5.1 und 5.2 detektierbar (Daten nicht gezeigt). Deswegen war davon auszugehen, dass die cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 aus den beiden lGSH-PAT-Adenin-Addukten 7.1 und 7.2 hervorgehen. Aufgrund der deutlich höheren Signalintensität der cyclischen gegenüber der linearen Addukte (ca. 30-fach) scheint die intramolekulare Cyclisierungsreaktion ein bevorzugter Reaktionsweg darzustellen.

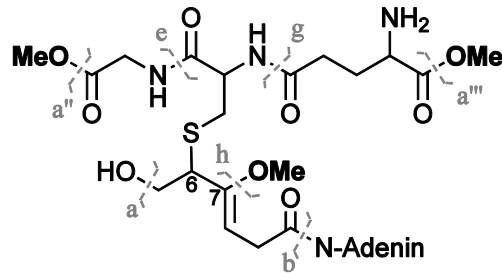
Weitere lineare Mischaddukte, z.B. die Vorstufen der cGSH-PAT-Adenin-Mischaddukte 5.3-5.7, waren im EIC nicht detektierbar (**Abb. 38**).

*Bestimmung der Position von Adenin innerhalb der Adduktstruktur*

Als Vorstufen der cyclischen Mischaddukte 5.1 und 5.2 war von einer Bindung von Adenin an C1 von PAT auszugehen. Dies wurde noch mittels Methylierung verifiziert. Für die Bestimmung der Anzahl der im Molekül methylierbaren Gruppen (Carboxyl- und Ketogruppen) wurden deshalb die lGSH-PAT-Adenin-Addukte 7.1 und 7.2 isoliert (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3), anschließend mit Diazomethan methyliert (Kapitel 6.2.5) und mittels HPLC-MS(/MS) analysiert (Kapitel 6.2.1.5). Durch die Verwendung von starken Basen bei der Methylierung können auch Aminogruppen im GSH-Molekül als Nebenreaktion modifiziert werden, weshalb die entsprechenden Übergänge bei der Auswertung berücksichtigt wurden.

Nach Analyse im MRM-Modus waren bei der Ionenspur der dreifach methylierten Addukte ( $m/z$  611  $[M+H]^+$  >  $m/z$  136  $[\text{Adenin}+H]^+$ ) zwei intensive Peaks vorhanden (Anhang A1.30). Die Ionenspuren für ein- und zweifach methylierte Addukte zeigten nur Peaks mit geringer Intensität, was auf unvollständige Methylierung zurückzuführen war. Die Ionenspuren für vier-, fünf- und sechsfach methylierte Addukte enthielten ebenso Peaks mit geringer Intensität, welche durch die als Nebenreaktion ablaufende Methylierung der GSH-Aminogruppen entstanden (Anhang A1.30). Das Vorhandensein der intensivsten Produkt-Peaks in der Ionenspur für dreifach methylierte Addukte, war auf die Methylierung von zwei Carboxylgruppen und einer Ketogruppe in der Adduktstruktur zurückzuführen (**Tab. 4**). Die Produktionenscan-Massenspektren der methylierten Addukte wiesen Fragmentationen auf, die um 28 bzw. 42 Da erhöht waren (**Tab. 4**; Anhang A1.31). Somit wurde das Vorhandensein von drei methylierbaren Gruppen innerhalb der Hauptaddukten verifiziert, was das lineare GSH-Molekül und die Bindung von Adenin über eine Amidbindung an C1 von PAT bestätigte (**Abb. 40**).

**Tab. 4:** Molekülionen ( $[M + H]^+$ ) und Fragmentationen der nicht-methylierten (ohne Me) IGS<sub>H</sub>-PAT-Adenin-Mischaddukte 7.1 und 7.2 und nach Methylierung mit Diazomethan (mit Me). HPLC-MS/MS-Analyse im *enhanced* Produktionenscan-Modus (HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Ein Unterschied ( $\Delta$ ) im  $m/z$ -Verhältnis um 28 oder 42 Da weist auf zwei bzw. drei methylierte funktionelle Gruppen in den Molekül- oder Fragmentationen hin. Chromatogramm und Spektren der methylierten Addukte im Anhang A1.22. Glu, Glutaminsäure; Gly, Glycin; n.d.; Fragmentation nicht detektiert; n.m., Fragmentation nicht möglich.

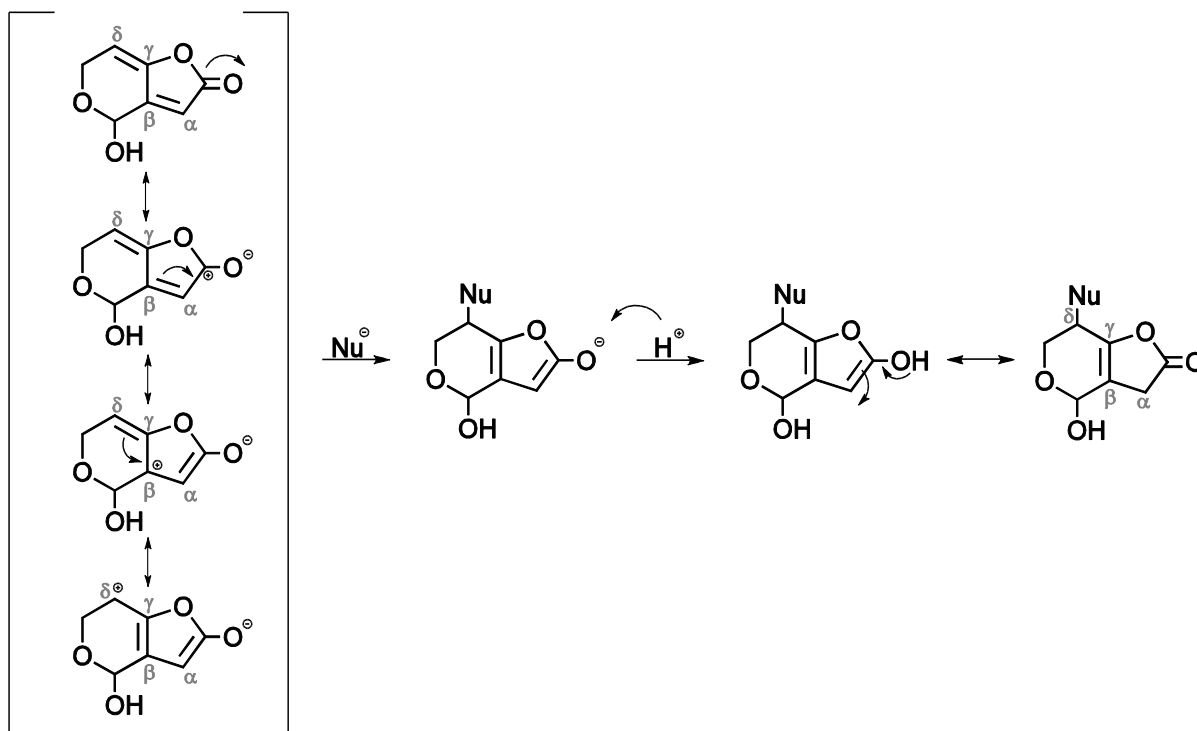


| Spaltposition    | Molekül-/Fragmentationen   | $m/z$   |        | $\Delta$ (Da) |
|------------------|--|---------|--------|---------------|
|                  |  | ohne Me | mit Me |               |
| ---              | $[M + H]^+$  | 569     | 611    | 42            |
| g                | $[- \text{Glu}]^+$   | 440     | 468    | 28            |
| b                | $[- \text{Adenin}]^+$  | 434     | 476    | 42            |
| b+a              | $[- \text{Adenin} - \text{H}_2\text{O}]^+$                             | 416     | 458    | 42            |
| g+a              | $[- \text{Glu} - \text{H}_2\text{O}]^+$                                | 422     | 450    | 28            |
| b+e              | $[- \text{Adenin} - \text{Gly}]^+$                                     | n.d.    | 387    | -             |
| b+e+a            | $[- \text{Adenin} - \text{Gly} - \text{H}_2\text{O}]^+$                | 341     | 369    | 28            |
| b+g+a            | $[- \text{Adenin} - \text{Glu} - \text{H}_2\text{O}]^+$                | 287     | 315    | 28            |
| b+g+a            | $[- \text{Adenin} - \text{Glu} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$               | 269     | n.m.   | -             |
| b+g+a+a''/a'''/h | $[- \text{Adenin} - \text{Glu} - \text{H}_2\text{O} - \text{OCH}_3]^+$ | n.m.    | 283    | -             |
| b                | $[\text{Adenin} + \text{H}]^+$   | 136     | 136    | -             |

### 3.1.2 Reaktionsmechanismus der Bildung von (Glutathion-)Patulin(-Adenin)-Addukten

Die PAT-Adenin-Monoaddukte und -Diaddukte, die neuartigen cyclischen und linearen GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte, sowie die bisher unveröffentlichten linearen und 6,7- bzw. 6,1-cyclischen GSH-PAT-Monoaddukte, weisen alle eine KHA-Struktur auf. Basierend auf dem Reaktionsschema, welches für die Reaktion von PAT mit Modell-Thiolen und -Aminen aufgestellt wurde (Fliege und Metzler, 2000a), wurde ein gemeinsames Reaktionsschema für die Bildung der (GSH-)PAT(-Adenin)-Addukte mit KHA-Struktur postuliert:

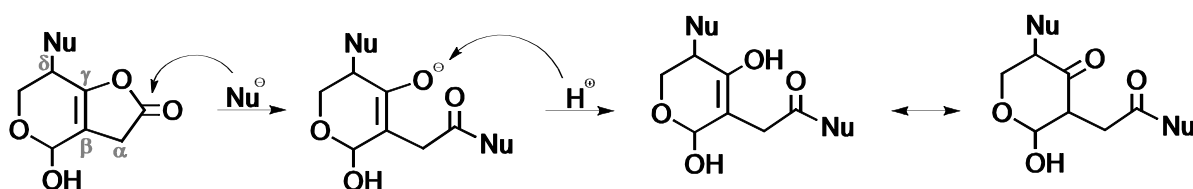
Die initiale Addition eines Nucleophils an ein  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigtes Carbonyl-System ist sowohl an der  $\beta$ -Position (entsprechend C3 von PAT, Michael-analoge 1,4-Addition) als auch an der  $\delta$ -Position (entsprechend C6 von PAT, Michael-analoge 1,6-Addition) möglich (zusammengefasst in Silva und Silva, 2012). Aufgrund von sterischen Effekten an C3 von PAT und der terminalen Ladungsverschiebung innerhalb des konjugierten Systems zur  $\delta$ -Position (C6 von PAT) findet der nukleophile Angriff am  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Lacton-Carbonyl-System von PAT in einer Michael-analogen 1,6-Addition statt (**Abb. 41**).



**Abb. 41:** Reaktionsschritt 1: Initialer nukleophiler Angriff eines Nucleophils (Nu) auf das  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Lacton-Carbonyl-System von PAT. Durch die Ladungsverschiebung im konjugierten System wird die  $\delta$ -Position (C6 von PAT) positiv geladen. Die Addition des Nu erfolgt an C6 von PAT. Nachfolgende Addition eines Protons führt zur Ausbildung eines  $\beta,\gamma$ -ungesättigten Enol-Lactons.

Dabei gilt die  $\delta$ -Position des  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigtes Carbonyl-System von PAT aufgrund der Polarisierbarkeit der Ladung als eine weiche elektrophile Position, die bevorzugt mit ebenso weichen Nucleophilen reagiert (Schultz et al., 2005). In den wässrigen Reaktionsmischungen zur Bildung von (GSH-)PAT-Adenin-Addukten waren drei Arten von Nucleophilen enthalten: i) GSH, dessen Thiolgruppe aufgrund des großen Atomradius des Schwefels und der dadurch bedingten Polarisierbarkeit der Elektronendichte, als ein weiches Nucleophil gilt, welches deswegen spontan mit Michael-Akzeptoren reagieren kann (zusammengefasst in Coles, 1985); ii) Aminogruppen von Adenin bzw. des Glutaminsäure-Restes des GSH-Moleküls, deren Elektronenpaar des Stickstoffatoms zwar auch polarisierbar ist, die Nucleophilie von Aminogruppen jedoch aufgrund des kleineren Ionenradius und der ausgeprägteren Elektronegativität als „härter“ einzustufen ist als die der GSH-Thiolgruppe (zusammengefasst in Coles, 1985; zusammengefasst in LoPachin und Gavin, 2014); iii) Wasser-Moleküle des Lösungsmittels, die harte Nucleophile darstellen (Pearson und Songstad, 1967). Daraus abgeleitet, ergibt sich als Reihenfolge der Reaktivität der möglichen Nucleophile mit C6 von PAT: Thiolgruppe>Aminogruppe>Wasser.

Die initiale Addition beseitigt nicht nur die Konjugation der Doppelbindungen, welche zuvor das Carbonyl-C1 von PAT inaktivierte, sondern führt zur Bildung eines  $\beta,\gamma$ -ungesättigtes Enol-Lacton, dessen Carbonyl-C reaktiv ist für einen weiteren nucleophilen Angriff (Cardellach et al., 1982). Das Carbonyl-C gilt als härteres Elektrophil (zusammengefasst in LoPachin und Gavin, 2014), welches somit wahrscheinlicher bevorzugter mit den nucleophilen Aminogruppen von Adenin oder des Glutaminsäure-Restes des GSH-Moleküls bzw. mit Wasser reagiert. Im Falle der Reaktion mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutaminsäure-Restes eines GSH-Moleküls, welches bereits an C6 von PAT gebunden ist, kommt es zur 6,1-Cyclisierung des GSH-Moleküls. Die Reaktion am Carbonyl-C führt zur Öffnung des Lactonrings unter Bildung eines Säurederivats an C1 und einer Ketogruppe an C7 infolge einer Enol-zu-Keto-Tautomerisierung (Abb. 42).



**Abb. 42:** Reaktionsschritt 2: Nucleophiler Angriff (Nu) auf das Carbonyl-C des  $\beta,\gamma$ -ungesättigten Enol-Lactons von PAT unter Öffnung des Lactonrings und Bildung eines Säurederivats an C1. Anschließende Addition eines Protons an C7 von PAT führt zur Enol-zu-Keto-Tautomerisierung.

Eine analoge Reaktion mit zwei Nucleophilen wurde für das strukturell ähnliche  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigte Lacton Protoanemonin beschrieben, einem  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Lacton mit einer exocyclischen Doppelbindung in  $\gamma,\delta$ -Position (Bigorra et al., 1985). Dabei wurde das Nucleophil Piperidin zunächst in einer Michael-analogen 1,6-Addition an die  $\delta$ -Position addiert und anschließend reagierte ein weiteres Molekül mit dem aktivierten Carbonyl-C des entstandenen Enol-Lactons unter Öffnung des Lactonrings infolge einer Aminolyse.

Auf den Angriff des zweiten Nucleophils folgt eine Öffnung des Halbacetal-Rings, mit anschließender Eliminierung von C4 des PAT-Rückgrats (Abb. 43, Fliege und Metzler, 2000a).

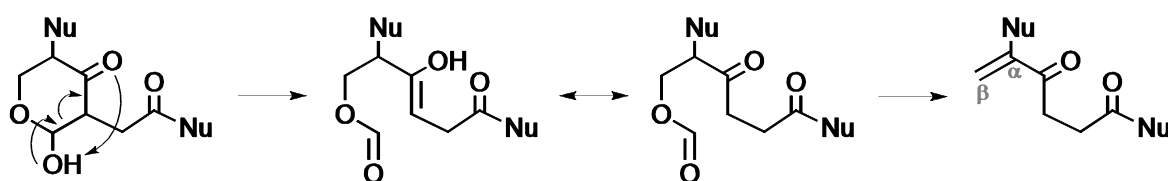


Abb. 43: Reaktionsschritt 3: Öffnung des Halbacetal-Rings und Eliminierung des C4-Kohlenstoffatoms von PAT unter Bildung eines  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketons (nach Fliege und Metzler, 2000a).

Hierbei wird als weiteres reaktives Zwischenprodukt ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Keton gebildet, welches in einer Michael-analogen 1,4-Addition mit einem weiteren nucleophilen Molekül reagiert (Abb. 44, Fliege und Metzler, 2000a). Als weiche elektrophile Position sollte die Reaktion an C5 bevorzugt mit weichen Nucleophilen ablaufen.

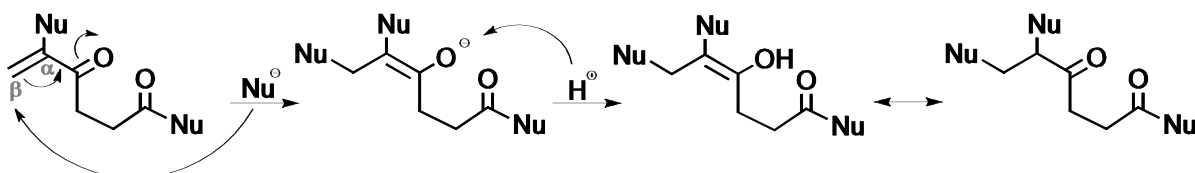


Abb. 44: Reaktionsschritt 4: 1,4-Addition eines weiteren Nucleophils (Nu) an das  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Keton. Anschließende Addition eines Protons an C7 von PAT führt zur Enol-zu-Keto-Tautomerisierung unter Bildung eines KHA-Derivats als stabiles Endprodukt.

Im Falle eines GSH-Moleküls an C5 oder C6 von PAT kann es zudem zu einer intramolekularen Cyclisierungsreaktion durch Reaktion der  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutaminsäure-Restes mit der C7-Carbonylgruppe von PAT kommen (5,7- bzw. 6,7-Cyclisierung). Zu welchem Zeitpunkt des Reaktionsmechanismus diese Cyclisierungsreaktion stattfindet, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt.

Anhand dieses Reaktionsschemas lässt sich die Bildung aller (GSH-)PAT(-Adenin)-Addukte des KHA-Typs herleiten (Tab. 5):

### PAT-Adenin-Addukte

Im Falle der PAT-Adenin-Monoaddukte 1.1-1.3, deren C1-Carboxylgruppe frei vorliegt (Kapitel 3.1.1.1), ist die Bindung des Adenin-Moleküls sowohl an C6, als auch an C5 von PAT möglich. Bei der Reaktion von PAT mit einem fünffachen Überschuss des Modell-Amins Bromanilin in methanolischem Phosphatpuffer (pH 7,0) bei 60°C wurden, neben C6-, auch C5-substituierte PAT-Amin Addukte beschrieben (Fliege und Metzler, 2000a), die infolge initialer Addition von OH an C6 von PAT und anschließender Reaktion des Amins mit C5 von PAT entstanden waren. Die Substitution von Adenin an C5 konnte anhand der massenspektrometrisch-basierten Daten nicht ausgeschlossen werden. Unter der Annahme, dass die initiale Addition an der weichen elektrophilen Position C6 unter den verwendeten Inkubationsbedingungen (RT, pH 7,4) bevorzugter mit den weniger harten nukleophilen Aminogruppen von Adenin reagiert, als mit dem harten Nukleophil Wasser, scheint die initiale Reaktion durch Michael-analoge Addition eines Stickstoffatoms von Adenin an C6 von PAT, gefolgt von der Hydrolyse des Lactonrings und anschließender Addition von OH an C5 von PAT der bevorzugte Reaktionsweg zu sein.

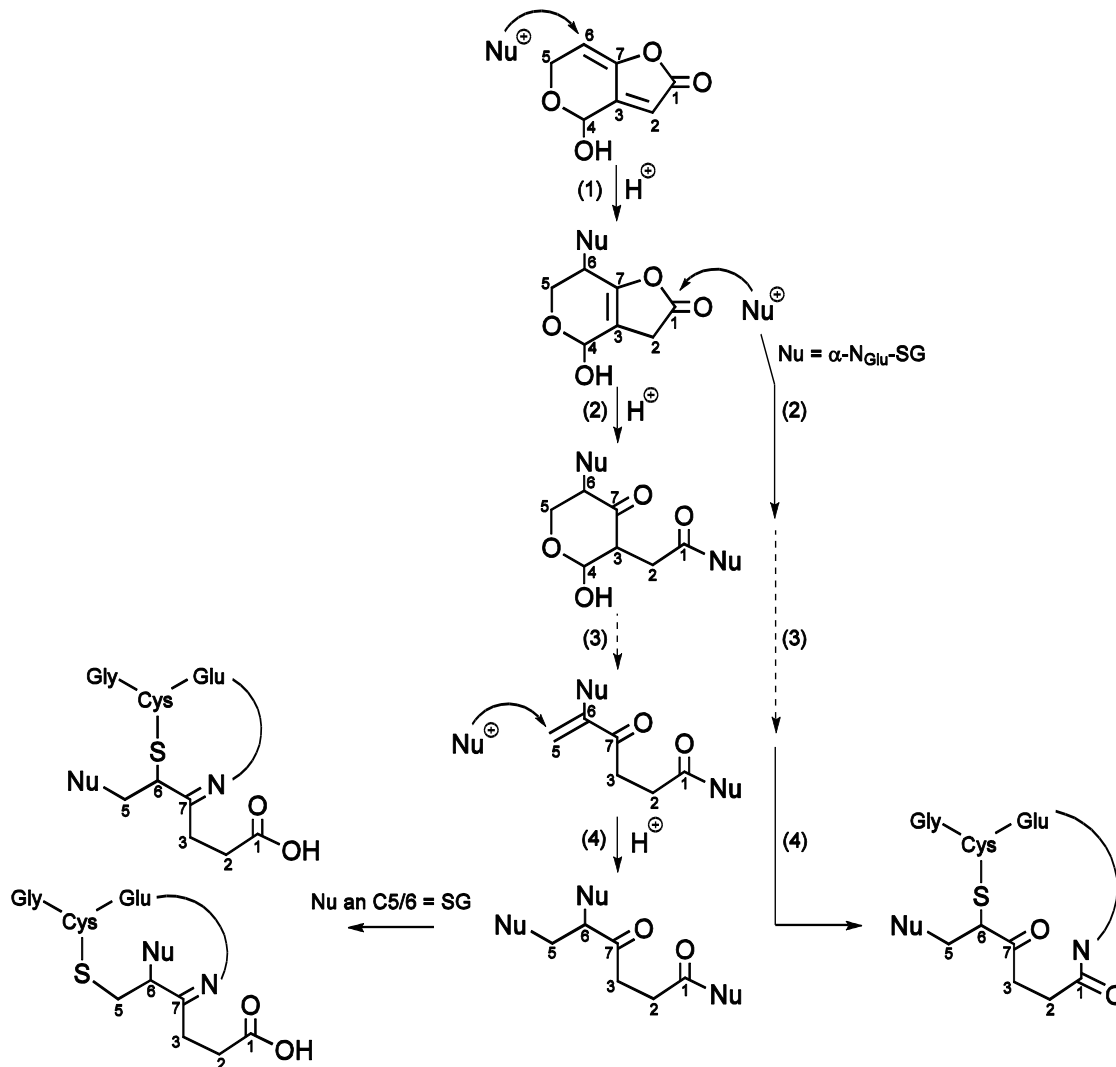
Die Bildung der PAT-Adenin-Diaddukten 2.1 und 2.2 wurde ebenso durch die initiale Addition von Adenin an C6 von PAT gestartet. Nach Hydrolyse des Lactonrings folgte die erneute Addition eines Adenin-Moleküls an C5 von PAT.

### GSH-PAT-Addukte

Das von Fliege und Metzler (2000b) identifizierte GSH-PAT-Addukt II (**Abb. 3**) vom KHA-Typ hat je ein GSH-Molekül an C6 und C5 gebunden und weist nach Hydrolyse des Lactonrings an C1 eine Carboxylgruppe auf. In den Studien von Fliege und Metzler (2000a,b) wurden keine Reaktionsprodukte des KHA-Typs von PAT mit C1-gebundenem GSH oder Modell-Thiolen identifiziert. Jedoch wurde ein 1, 5, 6-trisubstituiertes KHA-Addukt von PAT mit N-Acetyl-L-Cystein identifiziert, welches sich jedoch unter Hydrolyse der Thioesterbindung wieder in das disubstituierte KHA-Addukt mit C1-Carboxylgruppe umlagerte (Fliege und Metzler, 2000a). Die neu identifizierten GSH-PAT-Addukte (3, 4.1/1, 4.1/2 6.1 und 6.2), mit Ausnahme des Adduktes 4.2, haben ebenfalls an C1 eine Carboxylgruppe gebunden. Beim GSH-PAT-Addukt 4.2 hingegen reagierte die  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutaminsäure-Restes des an C6-gebundenen GSH-Moleküls mit der C1-Carbonylgruppe unter Aminolyse des Lactonrings.



**Tab. 5:** Vereinfacht dargestellter Reaktionsmechanismus der Bildung von (GSH-)PAT(-Adenin)-Addukten des KHA-Typs und Zuordnung der in der Arbeit beobachteten Adduktpeaks aus Kapitel 3.1.1. Detaillierte Reaktionsschritte (1-4) siehe **Abb. 41 - Abb. 44**. I, lineares GSH-Molekül (SG); c, cyclisches GSH-Molekül; N<sub>Glu</sub>, α-Aminogruppe der GSH-Glutaminsäure, N<sub>Adenin</sub>, Stickstoffatom von Adenin \*, genaue Position von Adenin (C6 oder C5) nicht aufgeklärt; \*\*, Cyclisierung des GSH-Moleküls an C5 oder C6 möglich.



| Addukte mit KHA-Struktur              | Nu an                          |                     |                                |
|---------------------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|
|                                       | C6                             | C1                  | C5                             |
| <b>PAT-Adenin-Addukte</b>             |                                |                     |                                |
| PAT-Adenin 1.1, 1.2, 1.3 *            | N <sub>Adenin</sub> / OH       | OH                  | OH / N <sub>Adenin</sub>       |
| PAT-Adenin 2.1, 2.2                   | N <sub>Adenin</sub>            | OH                  | N <sub>Adenin</sub>            |
| <b>GSH-PAT-Addukte</b>                |                                |                     |                                |
| GSH-PAT 3                             | <i>l</i> -SG                   | OH                  | OH                             |
| GSH-PAT 4.1/1, 4.1/2                  | 6,7- <i>c</i> -SG              | OH                  | OH                             |
| GSH-PAT 4.2                           | 6,1- <i>c</i> -SG              | N <sub>Glu</sub>    | OH                             |
| GSH-PAT II                            | <i>l</i> -SG                   | OH                  | <i>l</i> -SG                   |
| GSH-PAT 6.1, 6.2 **                   | <i>l</i> - / 6,7- <i>c</i> -SG | OH                  | <i>l</i> - / 6,7- <i>c</i> -SG |
| <b>GSH-PAT-Adenin-Addukte</b>         |                                |                     |                                |
| <i>c</i> GSH-PAT-Adenin 5.1, 5.2, 5.7 | 6,7- <i>c</i> -SG              | N <sub>Adenin</sub> | OH                             |
| <i>l</i> GSH-PAT-Adenin 7.1, 7.2      | <i>l</i> -SG                   | N <sub>Adenin</sub> | OH                             |

### GSH-PAT-Adenin-Addukte

Die GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte (5.1, 5.2, 5.7, 7.1 und 7.2) entstanden nach vorangegangener C6-Addition von GSH ebenso durch eine Aminolyse des Lactonrings infolge der Reaktion von Adenin mit dem C1-Carbonyl.

Somit waren alle charakterisierten Addukte durch Reaktion der C1-Carbonylgruppe mit Wasser bzw. mit Aminogruppen von Adenin oder des GSH-Glutaminsäure-Restes entstanden. Dies bestätigte die zuvor aufgestellte Vermutung, dass das härtere elektrophile Carbonyl-C des Enol-Lactons bevorzugter mit den härteren nukleophilen Aminogruppen von Adenin oder des Glutaminsäure-Restes des GSH-Moleküls bzw. mit dem harten Nukleophil Wasser reagierte.

Jedoch fiel auf, dass nach Addition von GSH an C6 von PAT sowohl Wasser, als auch die Aminogruppen von Adenin bzw. der Glutaminsäure mit C1 von PAT reagierten, während nach C6-Addition von Adenin das Lacton bei den Haupt-Mono- und Diaddukten ausschließlich hydrolysiert wurde. Die Addition des Thiols an C6 scheint somit die Reaktivität am C1-Carbonyl (gegenüber Aminogruppen) zu verändern. Cardellach et al. (1982) beschrieben für ein in  $\delta$ -Position (entsprechend C6) substituiertes  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Lacton

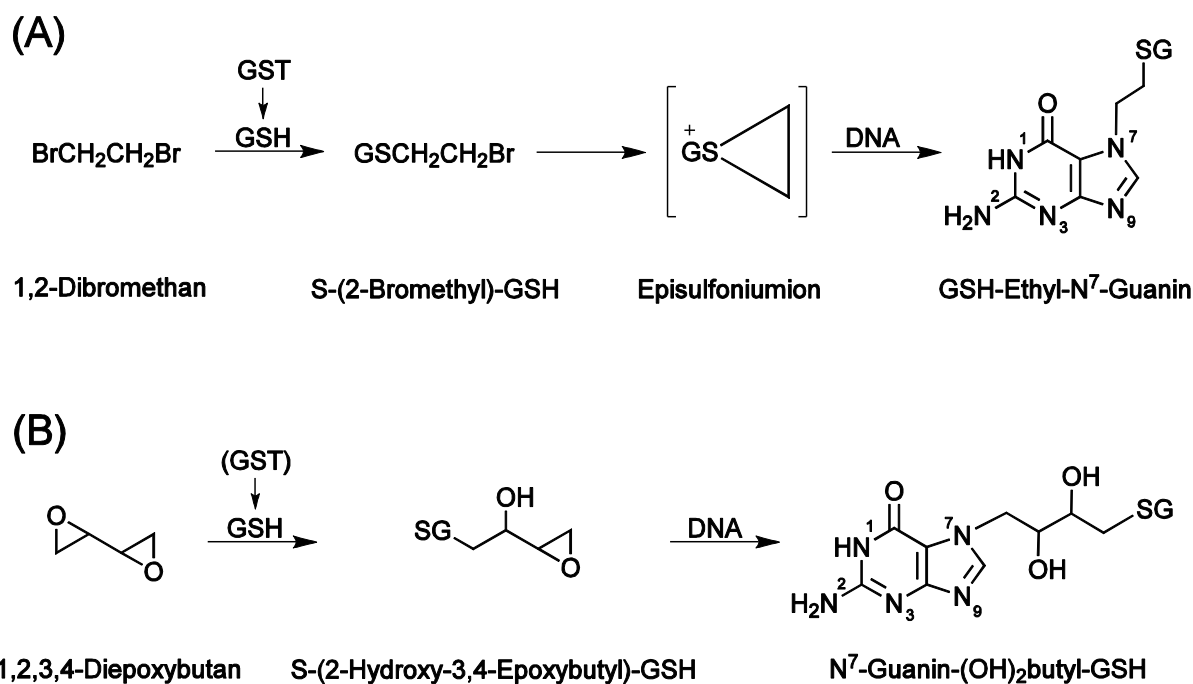
eine Erhöhung der Acitität des Protons in  $\gamma$ -Position und dadurch eine vermehrte Isomerisierung der  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung, wenn sich ein neutrales, weiches Nukleophil in  $\delta$ -Position befindet. Darauf basierend wurde vermutet, dass die Addition des weichen Nukleophils GSH an C6 die Reaktivität des Enol-Lacton-Carbonyl-C gegenüber Aminogruppen beeinflusst, und sich diese von der Reaktivität des Carbonyl-C nach C6-Addition der härteren nukleophilen Aminogruppen unterscheidet.

### Besonderheit des Bildungsmechanismus der GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte

Die Bildung von gemischten GSH-DNA-Basen-Addukten wurde bisher nur für 1,2-Dihaloalkane sowie 1,2,3,4-Diepoxybutan (DEB) beschrieben (zusammengefasst in Guengerich, 2003; Cho et al., 2010). Aufgrund der strukturellen Unterschiede der elektrophilen Substanzklassen (Dihaloalkan, Epoxid und  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigtes Lacton) sollte deren Reaktionsmechanismus mit dem der Bildung der GSH-PAT-Adenin-Addukte verglichen werden.

Die als Lösemittel zum Einsatz kommenden 1,2-Dihaloalkane, wie 1,2-Dibromethan, werden GST-katalysiert mit GSH konjugiert, was mechanistisch eine nukleophile Substitutionsreaktion ( $S_N2$ ) darstellt. Das entstandene S-(2-Bromethyl)-GSH-Konjugat lagert sich dann zum eigentlichen reaktiven Intermediat, einem Ethyl-GSH-Episulfoniumion um.

Dieses stark elektrophile Intermediat reagiert mit den DNA-Basen unter Alkylierung (**Abb. 45 A**, zusammengefasst in Guengerich, 2003). *In vivo* wurde ausgehend von 1,2-Dibromethan das GSH-Ethyl-N<sup>7</sup>-Guanin als Hauptaddukt (**Abb. 45 A**) und zudem das GSH-Ethyl-N<sup>1</sup>-Adenin-Addukt identifiziert. Die Inkubation von 1,2-Dibromethan mit DNA führte *in vitro* zur Bildung von N<sup>2</sup>- und O<sup>6</sup>-Guanin Addukten, daneben wurden N<sup>6</sup>-Adenin und N<sup>4</sup>-Cytosin-Addukte synthetisch generiert (zusammengefasst in Guengerich, 2003).



**Abb. 45:** Aktivierung durch GSH-Konjugation. (A) Mechanismus der Aktivierung von 1,2-Dibromethan durch GST-katalysierte GSH-Konjugation unter Bildung eines N<sup>7</sup>-Guanin-Adduktes (modifiziert nach Guengerich, 2003). (B) Mechanismus der Aktivierung von 1,2,3,4-Diepoxybutan, einem Oxidationsprodukt von 1,3-Butadien, durch spontane oder GST-katalysierte GSH-Konjugation unter Bildung eines N<sup>7</sup>-Guanin-Adduktes (modifiziert nach Cho et al., 2010 und Cho und Guengerich, 2012) Die Reaktion von Diepoxybutan führt zur Bildung verschiedener Regioisomeren des Epoxy-GSH-Konjugats, welche auch reaktiv gegenüber DNA-Basen sind.

DEB gilt als eines der potentesten mutagenen Metaboliten des gasförmigen 1,3-Butadiens, welches hauptsächlich für die Produktion von Synthetikautschuk eingesetzt wird. In der Phase II-Reaktion reagiert DEB spontan oder GST-katalysiert mit GSH unter Öffnung eines Epoxidrings (**Abb. 45 B**, Cho et al., 2010). Bei dieser Reaktion handelt es sich mechanistisch um eine nukleophile Substitutionsreaktion (S<sub>N</sub>2), wobei die Abgangsgruppe gebunden bleibt und protoniert wird (zusammengefasst in Deponte, 2013; **Abb. 45 B**). Die entstehenden regioisomeren Epoxy-GSH-Konjugate sind weiterhin elektrophil und alkylieren DNA-Basen unter Bildung von N<sup>7</sup>-Guanin und N<sup>6</sup>-Adenin-Addukten *in vivo*, sowie N<sup>3</sup>-Adenin, N<sup>6</sup>-Adenin, N<sup>7</sup>-Guanin, N<sup>1</sup>-Guanin, N<sup>4</sup>-Cytosin und N<sup>3</sup>-Thymin *in vitro* (Cho und Guengerich, 2012).

PAT wird hingegen initial in einer Michael-analogen Addition mit GSH konjugiert, wobei als reaktive Zwischenstufe ein GSH-PAT-Intermediat mit Enol-Lacton-Struktur entsteht. Die DNA-Base reagiert anschließend in einer nukleophilen Addition mit dem reaktiven Carbonyl-C des Lactons und wird somit über eine Amidbindung an PAT gebunden.

Die chemische Reaktion, die zur Bildung der neuartigen GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte führt, unterscheidet sich somit mechanistisch von den Reaktionen, welche zur Bildung von gemischten GSH-DNA-Basen-Addukten von 1,2-Dihaloalkanen sowie DEB führen (Tab. 6).

**Tab. 6:** Vergleich der bereits publizierten GSH-DNA-Basen-Addukte mit den GSH-PAT-DNA-Basen-Addukten (zusammengefasst in Guengerich, 2003; Cho et al., 2010; Cho und Guengerich, 2012).

|  | PAT  | 1,3-Butadien                             | 1,2-Dibromethan                 |
|--|--|--|---------------------------------|
| Substanzklasse                                     | $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigtes Lacton | zweifach-ungesättigter Kohlenwasserstoff | 1,2-Dihaloalkan                 |
| Phase I-Aktivierung                                | ---  | 1,2,3,4-Diepoxybutan                     | ---                             |
| <i>Initiale Reaktion mit GSH</i>                   |  |  |                                 |
| Mechanismus der Konjugation                        | nukleophile Addition                               | nukleophile Substitution                 | nukleophile Substitution        |
| spontan oder GST-katalysiert                       | beides   | beides                                   | GST-katalysiert                 |
| reaktives Zwischenprodukt                          | PAT-GSH-Addukt mit Enol-Lacton-Struktur            | Epoxy-GSH-Konjugat                       | Alkyl-GSH-Epissulfoniumion      |
| <i>Reaktion des reaktiven Intermediats mit DNA</i> |  |  |                                 |
| Typ der kovalenten Bindung                         | Aminbindung  | Alkylierung                              | Alkylierung                     |
| Reaktive Angriffsstellen in DNA-Basen              | Stickstoffatome                                    | Stickstoffatome                          | Stickstoff- und Sauerstoffatome |
| <i>Reaktion des reaktiven Intermediats mit GSH</i> |  |  |                                 |
| Detoxifizierung möglich?                           | Ja   | Ja                                       | Ja                              |

Somit wurde anhand von PAT für die Substanzklasse der  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Lactonen/Carbonylen zum ersten Mal gezeigt, dass trotz GSH-Konjugation die direkte DNA-Reaktivität bestehen bleibt und somit nicht, wie bisher angenommen, das elektrophile Potential beseitigt wird.

### **3.1.3 Physiologische Einflussfaktoren auf die Bildung von (Glutathion-)Patulin-Adenin-Addukten**

Um die Reaktivität von PAT gegenüber DNA-Basen in An- und Abwesenheit von GSH zu bewerten, wurde in den bisherigen zellfreien Reaktionen PAT im Überschuss zu GSH und Adenin eingesetzt (1:0,5:0,5). Für eine bessere Beurteilung zur Bedeutung und Relevanz der neuartigen (GSH-)PAT-Adenin-Addukte als potentielle DNA-Addukte folgten nun weitere Untersuchungen, bei denen folgende zelluläre Aspekte berücksichtigt wurden: i) in der Zelle liegt GSH üblicherweise im Überschuss vor; ii) im Cytosol der Zelle kommen das GSH-konjugierende Enzym GST vor, welche die Adduktbildung von PAT beeinflussen könnten. Im Folgenden sollten nun zum einen die Bildung der (GSH-)PAT-Adenin-Addukte sowohl unter dem Einfluss der Anhebung des GSH/PAT-Verhältnisses (Kapitel 3.1.3.1), als auch der Anwesenheit von cytosolischem Protein mit GST untersucht werden (Kapitel 3.1.3.2).

#### **3.1.3.1 Bildung von (Glutathion-)Patulin-Adenin-Addukten in Abhängigkeit von der Glutathionkonzentration**

Um das Potential der Reaktivität von PAT gegenüber Adenin zu beurteilen, wurde in den vorangegangenen zellfreien Reaktionen, als Enkonzentrationen 1,6 mM PAT und je 0,8 mM GSH und Adenin verwendet. Da im zellulären Kontext die Mutagenität von PAT sowohl durch dessen Konzentrationen als auch durch den GSH-Spiegel beeinflusst wird (Kapitel 1.1.3), wurde nun die Reaktivität von PAT gegenüber Adenin bei ansteigenden GSH-Mengen betrachtet.

Hierfür wurden zunächst die Konzentrationsverhältnisse von PAT zu GSH kalkuliert, die im HPRT-Test zu PAT-induzierten Genmutationen in kultivierten V79-Hamsterzellen führten (Schumacher et al., 2005a):

Die unbehandelten V79-Zellen wiesen dabei einen intrazellulären GSH-Gehalt von 20 nmol GSH/10 Millionen Zellen auf (Schumacher et al., 2005a). Bezogen auf die Bedingungen des HPRT-Tests wurden durch die 6 Millionen V79-Zellen insgesamt 12 nmol GSH zur Verfügung gestellt (detaillierte Berechnung siehe Anhang A2.1). Durch eine Verringerung des GSH-Spiegels der Zellen auf 40%, entsprechend ca. 5 nmol GSH, wurde die Mutagenität im HPRT-Test signifikant erhöht. Dagegen wurde durch eine Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehalts auf etwa das dreifache die Mutagenität aufgehoben (Schumacher et al., 2005a).

Die niedrigste PAT-Konzentration, die noch zu Genmutationen im hprt-Lokus führte, lag bei 0,3  $\mu$ M (Schumacher et al., 2005a). Unter Annahme passiver Diffusion von PAT in die Zelle, kann dessen intrazelluläre Konzentration nicht die Konzentration im Inkubationsmedium (20

ml) übersteigen. Aufgrund der hohen Reaktivität von PAT in der Zelle kann jedoch von einem schnellen Entzug des PAT aus dem Diffusionsgleichgewicht ausgegangen werden. Dies führt folglich zu einem ständigen Zustrom von PAT aus dem Inkubationsmedium in die Zelle bis PAT verbraucht ist. Untersuchungen zur Auswirkung von 0,6  $\mu\text{M}$  PAT auf die Zellzyklus-Verteilung in V79-Zellen zeigten, dass PAT schon nach einer Inkubationszeit von 4,5 h bis 6 h vollständig abreagiert war (Schumacher et al., 2005b), weswegen auch bei einer PAT-Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  ein schnelles Abreagieren von PAT zu erwarten war. Somit stand im HPRT-Test der Gesamtmenge des verfügbaren PAT (6 nmol) ein zweifacher Überschuss an GSH (12 nmol) gegenüber. Durch Modulation des intrazellulären GSH-Spiegels wurde dieser auf ca. 5 nmol GSH erniedrigt bzw. auf ca. 36 nmol GSH erhöht.

Desweiteren wurde die Adeninmenge errechnet, die PAT in der Zelle zur Verfügung steht: Das diploide Genom des chinesischen Hamsters besteht aus ca.  $5,0 \times 10^9$  Basenpaaren, entsprechend  $5,4 \times 10^{-12}$  g (Hoosier, 1987). Unter Berücksichtigung des Basenpaar-Verhältnisses im Genom von Säugetieren mit 60% Adenin und Thymin, sowie 40% Guanin und Cytosin (Chargaff, 1950), entspricht dies einer Adeninmenge von  $1,6 \times 10^{-12}$  g pro V79 Zelle. Bezogen auf 6 Millionen Zellen wird eine Adenin-Stoffmenge von 72 nmol erreicht ( $M = 135$  g/mol; Berechnung siehe Anhang A2.1).

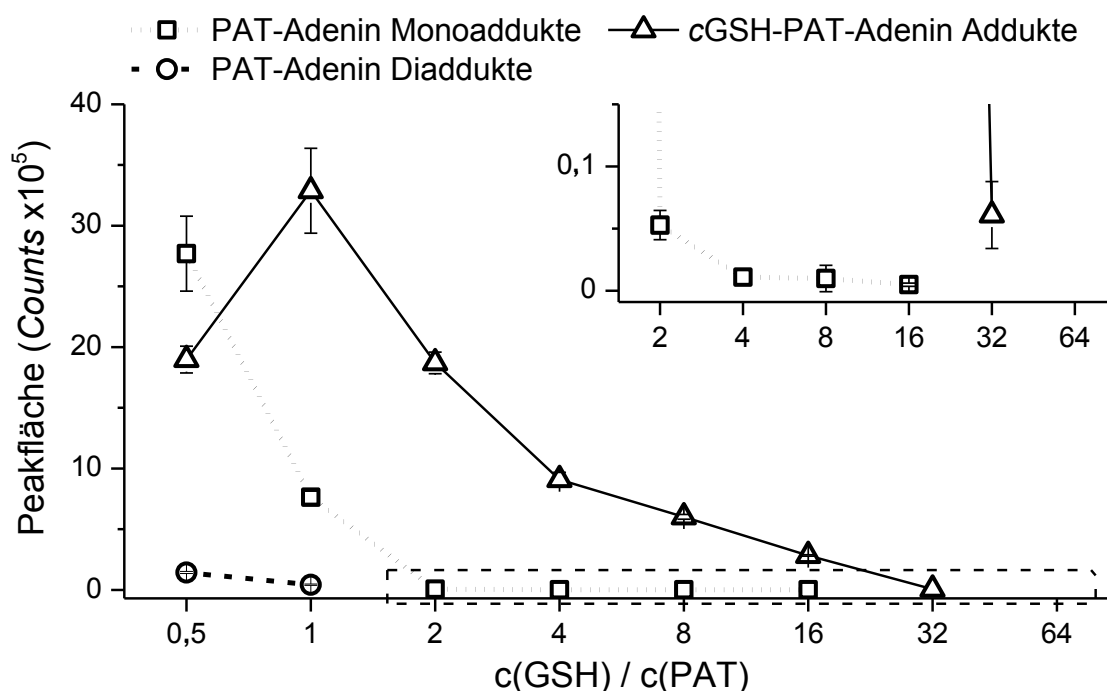
Die Konzentrationsverhältnisse belaufen sich somit auf 1:2:12 für Zellen mit normalem GSH-Gehalt, 1:0,8:12 für Zellen mit depletiertem GSH-Spiegel und 1:6:12 für Zellen mit erhöhtem GSH-Spiegel. Um sowohl ein niedriges als auch ein exzessives erhöhtes GSH-Level abzudecken, wurde der Anteil an GSH im Reaktionsgemisch auf das 0,5- bis 64-fache von PAT eingestellt. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit von Adenin, konnte nur ein PAT/Adenin-Verhältnis von 1:4 realisiert werden, wodurch die Reaktionen mit Adenin möglicherweise unterschätzt wurden.

Die Inkubationen wurden für drei Tage bei Raumtemperatur und pH 7,4 inkubiert (Kapitel 6.2.3.2) und nach Verdünnung (1+99, v+v) mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus analysiert. Wenn keine Addukte mehr detektierbar waren, wurden ebenso eine 1+9 (v+v)-Verdünnung analysiert und die Peakflächen auf die 1+99-Verdünnung zurückgerechnet.

Die größten Peakflächen der PAT-Adenin-Monoaddukte wurden bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 0,5:1 beobachtet (**Abb. 46**). Bereits ab einem zweifachen Überschuss an GSH sanken die Peakflächen auf <1%. Eine weitere Erhöhung auf den vierfachen GSH-Gehalt führte zu einer Verringerung der Peakflächen auf kleiner 0,1%, welche sich bis zum 16-fach GSH-Überschuss nicht mehr änderten. Ab einem 32-fachen Überschuss von GSH waren keine Addukte mehr detektierbar (**Abb. 46**). Die PAT-Adenin Diaddukte wiesen deutlich

geringere Peakflächen (<10%) auf und waren nur bis zu äquimolaren Konzentrationen an GSH detekierbar (**Abb. 46**).

Im Gegensatz dazu waren die Peakflächen der cGSH-PAT-Adenin-Mischaddukte bei äquimolaren Konzentrationen von GSH zu PAT am höchsten und sanken selbst bei 16-fachem GSH-Gehalt nur auf ca. 9% (**Abb. 46**). Ab einem 32-fachen Überschuss von GSH waren nur noch Peakflächen von <1% detekierbar. Bei 64-fachem Überschuss an GSH waren die Mischaddukte nicht mehr nachweisbar.



**Abb. 46:** Peakflächen der PAT-Adenin-Monoaddukte und -Diaddukte und GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte in Abhängigkeit des GSH/PAT-Verhältnisses ( $c(\text{GSH}) / c(\text{PAT})$ ) in der Reaktionsmischung von PAT (0,8 mM) und Adenin (3,2 mM). Analyse mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus (GSH-PAT-Adenin-Addukte  $m/z$  551>136, CE 31 V; PAT-Adenin-Addukte  $m/z$  280>136, CE 35 V; PAT-Adenin-Diaddukte  $m/z$  397>262, CE 17 V; Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Wenn kein Symbol mehr dargestellt ist, bedeutet das, dass ab dem GSH-Gehalt keine Addukte mehr detekierbar waren. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen. Der gestrichelte Bereich ist im kleinen Diagramm vergrößert dargestellt. Rohdaten im Anhang A2.2.

Inkubation von PAT mit einem zweifachen Überschuss einer Thiolkomponente (Bromthiophenol oder Mercaptoethanol) und einem 100-fachen Überschuss von Ethanolamin, führten ebenso zur Bildung von Thiol-PAT-Amin-Mischaddukten, wohingegen keine reinen PAT-Amin-Addukte gebildet wurden (Fliege und Metzler, 2000a).

Ab einem 2-fachen Überschuss der Thiolkomponente im Reaktionsansatz wurde somit die Reaktion von PAT mit den Aminogruppen von Adenin deutlich zurückgedrängt. Basierend

auf dem postulierten Reaktionsmechanismus, der zur Bildung von PAT-Addukten mit KHA-Struktur führt (Kapitel 3.1.2 und Fliege und Metzler, 2000a,b), erfolgt der initiale Angriff eines Nucleophils an der  $\delta$ -Position (C6) der zweifach-ungesättigten Carbonyl-Struktur von PAT in Form einer Michael-ähnlichen Addition. Gemäß dem HSAB-Prinzip (Kapitel 3.1.2) reagieren ungesättigte Carbonyle mit dem als weiches Elektrophil einzustufenden C-Atom am Ende der konjugierten Struktur deutlich bevorzugter und schneller mit den ebenso weichen nucleophilen Thiolgruppen als mit härteren nucleophilen Stickstoffatome von Nucleobasen oder Proteinseitenketten (zusammengefasst in LoPachin et al., 2012; zusammengefasst in LoPachin and Gavin, 2014). Die direkte Reaktion von PAT mit Adenin spielte somit bereits in Gegenwart äquimolarer Mengen an GSH nur eine untergeordnete Rolle. Daher ist die Bildung von reinen PAT-Nucleobasen-Addukten, wahrscheinlich nur bei niedrigen intrazellulären GSH-Konzentrationen zu erwarten. Niedrige intrazelluläre GSH-Spiegel können beispielsweise auftreten, wenn GSH durch die Reaktion mit hohen Dosen anderer Elektrophile depletiert wurde.

Folglich käme als Ursache für die erhöhte Mutagenität von PAT bei verringertem intrazellulärem GSH-Spiegel, die direkte DNA-Reaktivität unter Bildung von PAT-DNA-Addukten durchaus in Frage.

Im Gegensatz zu den PAT-Adenin-Addukten sind die GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte noch bis zu einem 16-fachen GSH-Überschuss deutlich detekierbar. Die Ursache hierfür erklärt sich wiederum aus dem postulierten Reaktionsmechanismus (Kapitel 3.1.2): Durch die initiale Reaktion von PAT mit dem weichen Nucleophil unter Bildung eines GSH-PAT-Intemediats wird das Carbonyl-C des Lactonrings reaktiver. Dieses Carbonyl-C ist ein härteres Elektrophil, weshalb die Reaktion mit den ebenso härteren nucleophilen Stickstoffatomen von Adenin bevorzugter zu sein scheint als mit einem weiteren weichen GSH-Molekül. Als weiteres für die Reaktion mit dem Carbonyl-C in Frage kommendes hartes Nucleophil kann Wasser fungieren, was zur Bildung von GSH-PAT-Monoaddukten oder -Diaddukten (nach Reaktion mit einem weiteren Molekül GSH an C5 von PAT) führt (**Tab. 5**).

Auch wenn die absoluten Verhältnisse nicht einfach auf die zellulären Bedingungen übertragen werden können, scheint mehr GSH benötigt zu werden, um die Bildung der GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte mit KHA-Struktur zu verhindern. So bildeten sich bei einem Überschuss der Thiolkomponente bevorzugt Thiol-PAT-Addukte des TEEK-Typs (Fliege und Metzler, 2000a), von denen bisher keine Adduktbildung mit Aminen bekannt ist. Durch die Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehalts auf das zwei- bis dreifache wurde die Mutagenität von PAT in V79-Zellen aufgehoben (Schumacher et al., 2005a), wohingegen eine 1,3-fache Anhebung des GSH-Gehalts die Induktion von Mikrokernen in HepG2-Zellen zwar signifikant reduzierte, aber nicht verhinderte (Zhou et al., 2009).



Daneben ist natürlich zu berücksichtigen, dass PAT im zellulären Kontext mit zahlreichen anderen nukleophilen Reaktionspartnern, wie den Thiol- und Aminogruppen von Proteinen reagieren kann, wodurch die Reaktion von PAT mit intrazellulärem GSH und/oder Nucleobasen ebenso beeinflusst wird.

### **3.1.3.2 Einfluss der Glutathion-S-Transferase auf die Bildung von (Glutathion-) Patulin-Adenin-Addukten**

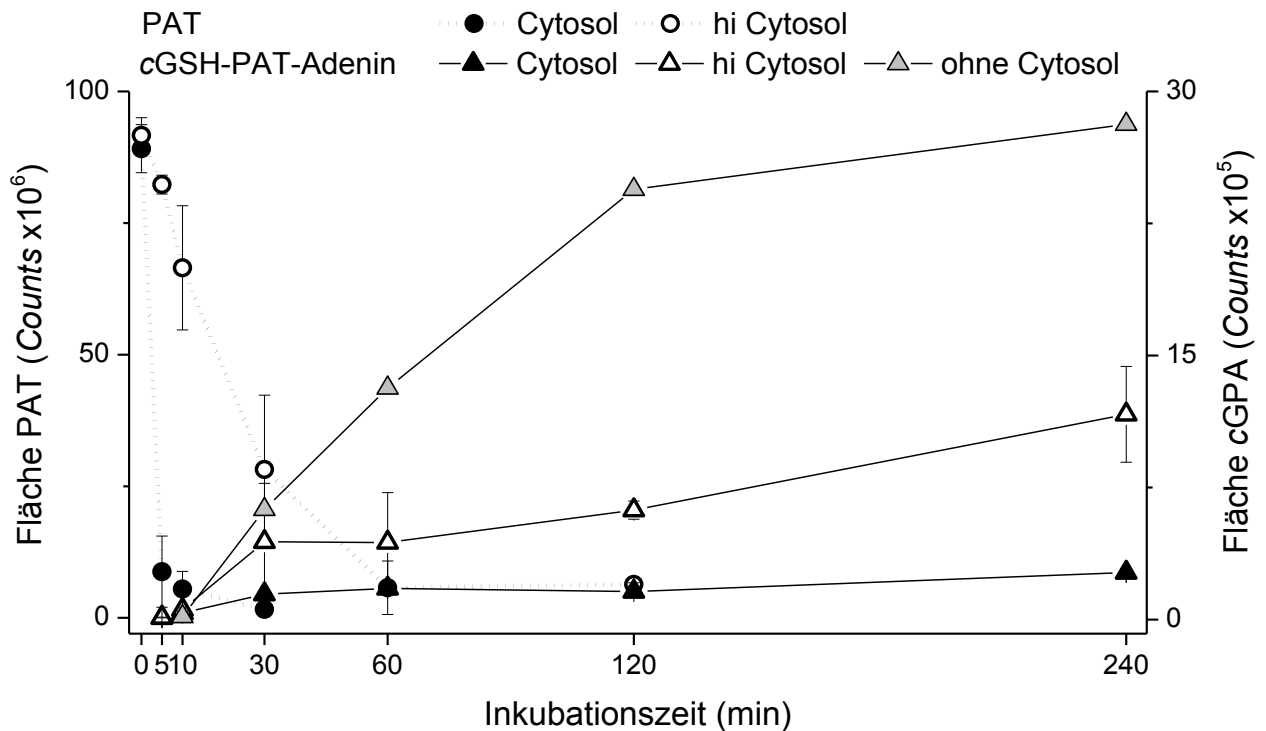
Da auf zellulärer Ebene die Konjugation von ungesättigten Carbonylen mit GSH sowohl spontan (Esterbauer et al., 1975), als auch durch das Enzym GST katalysiert (Boylund und Chasseau, 1967) abläuft, ist im zellulären System die Bildung von GSH-PAT-Addukten möglicherweise gegenüber der Bildung der PAT-Adenin- und GSH-PAT-Adenin-Addukte begünstigt. Somit wäre es möglich, dass die spontan ablaufende nukleophile Addition von GSH an PAT durch die Katalyse der GST noch beschleunigt wird und somit der nukleophile Angriff von Adenin verhindert wird.

Der Einfluss des Enzyms GST auf die Reaktion von PAT oder der GSH-PAT-Vorstufe mit Adenin, wurde anhand der Bildung der (cGSH-)PAT-Adenin-Addukte in Gegenwart von cytosolischer GST bzw. in Gegenwart von durch Hitze inaktiviertem Cytosol über einen Zeitraum von bis zu 4 h betrachtet (Kapitel 6.2.3.6). Um hierbei physiologisch ähnliche PAT:GSH:Adenin-Verhältnisse einzusetzen, wurden 250 µM PAT und ein vierfacher Überschuss an Adenin in Anwesenheit von Rattenlebercytosol mit 497 µM GSH und 2,9 mg cytosolischem Gesamtprotein inkubiert (Kapitel 6.2.2 und 6.2.3.6, Charakterisierung des Cytosols im Anhang A2.3). Durch die Hitzedenaturierung der cytosolischen Proteine wurde die GST-Aktivität von ursprünglich 0,8 µmol CDNB/min/mg Protein auf <0,6% reduziert (Anhang A2.3).

In Gegenwart von aktiver GST war der PAT-Peak schon nach 5-minütiger Inkubationszeit auf ca. ein Zehntel der ursprünglichen Fläche reduziert, und nur bis zu einer Inkubationszeit von 30 min noch detektierbar (**Abb. 47**). Bei Inkubation mit hitzeinaktiviertem Cytosol nahm die Peakfläche von PAT in den ersten 5 bis 10 min deutlich langsamer ab, so dass bei 30-minütiger Inkubationszeit noch rund 40% der Peakfläche vorhanden waren. Mit hitzeinaktiviertem Cytosol war PAT noch für mindestens 2 h nachweisbar.

Wie erwartet war die Bildung der cGSH-PAT-Adenin-Addukte am höchsten in Puffer ohne Cytosol und nahm durch die Anwesenheit des hitzeinaktivierten Cytosols ab (**Abb. 47**), was wahrscheinlicherweise durch die Reaktion von PAT mit Thiol- und Amino-Gruppen von cytosolischen Proteinen bedingt war. Die Anwesenheit der aktiven GST im nativen Cytosol

reduzierte die Bildung von cGSH-PAT-Adenin-Addukte weiter, verhinderte jedoch nicht die Bildung der Mischaddukte.



**Abb. 47:** Gesamtpeakfläche von PAT (Kreise) und den cGSH-PAT-Adenin-Mischaddukten 5.1 und 5.2 (cGPA, Dreiecke), welche durch Inkubation von PAT mit Adenin in Gegenwart von Rattenlebercytosol mit GSH ( $497 \pm 8 \mu\text{M}$ ) und aktiver GST ( $0,8 \pm 0,2 \mu\text{mol}$  2,4-Dinitrochlorbenzol/min/mg Protein, geschlossene Symbole) bzw. hitzeinaktiviertem (hi) Cytosol (offene Symbole) entstanden sind. Als Kontrolle diente die Adduktbildung in Gegenwart einer dem GSH-Gehalt des Cytosols angepassten GSH-Lösung (ohne Cytosol; grau-gefärbte Dreiecke). PAT-Adenin-Addukte wurden nicht detektiert. Analyse mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus (PAT  $m/z$  155>155, CE 5 V; cGSH-PAT-Adenin-Addukte  $m/z$  551>136, CE 31 V; Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Wenn kein Symbol dargestellt ist, waren kein PAT bzw. keine Addukte mehr detektierbar. Die Inkubationen mit Protein wurden in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Range/2. Die Inkubation ohne Cytosol erfolgte als Einfachbestimmung. Rohdaten im Anhang A2.4.

Die cGSH-PAT-Adenin-Mischaddukte wurden sowohl mit nativem als auch mit hitzeinaktiviertem Cytosol das erste Mal nach 5 min, bei Inkubation in Puffer nach 10 min detektiert (**Abb. 47**). Bis zu einer Inkubationszeit von 60 min waren, unter Berücksichtigung der Schwankungen, die Peakflächen der Mischaddukte in beiden cytosolischen Inkubationsansätzen nicht unterschiedlich. Nach 2 und 4 h, betragen die Peakflächen der Mischaddukte mit nativem Cytosol noch ca. 20-30% im Vergleich zu den Peakflächen der Mischaddukte mit hitzeinaktiviertem Cytosol. Aufgrund der deutlich schnelleren Abnahme der PAT-Peakfläche in Anwesenheit der GST, schien die initiale Reaktion von PAT mit GSH durch das Enzym GST katalysiert zu werden. Da sich die Peakflächen der Mischaddukte

zwischen den beiden Ansätzen bis zur 60-minütigen Inkubationszeit nicht unterschieden, war davon auszugehen, dass die anschließende Reaktion des GSH-PAT-Intermediats mit Adenin durch die Anwesenheit des aktiven Enzyms nicht wesentlich beeinflusst wurde. In dem Ansatz mit hitzeinaktiviertem Cytosol war nach 60 min noch unreakiertes PAT vorhanden, so dass es weiterhin zur Bildung der GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte und somit zum Anstieg der Flächen kommen konnte.

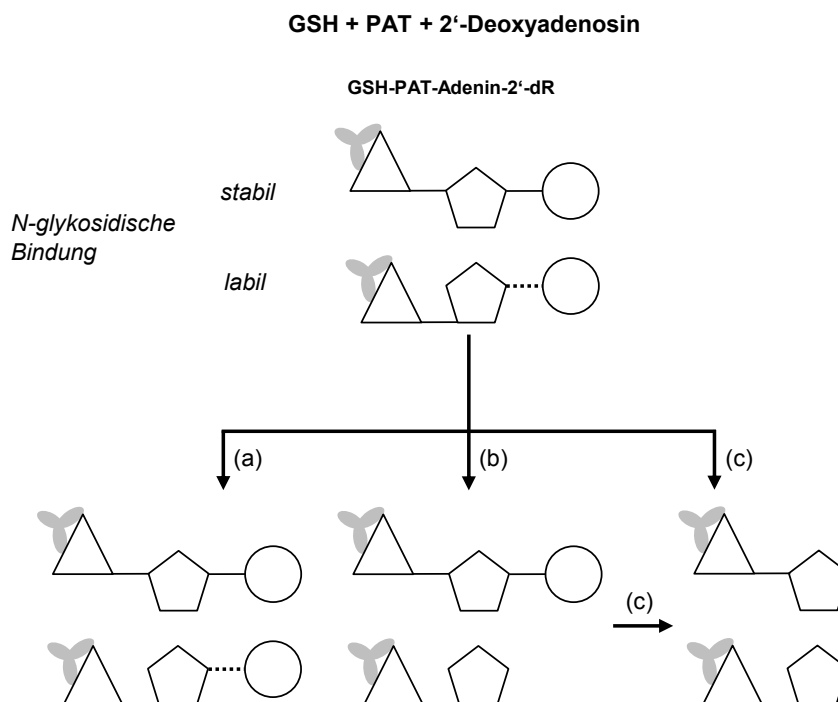
Die Bildung der GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte war somit auch in Anwesenheit der aktiven GST möglich. Reine PAT-Adenin-Monoaddukte wurden in keinem der beiden Ansätze detektiert. Die Verhinderung der Bildung von PAT-Adenin-Addukten ab einem zweifachen Überschuss von GSH zu PAT, wurde bereits durch die Inkubationsansätze mit variierender GSH-Konzentration (Kapitel 3.1.3.1) gezeigt.

### 3.1.4 Charakterisierung der an der Adduktbildung mit Patulin beteiligten Stickstoffatome von Adenin

Das mutagene Potential eines DNA-Addukts hängt u.a. von der Position des Addukts an der DNA-Base ab (Jarabek et al., 2009). DNA-Addukte an N<sup>3</sup> und N<sup>7</sup> von Adenin destabilisieren die N-glykosidische Bindung und können infolge der Bildung von apurinen Stellen die DNA-Stabilität beeinträchtigen (Kapitel 1.2.2). Addukte an den Basenpaar-Bindungsstellen (N<sup>1</sup>-, N<sup>6</sup>-Adenin) führen zu veränderten Wechselwirkungen innerhalb des DNA-Strangs und begünstigen die Entstehung von Basentransversionen (Kapitel 1.2.2).

Die glykosidische Bindung von 2'-Deoxynukleosid (dNuS)-Addukten, die die Bindung zum Zucker destabilisieren, kann spezifisch durch Erhitzen bei neutralem pH-Wert gespalten werden (zusammengefasst in Singh und Farmer, 2006; Kapitel 1.2.3). Im Gegensatz dazu ist die N-glykosidische Bindung von dNuS-Addukten am exocyclischen N<sup>6</sup> oder am N<sup>1</sup> nur durch saure Thermolyse zu spalten (zusammengefasst in Singh und Farmer, 2006). Aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeiten der glykosidischen Bindungen der 2'-Deoxyadenosin (dA)-Addukte gegenüber dem Erhitzen im Neutralen, waren Informationen über die an der Adduktbindung beteiligten Stickstoffatome der GSH-PAT-Adenin-Addukte (Kapitel 3.1.4.1) und der PAT-Adenin-Addukte (Kapitel 3.1.4.2) experimentell durch Inkubation von dA mit PAT in Gegenwart von GSH zugänglich. Hierfür wurde die Bildung der (cGSH)-PAT-dA-Addukte sowie der entsprechenden (cGSH)-PAT-Adenin-Addukte (a) ohne Thermolyse, (b) nach spezifischer Spaltung der destabilisierten N-glykosidischen Bindung der labilen Addukte durch neutrale Hydrolyse (100°C, 10 min) und (c) nach Spaltung der N-glykosidischen Bindung aller Addukte durch saure Thermolyse (1-molare HCl, 70°C, 30 min; Kapitel 6.2.6) mittels HPLC-MS/MS verglichen (**Abb. 48**). Um einen möglichen Zerfall der Addukte während der neutralen Thermolyse zu berücksichtigen, wurde in einer weiteren Reaktion die neutrale Thermolyse und anschließend sofort die saure Thermolyse (b+c) durchgeführt (**Abb. 48**).

Da die N-glykosidische Bindung innerhalb der dNuS-Struktur eine labile Stelle ist, die leicht durch kollisionsinduzierte Fragmentierung gespalten werden kann (zusammengefasst in Singh und Farmer, 2006), wurde zur Detektion der (cGSH-)PAT-dA-Addukte im MRM-Modus der Übergang vom Molekülion auf das Fragment nach Abspaltung der 2'-Deoxyribose gewählt. Zur Detektion der (cGSH-)PAT-Adenin-Addukte wurde der Übergang des Molekülions auf das Fragment nach Abspaltung von Adenin verwendet.



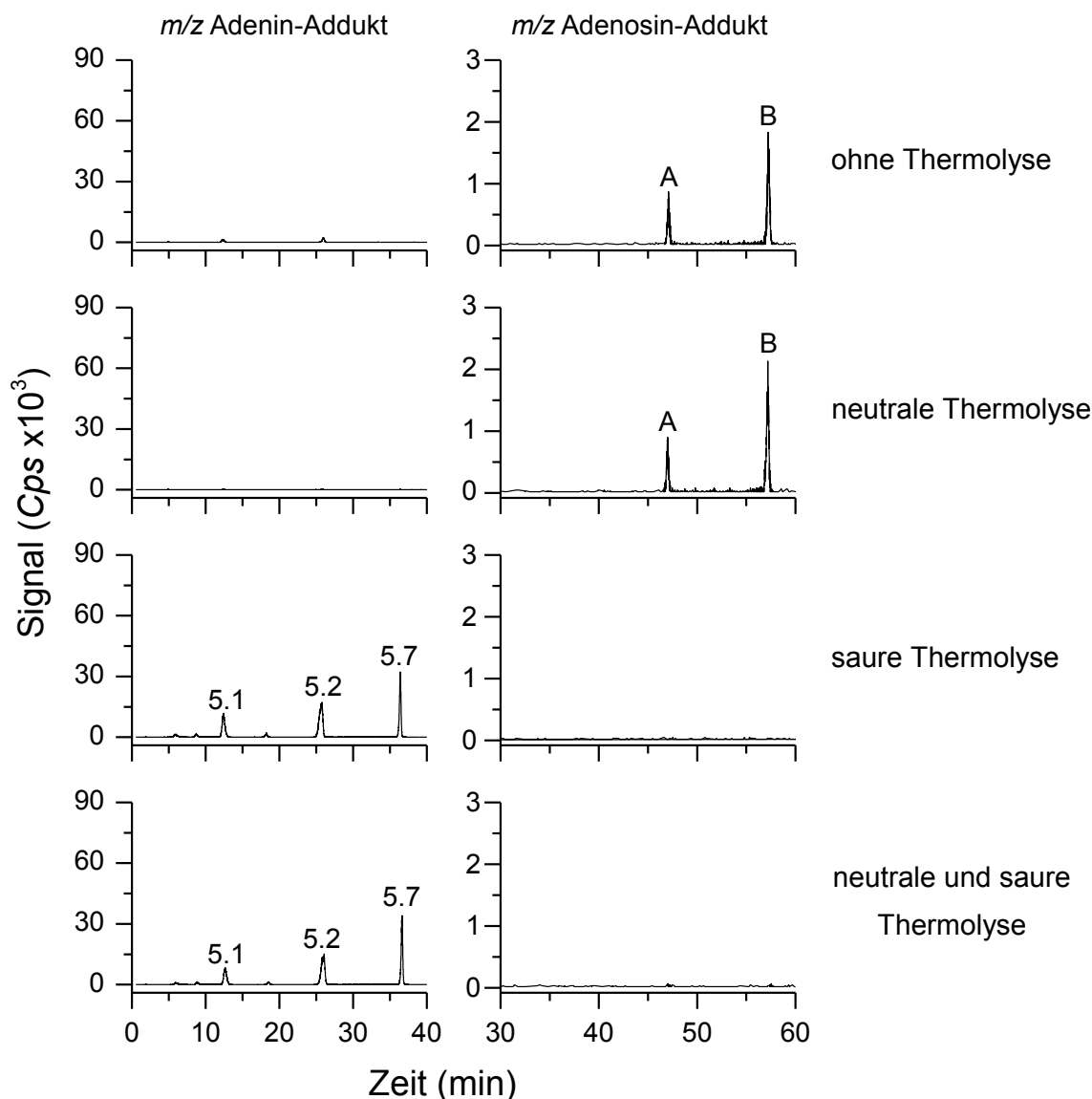
**Abb. 48:** Schematische Übersicht über die Versuchsdurchführung zur Charakterisierung der an der Bindung beteiligten Stickstoffatome von Adenin durch Untersuchung der Stabilität der N-glycosidischen Bindung von cGSH-PAT-2'-Deoxyadenosin-Addukten mittels Thermolyse (Kapitel 6.2.6) und anschließender HPLC-MS/MS-Analyse. Die Inkubation von PAT mit GSH und 2'-Deoxyadenosin wurde in vier Aliquote aufgeteilt und ein Aliquot bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt (a, ohne Thermolyse), ein Aliquot im Neutralen bei  $100^{\circ}\text{C}$  für 10 min erhitzt (b. neutrale Thermolyse), ein Aliquot mit 1 M HCl bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 30 min erhitzt (c, saure Thermolyse) und das vierte Aliquot erst neutral und anschließend saurer hydrolysiert (b+c).

### 3.1.4.1 Beteiligte Stickstoffatome in Glutathion-Patulin-Adenin-Addukten

In der Reaktionsmischung von PAT mit GSH und dA ohne Thermolyse und nach neutraler Thermolyse wurden zwei Peaks beim Übergang für cGSH-PAT-dA-Mischaddukte identifiziert (**Abb. 49**). Das Fragmentierungsmuster beider Adduktpeaks war gekennzeichnet durch ein intensives Fragmentation nach Spaltung der N-glycosidischen Bindung, welches das  $m/z$ -Verhältnis der cGSH-PAT-Adenin-Addukte aufwies ( $m/z$  551; Anhang A3.1). Daneben waren in den Produktionenscan-Massenspektren der dNuS-Addukte auch Fragmentationen enthalten, die auf die Abspaltung von Glycin und Adenin bzw. dA zurückzuführen waren (Anhang A3.1). Jedoch wurden nach neutraler Thermolyse neben den zwei cGSH-PAT-dA-Addukten keine cGSH-PAT-Adenin-Addukte detektiert (**Abb. 49**).

Im Gegensatz dazu waren nach saurer bzw. neutraler und saurer Thermolyse der Reaktionsmischung von PAT mit GSH und dA keine cGSH-PAT-dA-Mischaddukte mehr detektierbar (**Abb. 49**). Stattdessen wurden drei Peaks beim Übergang der Basen-Addukte detektiert, welche anhand der Retentionszeiten den cGSH-PAT-Adenin-Addukten 5.1, 5.2 und 5.7 zugeordnet wurden. Die N-glykosidische Bindung der dNuS-Addukte 5.1, 5.2 und 5.7

war somit während der neutralen Thermolyse stabil und wurde nur durch die saure Thermolyse gespalten. Bei den Addukten 5.1, 5.2 und 5.7, welche Adenin über eine Amidbindung an C1 von PAT gebunden haben (Kapitel 3.1.1.2.3), handelte es sich somit höchstwahrscheinlich um Addukte an N<sup>1</sup> oder N<sup>6</sup> von Adenin.



**Abb. 49:** MRM-Chromatogramme der GSH-PAT-dA-Addukte (links, GSH-PAT-dA  $m/z$  667  $[M+H]^+$  > 551  $[M+H-Deoxyribose]^+$ , CE 10 V) bzw. der GSH-PAT-Adenin-Addukte (rechts, GSH-PAT-Adenin,  $m/z$  551  $[M+H]^+$  > 136  $[Base+H]^+$ , CE 31 V), die ohne Thermolyse, nach neutraler Thermolyse (100°C, 10 min), nach saurer Thermolyse (1 M HCl, 70°C, 30 min) bzw. nach saurer und neutraler Thermolyse der Reaktionsmischung von PAT mit dA und GSH entstanden sind. Die Buchstaben A und B markieren die Peaks der GSH-PAT-dA-Addukte. Die Peakmarkierung der GSH-PAT-Adenin-Addukte entspricht den Kapiteln 3.1.1. HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1.

Das Addukt 5.7 wies nach saurer Thermolyse der Reaktionsmischung von PAT+GSH +Adenin zudem eine höhere Signalintensität als die Addukte 5.1 und 5.2 auf, welche die

Hauptaddukte nach Reaktion mit Adenin (**Abb. 32**) darstellten. Bei dem Addukt 5.7 könnte es sich, abgeleitet aus dem Fragmentierungsmuster (Kapitel 3.1.1.2.3), um ein cGSH-PAT-Adenin-Addukt handeln, welches mit der exocyclischen N<sup>6</sup>-Position von Adenin verknüpft ist. Möglicherweise läuft die Reaktion des GSH-PAT-Vorläufers mit N<sup>6</sup> von dA aufgrund des Einflusses der Deoxyribose an N<sup>9</sup> bevorzugt ab, weshalb nach saurer Thermolyse dieses Addukt als Hauptaddukt auszumachen war. So wurde auch für Diepoxybutan eine Verschiebung in der Reaktivität gegenüber der Stickstoffatome von Adenin oder dA, aufgrund der Anwesenheit der Deoxyribose in N<sup>9</sup>-Position beschrieben (Tretyakova et al., 1997).

Die Minor-GSH-PAT-Adenin-Addukte 5.3-5.6 wurden nach Inkubation mit dA und anschließender saurer Thermolyse nicht detektiert (**Abb. 49**). Somit könnte es sich entweder um (diastereomere) GSH-PAT-Adenin-Addukte handeln, die an N<sup>9</sup> von Adenin gebunden sind und somit aufgrund der Verknüpfung mit Deoxyribose in dA nicht durch die Reaktion mit PAT gebildet werden. Weiterhin wäre es jedoch auch möglich, dass die Addukte 5.3-5.6 nach Inkubation mit dA, aufgrund einer Verschiebung in der Reaktivität von PAT gegenüber bestimmten Stickstoffatomen von dA oder durch eine weniger ausgeprägte Reaktivität gegenüber dA nicht gebildet wurden und somit nach saurer Hydrolyse nicht detektierbar waren. So lieferte z.B. die Reaktion von Diepoxybutan mit dA viel geringere Adduktausbeuten als die Reaktion mit freiem Adenin (Tretyakova et al., 1997).

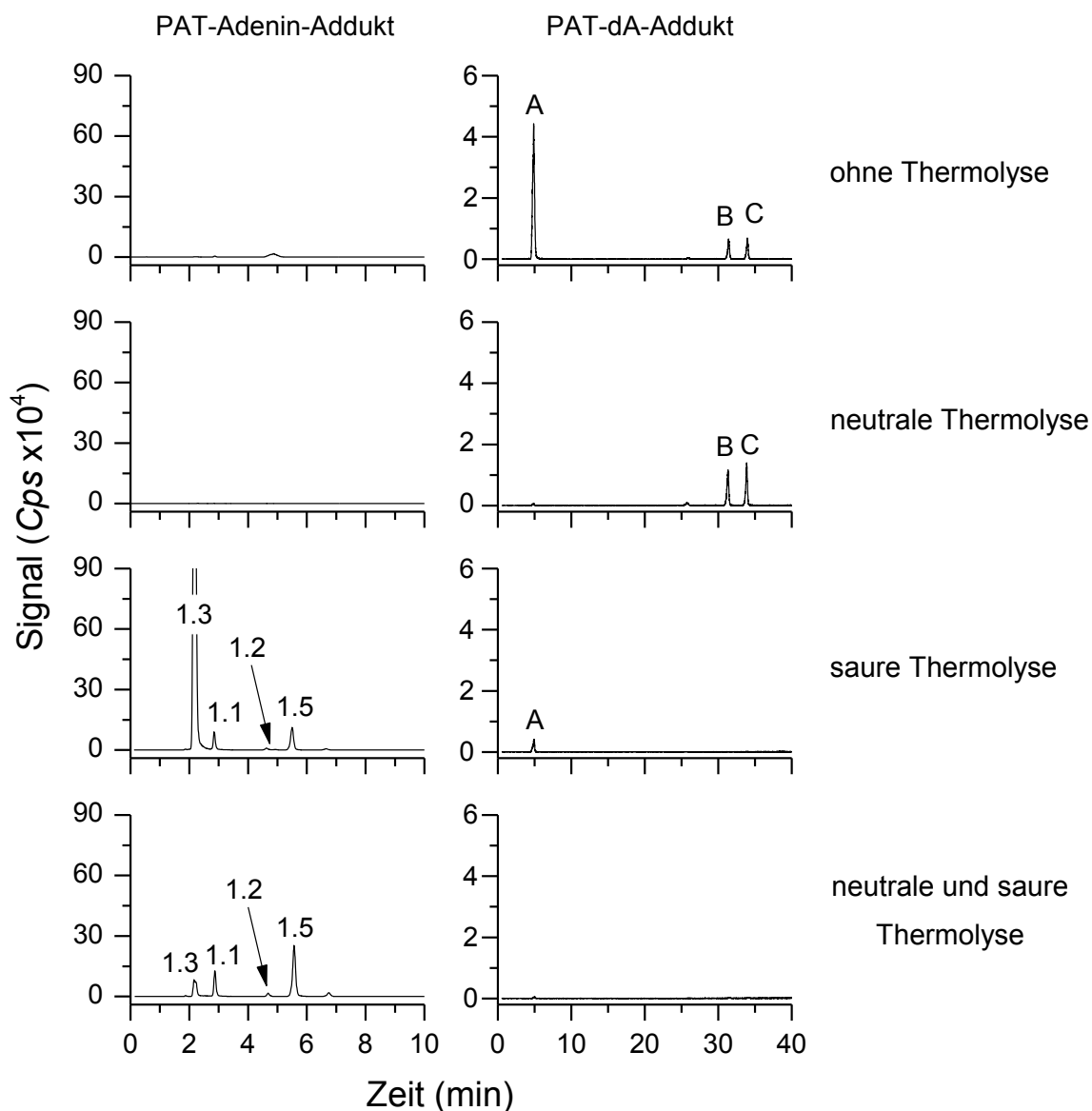
Addukte an der N<sup>1</sup>-Position von Adenin sind in der Lage sich infolge einer Ringöffnung durch die in N<sup>6</sup>-Adenin-Addukte umzulagern (Dimroth-Umlagerung; zusammengefasst in Gates, 2009). Sowohl das konstante Verhältnis der Peakintensitäten der GSH-PAT-dA-Addukte A und B ohne und nach neutraler Thermolyse und der GSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1, 5.2 und 5.7 nach saurer bzw. neutraler und saurer Thermolyse (**Abb. 49**) deuteten jedoch nicht auf eine Dimroth-Umlagerung hin.

#### **3.1.4.2 Beteiligte Stickstoffatome in Patulin-Adenin-Addukten**

In der Reaktionsmischung von PAT und dA ohne Thermolyse wurden drei Peaks als mögliche PAT-dA-Monoaddukte identifiziert (**Abb. 50**, Peak A-C). Auch in deren Fragmentierungsmustern ging das intensivste Fragmentation auf die Abspaltung der Deoxyribose zurück (Anhang A3.2). Daneben waren Fragmentationen nach Neutralverlust von Wasser-Molekülen und die Abspaltung von Adenin enthalten.

Die neutrale Thermolyse der Reaktionsmischung führte zum Verschwinden des PAT-dA-Adduktpeaks A unter gleichzeitiger Erhöhung der Signalintensitäten der PAT-dA-Adduktpeaks B und C (Verdopplung der Peakfläche; **Abb. 50**). Jedoch wurden infolge der neutralen Thermolyse keine PAT-Adenin-Addukte detektiert (**Abb. 50**). Somit war es durch

die neutrale Thermolyse nicht zu einer Spaltung der N-glykosidischen Bindung des PAT-dA-Adduktes A gekommen, sondern wahrscheinlich zu einer Umlagerung in die PAT-dA-Addukte B und C. Das Erhitzen von Lösungen mit N<sup>1</sup>-Adenin-Addukten wird beispielsweise angewandt, um diese Addukte durch Dimroth-Umlagerung in N<sup>6</sup>-Adenin-Addukten umzuwandeln (Tretyakova et al., 1997). Folglich könnte es sich bei dem PAT-dA-Addukt A um ein N<sup>1</sup>-Adenin-Addukt handeln, welches sich infolge der neutralen Thermolyse in die PAT-dA-Addukte B und C umwandelt.



**Abb. 50:** MRM-Chromatogramme der PAT-dA-Addukte (links, PAT-dA  $m/z$  396  $[M+H]^+ > 280 [M+H-Deoxyribose]^+$ , CE 10 V) bzw. der PAT-Adenin-Addukte (rechts, PAT-Adenin,  $m/z$  280  $[M+H]^+ > 136 [Base+H]^+$ , CE 35 V), die ohne Thermolyse, nach neutraler Thermolyse (100°C, 10 min), nach saurer Thermolyse (1 M HCl, 70°C, 30 min) bzw. nach saurer und neutraler Thermolyse der Reaktionsmischung von PAT mit dA und GSH entstanden sind. Die Buchstaben A, B und C markieren die Peaks der PAT-dA-Addukte. Die Peakmarkierung der PAT-Adenin-Addukte entspricht den Kapiteln 3.1.1. HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1.



Nach saurer Thermolyse der PAT-dA-Addukte wurden die PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2, 1.3 und 1.5 identifiziert (Kapitel 3.1.1.1). Das Monoaddukt 1.3 entstand dabei mit fast 10-fach höherer Signalintensität gegenüber der Addukte 1.1, 1.2 und 1.5 (**Abb. 50**).

Im Gegensatz dazu war die Signalintensität des Adduktes 1.3 nach neutraler und saurer Thermolyse erheblich kleiner als nur nach saurer Thermolyse. Folglich scheint das Addukt 1.3 aus dem PAT-dA-Addukt A hervorzugehen, welches infolge der neutralen Thermolyse verschwindet und somit zu erklären wäre, weshalb das Addukt 1.3 nach neutraler und saurer Thermolyse eine deutlich geringere Signalintensität aufweist als nur nach saurer Thermolyse. Während die Addukte 1.1 und 1.2 nach neutraler und saurer Thermolyse in etwa die gleiche Signalintensität aufwiesen wie nach saurer Thermolyse, war die Intensität des Adduktpeaks 1.5 nach saurer und neutraler Thermolyse ca. doppelt so hoch wie nach saurer Thermolyse (**Abb. 50**). Der Adduktpeak 1.5 könnte somit aus den PAT-dA-Addukten B und C hervorgegangen sein, deren Peakintensität infolge der neutralen Thermolyse zugenommen hatte. Das PAT-Adenin-Addukt 1.4 wurde nicht detektiert.

Folglich handelte es sich bei den PAT-dA-Addukten A, B und C höchstwahrscheinlich um stabile Addukte, da deren N-glykosidische Bindung erst infolge der sauren Thermolyse gespalten wurde. Aufgrund der beobachteten Umlagerungen sowohl der PAT-dA-Addukte, als auch der PAT-Adenin-Addukte während den Thermolysen war jedoch letztlich keine eindeutige Aussage möglich.

Durch die saure Thermolyse der (GSH-)PAT-Addukte mit dA wurden die meisten der zuvor charakterisierten (GSH-)PAT-Adenin-Addukte (Kapitel 3.1.1) erhalten: vier von fünf PAT-Adenin-Monoaddukten und drei von sieben cGSH-PAT-Adenin-Addukten. Ob die fehlenden Nukleobasen-Addukte aufgrund der nicht zugänglichen N<sup>9</sup>-Position innerhalb der dNuS, aufgrund von Verschiebung der Reaktivität bei Inkubation mit dA oder aufgrund von geringerer Adduktausbeute nach Inkubation mit dA zurückzuführen waren, konnte nicht abschließend geklärt werden. Es wurde durch die saure Thermolyse jedoch gezeigt, dass es sich, insbesondere bei den Hauptaddukten mit Adenin (Mischaddukte 5.1 und 5.2, Monoaddukte 1.1 und 1.3) nicht um Addukte handelte, die an N<sup>9</sup>-Adenin verknüpft und welche somit auf zellulärer Ebene gebildet werden können.

### 3.1.5 Reaktionsprodukte von Patulin mit weiteren DNA-Basen und 2'-Deoxynukleosiden

Nach Identifizierung und Charakterisierung der (GSH-)PAT-Adenin-Addukte, sowie nach Postulierung des Bildungsmechanismus, stellte sich die Frage, ob auch die anderen DNA-Basen nukleophile Reaktionspartner für PAT darstellen. Wie schon für die Purinbase Adenin postuliert, wäre die Reaktion von PAT mit jedem endo- oder exocyclischen Stickstoffatom der Purin- und Pyrimidinbasen möglich (**Abb. 5**).

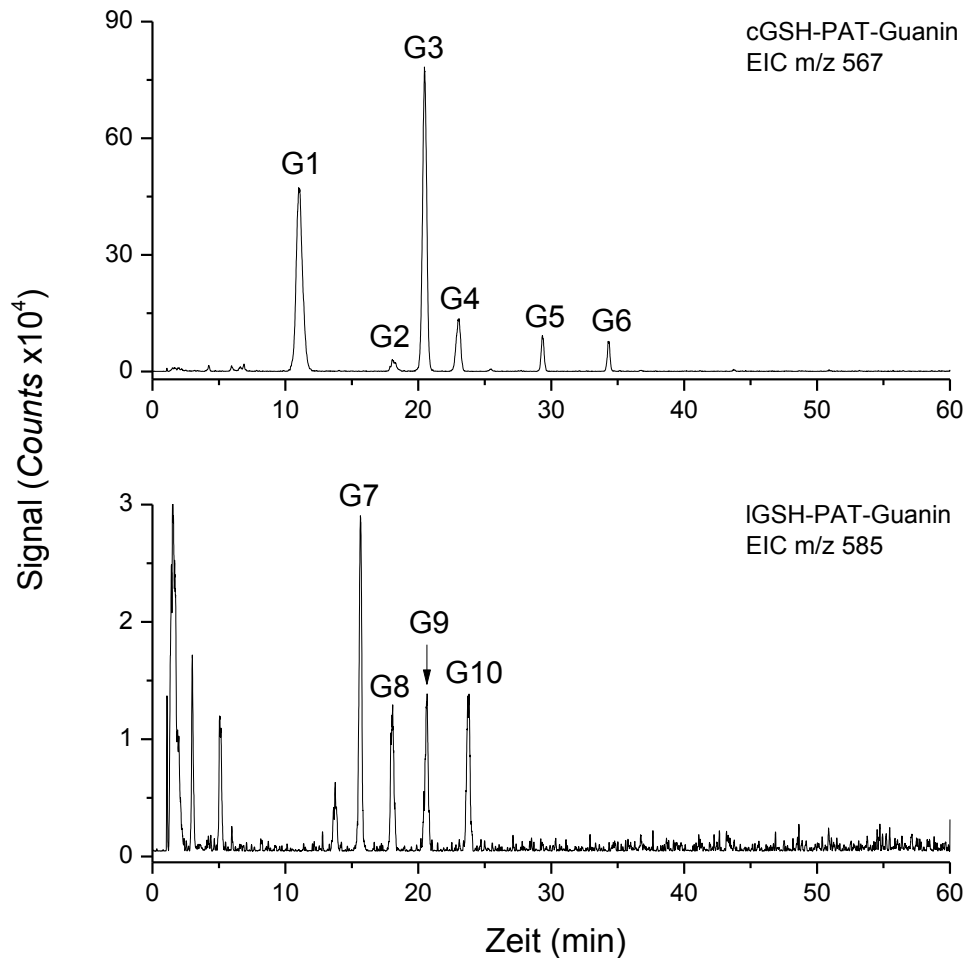
Daher wurde PAT (1,6 mM) in An- und Abwesenheit von GSH (0,8 mM) mit anderen DNA-Basen (je 0,8 mM) inkubiert und die Reaktionsansätze mittels HPLC-MS(/MS) auf die Bildung von gemischter GSH-PAT-DNA-Basen-Addukte (Kapitel 3.1.5.1) und PAT-DNA-Basen-Addukte (Kapitel 3.1.5.2) analysiert. Zudem wurde die Reaktivität gegenüber dNuS als eigentlichen nukleophilen DNA-Bausteinen untersucht (Kapitel 3.1.5.3).

#### 3.1.5.1 Bildung von gemischten Glutathion-Patulin-DNA-Basen-Addukten

Potentielle cyclische und lineare Mischaddukte wurden durch Extraktion des jeweiligen kalkulierten  $m/z$ -Verhältnisses aus den Vollscan-Analysen der Inkubationsmischungen (Kapitel 6.2.3.3) identifiziert und anschließend mittels kollisionsinduzierter Fragmentierung weiter charakterisiert.

##### Reaktivität gegenüber Guanin

Mit der Purinbase Guanin (**Abb. 5**) wurden sechs Adduktpeaks für cyclische und vier Adduktpeaks für lineare GSH-PAT-Guanin-Addukte gebildet (**Abb. 51**). Die Fragmentierungsmuster der GSH-PAT-Guanin-Mischaddukte waren gekennzeichnet durch ein intensives Fragmentation des abgespaltenen protonierten Guanin-Moleküls ( $m/z$  152, Anhang A4.1 A), welches ein charakteristisches Fragment für Addukte mit Guanin darstellt (Tretyakova et al., 2013). Daneben waren in den Produktionenscan-Massenspektren der cyclischen Addukte nur Fragmentationen enthalten, die auf die Abspaltung des Glycin-Rest zurückzuführen waren. Die linearen Mischaddukte hingegen wiesen Fragmentationen nach Abspaltung des Glycin-Restes und nach Neutralverlust von Pyroglutamat auf (Anhang A4.1 B).

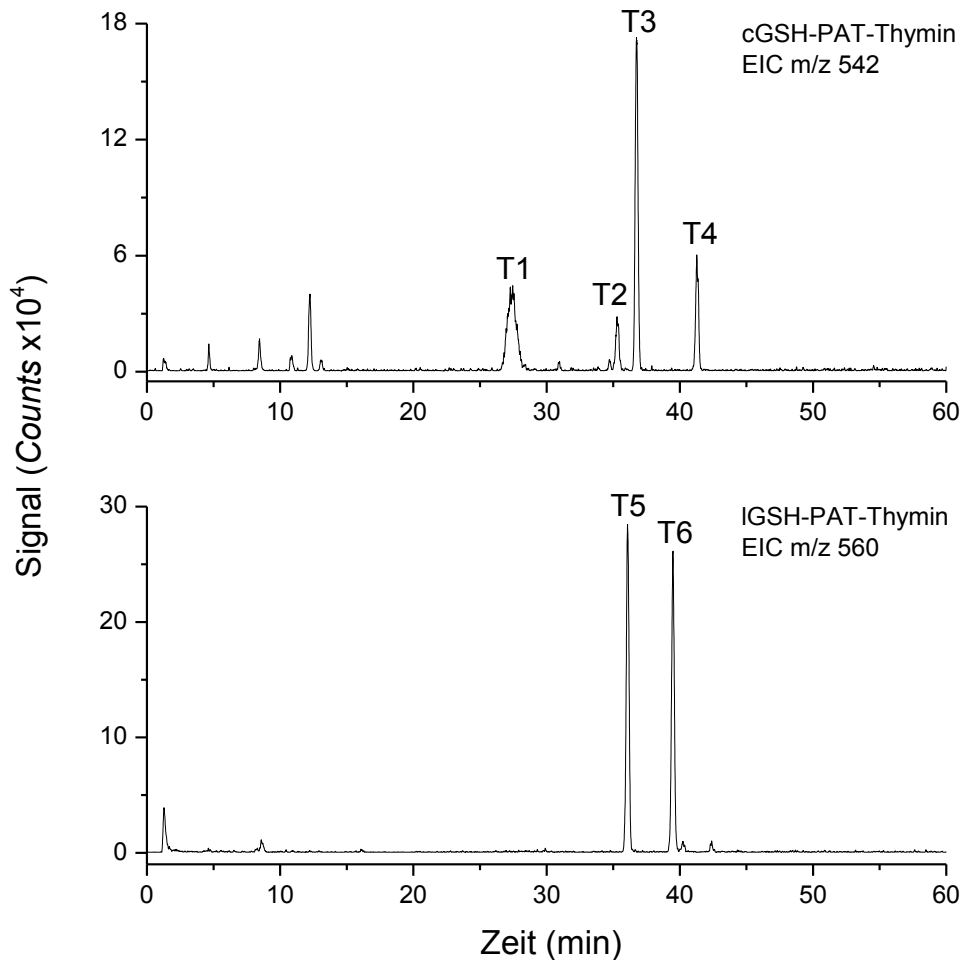


**Abb. 51:** EIC mit  $m/z$  567 der cyclischen GSH-PAT-Guanin-Reaktionsprodukte und EIC  $m/z$  585 der linearen GSH-PAT-Guanin-Reaktionsprodukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit GSH (0,8 mM) und allen DNA Basen (je 0,8 mM) gebildet wurden. Extraktion aus den Vollscan-Daten (HPLC-MS-Methode Kapitel 6.2.1.3).

### Reaktivität gegenüber Thymin

Auch für die Pyrimidinbase Thymin mit zwei sekundären Aminogruppen (**Abb. 5**) wurden vier cyclische GSH-PAT-Thymin-Adduktpeaks und zwei lineare GSH-PAT-Thymin-Adduktpeaks identifiziert (**Abb. 52**).

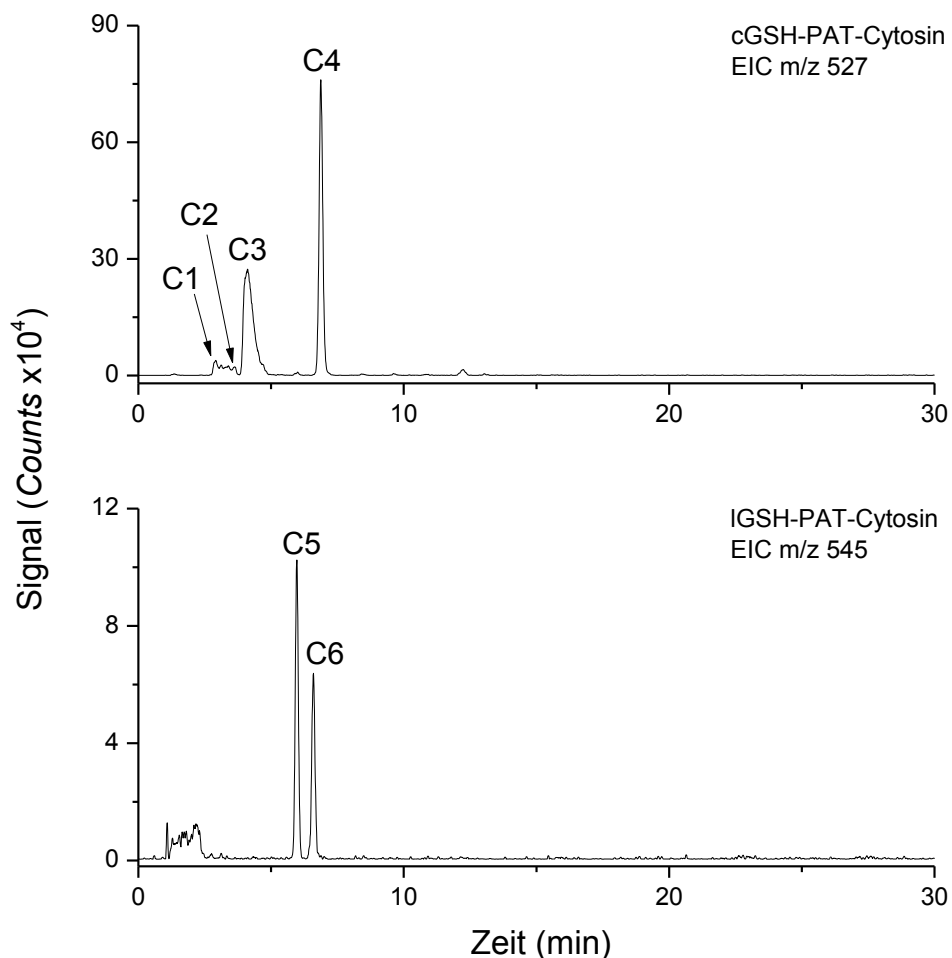
Wie bei den Fragmentierungsmustern der Mischaddukte mit Purinbasen, war auch das Fragmentation des protonierten abgespaltenen Thymin-Moleküls ( $m/z$  127) in den Massenspektren der Addukte enthalten (Anhang A4.2 A/B). Ebenso wurden alle anderen charakteristischen Fragmentierungen der cyclischen und linearen Mischaddukte auch für die GSH-PAT-Thymin-Addukte beobachtet (Anhang A4.2 A/B).



**Abb. 52:** EIC mit  $m/z$  542 der cyclischen GSH-PAT-Thymin-Reaktionsprodukte und EIC  $m/z$  560 der linearen GSH-PAT-Thymin-Reaktionsprodukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit GSH (0,8 mM) und allen DNA Basen (je 0,8 mM) gebildet wurden. Extraktion aus den Vollscan-Daten (HPLC-MS-Methode Kapitel 6.2.1.3).

### Reaktivität gegenüber Cytosin

Die Inkubation von PAT und GSH mit der Pyrimidinbase Cytosin (**Abb. 5**), welche je eine primäre, sekundäre und tertiäre Aminogruppe besitzt, führte zur Bildung von vier cyclischen und zwei linearen GSH-PAT-Cytosin-Mischaddukten (**Abb. 53**). Die Fragmentierungsmuster der Mischaddukte waren ebenfalls gekennzeichnet durch ein Fragmentation der unsubstituierten Base ( $m/z$  112) und durch die charakteristischen Fragmentierungen der cyclischen und linearen Mischaddukte (Anhang A4.3 A/B).



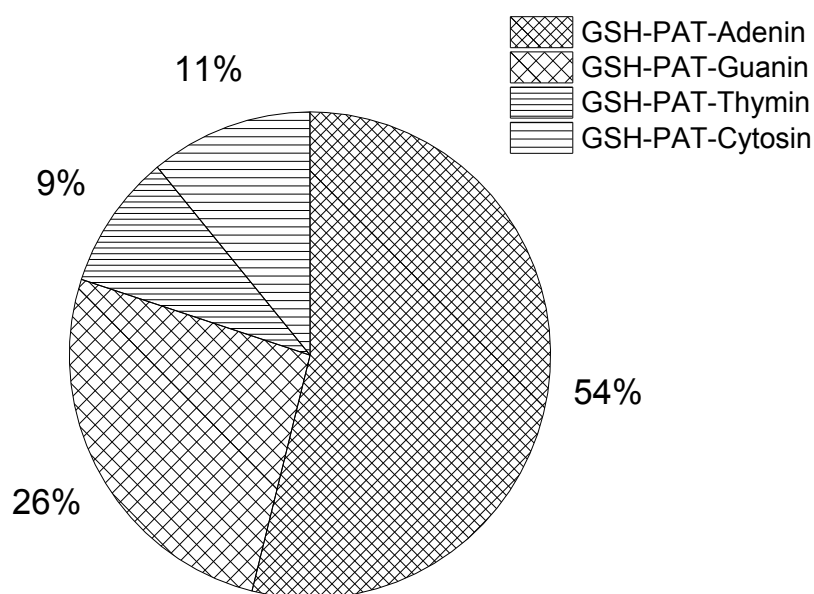
**Abb. 53:** EIC mit  $m/z$  527 der cyclischen GSH-PAT-Cytosin-Reaktionsprodukte und EIC  $m/z$  545 der linearen GSH-PAT-Cytosin-Reaktionsprodukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit GSH (0,8 mM) und allen DNA Basen (je 0,8 mM) gebildet wurden. Extraktion aus den Vollscan-Daten (HPLC-MS-Methode Kapitel 6.2.1.3).

Folglich war jede DNA-Base, aufgrund ihrer nukleophilen Stickstoffatome, ein möglicher Reaktionspartner für den GSH-PAT-Vorläufer.

#### Bevorzugte Reaktivität gegenüber Purin- oder Pyrimidinbasen

Um zu untersuchen, ob das initial gebildete GSH-PAT-Intermediäraddukt bevorzugter mit einer bestimmten DNA-Base reagiert, wurde, nach Inkubation von PAT mit GSH und einer Mischung von DNA-Basen und HPLC-MS-Analyse im Vollscan-Modus, der Prozentanteil an der Gesamt-Peakfläche der GSH-PAT-DNA-Basen-Mischaddukte für jede DNA-Base berechnet. Da alle Mischaddukte mehrere protonierbare Stickstoffatome aufweisen, wurde eine vergleichbare Ionisierung und somit ein ähnlicher Response der Addukte im Vollscan vermutet.

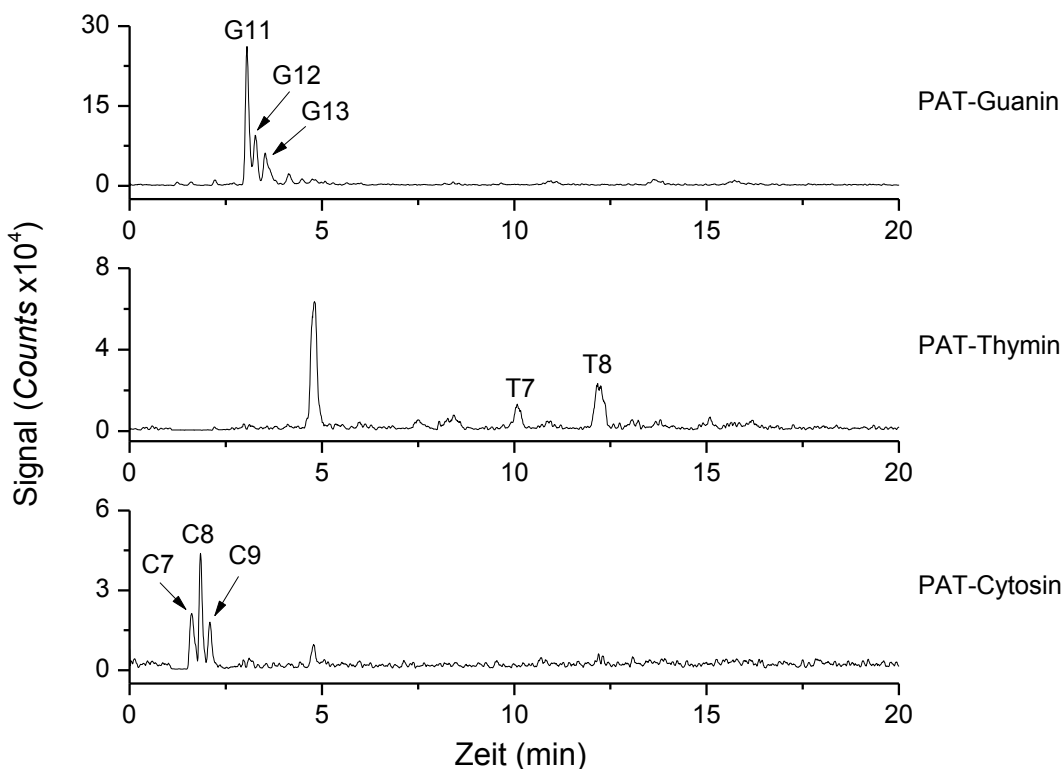
Der Anteil der GSH-PAT-DNA-Basen-Mischaddukte mit den Purinbasen betrug 54% für Adenin und 26% für Guanin, während der prozentuale Anteil der Mischaddukte mit den Pyrimidinbasen mit 11% für Cytosin und 9% für Thymin deutlich niedriger war (**Abb. 54**). Der GSH-PAT-Vorläufer reagierte somit bevorzugter mit den Stickstoffatomen der Purinbasen. Zwar sind die Affinitäten für die nukleophilen Stickstoffatome in den DNA-Basen abhängig von der Struktur des Elektrophils, jedoch gelten die Stickstoffatome von Purinbasen im allgemeinen als reaktiver für einen Angriff durch Elektrophile (zusammengefasst in Farmer und Sweetman, 1995; zusammengefasst in Gates, 2009).



**Abb. 54:** Anteil der Peakflächen der einzelnen GSH-PAT-DNA-Basen-Mischaddukte an der Gesamt-Peakfläche der Mischaddukte. Generierung der Mischaddukte durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit GSH (0,8 mM) und den DNA-Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin (je 0,8 mM) und HPLC-MS-Analyse im Vollscan-Modus (HPLC-MS-Methode Kapitel 6.2.1.3). Peakflächen nach Extraktion aus den Vollscan-Daten mit  $m/z$  551 (Adenin),  $m/z$  567 (Guanin),  $m/z$  542 (Thymin) und  $m/z$  527 (Cytosin). Rohdaten im Anhang A4.4.

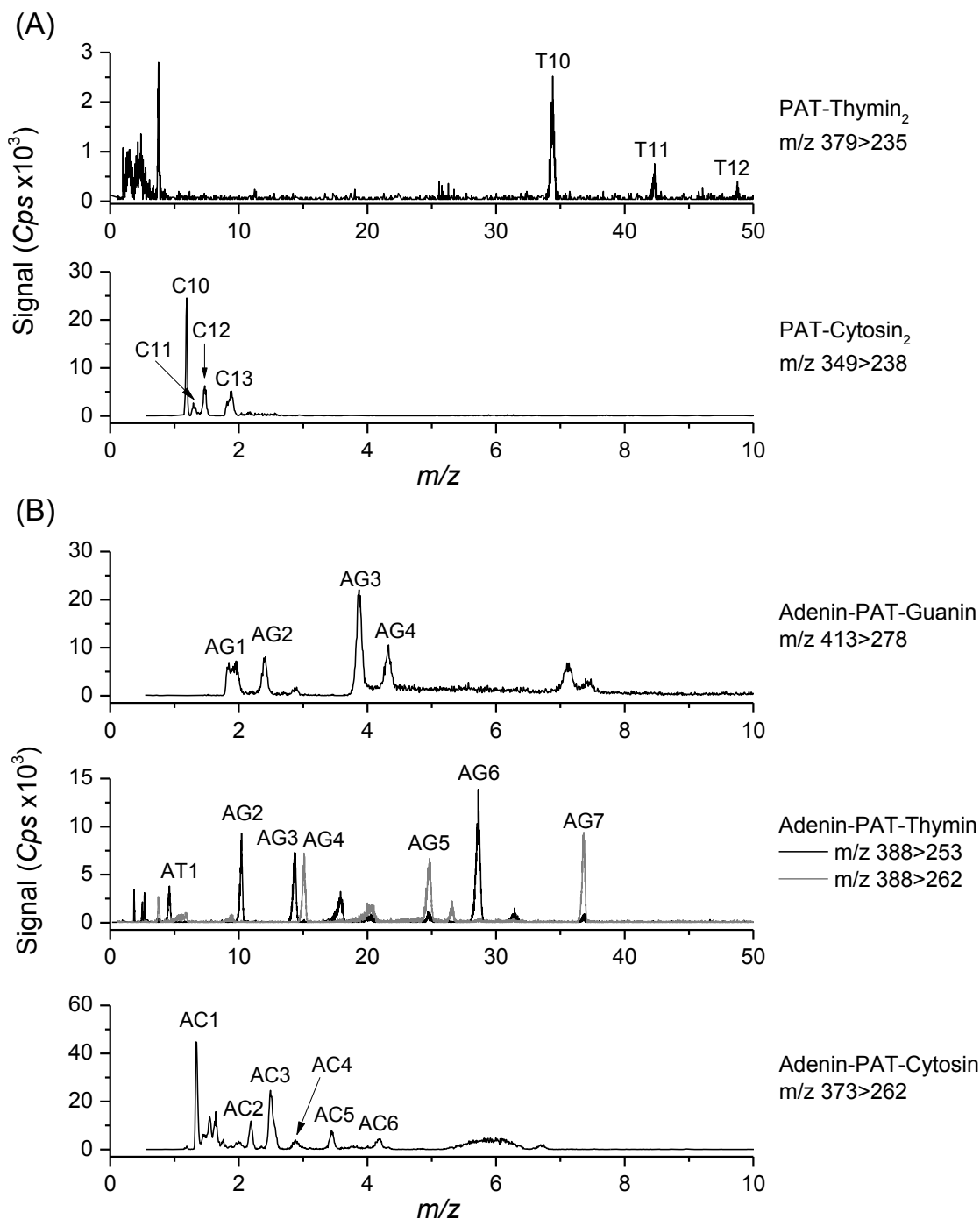
### 3.1.5.2 Bildung von Patulin-DNA-Basen-Addukten

Neben den cyclischen und linearen Mischaddukten wurden auch monosubstituierte PAT-DNA-Basen-Addukte mit Guanin, Thymin und Cytosin, selbst in Gegenwart von GSH im Inkubationsansatz, gebildet (**Abb. 55**). Die Fragmentierungsmuster der Addukte enthielten alle das charakteristische Fragmentation der unsubstituierten DNA-Base (Anhang A4.5).



**Abb. 55:** EIC der Reaktionsprodukte PAT-Guanin ( $m/z$  296), PAT-Thymin ( $m/z$  271) und PAT-Cytosin ( $m/z$  256), welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit GSH (0,8 mM) und allen DNA Basen (je 0,8 mM) gebildet wurden. Extraktion aus den Vollscandaten (HPLC-MS-Methode Kapitel 6.2.1.3).

Die entsprechenden Diaddukte von PAT mit zwei gleichen DNA-Basen waren durch die Detektion im Vollscan-Modus und Extraktion des  $m/z$ -Verhältnisses weder in Anwesenheit, noch in Abwesenheit von GSH im Inkubationsansatz identifizierbar. Jedoch wurden durch die Analyse im MRM-Modus mit kalkulierten Übergängen einige PAT-Thymin und PAT-Cytosin-Diaddukte auffindig gemacht (**Abb. 56**), welche anschließend durch die mittels *enhanced* Produktionenscan erhaltenen Fragmentierungsmuster als Diaddukte bestätigt wurden (Anhang A4.6A4.6 A und B). Auf die gleiche Weise wurden daneben auch einige heterogene Diaddukte von PAT mit je einem Molekül Adenin und einer der anderen DNA-Basen identifiziert (**Abb. 56**) und mittels kollisionsinduzierter Fragmentierung charakterisiert (Anhang A4.6 C-E). Alle diese Diaddukte wurden auch in Gegenwart von GSH im Inkubationsansatz gebildet, wobei die Signalintensitäten um bis zu eine Zehnerpotenz niedriger als ohne GSH waren (Anhang A4.7). Homosubstituierte Diaddukte mit Guanin wurden nicht identifiziert.



**Abb. 56:** MRM-Chromatogramme der (A) homostituierten PAT-Thymin (PAT-Thymin<sub>2</sub>:  $m/z$  379 [M + H]<sup>+</sup> > 235 [M + H - Thymin - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) und PAT-Cytosin (PAT-Cytosin<sub>2</sub>:  $m/z$  349 [M + H]<sup>+</sup> > 238 [M + H - Cytosin]<sup>+</sup>) -Diaddukte und der (B) heterostituierten Adenin-PAT-Guanin ( $m/z$  413 [M + H]<sup>+</sup> > 278 [M + H - Adenin]<sup>+</sup>), Adenin-PAT-Thymin ( $m/z$  388 [M + H]<sup>+</sup> > 253 [M + H - Adenin]<sup>+</sup>,  $m/z$  388 [M + H]<sup>+</sup> > 262 [M + H - Thymin]<sup>+</sup>) und Adenin-PAT-Cytosin ( $m/z$  373 [M + H]<sup>+</sup> > 262 [M + H - Cytosin]<sup>+</sup>) -Diaddukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) und allen DNA Basen (je 0,8 mM) gebildet wurden. HPLC-MS/MS-Analyse Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1.

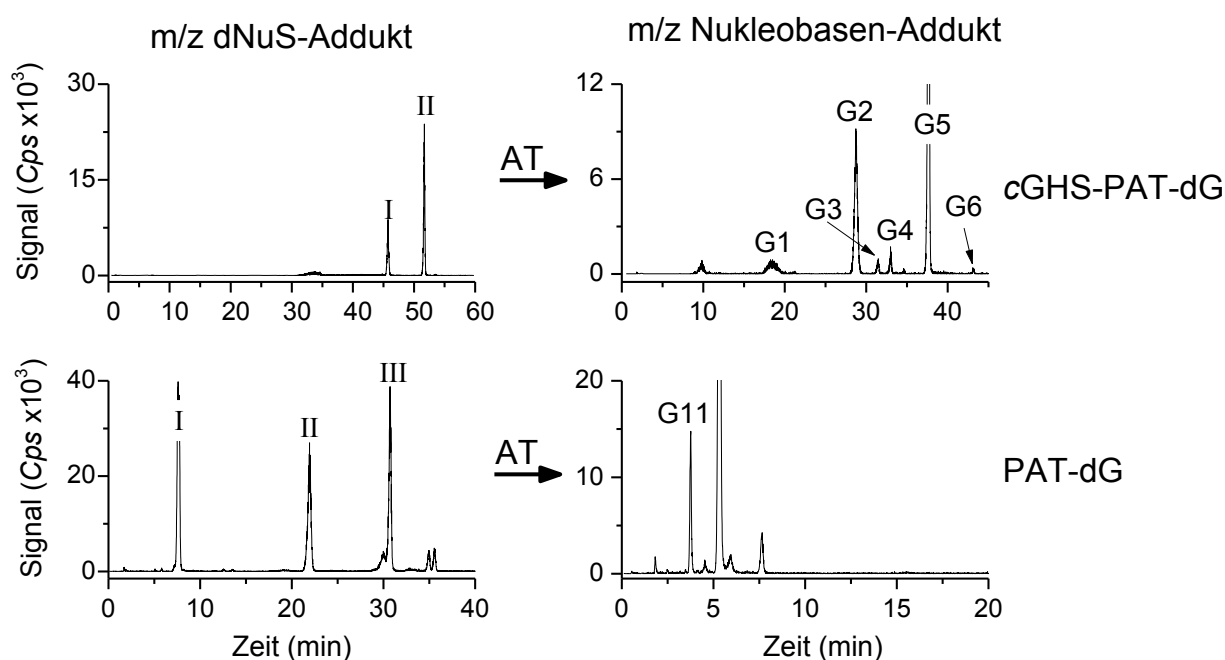


### 3.1.5.3 Reaktionsprodukte mit 2'-Deoxynukleosiden

Um auch die Reaktivität von PAT gegenüber den eigentlichen DNA-Bausteinen 2'-Deoxyguanosin (dG), 2'-Deoxycytidin (dC) bzw. 2'-Deoxythymidin (dT) zu untersuchen wurde diese (je 0,8 mM) mit PAT (1,6 mM) in An- und Abwesenheit von GSH (0,8 mM) für drei Tage inkubiert und die Reaktionsprodukte mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus analysiert (Kapitel 6.2.3.4). Die Detektion der (GSH-)PAT-dNuS-Addukte erfolgte im MRM-Modus.

#### Reaktionsprodukte mit 2'-Deoxyguanosin vor und nach saurer Thermolyse

Die Reaktion von PAT mit GSH und dG führte zur Bildung von zwei cGSH-PAT-dG-Adduktpeaks (**Abb. 57**), deren Produktionenscan-Massenspektren Fragmentationen nach Abspaltung der Deoxyribose, Guanin bzw. dG und Glycin enthielten (Anhang A4.8 A). Nach saurer Thermolyse waren aus den dNuS-Adduktpeaks alle sechs GSH-PAT-Guanin-Addukte entstanden, die in Kapitel 3.1.5.1 identifiziert wurden.



**Abb. 57:** MRM-Chromatogramme der dNuS-Addukte von PAT mit dG mit und ohne GSH (links) und der nach saurer Thermolyse (AT; 1 M HCl, 70°C, 30 min) der Reaktionsmischung entstandenen Nucleobasen-Addukte (rechts). Die römischen Zahlen markieren die Peaks der dNuS-Addukte. Die Peakmarkierung der Nucleobasen-Addukte entspricht den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.5. Analyse mittels LC-MS/MS im MRM-Modus (Übergang dNuS-Addukte  $[M+H]^+ \rightarrow [M+H\text{-Deoxyribose}]^+$ : GSH-PAT-dG,  $m/z$  683>567, CE 10 V; PAT-dG,  $m/z$  412>296, CE 10 V; Nucleobasen-Addukte Addukte  $[M+H]^+ \rightarrow [Base+H]^+$ : GSH-PAT-Guanin,  $m/z$  567>152, CE 20 V; PAT-Guanin,  $m/z$  296>152, CE 15 V; Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1).

Die Hauptaddukte war dabei G2 und G5, während nach Reaktion mit der Nukleobase G1 und G3 (**Abb. 51**) als Hauptaddukte entstanden waren. Die N-glykosidische Bindung zum Zucker scheint somit die Adduktbildung durch sterische Einflüsse oder Veränderung der Nucleophilie der Stickstoffatome von Guanin zu beeinflussen.

Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von GSH wurden in der Reaktionsmischung von PAT und dG drei Peaks als mögliche PAT-dG-Addukte identifiziert (**Abb. 57**) und mittels Produktionenscan charakterisiert (Anhang A4.8 B). Nach saurer Thermolyse dieser dNuS-Addukte wurde eines der drei PAT-Guanin-Addukte als Addukt G11 identifiziert (**Abb. 55**). Daneben war ein weiterer Peak detektierbar, der jedoch anhand der Retentionszeit keinem der bekannten PAT-Guanin-Addukte zugeordnet wurde. Die PAT-Guanin-Addukte G12 und G13 wurde nicht detektiert.

Durch die saure Thermolyse der dG-Addukte wurden folglich die meisten der zuvor charakterisierten Guanin-Addukte erhalten: eines von drei PAT-Guanin-Monoaddukten und alle cGSH-PAT-Guanin-Addukte.

### Reaktionsprodukte mit den 2'-Deoxynukleosiden der Pyrimidinbasen

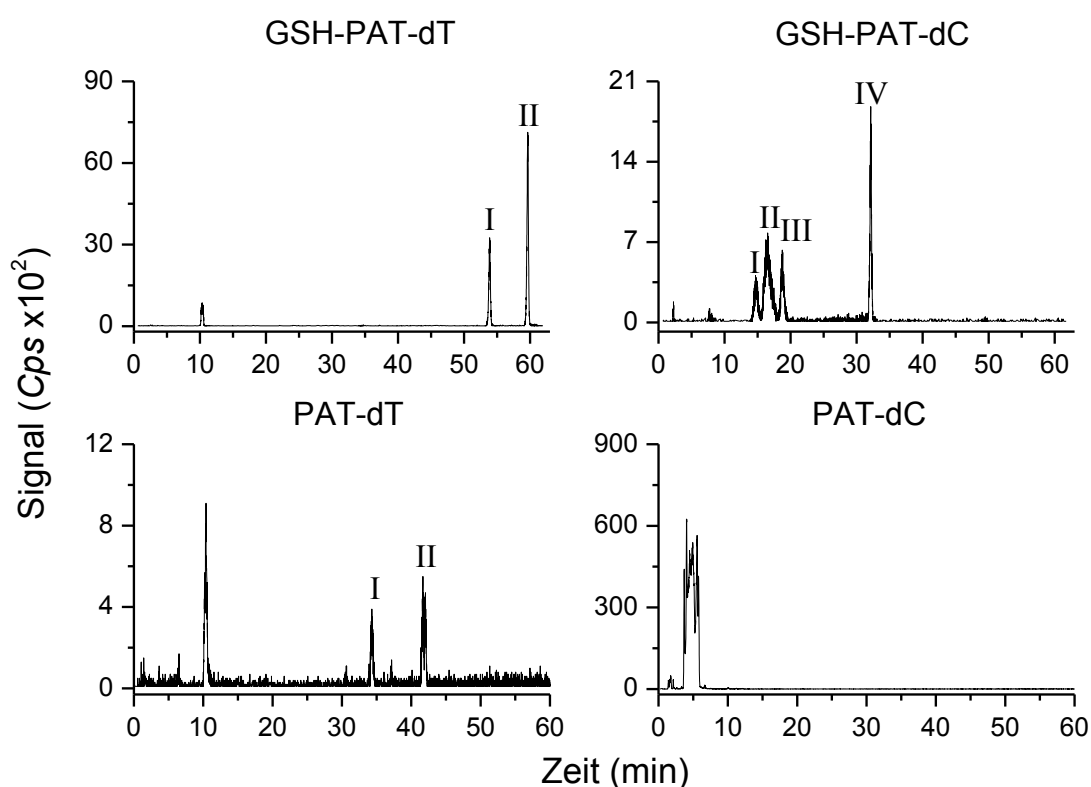
Die N-glykosidische Bindung der Pyrimidin-Nukleoside wird im Gegensatz zu den Purin-Nukleosiden, nur unter drastischen sauren Thermolysebedingungen, mit Temperaturen über 100°C und längeren Hydrolysezeiten (> 1 h) gespalten (Swarts et al., 1996). Da dies vermutlich zu Verlusten der Addukte führen würde (Kapitel 3.2.1.1.1), wurde auf eine Spaltung der dNuS-Addukte verzichtet.

Die Reaktion von PAT mit GSH und dT führte zur Bildung von zwei GSH-PAT-dT-Adduktpeaks (**Abb. 58**), deren Produktionenscan-Massenspektren zahlreiche Fragmentationen nach Abspaltung von Deoxyribose, dT und Glycin, sowie weitere Folgeabspaltungen wie Neutralverluste von Wasser und CO, enthielten (Anhang A4.9 A). dT enthält nur eine freie sekundäre Aminogruppe an N<sup>3</sup>-Position, welche für die Reaktion mit PAT zugänglich ist. Die Anzahl der Adduktpeaks deutete deswegen darauf hin, dass es sich um diastereomere cGSH-PAT-dT-Mischaddukte unter Beteiligung von N<sup>3</sup>-dT handelte.

In Abwesenheit von GSH wurden zwei mögliche PAT-dT-Adduktpeaks beim entsprechenden MRM-Übergang detektiert (**Abb. 58**). Die Intensität der Addukte war jedoch zu gering um eine Charakterisierung durch kollisionsinduzierte Fragmentierung durchzuführen. Unter Berücksichtigung der postulierten Struktur für PAT-Adenin-Monoaddukte (Kapitel 3.1.1.1) und somit die Bindung der Base/des dNuS an C6 von PAT, wurde nur ein Adduktpeak nach Reaktion mit N<sup>3</sup>-dT erwartet. Jedoch wäre es auch möglich, dass eine Bindung von N<sup>3</sup>-dT an C1 oder C5 von PAT erfolgt.

Die Reaktion von PAT mit GSH und dC führte zur Bildung von vier cGSH-PAT-dC-Adduktpeaks (**Abb. 58**), deren Produktionenscan-Massenspektren Fragmentationen nach Abspaltung von Deoxyribose, Cytosin bzw. dC und Glycin aufwiesen (Anhang A4.9 B). Durch die Reaktion von PAT mit den beiden freien Aminogruppen (tertiär an N<sup>3</sup>, primär an N<sup>4</sup>) waren jeweils zwei diastereomer Addukte zu erwarten.

In Abwesenheit von GSH wurden ebenso mögliche PAT-dC-Adduktpeaks detektiert (**Abb. 58**). Jedoch war aufgrund der Co-Elution mehrerer Peaks keine genaue Anzahl der Addukte zu bestimmen. Eine weitere Charakterisierung mittels kollisionsinduzierter Fragmentierung wurde nicht durchgeführt.



**Abb. 58:** MRM-Chromatogramme der dNuS-Addukte von PAT mit dT (links) und dC (rechts) mit (oben) und ohne (unten) GSH. Die römischen Zahlen markieren die Peaks der dNuS-Addukte. Analyse mittels LC-MS/MS im MRM-Modus (Übergang dNuS-Addukte  $[M+H]^+ > [M+H\text{-Deoxyribose}]^+$ : GSH-PAT-dT,  $m/z$  658>542, CE V; PAT-dT,  $m/z$  387>271, CE V; GSH-PAT-dC,  $m/z$  643>527, CE V; PAT-dC,  $m/z$  372>256, CE V; Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). In den Chromatogrammen mit dT wurde immer ein Peak bei ca. 10 min detektiert, der keinem Addukt zugeordnet werden konnte.

### 3.1.6 DNA-Basen-Addukte als mögliche genotoxische Wirkungsweise von Patulin

Unter zellfreien Bedingungen wurden trotz der Anwesenheit von GSH einige mono- und disubstituierte PAT-DNA-Basen-Addukte, sowie gemischte GSH-PAT-DNA-Basen-Addukte gebildet. Wie zahlreiche andere Elektrophile mit ungesättigter Carbonyl-Struktur (zusammengefasst in Witz, 1989; Eder und Hoffman, 1993) weist somit auch PAT eine direkte Reaktivität gegenüber DNA-Basen auf.

Die Bindung von zwei gleichen oder unterschiedlichen DNA-Basen-Molekülen an ein PAT-Molekül könnten die DNA-DNA-Quervernetzungen erklären, die bei Inkubation von PAT mit V79-Hamsterzellen induziert wurden (Schumacher et al., 2006; Glaser und Stopper, 2012). Zum mutagenen Potential von PAT im HPRT-Test mit V79-Hamsterzellen, welcher sensitiv für Basensubstitutionen ist (Albertini et al., 1993), könnten hingegen die monosubstituierten PAT-DNA-Basen-Addukte verantwortlich sein, welche jedoch eher bei geringem intrazellulären GSH-Gehalt gebildet werden.

Als weitere mögliche DNA-Basen-Addukte, die unter zellfreien Bedingungen auch bei GSH im Überschuss und trotz der Anwesenheit der GST gebildet wurden, könnten die neuartigen GSH-PAT-DNA-Basen-Mischaddukte zur PAT-induzierten Mutagenität im *hprt*-Lokus beitragen. Drei der cGSH-PAT-Adenin-Addukte, die nach Umsetzung von PAT mit GSH und 2'-Deoxyadenosin beobachtet wurden, wurden als Addukte an der N<sup>1</sup>- und N<sup>6</sup>-Position von Adenin charakterisiert. Andere DNA-Basen-Addukte an der N<sup>1</sup>- oder der N<sup>6</sup>-Position von Adenin (Addukte von Epoxid-Metaboliten wie z.B. Styrol-7,8-Oxid, Butadiendiepoxid) induzierten Basenpaarsubstitutionen (zusammengefasst in Koskinen und Plná, 2000). Folglich könnten die cGSH-PAT-N<sup>1</sup>/N<sup>6</sup>-Adenin-Addukte für Basenpaarsubstitutionen und möglicherweise auch für Frameshift-Mutationen verantwortlich sein, welche die im HPRT-Test beobachteten Genmutationen verursachen.

Die GSH-Konjugation von Substanzen mit ungesättigter Carbonyl-Struktur stellt im Allgemeinen eine Entgiftungsreaktion dar (Berhane et al., 1994), welche jedoch nach Erschöpfung des intrazellulären GSH-Gehalts indirekt zu Modifikationen an DNA-Basen durch reaktive Sauerstoffspezies und Lipidperoxidationsprodukten (Glaab et al., 2001; Janzowski et al., 2003; Blair, 2006) führen kann. Daneben können GSH-Konjugate ungesättigter Carbonyle in einer reversiblen Reaktion die reaktiven Spezies, die sie ursprünglich entgiftet haben, wieder freisetzen und somit als sogenanntes „Transportmittel“ fungieren (Esterbauer et al., 1975; Vroomen et al., 1988; Baillie und Slatter, 1991; Eisenbrand et al., 1995; van Bladeren, 2000). Interessanterweise wurde jedoch für Substanzen mit ungesättigter Carbonyl-Struktur bisher noch keine GSH-Konjugate

beschrieben, die als reaktive Intermediate anschließend noch mit DNA-Basen reagieren können.

Aufgrund der potentiellen direkten DNA-Basen-Reaktivität von PAT oder PAT-GSH-Intermediaten besteht die Möglichkeit, dass die DNA der Schleimhäute von Mundhöhle, Speiseröhre und Gastrointestinaltrakt durch den Verzehr von PAT-belasteten Lebensmitteln geschädigt werden könnte.

In Gegenwart von Cytosol schien PAT neben GSH und Adenin auch mit den nukleophilen Thiol- und Aminogruppen der cytosolischen Proteine zu reagieren. Die Reaktivität von PAT mit Proteinen, sowie dessen quervernetzendes Potential auf Proteinebene, wurde bereits beschrieben (Pfeiffer et al., 1998; Fliege und Metzler, 1999). Die Reaktion von PAT mit zahlreichen weiteren nukleophilen Reaktionspartnern auf zellulärer Ebene wäre eine Erklärung dafür, weshalb weder eine messbare GSH-Depletion noch oxidative DNA-Schäden durch die mutagenen PAT-Konzentrationen beobachtet wurden (Schumacher et al., 2005a; Schumacher et al., 2006). Bei höheren Konzentrationen an PAT, ist auch eine indirekte Mutagenität durch oxidativen Stress, infolge der GSH-Depletion wahrscheinlich.

Aufgrund der bekannten Reaktivität von PAT gegenüber Enzymen (zusammengefasst in Wouters und Speijers, 1996), könnte die Hemmung von Enzymen, die an der Aufrechterhaltung der DNA-Integrität beteiligt sind, indirekt zur Mutagenität von PAT beitragen.

## **3.2 Reaktivität von Patulin gegenüber genomischer DNA**

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Reaktivität von PAT gegenüber frei vorliegenden DNA-Basen gezeigt und neben mono- und disubstituierten PAT-DNA-Basen-Addukten, neuartige GSH-PAT-DNA-Basen-Mischaddukte identifiziert und charakterisiert. Im folgenden Kapitel wurde die Adduktbildung nach Reaktion von PAT mit genomischer DNA untersucht, wofür zunächst eine Methode zur Freisetzung und Detektion der potentiellen DNA-Addukte entwickelt (Kapitel 3.2.1) und anschließend für deren Nachweis aus DNA angewandt wurde (Kapitel 3.2.2).

### **3.2.1 Entwicklung von Methoden zur Hydrolyse, Anreicherung und Detektion der potentiellen (Glutathion-)Patulin-DNA-Basen-Addukte**

Für den Nachweis von DNA-Addukten aus genomischer DNA bedarf es geeigneter Methoden für i) die Hydrolyse der stabilen und/oder labilen Addukte aus dem DNA-Rückgrat, ii) die Anreicherung der Addukte, und iii) die empfindliche Detektion der Addukte mittels LC-MS/MS (zusammengefasst in Singh und Farmer, 2006; zusammengefasst in Koc und Swenberg, 2002; Kapitel 1.2.3). Insbesondere während der ersten beiden Aufarbeitungsschritte war es wichtig, dass die DNA-Addukte unter den jeweiligen Bedingungen stabil sind. Deshalb wurden im Rahmen der Methodenentwicklung und –optimierung Stabilitätsuntersuchungen der DNA-Basen-Addukte von PAT mitgeführt. Da die Adduktbildung von PAT mit der DNA-Base Adenin sowohl mit und ohne Beteiligung von GSH gegenüber den anderen Basen bevorzugt war (Kapitel 3.1.5.1) und außerdem einige der (cGSH-)PAT-Adenin-Addukte durch Isolierung mittels semi-präparativer HPLC (Kapitel 6.2.4.3) zugänglich waren, wurden diese Addukte als Modell-Addukte für die Entwicklung der Aufarbeitungsschritte der DNA-Hydrolyse (Kapitel 3.2.1.1) und Anreicherung der Addukte (Kapitel 3.2.1.2) verwendet. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit sollte die entwickelten Methoden für Hydrolyse und Anreicherung der Addukte universell für alle (GSH-)PAT-DNA-Basen-Addukte anwendbar sein. Für die empfindliche Detektion der (GSH-)PAT-DNA-Basen-Addukte wurde eine HPLC-MS/MS-Methode im MRM-Modus erstellt (Kapitel 3.2.1.3).

#### **3.2.1.1 DNA-Hydrolyse**

Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Freisetzung von DNA-Addukten aus dem DNA-Rückgrat um diese für eine Analyse mittels HPLC-MS/MS zugänglich zu machen.

Durch den enzymatischen Verdau von DNA mit einer Kombination aus drei Endo- und Exonukleasen in alkalischem oder auch saurem Milieu werden nach mehrstündigem Verdau

als Endprodukte alle vier dNuS sowie deren Addukte erhalten. (Marsch et al., 2001; zusammengefasst in Tarun und Rusling, 2005; zusammengefasst in Singh und Farmer, 2006).

Die saure Hydrolyse der DNA bei milden Temperaturen führt zur selektiven Spaltung der N-glykosidischen Bindung der Purinbasen und deren Addukten, wohingegen bei der sauren thermischen Hydrolyse mit hohen Temperaturen alle vier DNA-Basen abgespalten werden (zusammengefasst in Singh und Farmer, 2006).

Die DNA-Addukte an der N<sup>3</sup>- oder N<sup>7</sup>-Position von Guanin oder Adenin, welche aufgrund der Destabilisierung der N-glykosidischen Bindung sogenannte labile Addukte darstellen, können schon durch Erhitzen in neutralem Milieu freigesetzt werden (zusammengefasst in Singh und Farmer, 2006; zusammengefasst in Tarun und Rusling, 2005). Hierbei werden selektiv nur die labilen Addukte abgespalten, so dass für die HPLC-MS/MS-Analyse kein Anreicherungsschritt mehr nötig ist.

#### *3.2.1.1.1 Auswahl von geeigneten Hydrolysebedingungen mithilfe von Stabilitätsuntersuchungen an (Glutathion-)Patulin-Adenin-Addukten*

Die Untersuchungen zur Stabilität von potentiellen PAT-DNA-Basen-Addukten unter den möglichen Hydrolysebedingungen wurden mit den Addukten von PAT mit der DNA-Base Adenin mit und ohne GSH durchgeführt (Addukt 1.1, 1.2, 1.3 und 2.1, sowie 5.1). Welche Bedingungen am besten geeignet sind, wurde durch die Wiederfindung der Addukte nach Inkubation unter den jeweiligen Hydrolysebedingungen überprüft. Da allgemein DNA-Addukte nur in einer Häufigkeit von 1 Addukt pro 10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> Nukleotide (zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013) vorkommen, war es für die spätere Erfassung der potentiellen DNA-Addukte notwendig, dass die (GSH-)PAT-Adenin-Addukte bei den Hydrolysebedingungen stabil sind und nicht mehr als die Hälfte der Addukte zerfallen.

Durch Literaturrecherche wurden typische Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse und die thermischen Hydrolysen im Saurem bzw. neutralem Milieu ausgewählt:

- Für die enzymatische Hydrolyse mit Nukleasen, deren pH-Optimum im Alkalischen liegt, wird ein TRIS-HCl-Puffer mit pH 8 verwendet. Da zunächst einige Stunden mit einer Endonuklease vorinkubiert wird und dann über Nacht die Inkubation mit Exonukleasen anschließt, beträgt die Inkubationszeit >12 h. (Chaudhary et al., 1996; Jones und Sabbioni, 2003; Neale et al., 2008). Die optimale Inkubationstemperatur beträgt 37°C.
- Die Bedingungen für den enzymatischen Verdau in saurem Milieu wurden einer Studie von Marsch et al. (2001) entnommen, in welcher labile Dihalomethan-GSH-

DNA-Addukte untersucht wurden. Die Inkubation erfolgte in einem NaOAc-Puffer mit pH 5 für insgesamt 115 min bei 37°C.

- Für die saure thermische Hydrolyse ist die Verwendung der Säuren Trifluoressigsäure (TFA), Salzsäure (HCl) und Ameisensäure (FA) üblich. Temperaturen von 60-80°C garantieren eine milde Hydrolyse und führen somit nur zur Abspaltung der Purinbasen. Die Erhitzungszeit liegt dabei unter 1 h (Vu et al., 1986; Arimoto-Kobayashi et al., 1997; Tretyakova et al., 1998; Hakala et al., 1999; Inagaki et al., 2003; Moore et al., 2010).
- Die saure thermische Hydrolyse unter stärkeren Bedingungen, welche auch die Pyrimidinbasen vom DNA-Rückgrat freisetzt, erfolgt mit FA durch Erhitzen in geschlossenen Gefäßen auf über 100°C für eine Stunde (Swarts et al., 1996).
- Für die neutrale thermische Hydrolyse wird bei 100°C für unter 1 h erhitzt (Mathison et al., 1994; Koskinen et al., 2000; Liao et al., 2001; da Costa et al., 2003).

Das isolierte cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 sowie eine Mischung isolierter PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2, 1.3 und 2.1 (Kapitel 6.2.4) wurden unter den jeweiligen Hydrolysebedingungen inkubiert (Kapitel 6.2.9.1 und 6.2.9.3) und deren Wiederfindung durch anschließende Messung mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 1 bzw. 4) und dem Peakflächenvergleich mit einer unbehandelten Kontroll-Fraktion ermittelt. Da sich aus dem Diastereomer 5.1 des cGSH-PAT-Adenin-Addukts während der Inkubation immer auch Diastereomer 5.2 bildete, wurde als Peakfläche die Summe der beiden Adduktpeaks herangezogen.

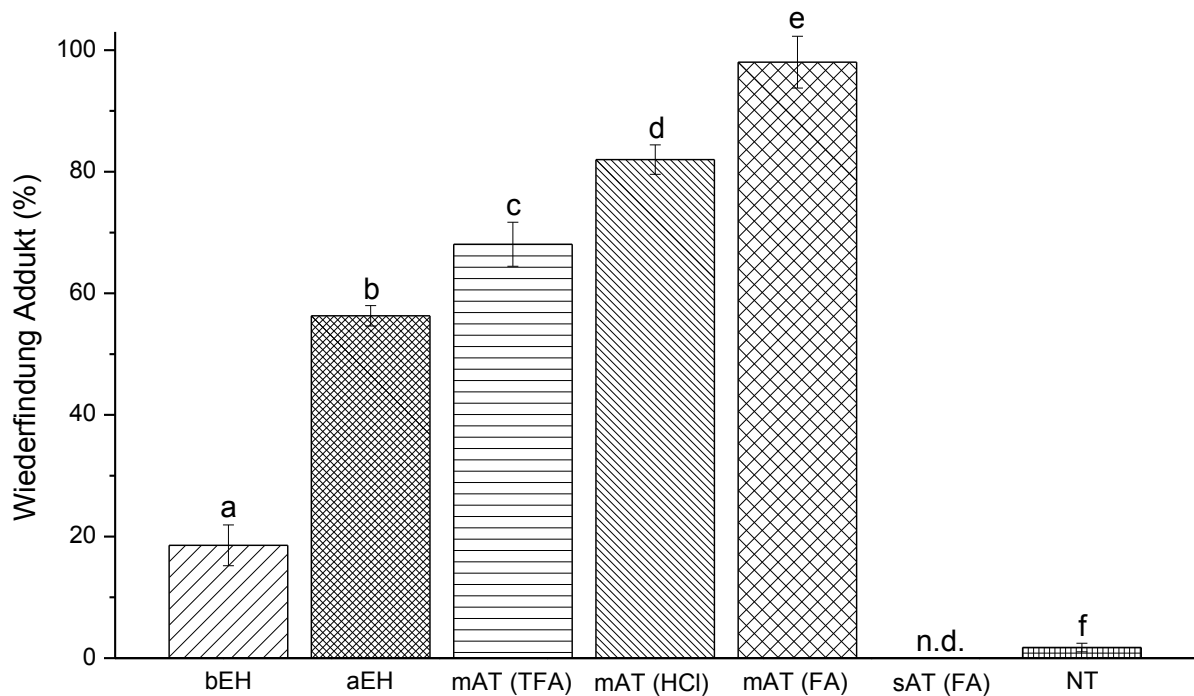
### Wiederfindung der cGSH-PAT-Adenin-Addukte

Die Wiederfindung der cGSH-PAT-Adenin-Addukte in dem für enzymatische DNA-Hydrolysen im Alkalischen üblicherweise verwendeten TRIS-HCl-Puffer bei pH 8 für eine Inkubationsdauer von 16 h bei 37°C lag bei nur  $18,56 \pm 3,36\%$  (**Abb. 59**). Wohingegen, nach Inkubation unter den Bedingungen der enzymatischen DNA-Hydrolyse in saurem Milieu (NaOAc-Puffer pH 5, 115 min, 37°C) signifikant mehr cGSH-PAT-Adenin-Addukt ( $56,30 \pm 1,68\%$ ) wiedergefunden wurde (**Abb. 59**). Eine lange Inkubationsdauer und die Inkubation in alkalischem Milieu wirken sich somit negativ auf die Stabilität der cGSH-PAT-Adenin-Addukte aus.

Die Inkubationen unter den Bedingungen der milden, sauren Hydrolyse mit den Säuren TFA, HCl und FA ergaben alle signifikant höhere Wiederfindungen der cGSH-PAT-Adenin-Addukte als bei der sauren, enzymatischen Hydrolyse (**Abb. 59**). Die Wiederfindung der Addukte bei Hydrolyse mit 88%iger FA (15 min, 70°C) war dabei mit  $98,03 \pm 4,25\%$  signifikant höher als bei der Hydrolyse in 1 M HCl (30 min, 70°C) mit  $82,00 \pm 2,43\%$  und in



98%iger TFA (45 min, 70°C) mit  $68,07 \pm 3,62\%$ , welche sich ebenso signifikant unterschieden (Abb. 59).



**Abb. 59:** Wiederfindung der diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 nach Inkubation unter verschiedenen Hydrolysebedingungen und anschließender Messung mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 4). Bedingungen: alkalische enzymatische Hydrolyse (bEH) in TRIS-HCl-Puffer, pH 8, 16 h, 37°C; saure enzymatische Hydrolyse (aEH) mit einem Puffermix aus NaOAc, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, pH 5, 115 min, 37°C; milde saure Thermolyse mit 98%iger TFA, 45 min, 70°C; milde saure Thermolyse (mAT) mit 1 M HCl, 30 min, 70°C; milde saure Thermolyse mit 88%iger FA, 15 min, 70°C; starke saure Thermolyse (sAT) mit 88%iger FA, 45 min, 140°C; neutrale Thermolyse (NT) in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4), 10 min, 100°C (Kapitel 6.2.9.1 und 6.2.9.3). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Tukey Test,  $p < 0,05$ ). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. n.d., kein Diastereomerenpeak mehr detektierbar. Rohdaten: Anhang A5.1.

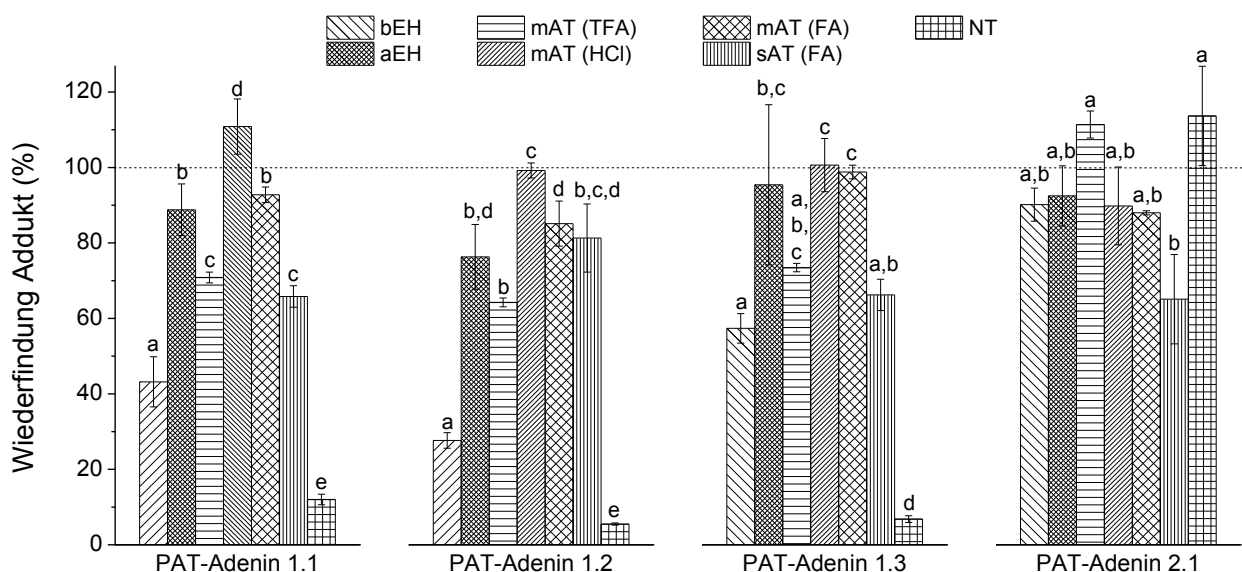
Nach Inkubation der cGSH-PAT-Adenin-Addukte unter den Bedingungen der stark sauren Hydrolyse (88%ige FA, 45 min, 140°C) waren keine Adduktpeaks mittels HPLC-UV mehr detektierbar (A5.3). Stattdessen nahm die Fläche eines Peaks (Rt 3,4 min) im Vergleich zur Kontrolle deutlich zu. Bei diesem Peak handelte es sich um Adenin, welches durch den Zerfall der diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 unter den starken Hydrolysebedingungen entstanden war. Ein Peak für ein nach Abspaltung von Adenin verbleibendes GSH-PAT-Addukt war unter den Analysebedingungen nicht detektierbar.

Nach Inkubation unter den Bedingungen der neutralen Thermolyse (in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 10 min, 100°C) wurden nur  $1,75 \pm 0,70\%$  Addukt

wiedergefunden. In den Chromatogrammen der Hydrolyse ist zudem wieder ein Peak von Adenin vorhanden. Die neutrale Hydrolyse bei 100°C führte ebenfalls zum Zerfall des Adduktes unter Abspaltung von Adenin. Die Wiederfindung in neutralem Kaliumphosphatpuffer betrug nach 3 Tagen bei RT und bei 37°C rund 60% bzw. 55% (Abb. 37). Somit war vermutlich die hohe Inkubationstemperatur von 100°C die Ursache für die geringe Wiederfindung.

### Wiederfindung der PAT-Adenin-Addukte

Die Wiederfindungen einer Mischung von isolierten PAT-Adenin-Addukten nach Inkubation in TRIS-HCl-Puffer bei pH 8 (16 h, 37°C) lagen für die Monoaddukte (1.1-1.3) nur bei 28 - 57%, wohingegen das Diaddukt (2.1) mit einer Wiederfindung von 90% eine bessere Stabilität im Alkalischen zeigte (Abb. 60). Im Gegensatz dazu wurden nach Inkubation unter den Bedingungen der enzymatischen DNA-Hydrolyse in saurem Milieu (NaOAc-Puffer pH 5, 115 min, 37°C) sowohl für die Monoaddukte als auch für das Diaddukt Wiederfindungen im Bereich von 76 - 95% erhalten.



**Abb. 60:** Wiederfindung der PAT-Adenin-Addukte nach Inkubation unter verschiedenen Hydrolysebedingungen und anschließender Messung mittels HPLC-UV (Kapitel 5.2.1.1 Methode 1). Bedingungen: alkalische enzymatische Hydrolyse (bEH) in TRIS-HCl-Puffer, pH 8, 16 h, 37°C; saure enzymatische Hydrolyse (aEH) mit einem Puffermix aus NaOAc, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, pH 5, 115 min, 37°C; milde saure Thermolyse mit 98%iger TFA, 45 min, 70°C; milde saure Thermolyse (mAT) mit 1 M HCl, 30 min, 70°C; milde saure Thermolyse mit 88%iger FA, 15 min, 70°C; starke saure Thermolyse (sAT) mit 88%iger FA, 45 min, 140°C; neutrale Thermolyse (NT) in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4), 10 min, 100°C (Kapitel 6.2.9.1 und 6.2.9.3). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Signifikante Unterschiede innerhalb jeden Adduktes wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, p<0,05). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Rohdaten: Anhang A5.1.

Die Wiederfindungen der PAT-Adenin-Monoaddukte nach Inkubation mit 88%iger FA (15 min, 70°C) lagen im Bereich von 85 - 99%. Nach Inkubation in 1 M HCl wurden für die Monoaddukte Wiederfindungen von 99 - 111% erreicht. Auch für das Diaddukt wurde unter diesen beiden Hydrolysebedingungen Wiederfindungen von 88% bzw. 90% erhalten. Nach Inkubation in 98%iger TFA waren die Wiederfindungen für die Monoaddukte mit 64 - 73% etwas niedriger als bei den beiden anderen Säuren. Das Diaddukt wurde unter diesen Bedingungen zu 111% wiedergefunden (**Abb. 60**).

Nach Inkubation der PAT-Adenin-Addukte unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse bei hoher Temperatur (88%ige FA, 45 min, 140°C) betrug die Wiederfindung für die Monoaddukte 66-81% und für das Diaddukt 65% (**Abb. 60**). Im Gegensatz zu den cGSH-PAT-Adenin-Addukten können die PAT-Adenin-Addukte den Bedingungen dieser Hydrolyse standhalten.

Nach Inkubation unter den Bedingungen der neutralen Thermolyse (in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 10 min, 100°C) wurden nur 6 - 12% der Monoaddukte wiedergefunden. Das PAT-Adenin-Diaddukt zeigte mit einer Wiederfindung von 114% eine bessere Stabilität (**Abb. 60**). Die neutrale Hydrolyse bei 100°C führte somit, wie schon bei den diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukten beobachtet, zum Zerfall der Monoaddukte unter Abspaltung von Adenin, dessen Peak in den Chromatogrammen vorhanden war. Die hohe Inkubationstemperatur von 100°C als alleinige Ursache für die schlechte Wiederfindung ist auszuschließen, da nach Inkubation bei 140°C im Sauren gute Wiederfindungen erreicht wurden.

#### Zusammenfassung der Stabilitätsuntersuchungen

Unter den Bedingungen der enzymatischen Hydrolyse im Alkalischen waren sowohl die cGSH-PAT-Adenin-Addukte als auch der PAT-Adenin-Monoaddukte mit Wiederfindungen von knapp 20% bzw. 28 - 57% nur mäßig stabil, weshalb diese Hydrolysemethode nicht weiter berücksichtigt wurde. Weiterhin wurde die saure Hydrolyse bei hoher Temperatur für die Abspaltung von Purin- und Pyrimidinbasen nicht weiter optimiert, da diese Bedingungen zum vollständigen Zerfall der cGSH-PAT-Adenin-Addukte führte. In saurem Milieu und bei Temperaturen von 37°C bzw. 70°C lagen die Wiederfindungen aller Addukte bei über 55%. Da durch die saure Thermolyse die potentiellen PAT-Addukte mit den Purinbasen vom DNA-Rückgrat abgetrennt werden, welche in den vergangenen Kapiteln ausgiebig charakterisiert wurden, wurde im Folgenden die saure Thermolyse mit den Säuren TFA, HCl und FA hinsichtlich der Ausbeute an Spaltprodukten optimiert. Da die cGSH-PAT-Adenin-Addukte in den soeben beschriebenen Vorversuchen zur Stabilität die empfindlicheren Addukte darstellten, wurden Veränderungen der oben aufgeführten Inkubationsbedingungen im

Rahmen der Optimierung durch weitere Stabilitätsuntersuchungen an diesen Addukten überprüft.

Die geringen Wiederfindungen der cGSH-PAT-Adenin-Addukte als auch der PAT-Adenin-Monoaddukte nach thermischer Behandlung im Neutralen führten dazu, dass für die spezifische Abspaltung labiler Addukte vom DNA-Rückgrat die neutrale Thermolyse nicht angewandt wurde. Die labilen Addukte müssen somit zusammen mit den stabilen Addukten durch eine der anderen Hydrolysen abgespalten werden, bei deren Inkubationsbedingungen bessere Wiederfindungen resultieren.

#### *3.2.1.1.2 Optimierung der thermischen Hydrolysen mit Säuren unter milden Bedingungen*

Durch saure Hydrolyse von DNA unter milden Bedingungen werden nur die DNA-Basen Adenin und Guanin vom Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA abgespalten. Die Optimierung der sauren Hydrolysen erfolgte mit genomischer DNA (jeweils 270 µg, Kapitel 6.2.7) unter Verwendung der Säuren TFA, HCl und FA und durch Variation von Hydrolysezeit und -temperatur. Für die Säure HCl wurde vorab noch der Einfluss der Molarität untersucht.

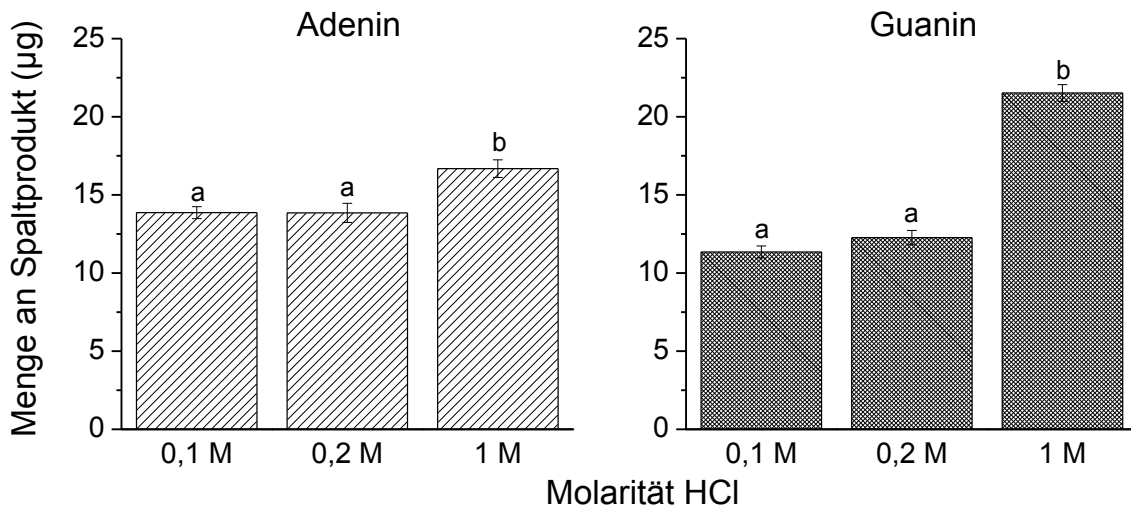
#### Kalibriergeraden

Die Quantifizierung der Menge an den Spaltprodukten Adenin und Guanin erfolgte mittels HPLC-UV durch externe Kalibrierung mit Referenzlösungen unter Verwendung eines internen Standards (Theobromin, Kapitel 6.2.8.1 und 6.2.1.1 Methode 2). Durch Spaltung von 270 µg DNA werden ungefähr 27 µg Adenin und 18 µg Guanin erwartet (Anteil DNA-Basen an der Masse der DNA 33,3%, Verhältnis der Basenpaare AT/CG = 60/40). Umgerechnet auf das Ansatzvolumen (500 µl) und unter Einberechnung der 1:10-Verdünnung (Kapitel 6.2.8.2 - 6.2.8.4) beträgt die Menge in 10 µl Injektionsvolumen ungefähr 54 ng für Adenin und 36 ng für Guanin. Die Kalibriergeraden wurden deshalb in dem Bereich von 12-60 ng pro 10 µl Injektionsvolumen erstellt (Kapitel 6.2.8.1). Der gewählte Arbeitsbereich ist varianzenhomogen (Varianzen F-Test,  $p < 0,05$ ) und linear (Linearitätstest nach Mandel  $p < 0,05$ ; Anhang A5.4).

#### Auswirkungen der Molarität von Salzsäure auf die Hydrolyseeffizienz

Für die Freisetzung von Purinbasen-Addukten mit HCl werden 0,1 M (Tretyakova et al., 1998; Inagaki et al., 2003) bis 1 M (Moore et al., 2010) Lösungen verwendet. Um die Auswirkungen verschiedener Stoffmengenkonzentrationen auf die Ausbeute an Adenin und

Guanin zu untersuchen, wurden 270 µg DNA bei 70°C für 60 min im Wasserbad mit 0,1 M, 0,2 M und 1M Salzsäure hydrolysiert (Kapitel 6.2.8.3). Die Menge (µg) an Spaltprodukt war, sowohl für Adenin als auch für Guanin, bei der Hydrolyse mit 1 M HCl signifikant höher als unter Verwendung von HCl mit niedrigeren Molaritäten von 0,1 M und 0,2 M (**Abb. 61**).



**Abb. 61:** Menge (µg) des Spaltprodukts Adenin (links) bzw. Guanin (rechts) nach 60-minütiger Hydrolyse bei 70°C von 270 µg DNA mit 200 µl HCl (0,1 M, 0,2 M und 1 M; Kapitel 6.2.8.3). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Tukey Test,  $p < 0,05$ ). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Rohdaten: Anhang A5.5.

Zudem fällt auf, dass die Ausbeute an Guanin bei der Hydrolyse mit 1 M HCl signifikant höher war als die Ausbeute an Adenin (t-Test,  $p < 0,05$ ), während die Hydrolysen bei den niedrigeren HCl-Molaritäten signifikant höhere Ausbeuten an Adenin lieferten (t-Test,  $p < 0,05$ ). Ab einem pH-Wert von  $\leq 3$  wird Guanin besser vom DNA-Rückgrat abgespalten als Adenin (Shapiro und Danzig, 1972). Der berechnete pH-Wert der HCl-Lösungen mit den verschiedenen Molaritäten (pH 1 für 0,1 M, pH 0,7 für 0,2 M und pH 0 für 1 M HCl) lag jedoch immer unterhalb eines pH-Wertes von 3. Die bevorzugte Abspaltung von Guanin trat also erst bei niedrigeren pH-Werten auf.

Aufgrund der signifikant höheren Menge an Spaltprodukten nach Hydrolyse mit 1 M HCl, wurde diese Molarität für die weitere Optimierung der Thermolyse hinsichtlich Inkubationszeit und -temperatur verwendet.

#### Optimierungen der milden sauren Thermolysen

Die Optimierung der sauren thermischen Hydrolyse von DNA wurden mit 98%iger TFA, 1 M HCl und 88%iger FA durchgeführt. Die Optimierung der Hydrolysetemperatur erfolgte mit

60°C, 70°C und 80°C und als Inkubationsdauern wurden die Zeitpunkte 15, 30, 45, 60 und 90 min gewählt. Die DNA-Pellets wurden, wie in den Kapiteln 6.2.8.2 - 6.2.8.4 beschrieben, hydrolysiert und anschließend mittels HPLC-UV analysiert (Kapitel 6.2.1.1 Methode 2). Für jede Hydrolysebedingung wurde die Menge an Spaltprodukten mithilfe der Kalibriergeraden kalkuliert und die signifikanten Unterschiede mit Hilfe des ANOVA Tukey-Test ermittelt.

Das Ziel der Optimierung der Hydrolyse bestand neben der Erhöhung der Ausbeute an Adenin (ca. 27 µg) und Guanin (ca. 18 µg) darin, Bedingungen zu finden, die zugleich eine möglichst hohe Wiederfindung des als Modell-Addukt verwendeten diastereomeren GSH-PAT-Adenin-Addukts gewährleisten. Für ausgewählte Hydrolysebedingungen wurden deshalb anschließend noch die Wiederfindungen des GSH-PAT-Adenin-Addukts bestimmt (Kapitel 6.2.9.3).

### Vergleich der optimierten Thermolysen

Die Hydrolysen mit TFA lieferten die Spaltprodukte in Mengen von 15,4 ± 1,3 µg (60°C, 15 min) bis 22,5 ± 1,0 µg (70°C, 90 min) für Adenin und 16,1 ± 1,3 µg (60°C, 15 min) bis 27,0 ± 0,3 µg (80°C, 45 min) für Guanin (Anhang A5.6 A). Die Ausbeuten für Guanin lagen meist etwas höher als die Ausbeuten an Adenin. Sowohl bei der Zunahme der Inkubationsdauer, als auch bei Erhöhung der Temperatur war einen ansteigenden Trend in der Ausbeute der Purinbasen erkennbar.

Die Hydrolyse mit TFA bei 60°C für 45 min ergab Ausbeuten an Spaltprodukten die vergleichbar waren mit der Ausbeute bei höheren Temperaturen. Die Wiederfindung der GSH-PAT-Adenin Addukte war bei der 60°C-Hydrolyse mit 76,3 ± 1,7% jedoch höher. Es wurde dabei signifikant mehr Guanin (20,2 ± 1,0 µg) abgespalten als Adenin (18,1 ± 0,6 µg; t-Test, p<0,05).

Die Hydrolysen mit HCl lieferten die Spaltprodukte in Mengen von 12,2 ± 0,1 µg (70°C, 15 min) bis 24,8 ± 0,2 µg (80°C, 90 min) für Adenin und 12,1 ± 0,1 µg (70°C, 15 min) bis 36,8 ± 0,2 µg (80°C, 90 min) für Guanin (Anhang A5.6 B). Auch bei den Hydrolysen mit HCl waren die Ausbeuten an Guanin meist höher als für Adenin.

Aufgrund der hohen Wiederfindung der cGSH-PAT-Adenin-Addukte (82,0 ± 2,4%) wurde die Hydrolyse mit 1 M HCl bei 70°C für 30 min als geeignete Hydrolysemethode ausgewählt. Hierbei wurde signifikant mehr Guanin (20,1 ± 0,3 µg) abgespalten als Adenin (19,1 ± 0,1 µg; t-Test, p<0,001).

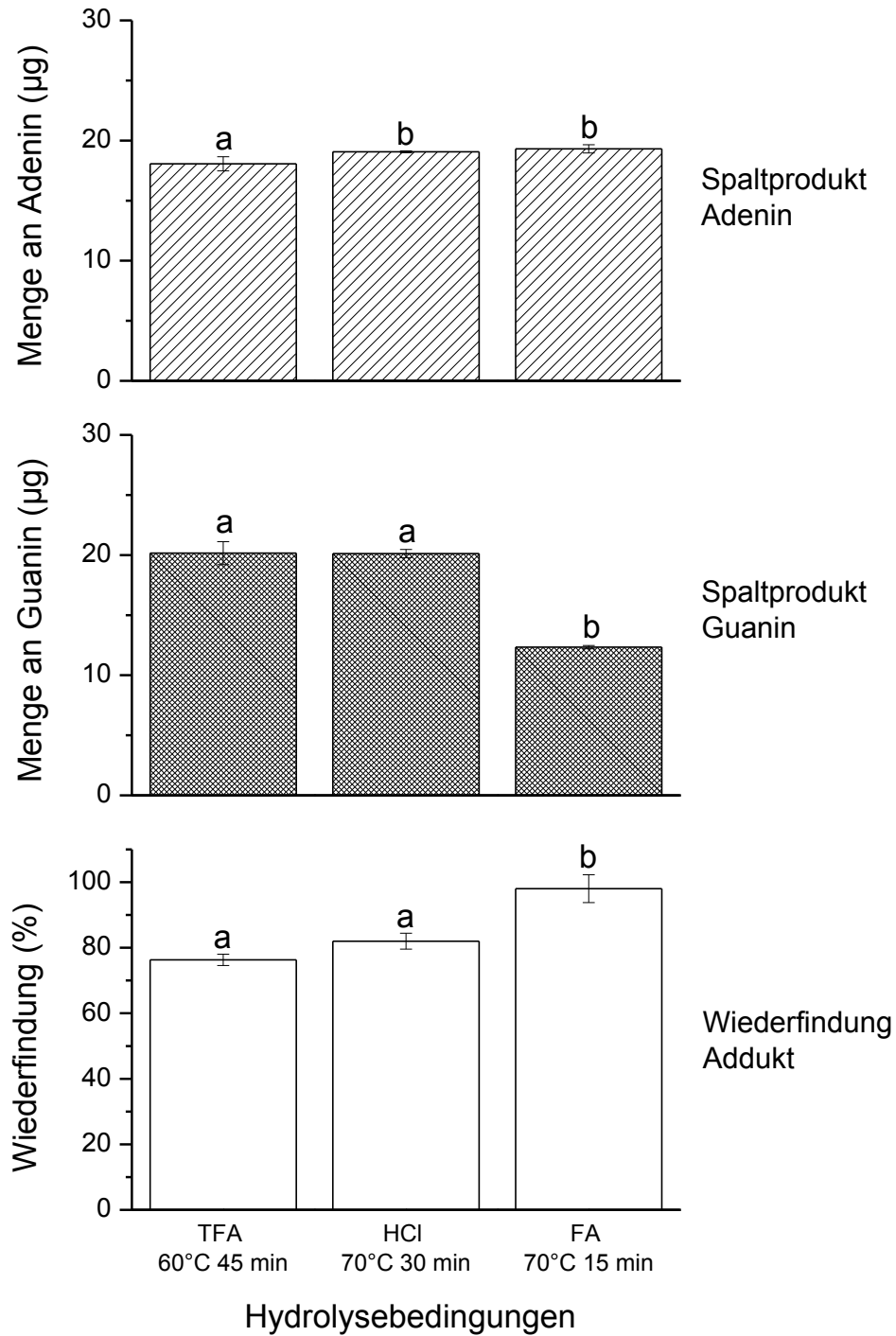
Die Hydrolysen mit FA lieferten die Spaltprodukte in Mengen von 17,5 ± 0,2 µg (80°C, 15 min) bis 21,6 ± 0,1 µg (80°C, 45 min) für Adenin und 12,3 ± 0,1 µg (70°C, 15 min) bis 24,8 ± 0,6 µg (80°C, 45 min) für Guanin (Anhang A5.6 C).

Aufgrund der hohen Wiederfindung der cGSH-PAT-Adenin-Addukte ( $98,0 \pm 4,2\%$ ) und einer Adenin-Ausbeute die vergleichbar war mit der bei höheren Temperaturen und längeren Inkubationszeiten, wurde die Hydrolyse mit FA bei  $70^\circ\text{C}$  für 15 min als geeignete Hydrolysemethode ausgewählt, auch wenn unter diesen Hydrolysebedingungen die signifikant niedrigste Ausbeute an Guanin resultierte. Im Gegensatz zu den Hydrolysen mit TFA und HCl wurde durch die Hydrolyse mit FA ( $70^\circ\text{C}$ , 15 min) signifikant mehr Adenin ( $19,3 \pm 0,3 \mu\text{g}$ ) abgespalten als Guanin ( $12,3 \pm 0,1 \mu\text{g}$ ; t-Test,  $p < 0,0001$ ).

Zur Auswahl einer sauren Hydrolysemethode wurden sowohl die Ausbeute an Spaltprodukten als auch die Wiederfindung der diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukte der zuvor ausgewählten Hydrolysebedingungen für TFA ( $60^\circ$ , 45 min), HCl ( $70^\circ\text{C}$ , 30 min) und FA ( $70^\circ\text{C}$ , 15 min) untereinander verglichen. Nach den Hydrolysen mit HCl und FA waren die Mengen an Adenin zwar signifikant höher als nach Hydrolyse mit TFA, wobei die Differenz in der abgespaltenen Menge an Adenin nur  $1 \mu\text{g}$  betrug (**Abb. 62**). Die Menge an Guanin war nach Hydrolysen mit TFA und mit HCl signifikant höher als nach Hydrolyse mit FA, jedoch war hier die Differenz in der abgespaltenen Menge an Guanin mit ca.  $8 \mu\text{g}$  wesentlich ausgeprägter (**Abb. 62**).

Da nach Spaltung von  $270 \mu\text{g}$  DNA ungefähr  $27 \mu\text{g}$  Adenin und  $18 \mu\text{g}$  Guanin erwartet werden (Anteil DNA-Basen an der Masse der DNA  $33,3\%$ , Verhältnis der Basenpaare AT/CG = 60/40; Chargaff, 1950) liegt die berechnete Effizienz der Spaltung mit den drei ausgewählten Hydrolysen bei 67-72% für Adenin und bei 69-112% für Guanin.

Unter den Bedingungen der Hydrolyse mit FA ( $70^\circ\text{C}$ , 15 min) war die Wiederfindung der cyclischen Mischaddukte signifikant höher als die unter den beiden anderen Hydrolysebedingungen, welche sich nicht signifikant unterschieden (**Abb. 62**). Da die Hydrolyse mit HCl ( $70^\circ\text{C}$ , 30 min) für beide Spaltprodukte mit die höchste Ausbeute lieferte und eine gute Wiederfindung der Addukte mit  $82,0 \pm 2,4\%$  gewährleistet, sollten diese Hydrolysebedingungen für die Hydrolyse von DNA zur Freisetzung potentieller DNA-Addukte im Folgenden angewandt werden.



**Abb. 62:** Vergleich der optimierten Hydrolysebedingungen mit TFA (60°C, 45 min), HCl (70°C, 30 min) und FA (70°C, 15 min). Menge an Spaltprodukten Adenin (oben) und Guanin (Mitte) nach Hydrolyse von 270 µg DNA (Kapitel 6.2.8.2 - 6.2.8.4). Sowie Wiederfindung der diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 (unten) unter den jeweiligen Hydrolysebedingungen (Kapitel 6.2.9.3). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Tukey Test,  $p < 0,05$ ). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Rohdaten: Anhang A5.7 und A5.8.



### 3.2.1.2 Anreicherung der Addukte mittels Festphasenextraktion

Da mittels saurer DNA-Hydrolyse neben den potentiellen DNA-Addukten auch nicht-adduktivierte Purinbasen vom DNA-Rückgrat abgespalten werden und zudem die DNA-Addukte meist nur in einer Häufigkeit von 1 Addukt pro  $10^6$ - $10^9$  Nukleotide (zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013) vorkommen, müssen diese zunächst noch angereichert werden. In der Literatur wird zur Anreicherung von DNA-Addukten häufig die Methode der Festphasenextraktion angewandt. Hierbei kommen als Sorbentien neben unpolaren Umkehr (RP)-Phasen auch Ionenaustauscherphasen sowie sogenannte silika-basierte „mixed mode“-Phasen mit hydrophoben Elementen und ionenaustauschenden Fähigkeiten zum Einsatz (zusammengefasst in Tretyakova et al., 2013), durch welche die DNA-Addukte zurückhalten und von den freien DNA-Basen abgetrennt werden können.

Die PAT-Adenin-Addukte zeigten bei der HPLC-Trennung mit RP-Phasen ein sehr ähnliches Elutionsverhalten wie die freie DNA-Base (**Abb. 6**). Zudem enthalten vor allem die Mischaddukte mit GSH ionische Gruppen, deren Anwesenheit gegen die Verwendung von RP-Phasen spricht. Da alle Addukte von PAT mit DNA-Basen, mit und ohne GSH, eine oder zwei anionische Carboxylgruppen aufweisen und die freien DNA-Basen wiederum keine anionischen Gruppen besitzen, kam als SPE-Phase ein anionenaustauschendes Sorbens in Frage. An dieses können die Addukte mit ihren anionischen Carboxylgruppen binden, wohingegen die freien DNA-Basen aufgrund fehlender anionischer Gruppen keine Wechselwirkungen eingehen können. Durch den Spülvorgang sollen somit zuerst die freien DNA-Basen aus der Säule gewaschen und anschließend die Addukte von der Säule eluiert und somit angereichert werden.

Die zur Bindung an die SPE-Phase benötigten Carboxylgruppen sind Bestandteil des PAT-Grundgerüsts (PAT-Adenin-Addukte) bzw. des GSH-Moleküls (c//GSH-PAT-Adenin-Addukte) und somit ist die Bindung an die kationischen Gruppen der SPE-Phase nicht von der gebundenen DNA-Base oder der GSH-Struktur im Addukt (cyclisch oder linear) abhängig. Da einige (cGSH-)PAT-Adenin-Addukte (1.1-1.3, 2.1, 5.1 und 5.2) durch semi-präparative HPLC isolierbar waren (Kapitel 6.2.4), wurden diese für die Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode verwendet. Zudem wurde durch die Verwendung einer DNA-Basenmischung überprüft, ob sich die freien DNA-Basen durch die Spülschritte der SPE-Methode abtrennen lassen.

#### 3.2.1.2.1 Festphasenextraktion an einer starken Anionenaustauscherphase

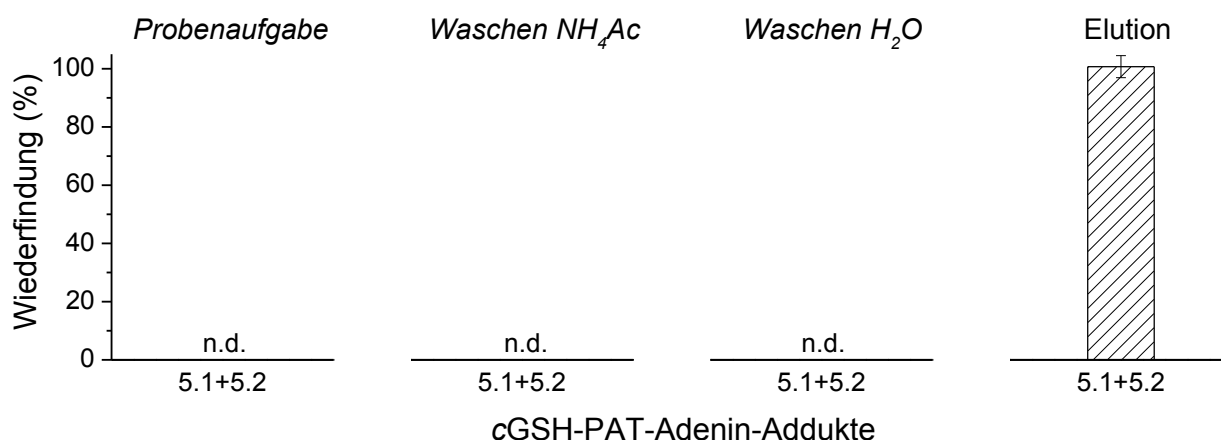
An einer silika-basierten starken Anionenaustauscherphase (strata-SAX, *strong anion exchange mode*) mit positiv geladenen quartären Ammoniumionen können schwach saure

Analyten selektiv angereichert. Diese Phase bietet zudem den Vorteil, dass als Wasch- und Elutionslösungen wässrige Puffer- und Säurelösungen verwendet werden können, in denen die Stabilität der Addukte höher ist als in den für Umkehrphasen üblichen organischen Lösemitteln wie z.B. Methanol (Kapitel 3.1.1.2.3).

Die in Wasser gelösten isolierten Fraktionen der PAT-Adenin-Addukte (Addukte 1.1-1.3, 2.1), der diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukte (Addukte 5.1 und 5.2) und eine DNA-Basenmischung wurden jeweils auf eine SPE-Säule gegeben, welche zuvor gemäß den Herstellerangaben konditioniert wurde (Kapitel 6.2.10.1). Die Eluate der Probenaufgabe, der beiden Spülschritte und der Elution wurden getrennt aufgefangen und nach Gefriertrocknung mittels LC-MS/MS im MRM-Modus ((cGSH-)PAT-Adenin-Addukte) bzw. mittels HPLC-UV (DNA-Basenmischung) analysiert. Die Wiederfindung in den einzelnen SPE-Eluaten wurde durch den Peakflächenvergleich mit einer unbehandelten Adduktfraktion bzw. der DNA-Basenmischung ermittelt.

#### cGSH-PAT-Adenin-Addukte

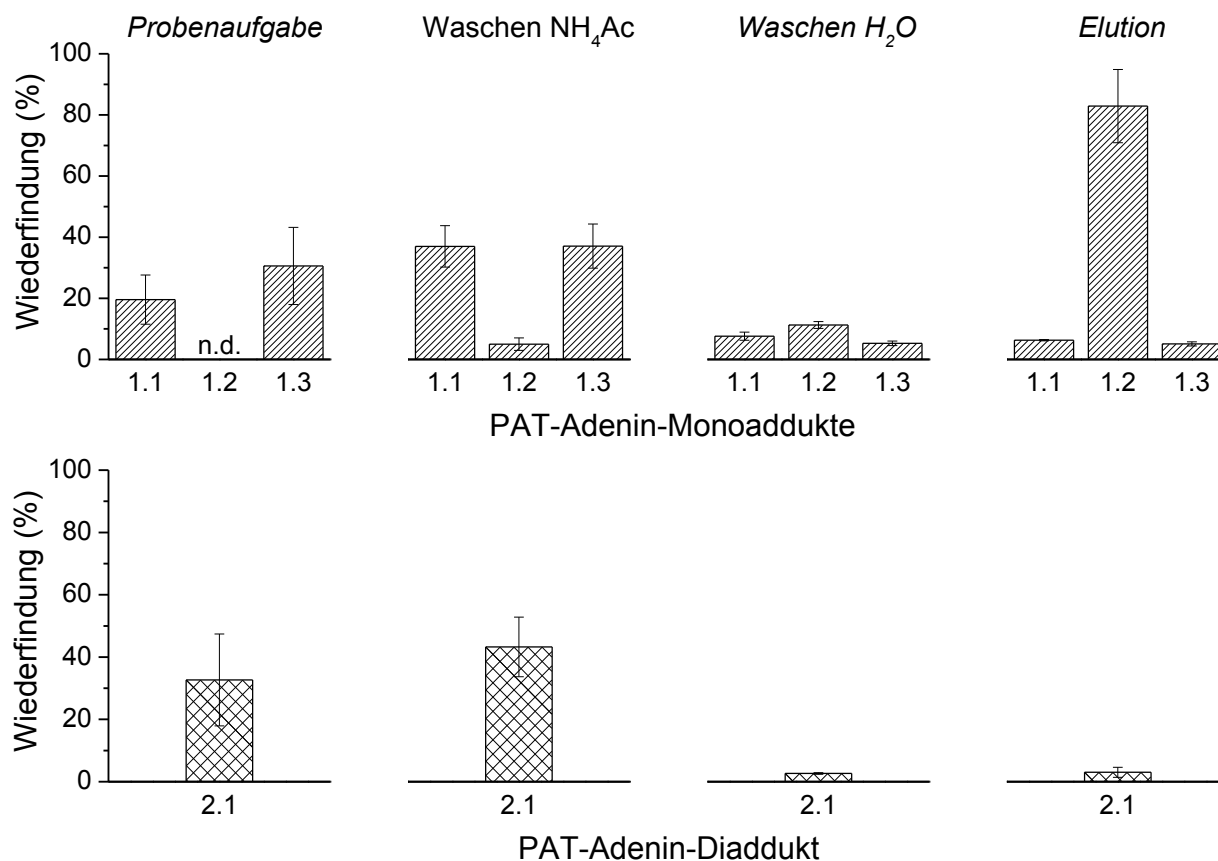
Die cGSH-PAT-Adenin-Addukte wurden zu  $100,7 \pm 3,8\%$  in der Elutionsfraktion wiedergefunden (**Abb. 63**). Alle anderen Eluate enthielten keinen Peak der diastereomeren Addukte. Die hohe Wiederfindungsrate der Mischaddukte in der Elutionsfraktion zeigte, dass die Addukte über die kationischen Gruppen der SPE-Phase gebunden und durch die wässrige-saure Elutionslösung wieder vollständig freigesetzt wurden.



**Abb. 63:** Wiederfindung der cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 in den einzelnen SPE-Eluaten nach Extraktion an einer SAX-Säule. Konditionierung mit 1 ml MeOH und 1 ml Wasser, Probenaufgabe von 1 ml Addukt Mischung (gelöst in Wasser), Waschen mit 1 ml Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>Ac) 25 mM 1 ml Wasser, Elution mit 5 ml Wasser mit 5% FA (Kapitel 6.2.10.1). Anschließende Analyse der SPE-Eluate mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus (cGSH-PAT-Adenin-Addukte *m/z* 551>136, CE 31 V; Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 2). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Bestimmungen. n.d., kein Adduktpeak detektierbar. Rohdaten: Anhang A6.1.

PAT-Adenin-Addukte

Die PAT-Adenin-Addukte waren in allen Eluaten der SPE detektierbar (**Abb. 64**). Die Monoaddukte 1.1 und 1.3 wurden mit insgesamt ca. 68% bzw. 57% in den Eluaten der Probenaufgabe und des ersten Waschschrattes wiedergefunden. Die restlichen Fraktionen enthielten jeweils nur noch weniger als 10% dieser Addukte. Monoaddukt 1.2 hingegen wurde zu  $82,9 \pm 12\%$  in der Elutionsfraktion wiedergefunden. Die restlichen ca. 16% befanden sich in den beiden Waschschrritten.



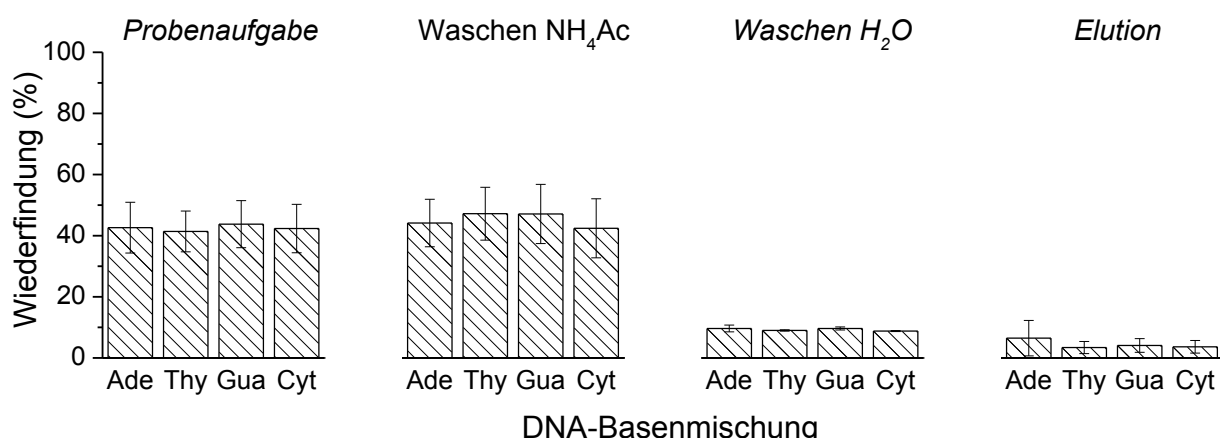
**Abb. 64:** Wiederfindung der PAT-Adenin-Monoaddukte (oben) und -Diaddukt (unten) in den einzelnen SPE-Eluaten nach Extraktion an einer SAX-Säule. Konditionierung mit 1 ml MeOH und 1 ml Wasser, Probenaufgabe von 1 ml Adduktmischung (gelöst in Wasser), Waschen mit 1 ml Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>Ac) 25 mM und 1 ml Wasser, Elution mit 5 ml Wasser mit 5% FA (Kapitel 6.2.10.1). Anschließende Analyse der SPE-Eluate mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus (PAT-Adenin-Addukte  $m/z$  280>136, CE 35 V; PAT-Adenin-Diaddukte  $m/z$  397>262, CE 17 V; Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 2). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Bestimmungen. n.d., kein Adduktpeak detektierbar. Rohdaten: Anhang A6.2.

Das Diaddukt 2.1 eluierte zu ca. 76% nach Probenaufgabe und dem ersten Waschschriff (**Abb. 64**). In den folgenden Fraktionen wurden insgesamt nur noch ca. 6% des Diaddukts wiedergefunden.

Mit Ausnahme des Monoaddukts 1.2 wurden die PAT-Adenin-Addukte nicht von den funktionellen Gruppen des Sorbens zurückgehalten und eluierten größtenteils schon direkt nach der Probenaufgabe und in den beiden Waschschrritten. Somit war die SAX-Phase nicht zur Anreicherung aller PAT-Adenin-Addukte geeignet. Dies lag vermutlich daran, dass die PAT-Adenin-Addukte nur eine saure Carboxylgruppe besitzen, die an die kationische SPE-Phase bindet, wohingegen die Mischaddukte zwei Carboxylgruppen besitzen und somit stärker gebunden werden.

#### Abtrennung einer Mischung von DNA-Basen

Die Wiederfindung der DNA-Basen betrug in den Eluaten der Probenaufgabe 41 - 44% und im ersten Waschschrift 42 - 47% (**Abb. 65**). Im zweiten Waschschrift wurden noch zwischen 9 - 10% der Basen wiedergefunden. In der Elutionsfraktion lag die Wiederfindung der DNA-Basen nur noch bei 3 - 6%. Somit betrug die Wiederfindung der DNA-Basen in den Eluaten der Probenaufgabe und der beiden Waschschrritte 97 - 105%. Somit ist eine Abtrennung der DNA-Basen durch SPE mit der SAX-Phase gewährleistet.



**Abb. 65:** Wiederfindung einer Mischung der DNA-Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin in den einzelnen SPE-Eluaten nach Extraktion an einer SAX-Säule. Konditionierung mit 1 ml MeOH und 1 ml Wasser, Probenaufgabe von 1 ml Addukt Mischung (gelöst in Wasser), Waschen mit 1 ml Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>Ac) 25 mM und 1 ml Wasser, Elution mit 5 ml Wasser mit 5% FA (Kapitel 6.2.10.1). Anschließende Analyse der SPE-Eluate mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 3). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Rohdaten: Anhang A6.3.

#### Eignung der SAX-Phase

Die Eignung der SAX-Phase für die Anreicherung von (cGSH-)PAT-Basen-Addukten wurde durch die isolierten Addukte mit Adenin überprüft. Aufgrund der Wiederfindung der cGSH-PAT-Adenin-Addukte in der Elutionsfraktion und der nahezu vollständigen Abtrennung der

freien DNA-Basen durch die Probenaufgabe und der beiden Waschschriffe, ist die SPE mit der SAX-Phase für die Anreicherung der Mischaddukte geeignet. Die PAT-Adenin-Addukte zeigten jedoch, aufgrund der Elution in den beiden Waschschriffen, keine ausreichende Bindung zum Sorbens. Für die Anreicherung der PAT-Basen-Addukte ohne GSH musste deshalb eine andere SPE-Phase gefunden werden.

### 3.2.1.2.2 Festphasenextraktion an einer starken Anionenaustauscher-Mischphase

Aufgrund der unzureichenden ionischen Wechselwirkungen der PAT-Adenin-Addukte mit der starken Anionenaustauscherphase (Kapitel 3.2.1.2.1), wurde eine polymerbasierte Anionenaustauscher-Mischphase (*strata X-A, strong anion mixed mode*) ausgewählt, an welcher die schwach sauren Analyten zusätzlich noch durch  $\pi$ - $\pi$ -Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen binden können. Aufgrund der zusätzlichen Wechselwirkungen erfolgt die Elution der an die X-A-Phase gebundenen Analyten durch den Einsatz von wässrigen Lösungen die sowohl Säure, zur Verdrängung des Analyten durch Konkurrenz mit den funktionellen Gruppen, als auch organische Lösemittel, zur Elution der hydrophob wechselwirkenden Gruppen, enthalten müssen.

Für die Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode wurde die SPE-Phase zunächst gemäß den Herstellerangaben konditioniert und nach Probenaufgabe gespült. Für die Überprüfung des für die Elution der Addukte notwendigen organischen Anteils erfolgte die Elution schrittweise mit je 1 ml wässriger Elutionsmischungen mit ansteigendem Anteil an Methanol, welche jeweils 5% FA enthielten (Kapitel 6.2.10.2).

Die Eluate der Probenaufgabe, der beiden Spülschriffe und die Elutionsfraktionen wurden getrennt aufgefangen und nach Gefrietrocknung bzw. Evaporation für die Methanol-enthaltenden Eluate mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus analysiert. Die Wiederfindung in den einzelnen SPE-Eluaten wurde durch den Peakflächenvergleich mit einer unbehandelten Adduktfraktion ermittelt.

Die Abtrennung von den freien Basen wurde mit der optimierten Elutionsmischung durch die Bestimmung der Wiederfindung einer Basenmischung in den einzelnen SPE-Eluaten mittels HPLC-UV überprüft.

### PAT-Adenin-Addukte

Die PAT-Adenin-Addukte waren in den Eluaten der Probenaufgabe und der beiden Waschschriffe nicht bzw. nur in geringen Mengen vorhanden (Tab. 7), was eine Bindung der Addukte an das Sorbens bestätigt. In der ersten Elutionsfraktion ohne organischen Anteil eluierten zwischen 67 - 76 % der Addukte. In der nachfolgenden Elutionsfraktion mit 1%

Methanol wurden noch weitere 15 - 17%, in der Fraktion mit 3% Methanol noch ca. 1% der Addukte wiedergefunden. Die Wiederfindung in den weiteren Elutionsfraktionen mit höheren Methanolanteilen lag bei <0,3%. Mit den ersten beiden Elutionsfraktionen wurde somit eine Wiederfindung der Addukte zwischen 83 - 91% erreicht. Um eine vollständige Elution der Addukte zu gewährleisten, sollte fortan die Elution mit 1 ml Wasser mit 5% FA und 1 ml 3% Methanol mit 5% FA erfolgen.

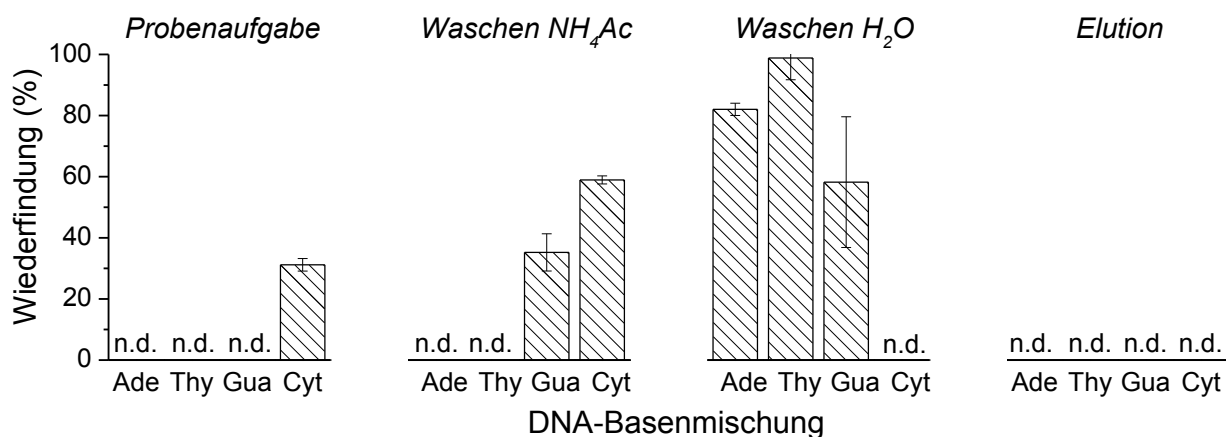
**Tab. 7:** Wiederfindung der PAT-Adenin-Monoaddukte (1.1, 1.2 und 1.3) und des PAT-Adenin-Diaddukts (2.1) in den einzelnen SPE-Eluaten nach Extraktion an einer X-A-Säule. Konditionierung mit 2 ml MeOH und 2 ml Wasser, Probenaufgabe von 1 ml Adduktgemisch (gelöst in Wasser), Waschen mit 1 ml Ammoniumacetat 25 mM und 2 ml MeOH, Elution mit 1 ml Wasser mit 5% FA und ansteigendem Anteil an MeOH (Kapitel 6.2.10.2). Analyse der SPE-Eluate mittels LC-MS/MS im MRM-Modus (Details siehe **Abb. 64**). Dargestellt sind die Werte einer Einfachbestimmung. n.d., kein Peak detektierbar. Rohdaten: Anhang A6.4.

| SPE-Fraktion               |                         | Wiederfindung (%) |      |      |      |
|----------------------------|-------------------------|-------------------|------|------|------|
|                            |                         | 1.1               | 1.2  | 1.3  | 2.1  |
| Probenaufgabe              |                         | n.d.              | n.d. | n.d. | n.d. |
| Waschen NH <sub>4</sub> Ac |                         | 0,01              | n.d. | n.d. | n.d. |
| Waschen MeOH               |                         | n.d.              | n.d. | 0,13 | n.d. |
| Elution                    | H <sub>2</sub> O, 5% FA | 72,4              | 74,4 | 75,7 | 67,1 |
| Elution                    | 1% MeOH, 5% FA          | 17,0              | 16,7 | 14,8 | 15,6 |
| Elution                    | 3% MeOH, 5% FA          | 1,2               | 1,4  | 1,1  | 1,2  |
| Elution                    | 5% MeOH, 5% FA          | 0,1               | n.d. | 0,2  | 0,3  |
| Elution                    | 10% MeOH, 5% FA         | 0,1               | n.d. | 0,1  | n.d. |
| Elution                    | 50% MeOH, 5% FA         | 0,1               | n.d. | 0,1  | 0,3  |
| Elution                    | 100% MeOH, 5% FA        | 0,04              | n.d. | 0,04 | n.d. |

#### Abtrennung einer Mischung von DNA-Basen

In dem Eluat der Probenaufgabe wurde nur die Base Cytosin mit ca. 31% wiedergefunden (**Abb. 66**). Durch die beiden Waschschrte wurden weitere 59% Cytosin und zudem ca. 93% Guanin, 99% Thymin und 82% Adenin eluiert. Dabei wurde der größere Anteil der DNA-Basen Adenin, Guanin und Thymin erst durch das Waschen mit Methanol von der SPE-Säule gespült. Dies ist durch hydrophobe Wechselwirkungen der DNA-Basen mit dem Mischphasen-Sorbens erklärbar, was den Einsatz von Methanol als Waschlösung zwingend

erforderlich macht. In der Elutionsfraktion waren keine Basen mehr detektierbar, wodurch eine Abtrennung der DNA-Basen durch SPE mit der X-A-Phase gewährleistet ist.



**Abb. 66:** Wiederfindung einer Mischung der DNA-Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin in den einzelnen SPE-Eluaten nach Extraktion an einer X-A-Säule. Konditionierung mit 2 ml MeOH und 2 ml Wasser, Probenaufnahme von 1 ml Addukt Mischung (gelöst in Wasser), Waschen mit 1 ml Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>Ac) 25 mM und 2 ml MeOH, Elution mit 1 ml Wasser mit 5% FA und 1 ml 3% MeOH mit 5% FA (Kapitel 6.2.10.2). Anschließende Analyse der SPE-Eluate mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 2). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei Bestimmungen. n.d., kein Peak detektierbar. Rohdaten: Anhang A6.5.

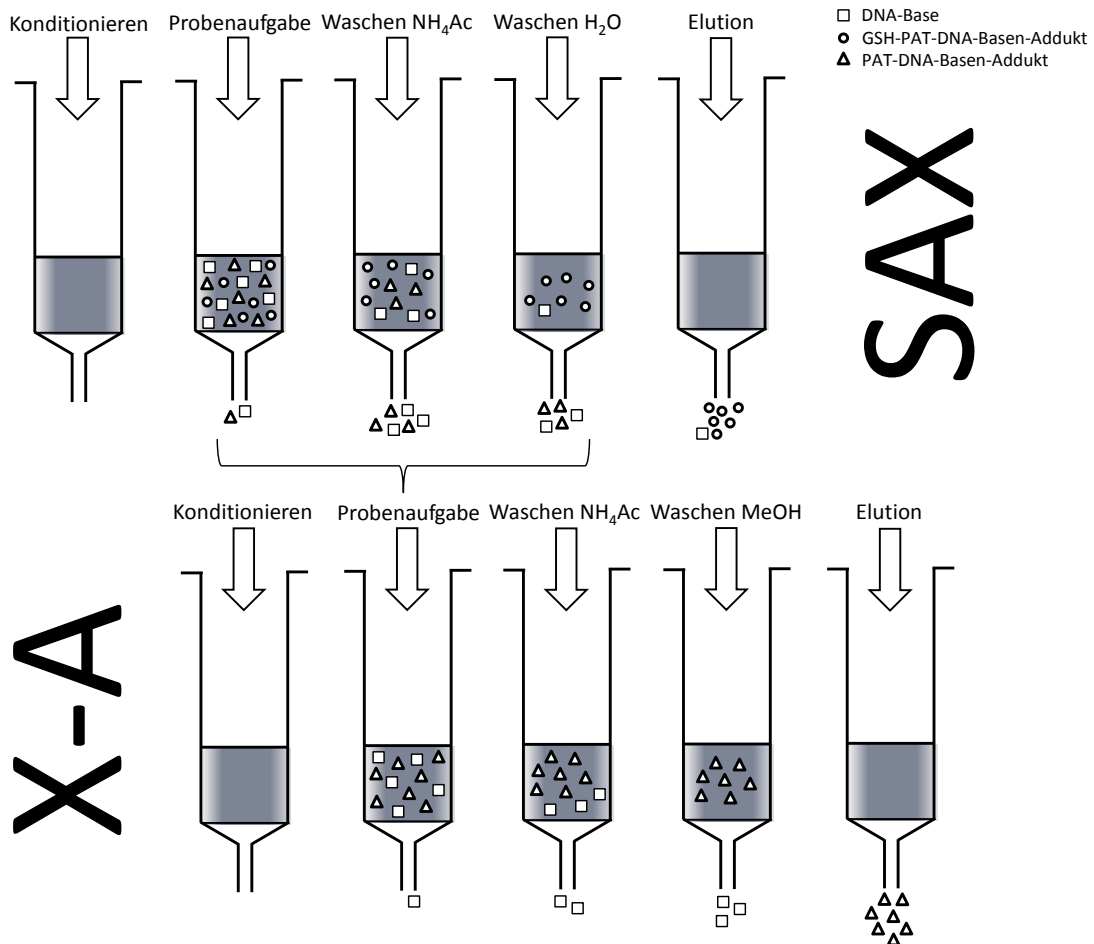
### Eignung der X-A-Phase

Aufgrund der hohen Wiederfindung der PAT-Adenin-Addukte in der Elutionsfraktion und der vollständige Abtrennung der freien DNA-Basen durch die Probenaufnahme und die Waschschrte, ist die SPE mit der X-A-Phase für die Anreicherung der PAT-DNA-Basen-Addukte geeignet. Von einer Überprüfung der Eignung dieser Phase für die Anreicherung von GSH-PAT-DNA-Basen-Addukten wurde abgesehen, da sowohl als Waschschrte als auch zur Elution der Einsatz von Methanol notwendig ist und die Mischaddukte im Organischen instabil sind (Kapitel 3.1.1.2.3). Um dennoch die Lösung der Addukte nach vorangegangener DNA-Hydrolyse nicht aufteilen zu müssen, sollte mit den beiden SPE-Phasen eine zweidimensionale SPE zusammengestellt werden.

### 3.2.1.2.3 Zweidimensionale Fesphasenextraktion zur Anreicherung der (Glutathion-)Patulin-DNA-Basen-Addukte

Die Anreicherung der (cGSH-)PAT-DNA-Basen-Addukte mit zwei unterschiedlichen SPE-Phasen ohne die Notwendigkeit des Aufteilens der DNA-Hydrolyselösung, sollte durch die aufeinanderfolgende Durchführung der beiden SPE-Methoden (zweidimensional) erfolgen.

Durch die erste SPE mit der SAX-Phase sollten die cGSH-PAT-DNA-Basen-Addukte in der Elutionsfraktion angereichert werden. Alle anderen Fraktionen, welche neben den PAT-DNA-Basen-Addukten auch die freien DNA-Basen enthalten, sollten vereinigt und direkt auf die zweite SPE mit der X-A-Phase gegeben werden (Abb. 67). Hierdurch sollten die DNA-Basen abgetrennt und die verbleibenden Addukte angereichert werden.



**Abb. 67:** Schema zur Durchführung der zweidimensionalen SPE mit einer SAX-Phase zur Anreicherung der cGSH-PAT-DNA-Basen-Addukte und X-A-Phase zur Anreicherung der PAT-DNA-Basen-Addukte.

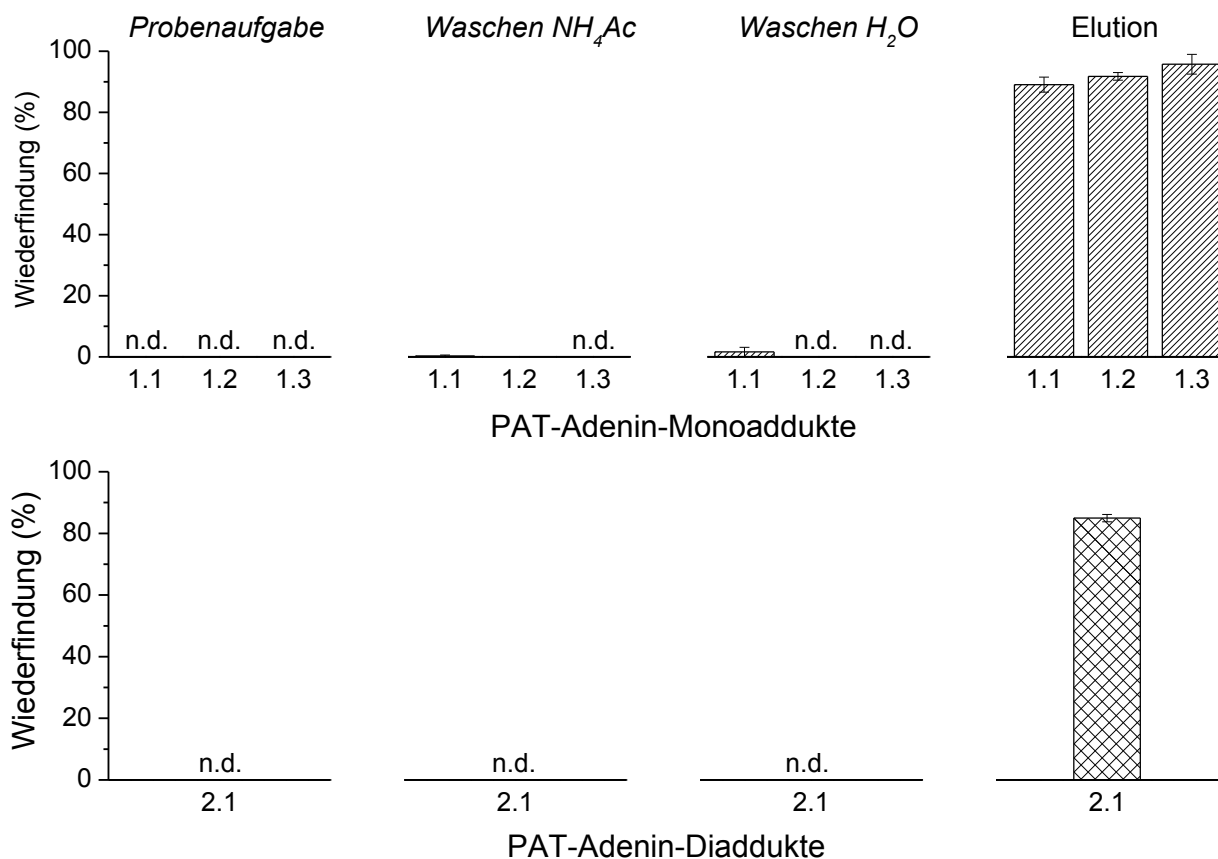
Einfluss der veränderten Probenaufnahme auf die Elution der Patulin-Adenin-Addukte

Da sich durch die vorangehende SPE mit der SAX-Phase die Probenaufnahme für die SPE mit der X-A-Phase hinsichtlich Aufgabevolumen (3 ml statt zuvor 1 ml) und Zusammensetzung der Aufgabelösung (Mischung aus Wasser und Ammoniumacetatlösung statt zuvor Wasser) änderte, wurde zunächst überprüft, ob dies Auswirkungen auf die Elution der PAT-Adenin-Addukte hat. Hierfür wurden die PAT-Adenin-Addukte in 2 ml Wasser und 1 ml Ammoniumacetatlösung (25 mM) gelöst und die SPE mit der X-A-Phase wie zuvor



beschrieben durchgeführt (Kapitel 6.2.10.2). Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mittels LC-MS/MS im MRM-Modus analysiert.

Die PAT-Adenin-Monoaddukte und -Diaddukte wurden zu 91 - 99% (Monoaddukte) bzw. 79% (Diaddukte) in der Elutionsfraktion wiedergefunden und somit durch die veränderte Probenaufgabelösung nicht beeinflusst (**Abb. 68**).



**Abb. 68:** Wiederfindung der PAT-Adenin-Monoaddukte (oben) und des PAT-Adenin-Diaddukts (unten) in den einzelnen SPE-Eluaten nach Extraktion an einer X-A-Säule. Konditionierung mit 2 ml MeOH und 2 ml Wasser, Probenaufgabe von 1 ml Adduktgemisch (gelöst in 2 ml Wasser und 1 ml Ammoniumacetat 25 mM), Waschen mit 1 ml Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>Ac) 25 mM und 2 ml MeOH, Elution mit 1 ml Wasser mit 5% FA und 1 ml 3% Methanol mit 5% FA, sowie einer Post-Elution mit 1 ml MeOH mit 5% FA (Kapitel 6.2.10.2). Analyse der SPE-Eluate mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus (Details siehe **Abb. 64**). Dargestellt sind die Werte einer Dreifachbestimmung. n.d., kein Peak detektierbar. Rohdaten: Anhang A6.6.

Für eine Überprüfung der vollständigen Elution der Addukte wurde eine Post-Elution mit 100% MeOH durchgeführt. In dieser Post-Elutionsfraktion wurden noch 1,1 - 1,7% bzw. 1,9% der Addukte wiedergefunden (**Abb. 68**).

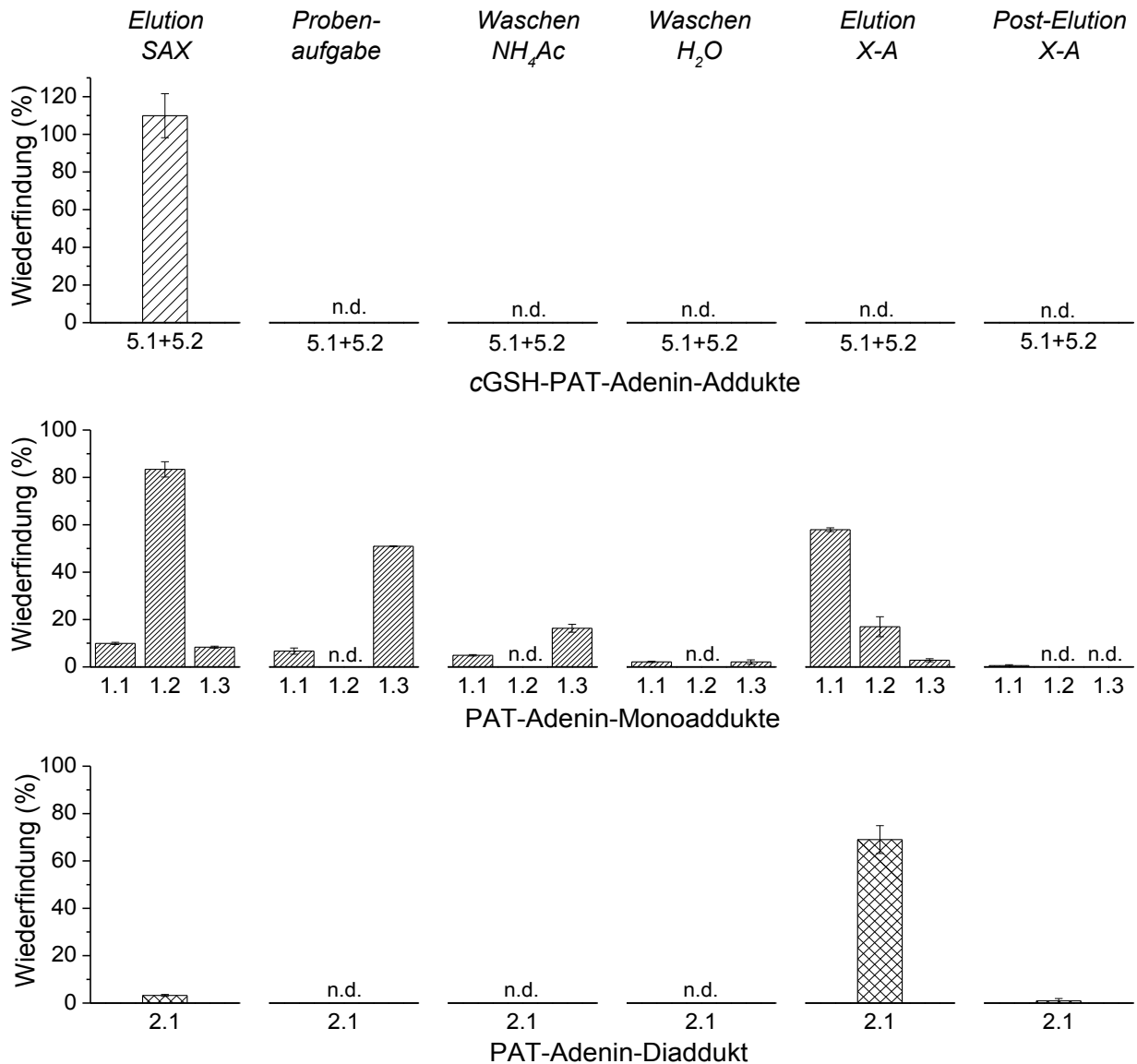
Eignung der zweidimensionalen Festphasenextraktion

Die Überprüfung der Eignung der zweidimensionalen SPE erfolgte mit einer Mischung aus cGSH-PAT-Adenin- und PAT-Adenin-Addukten (Kapitel 6.2.10.3) und anschließender HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus.

Die cGSH-PAT-Adenin-Addukte wurden zu  $109,9 \pm 11,7\%$  in der Elutionsfraktion wiedergefunden (**Abb. 69**). Alle anderen SPE-Fractionen enthielten keinen Peak der diastereomeren Addukte.

Das PAT-Adenin-Monoaddukte 1.2 wurden zu  $83,4 \pm 3,2\%$  in der Elutionsfraktion der SAX-Phase und nur zu  $17,0 \pm 4,2\%$  in der Elutionsfraktion der X-A-Phase wiedergefunden (**Abb. 69**). Diese hohe Wiederfindung in der Elutionsfraktion der SAX-Phase wurde bereits in Kapitel 3.2.1.2.1 beobachtet. Das Monoaddukt 1.1 eluierte zu  $57,9 \pm 0,8\%$  in der Elutionsfraktion der X-A-Phase. Da weitere  $9,9 \pm 0,5\%$  bereits in der Elutionsfraktion der SAX-Phase wiedergefundenen wurden, ergibt sich durch Vereinigung der Elutionsfraktionen eine Wiederfindung von ca. 68%. Durch die Vereinigung der Elutionsfraktionen wurde für das Diaddukt 2.1 eine Wiederfindung von ca. 72% erreicht.

Das PAT-Adenin-Monoaddukt 1.3 wurde nur zu  $2,8 \pm 0,6\%$  in der Elutionsfraktion der X-A-Phase wiedergefunden, weniger als 1% waren in der Fraktion des Post-Elution enthalten. In der Elutionsfraktion der SAX-Phase befanden sich  $8,3 \pm 0,4\%$ . Mit  $50,9 \pm 0,2\%$ , eluierte die Hälfte des Monoaddukts 1.3 bereits bei der Probenaufgabe. Weitere  $16,3 \pm 1,7\%$  befanden sich in dem Eluat des ersten Waschschrittes. Entgegen den Ergebnisse aus **Abb. 68**, wurde durch die zweidimensionale SPE aufgrund der geringen Wiederfindung von ca. 11% in den vereinigten Elutionsfraktionen, keine Anreicherung des Monoaddukt 1.3 durch Bindung an das Sorbens erreicht. Um das Monoaddukt 1.3 nicht zu verlieren, wäre es möglich die Fraktion der Probenaufgabe mit aufzufangen um eine Wiederfindung von ca. 62% zu erreichen. Da die Probenaufgabe nur die DNA-Base Cytosin enthielt (**Abb. 66**), welche bei der sauren DNA-Hydrolyse nicht abgespalten wird, würde somit trotzdem eine Anreicherung erfolgen können.



**Abb. 69:** Wiederfindung der diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukte (oben) und der PAT-Adenin-Monoaddukte (Mitte) und -Diaddukt (unten) in den einzelnen Eluaten nach 2-dimensionaler SPE mit einer SAX und X-A Säule (Kapitel 6.2.10.3). Analyse der SPE-Eluate mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus (Details siehe **Abb. 63** und **Abb. 64**). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Range/2 aus zwei Bestimmungen. n.d., kein Adduktpeak detektierbar. Rohdaten: Anhang 0.

### 3.2.1.3 LC-MS/MS-Methode im multiple reaction monitoring-Modus

DNA-Addukte werden mittels eines LC-gekoppelten Tripel-Quadrupole-Massenspektrometers am sensitivsten im MRM-Modus analysiert. In diesem Messmodus wird im Quadrupol Q1 ein de- oder protoniertes Vorläuferion mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis selektiert, welches dann in dem als Kollisionszelle dienenden Quadrupole Q2 durch eine bestimmte Kollisionsenergie fragmentiert wird. Durch den Quadrupol Q3 gelangt dann wiederum nur ein Fragmention (Produkt-Ion) mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis, welches dann am Detektor erfasst wird (**Abb. 70** schematische Darstellung des MRM-Modus in Q1-Q3). Somit erscheint im Chromatogramm nur dann ein Signal, wenn ein spezieller Massenübergang  $m/z$  Vorläuferion  $\rightarrow$   $m/z$  Produkt-Ion auftritt. Dieses zweistufige Kriterium macht den Messmodus sehr selektiv. Da andere Komponenten aufgrund anderer  $m/z$ -Verhältnisse von Vorläufer- und/oder Fragmention nicht erfasst werden, wird das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert, wodurch eine höhere Empfindlichkeit resultiert.

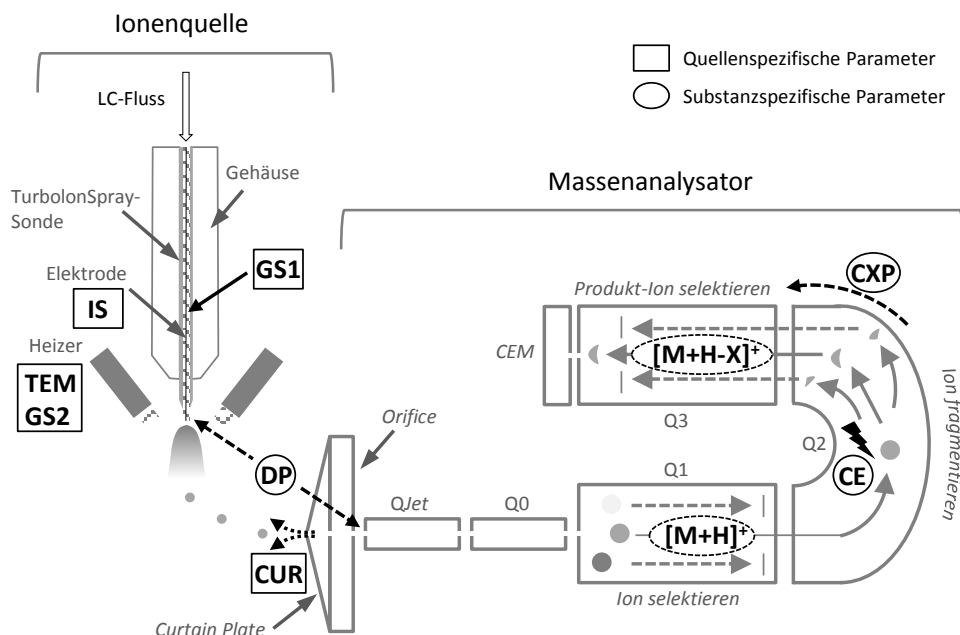
Innerhalb eines Experiments können mehrere Massenübergänge nacheinander in sogenannten Zyklen abgearbeitet werden. Durch die Eingabe von zwei intensiven Massenübergängen für einen Analyten, kann dieser quantifiziert (Massenübergang des Quantifiers) und zudem eindeutig identifiziert (Massenübergang des Qualifiers) werden, da das Verhältnis der Intensität von Quantifier zu Qualifier für einen bestimmten Analyten ebenso spezifisch ist. Zudem können in einem Experiment mehrere Analyten nebeneinander erfasst werden.

Um eine MRM-Methode zur Erfassung von potentiellen DNA-Addukten von PAT mit den DNA-Basen Adenin und Guanin zu erhalten, wurden neben der Bestimmung der intensivsten Vorläufer- und Fragmentionen weitere Geräteeinstellungen optimiert, welche ebenfalls vom Analyten abhängig sind und somit als substanzspezifische Parameter bezeichnet werden (**Abb. 70**, schwarze Kreise; Kapitel 3.2.1.3.1).

Im Anschluss daran wurden die quellenspezifischen Parameter für eine empfindliche Ionisierung der Analyten optimiert werden (**Abb. 70**, schwarze Rechtecke; Kapitel 3.2.1.3.2), die überwiegend von den LC-Bedingungen beeinflusst werden.

Da alle (GSH-)PAT-DNA-Basen Addukte mehrere Stickstoffatome aufweisen, welche leicht protoniert werden können, wurden die Optimierungen der MRM-Methode im positiven Ionisierungsmodus (ESI positiv) durchgeführt.

Nach den Optimierung der MRM-Übergänge und den dazugehörigen Geräteeinstellungen soll die MRM-Methode zusammengestellt werden (Kapitel 3.2.1.3.3).



**Abb. 70:** Schematisch Darstellung des Aufbaus der ESI-Ionenquelle und des Massenanalysators des verwendeten ESI-MS/MS-Systems (QTrap 5500 LC/MS/MS-System mit Turbo V™-Ionenquelle und Turbulonspray®-Sonde, ABSciex GmbH, Darmstadt). Im Quadrupol (Q) 1 - 3 ist schematisch die Funktionsweise des MRM-Modus dargestellt (Details im Text). Die für die Erstellung einer MRM-Methode zu optimierenden Parameter sind schwarz umrandet. Diese sind eingeteilt in die substanzspezifischen Parameter (Kreis, *Declustering Potential* (DP), Kollisionsenergie (CE), *Collision Exit Potential* (CXP), sowie Vorläuferion  $[M+H]^+$  und Produkt-Ion  $[M+H-X]^+$ ) und quellspezifischen Parameter (Rechteck, *Curtain Gas* (CUR), Ionisierungsspannung (IS), Zerstäubergas (GS1), Temperatur (TEM) und Turbogas (GS2); Details siehe Text sowie **Tab. 8** und **Tab. 9**). CEM, *Continuous Electron Multiplier*.

### 3.2.1.3.1 Bestimmung von substanzspezifischen Detektionsparametern sowie der intensivsten Vorläufer- und Fragmentionen

Für die identifizierten (GSH-)PAT-Adenin/Guanin-Addukte mussten zunächst die intensivsten Massenübergänge der Vorläuferionen ( $[M + H]^+$ ) auf bestimmte Fragmentionen ( $[M + H - X]^+$ ), sowie die dafür nötige Kollisionsenergie (CE), für jeden Analyten bestimmt werden (**Abb. 70**).

Damit ein Vorläuferion nach der Ionisierung mit maximaler Intensität in die Vakuumkammer gelangt, musste zudem das *Declustering Potential* (DP; **Abb. 70**) für jeden Analyten optimiert werden. Diese Spannung zwischen Elektrode und QJet dient der Minimierung der Analyt-Fließmittel-Cluster. Für einen vollständigen Transport der in der Kollisionzelle Q2 produzierten Fragmentionen in den Quadrupol Q3 musste anschließend noch die als *Cell Exit Potential* (CXP; **Abb. 70**) bezeichnete, zwischen Q2 und Q3 angelegte Spannung angepasst werden.

Für die Optimierung der Vorläufer- und Fragmentionen, sowie der substanzabhängigen Detektionsparameter DP, CE und CXP wurden die durch semipräparative HPLC-UV isolierten Addukte einzeln über die Spritzenpumpe injiziert (ESI-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.4) und mit einem manuell durchgeführten Vollscan im Q1 in dem Bereich des zu erwartenden  $m/z$ -Verhältnis ( $\pm 50$  Da) zunächst auf das Vorhandensein des Vorläuferions des Addukts mit einer Intensität von  $5 \times 10^5$  -  $5 \times 10^6$  cps überprüft. Anschließend wurde mittels Injektion der verdünnten Adduktlösungen mit Hilfe der Spritzenpumpe (Fließgeschwindigkeit 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) die Software-basierte (Analyst 1.6.1) automatische *Compound Optimization* durchgeführt. Hierbei wurde zunächst mit einem Q1 Scan das DP optimiert (Tab. 8) und mit dieser Einstellung ein Produktionenscan von dem Vorläuferion durchgeführt. Für die acht intensivsten Fragmentionen wurden anschließend noch die CE sowie das CXP für eine maximale Signalausbeute bestimmt (Tab. 8).

Für eine sichere Adduktidentifizierung und -bestimmung wurden zwei bis drei Übergänge pro Adduktgruppe (GSH-PAT-Adenin-, PAT-Adenin-, GSH-PAT-Guanin-, PAT-Guanin-Addukte) ausgewählt, wobei das intensivste Fragmention als Quantifizierung, das zweit- oder drittintensivste als Qualifizierung festgelegt wurde (Anhang A7.1).

**Tab. 8:** Übersicht über die substanzspezifischen Parameter, deren Optimierungseinstellungen und Funktionen

| Parameter                          | Optimierungsbereich |       |         | Aufgabe/Funktion   |
|------------------------------------|---------------------|-------|---------|--|
|                                    | von                 | bis   | Schritt |  |
| <i>Declustering Potential</i> (DP) | 1 V                 | 300 V | 5 V     | Spannung zwischen Elektrospraynadel und QJet®-Ionenführung, dient der Minimierung der Analyt-Fließmittel-Cluster   |
| <i>Collision Energie</i> (CE)      | 5 V                 | 130 V | 2 V     | Stoßenergie, bestimmt die Potentialdifferenz zwischen der Spannung an Q0 und Q2 (Stoßzelle); auf die Vorläuferionen einwirkende Energiemenge wenn sie in die Stoßzelle hinein beschleunigt werden und mit Gasmolekülen kollidieren und fragmentieren |
| <i>Cell Exit Potential</i> (CXP)   | 0 V                 | 55 V  | 2 V     | Stoßzellen-Austrittspotential, Spannung zwischen Q2 (Stoßzelle) und Q3, dient dem Transport der Fragmentionen aus Q2 in Q3   |

### 3.2.1.3.2 Bestimmung der quellenspezifischen Detektionsparameter

Anschließend an die Optimierung der substanzspezifischen Detektionsparameter erfolgte die für hohe Ionisierungsausbeuten nötige Optimierung der quellenspezifischen Parameter. Neben einer optimalen Ionisierungsspannung (IS) zur Ionisierung der sich im Fließmittel

befindenden Analyten, muss durch optimalen Druck des Zerstäubergases (GS1) und des Turbogases (GS2) sowie Temperatur des Turbogases (TEM) die Verdampfung des Fließmittels, die Stabilität des Sprays und die Förderung der Bildung von Analytionen in der Gasphase unterstützt werden (**Abb. 70**). Zudem sorgt ein aus der *Curtain Plate* herausströmendes und somit dem Spray entgegenströmendes Gas (*Curtain Gas*, CUR) dafür, das Gerät vor Kontaminationen zu schützen (**Abb. 70**). Der Hersteller empfiehlt für das CUR immer den höchsten Wert zu verwenden, bei dem noch kein Verlust an Empfindlichkeit feststellbar ist. Da insbesondere GS2 und die TEM von der Flussrate und der Lösungsmittelzusammensetzung abhängig sind, müssen die quellenspezifischen Parameter unter UHPLC-Bedingungen optimiert werden.

Hierfür wurde eine Mischung von (GSH-)PAT-Adenin- und (GSH-)PAT-Guanin-Addukten durch wiederholte Injektion mittels UHPLC aufgetrennt und im MRM-Modus (Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1), mit den zuvor optimierten Massenübergängen und substanzspezifischen Parametern (Kapitel 3.2.1.3.1) analysiert, wobei die quellenspezifischen Parameter innerhalb der üblichen Einstellungen (**Tab. 9**) nacheinander verändert wurden. Für jede Einstellung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und die gemittelten Flächen der Adduktpeaks untereinander verglichen.

**Tab. 9:** Übersicht über die quellenspezifischen Parameter, deren üblicher Einstellungsbereich bei einem Fluss von 0,2 ml/min und Funktionen.

| Parameter                    | Übliche Einstellungen |        | Aufgabe/Funktion  |
|------------------------------|-----------------------|--------|---|
|                              | von                   | bis    |   |
| <i>Curtain Gas</i> (CUR)     | 20 psi                | 35 psi | Gasdruck zwischen Transferkapillare und <i>Curtain Plate</i> , hilft bei der Verdampfung des Fließmittels und dient dem Schutz vor Kontamination                    |
| <i>Ionspray Voltage</i> (IS) | 1,5 kV                | 5,5 kV | Spannung zwischen Elektrospraynadel und <i>Orifice-Plate</i> , dient der Ionisierung der Analyten   |
| <i>Temperatur</i> (TEM)      | 450°C                 | 650°C  | Temperatur des Turbogases in der <i>TurbolonSpray</i> ®-Sonde, unterstützt die Verdampfung des Fließmittels und fördert die Bildung von Analytionen in der Gasphase |
| <i>Gas 1</i> (GS1)           | 40 psi                | 60 psi | Zerstäubergas, unterstützt die Erzeugung kleiner Fließmitteltröpfchen und beeinflusst die Spray-Stabilität und Empfindlichkeit                                      |
| <i>Gas 2</i> (GS 2)          | 50 psi                | 70 psi | Turbogas, unterstützt die Verdampfung des Fließmittels und fördert die Bildung von Analytionen in der Gasphase  |

### 3.2.1.3.3 Zusammenstellung der MRM-Methode

Mit diesen optimierten Parametern wurde nun eine Methode erstellt (**Tab. 10**), welche für die Erfassung der potentiellen (GSH-)PAT-Adenin/Guanin-Addukte in genomischer DNA angewandt wurde. Für jeden der 15 Massenübergänge wurde eine Messzeit (*dwell time*) von 40 msek eingestellt, woraus sich als Gesamtzeit für einen Messzyklus (*cycle time*) 0,8 sek ergab (zwischen den Übergängen je 5,007 msek Pause). Die geringste Peakbreite der Adduktpeaks lag bei ca. 18 sek (PAT-Guanin G12). Somit war jeder Peak definiert durch mehr als 10 Datenpunkte. Üblicherweise werden 10-15 Datenpunkte auf einem Peak für eine gute Reproduzierbarkeit der Peakfläche (< 10%) empfohlen.

**Tab. 10:** Zusammenstellung der optimierten MRM-Methode zur Erfassung von (GSH-)PAT-Adenin- und (GSH-)PAT-Guanin-Addukten

(A) Ionisierungsparameter.

| Parameter | Einstellung |
|-----------|-------------|
| Polarität | positiv     |
| CUR       | 35 psi      |
| IS        | 5000 V      |
| TEM       | 550°C       |
| GS1       | 40 psi      |
| GS2       | 70 psi      |

(B) Vorläufer- und Fragmentionen der einzelnen Addukte sowie substanzspezifische Parameter. Das Quantifier/Qualifier (Quant/Qual)-Verhältnis ist das Verhältnis der Addukt-Peakfläche bei dem intensivsten Massenübergang zur Addukt-Peakfläche des zweitintensivsten Übergangs und wurde zusammen mit der Retentionszeit (Rt) zur Adduktidentifizierung herangezogen. Der Bereich des Quant/Qual und die Rt wurden aus 8 Messungen einer Reaktionsmischung von PAT+GSH+Adenin+Guanin ermittelt. \*, Adduktpeak nur beim Quantifierübergang detektierbar. n.d., kein Peak detektiert.

| DP<br>(V)              | <i>m/z</i>               |  | CE<br>(V) | CXP<br>(V) | Addukt-<br>code | Rt<br>(min) | Quant/<br>Qual |         |
|------------------------|--------------------------|--|-----------|------------|-----------------|-------------|----------------|---------|
|                        | Vorläuferion             | Fragmention [Fragment]                                       |           |            |                 |             |                |         |
| PAT-Adenin-Monoaddukte |                          |  |           |            |                 |             |                |         |
| 60                     | 280,0 [M+H] <sup>+</sup> | 136,1 [Adenin+H] <sup>+</sup>                                | 35        | 11         | 1.1             | 2,9         | 1,0            |         |
|                        |                          | 206,0 [M+H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -COOH] <sup>+</sup> | 27        | 17         | 1.2             | 4,6         | 1,3            |         |
|                        |                          |  |           |            |                 | 1.3         | 2,2            | 4,9-5,4 |
|                        |                          |  |           |            |                 | 1.4         | 4,3            | *       |
|                        |                          |  |           |            |                 | 1.5         | 5,6            | *       |
| PAT-Adenin-Diaddukte   |                          |  |           |            |                 |             |                |         |
| 76                     | 396,9 [M+H] <sup>+</sup> | 262,1 [M+H-Adenin] <sup>+</sup>                              | 17        | 14         | 2.1             | 4,9         | 1,7-2,0        |         |
|                        |                          | 136,1 [Adenin+H] <sup>+</sup>                                | 39        | 12         | 2.2             | 10,6        | 2,0-2,3        |         |



|                         |                          |  |    |    |       |      |         |  |
|-------------------------|--------------------------|--|----|----|-------|------|---------|--|
| cGSH-PAT-Adenin-Addukte |                          |  |    |    |       |      |         |  |
| 56                      | 551,1 [M+H] <sup>+</sup> | 135,9 [Adenin+H] <sup>+</sup>                                | 31 | 12 | 5.1   | 12,8 | 4,1-4,9 |  |
|                         |                          | 341,1 [M+H-Gly-Adenin] <sup>+</sup>                          | 27 | 26 | 5.2   | 26,2 | 4,4-5,1 |  |
|                         |                          |  |    |    | 5.3   | 6,0  | 0,6-1,2 |  |
|                         |                          |  |    |    | 5.4   | 8,9  | 0,6-1,4 |  |
|                         |                          |  |    |    | 5.5   | 18,7 | 0,2-2,0 |  |
|                         |                          |  |    |    | 5.6   | 29,7 | *       |  |
|                         |                          |  |    |    | 5.7   | 36,6 | 1,4-1,7 |  |
| /GSH-PAT-Adenin-Addukte |                          |  |    |    |       |      |         |  |
| 70                      | 569,0 [M+H] <sup>+</sup> | 136,0 [Adenin+H] <sup>+</sup>                                | 30 | 13 | 7.1   | 22,9 | 1,7-2,4 |  |
|                         |                          | 287,0 [M+H-Glu-Adenin-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>         | 20 | 13 | 7.2   | 26,0 | 1,1-1,4 |  |
| PAT-Guanin-Monoaddukte  |                          |  |    |    |       |      |         |  |
| 80                      | 296,9 [M+H] <sup>+</sup> | 152,1 [Guanin+H] <sup>+</sup>                                | 33 | 16 | G11   | 3,7  | 4,1-4,7 |  |
|                         |                          | 222,0 [M+H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -COOH] <sup>+</sup> | 20 | 13 | G12   | 4,1  | 2,1-2,4 |  |
|                         |                          |  |    |    | G13   | 4,3  | *       |  |
| cGSH-PAT-Guanin-Addukte |                          |  |    |    |       |      |         |  |
| 91                      | 567,0 [M+H] <sup>+</sup> | 416,0 [M+H-Guanin] <sup>+</sup>                              | 27 | 20 | G1    | 18,3 | 1,2     |  |
|                         |                          | 341,0 [M+H-Gly-Guanin] <sup>+</sup>                          | 29 | 26 | G2    | 28,1 | 1,6-1,8 |  |
|                         |                          | 152,0 [Guanin+H] <sup>+</sup>                                | 29 | 13 | G3    | 31,0 | 1,1     |  |
|                         |                          |  |    |    | G4    | 32,5 | 0,8     |  |
|                         |                          |  |    |    | G5    | 37,1 | 1,9-2,1 |  |
|                         |                          |  |    |    | G6    | 42,6 | 1,81,9  |  |
| /GSH-PAT-Guanin-Addukte |                          |  |    |    |       |      |         |  |
| 80                      | 585,0 [M+H] <sup>+</sup> | 287,0 [M+H-Glu-Guanin-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>         | 20 | 13 | G7-10 | n.d. | ---     |  |
|                         |                          | 416,0 [M+H-Guanin-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>             | 20 | 13 |       |      |         |  |

Durch die mehrfache Messung einer Inkubationsmischung von PAT mit GSH und Adenin bzw. Guanin (Kapitel 6.2.3.1 und 6.2.3.3) wurden die PFV bestimmt (Tab. 10), welche zusammen mit der Retentionszeit herangezogen werden können um die Addukte eindeutig zu identifizieren. Jedoch wurden in der Mischung keine /GSH-PAT-Guanin-Addukte detektiert, weswegen für diese Addukte weder Retentionszeiten noch PFV definiert wurden. Die MRM-Methode ist somit nicht zur Identifizierung von /GSH-PAT-Guanin-Addukten geeignet.

Daneben war für einige Minor-Addukte (PAT-Adenin 1.4 und 1.5, PAT-Guanin G13, cGSH-PAT-Adenin 5.6) nur ein Signal auf der Spur des intensivsten MRM-Übergangs (*Quantifier*) detektierbar. Für diese Addukte steht somit kein PFV zur eindeutigen Identifizierung zur Verfügung. Ein Signal auf der *Quantifier*-Spur bei der entsprechenden Retentionszeit, kann somit nur als Hinweis auf die Bildung dieser Addukte angesehen werden.

### 3.2.2 Nachweis möglicher Addukte von Patulin mit DNA

Um die Reaktivität von PAT gegenüber DNA zu betrachten, sollte das Adduktbildungspotential von PAT durch Inkubation mit genomischer DNA in An- und Abwesenheit von GSH untersucht werden.

Hierfür sollten die in Kapitel 3.2.1 entwickelten Methoden zur DNA-Hydrolyse, Anreicherung und Detektion potentieller Addukte angewandt werden, durch welche die Erfassung von (GSH-)PAT-DNA-Basen-Addukten der Purinbasen Adenin und Guanin möglich ist.

Im Folgenden wurde nun zunächst ein Protokoll für die Inkubation von PAT mit DNA und die anschließenden Aufarbeitungsmethoden erstellt (Kapitel 3.2.2.1) und danach die Wiederfindungen von (GSH-)PAT-Adenin-Addukten, die mit diesem Protokoll erzielt werden können, bestimmt (Kapitel 3.2.2.2). Anschließend wurde das Protokoll angewandt, um die direkte Reaktion von PAT mit DNA unter Bildung potentieller (GSH-)PAT-Adenin/Guanin-Addukte zu untersuchen (Kapitel 3.2.2.3).

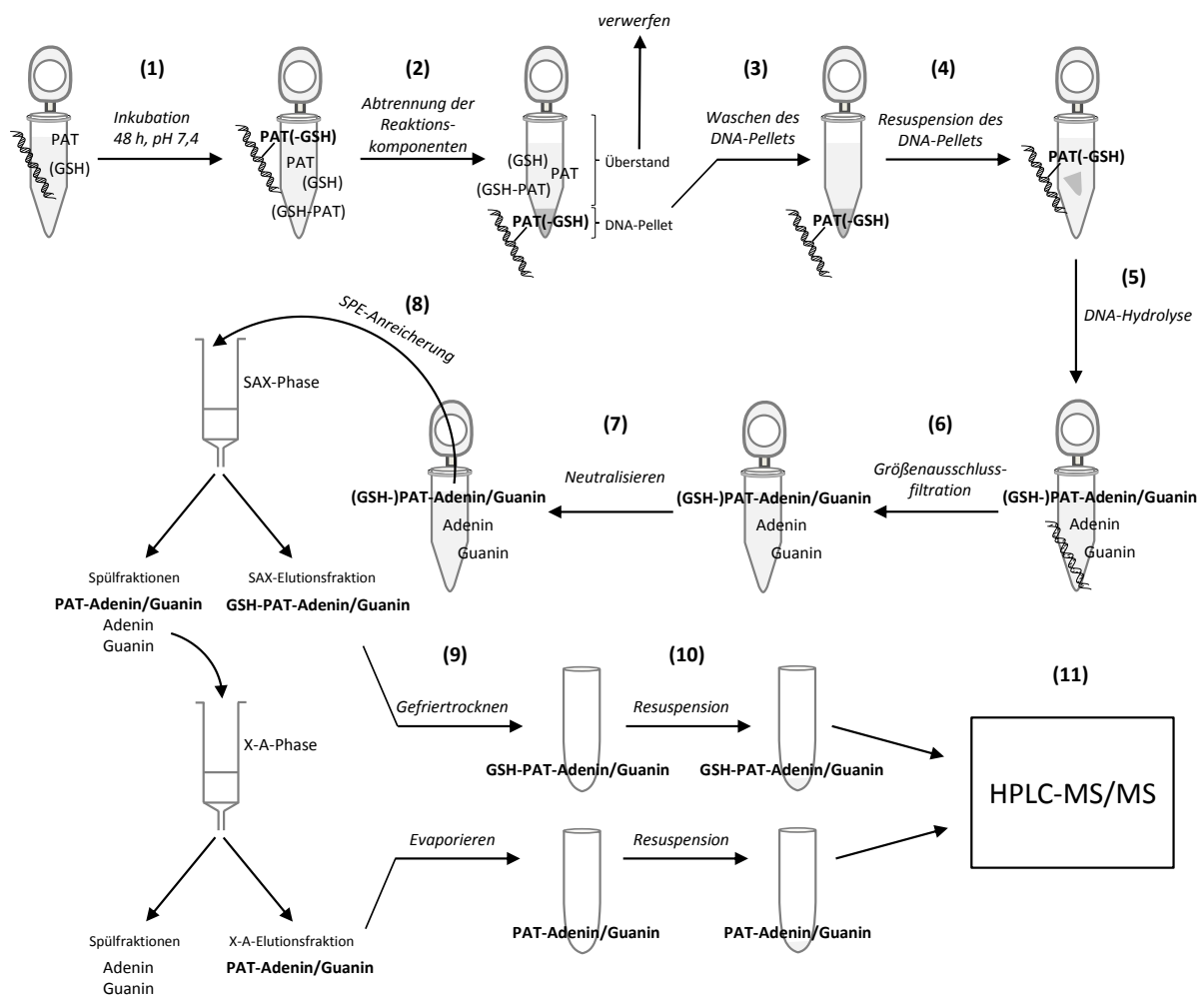
#### 3.2.2.1 Erstellen eines Protokolls für den Nachweis von Addukten von Patulin mit DNA

Für die Inkubation von PAT mit genomischer DNA wurde ein Protokoll (**Abb. 71**) erstellt, um sowohl die Bedingungen für die Inkubation, als auch der nachfolgenden Aufarbeitung sinnvoll aufeinander abzustimmen und durch nötige Zwischenschritte zu ergänzen, so dass der Nachweis von potentiellen DNA-Addukten von PAT dadurch möglich ist.

**Inkubationsbedingungen** (Schritt 1 in **Abb. 71**) Um die eingesetzten Konzentrationen an PAT und DNA eher den zellulären Bedingungen anzugleichen (Kapitel 3.1.3.1), sollte PAT mit einem Überschuss an DNA-Basen inkubiert werden. Hierfür musste zunächst noch eine DNA-Menge festgelegt werden, die zur Inkubation mit PAT eingesetzt werden sollte. In Studien über die DNA-Adduktbildung von Substanzen mit Kalbstyhmus-DNA wurden oftmals ca. 1 mg DNA eingesetzt (Mate et al., 1977; Inagaki et al., 2003; Inagaki et al., 2010). Um potentielle DNA-Addukte später in PAT-inkubierten Säugerzellen zu identifizieren, steht jedoch eine geringer DNA-Menge (ca. 5-7 µg DNA pro 10 Millionen Zellen) zur Verfügung. Für die Detektion von DNA-Addukten aus Zellen oder Gewebe mittels HPLC-MS/MS werden bis zu 100 µg DNA benötigt (zusammengefasst in Farmer et al., 2005; zusammengefasst in Himmelstein et al., 2009). Deshalb sollten zwischen 1 mg und 100 µg Kalbstyhmus-DNA für die Inkubation mit PAT eingesetzt werden, was Konzentrationen von ca. 2,3 bzw. 0,2 mM Adenin und 1,5 bzw. 0,2 mM Guanin im Reaktionsansatz entsprechen (basierend auf dem durchschnittlichen Molekulargewicht von 330 g/mol pro Base). Da die infolge der DNA-Hydrolyse freigesetzten DNA-Basen unter Umständen durch Überladung der SPE-Säule die

Anreicherung der Addukte stören könnten, wurde nach Erstellung dieses Protokolls zunächst die Wiederfindung von isolierten (GSH-)PAT-Adenin-Addukten nach Aufarbeitung mit 1 mg bzw. 100 µg DNA überprüft (Kapitel 3.2.2.2).

Um den Einfluss von GSH auf die direkte Reaktion von PAT mit DNA zu untersuchen, sollten die Inkubationen von PAT mit DNA sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von GSH durchgeführt werden. Entsprechend den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.3.1, wurden dafür GSH/PAT-Verhältnisse von 0,5, 1 und 2 gewählt. Die Inkubationen sollten im Neutralen bei RT und für 48 h unter leichtem Schütteln durchgeführt werden.



**Abb. 71:** Protokoll der Inkubation von PAT mit genomischer DNA in An- und Abwesenheit von GSH (1), sowie alle Aufarbeitungsschritte (2-10) bis zur Detektion der potentiellen (GSH-)PAT-Adenin/Guanin-Addukte mittels HPLC-MS/MS (11). Für eine detaillierte Erläuterung zu Punkten 1-11 siehe Text.

**Abtrennung von Reaktionskomponenten** (Schritt 2 in Abb. 71) Nach der 48-stündigen Inkubation liegt neben der potentiell modifizierten DNA zudem unreaktiertes PAT im Ansatz vor. Wenn das unreaktierte PAT im Ansatz verbleibt, könnte es nach Hydrolyse der DNA und anschließender Neutralisation der sauren Lösung wieder mit den freien DNA-

Basen reagieren und somit Addukte bilden, die jedoch nicht durch Reaktion mit der DNA entstanden sind. Deshalb muss PAT aus der DNA-Inkubationslösung entfernt werden. Weiterhin werden in Gegenwart von GSH auch noch unreaktiertes GSH, sowie GSH-PAT-Addukte in der Inkubationsmischung erwartet. Sowohl GSH als auch die GSH-PAT-Addukte könnten im weiteren Verlauf der Aufarbeitung stören, da sie aufgrund ihrer anionischen Carboxylgruppen mit den anionenaustauschenden Gruppen der SPE-Phase wechselwirken und dadurch mit den DNA-Basen-Addukten um die Bindungsstellen konkurrieren können. Das Entfernen von Reaktionskomponenten aus einer DNA-Inkubationslösung ist z.B. durch Extraktion mit einem geeigneten Lösungsmittel (Tretyakova et al., 1998) oder durch das Ausfällen der DNA mit EtOH und Verwerfen des Überstands (Hakala et al., 1999) möglich. Die Extraktion von PAT aus wässrigen Lösungen ist möglich mit Ethylacetat und wird z.B. zur PAT-Analyse in Fruchtsäften angewandt (zusammengefasst in Shephard und Leggott, 2000).

Die Eignung der Ethylacetat-Extraktion zur Extraktion von sowohl PAT als auch GSH und GSH-PAT-Addukten wurde anhand einer 24-stündigen Inkubationsmischung von PAT mit GSH, Adenin und Guanin ausgetestet. Die wässrige Mischung wurde dafür dreifach mit Ethylacetat extrahiert, anschließend sauer hydrolisiert und nach Neutralisation die SPE durchgeführt (Kapitel 6.2.11.1). Mittels HPLC-MS/MS wurden in allen SPE-Fractionen sowohl GSH als auch die GSH-PAT-Addukte detektiert (Anhang A8.1). Somit waren GSH und die GSH-PAT-Addukte nicht mit Ethylacetat extrahierbar. Mittels einer unbehandelten Kontroll-Inkubationsmischung wurden die Gesamtwiederfindungen der GSH-PAT-Addukte nach der Aufarbeitung kalkuliert. So wurden einige Addukte mit über 100% wiedergefunden (Anhang A8.1). Somit scheint es im Laufe der Aufarbeitung zu einer Neubildung der Addukte durch Reaktion von nicht extrahiertem GSH mit ebenso nicht vollständig extrahiertem PAT gekommen zu sein. Die Extraktion mit Ethylacetat wurde deshalb nicht zur Entfernung von PAT, GSH und der GSH-PAT-Addukte aus dem Inkubationsansatz herangezogen.

Stattdessens sollte nach erfolgter Inkubation die DNA durch Zugabe von kaltem EtOH und Zentrifugation ausgefällt und durch Abnehmen des wässrigen Überstands die Reste von unreaktiertem PAT, sowie GSH und GSH-PAT-Addukten abgetrennt werden.

**Waschen des DNA-Pellets** (Schritt 3 in **Abb. 71**) Um ein vollständiges Entfernen von PAT, sowie GSH und GSH-PAT-Addukten zu gewährleisten, sollte das DNA-Pellet insgesamt dreimal mit 70%-igem EtOH augeschlämmt und anschließend wieder abzentrifugiert werden.

**Resuspension des DNA-Pellets** (Schritt 4 in **Abb. 71**) Für die anschließende Hydrolyse des DNA-Pellets kann die Säure entweder direkt zum DNA-Pellet oder zu der durch

Resuspension des Pellets entstandenen DNA-Lösung gegeben werden. Da die Zugabe der Säure zu einer sich in Lösung befindenden, entfalteten DNA weniger aggressiv erschien, sollte das DNA-Pellet für die anschließende DNA-Hydrolyse zunächst wieder in Wasser resuspendiert werden.

**DNA-Hydrolyse und Abtrennung des DNA-Rückgrats** (Schritt 5 und 6 in **Abb. 71**) Die DNA-Hydrolyse sollte gemäß den in Kapitel 3.2.1.1 optimierten Bedingungen durch Zugabe von HCl (Endkonzentration 1 M) und Erhitzen auf 70°C für 30 min erfolgen. Durch diese milden Hydrolysebedingungen werden nur die Purinbasen Adenin und Guanin, sowie die potentiellen Addukte mit diesen Basen abgespalten. Der restliche DNA-Strang verbleibt in der Hydrolyselösung (Kapitel 1.2.3). Bei der nachfolgenden SPE zur Anreicherung der Addukte könnte der hydrolysierte DNA-Strang die SPE-Säule blockieren oder die Wechselwirkung der Addukte mit der SPE-Phase beeinflussen. Aus diesem Grund muss der hydrolysierte DNA-Strang aus der Hydrolyselösung abgetrennt werden, um eine klare Lösung von potentiellen Addukten und freien Purinbasen zu erhalten. Die einfachste und schnellste Möglichkeit hierfür ist die Zentrifugation durch einen Molekularfilter, welcher Moleküle mit größeren Massen zurückhält. Die DNA-Hydrolyselösung sollte deshalb durch einen Molekularfilter mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa zentrifugiert werden.

**Neutralisation der Hydrolyselösung und SPE-Anreicherung der potentiellen Addukte** (Schritt 7 und 8 in **Abb. 71**) Die SPE-Anreicherung sollte gemäß den in Kapitel 3.2.1.2 optimierten Bedingungen durch zwei aufeinanderfolgend angewandte SPE-Methoden mit verschiedenen stationären Phasen erfolgen: die Anreicherung potentieller GSH-PAT-DNA-Basen-Addukte an einer SAX-Anionenaustauscherphase und potentieller PAT-DNA-Basen-Addukte an einer X-A-Anionenaustauscher-Mischphase. Damit die Addukte an die funktionellen Gruppen der SPE-Phase binden können, muss die Lösung der Probenaufgabe einen pH-Wert zwischen 6-7 aufweisen. Der pH-Wert des Filtrats der DNA-Hydrolyselösung liegt bei ca. 1-2. Deshalb sollte das Filtrat durch Zugabe von Ammoniumhydroxid- und Ammoniumacetatlösung auf pH 6-7 eingestellt werden und anschließend direkt auf die SPE-Säule gegeben werden. Bei Abwesenheit von GSH im Inkubationsansatz wird die SAX-Phase zur Anreicherung von Mischaddukten nicht benötigt, deshalb sollte die Probenaufgabe der neutralisierten Hydrolyselösung direkt auf die X-A-SPE-Phase erfolgen.

**Aufkonzentrierung und Resuspension, sowie HPLC-MS/MS-Analyse der potentiellen Addukte** (Schritt 9 bis 11 in **Abb. 71**) Die potentiellen Addukte liegen in den SPE-Elutionsfraktionen in Wasser mit Ameisensäure (GSH-PAT-DNA-Basen-Addukte) oder in methanolischer Lösung mit Ameisensäure (PAT-DNA-Basen-Addukte) vor. Um die potentiellen DNA-Addukte anzureichern, muss das Lösungsmittel zunächst vollständig

entfernt werden. Dies sollte durch Gefriertrocknen (rein wässrige Lösung) bzw. durch Evaporation (methanolhaltige Lösung) erfolgen.

Die trockenen Fraktionen der potentiellen Addukte müssen anschließend für die HPLC-MS/MS-Analyse in einem definierten Volumen eines Lösungsmittels aufgenommen werden. Da die Fraktionen der SPE in 15 ml-Glasröhrchen aufgefangen und anschließend getrocknet werden (Elutionsvolumen zwischen 3 - 5 ml), sollte in einem Volumen von 200 µl gelöst werden, wodurch ein vollständiges Benetzen des Röhrchenbodens und der Wände zum Lösen der potentiellen Addukte möglich war. Da sich die Addukte in Wasser lösen und zudem die HPLC-Gradientenmethode mit einem hohen Wasseranteil startet, sollte als Lösungsmittel *LC-MS-Grade* Wasser verwendet werden.

### 3.2.2.2 *Wiederfindung der Addukte*

Mithilfe der isolierten PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2 und 1.3, sowie der diastereomeren GSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 wurde die Wiederfindung der Addukte bei Anwendung des Aufarbeitungs-Protokolls (Kapitel 3.2.2.1) bestimmt. Hierfür wurde ein Aliquot der isolierten Addukte zu einer DNA-Lösung gegeben, ab der DNA-Hydrolyse (Schritt 5 in **Abb. 71**) aufgearbeitet und nach der HPLC-MS/MS-Analyse die Peakflächen der Addukte mit einem unbehandeltem Addukt-Aliquot verglichen (Kapitel 6.2.11.2). Um einen möglichen Einfluss der DNA-Menge auf die SPE-Anreicherung der Addukte zu untersuchen, wurde eine DNA-Lösung mit einer DNA-Menge von 1 mg und 100 µg eingesetzt.

Die Anreicherung der PAT-Adenin-Addukte sollte an der X-A-Anionenaustauscher-Mischphase erfolgen und diese Addukte somit in der Elutionsfraktion der X-A-Phase zu finden sein (**Abb. 71**). Die PAT-Adenin-Addukte 1.1 und 1.2 wurden mit 96,5% bis 113,1% fast vollständig in der Elutionsfraktion der X-A-Phase wiedergefunden (**Tab. 11**). Dabei waren die Wiederfindungen nicht abhängig von der eingesetzten DNA-Menge.

Die Wiederfindung des PAT-Adenin-Addukts 1.3 in der X-A-Elutionsfraktion betrug hingegen nur 51% (1 mg DNA) bzw. 81% (0,1 mg DNA). Daneben waren in der Spülfraktion der X-A-Phase 22% (1 mg DNA) bzw. 25% (0,1 mg DNA) und in der Elutionsfraktion der SAX-Phase 2% (1 mg DNA) bzw. 5% (0,1 mg DNA) des Addukts 1.3 enthalten (**Tab. 11**). Mit einer DNA-Menge von 1 mg wurden somit insgesamt nur 76% des Addukts 1.3 wiedergefunden. Da sich jedoch in der X-A-Spülfraktion und der SAX-Elutionsfraktion die Wiederfindungen des Addukts 1.3 bei beiden DNA-Mengen nicht deutlich unterschieden, scheint die geringere Wiederfindung in der X-A-Elutionsfraktion bei der höheren DNA-Menge nicht durch die eingesetzte DNA-Menge (1 mg), sondern beispielsweise infolge eines zufälligen Fehlers im Verlaufe der Aufarbeitung bedingt zu sein.

**Tab. 11:** Wiederfindungen der (GSH-)PAT-Adenin-Addukte in den SPE-Fractionen nach Aufarbeitung einer Mischung der Addukte mit einer DNA-Lösung mit 1 mg oder 0,1 mg DNA gemäß dem dem Protokoll aus **Abb. 71** (ab Schritt 5). SPE-Fractionen: SAX-Elutionsfraktion (ElutionF) zur Anreicherung der GSH-PAT-Adenin-Addukte; X-A-ElutionsF zur Anreicherung der PAT-Adenin-Addukte; Spülfraktion (SpülF) der X-A-Phase, zur Abtrennung der freien DNA-Basen. Die Fractionen in der die Addukte zu erwarten waren, wurden grau hinterlegt. n.d., kein Peak detektierbar.

| Addukt                    | DNA-Menge<br>(mg) | Wiederfindung (%) |           |              |        |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------|--------------|--------|
|                           |                   | SAX-ElutionF      | X-A-SpülF | X-A-ElutionF | Gesamt |
| PAT-Adenin 1.1            | 1                 | 2,2               | 3,4       | 96,5         | 102,2  |
|                           | 0,1               | 4,4               | n.d.      | 100,9        | 105,4  |
| PAT-Adenin 1.2            | 1                 | n.d.              | 7,3       | 113,1        | 120,4  |
|                           | 0,1               | n.d.              | n.d.      | 111,1        | 111,1  |
| PAT-Adenin 1.3            | 1                 | 2,3               | 22,2      | 51,2         | 75,6   |
|                           | 0,1               | 4,6               | 25,1      | 80,8         | 110,4  |
| GSH-PAT-Adenin<br>5.1+5.2 | 1                 | 3,4               | 1,1       | 6,5          | 11,0   |
|                           | 0,1               | 4,8               | n.d.      | 6,3          | 11,1   |

Die Anreicherung der GSH-PAT-Adenin-Addukte sollte an der SAX-Anionenaustauscher-Phase erfolgen und diese Addukte somit in der Elutionsfraktion der SAX-Phase zu finden sein (**Abb. 71**). Jedoch wurden in dieser Phase nur 3% (1 mg DNA) bzw. 5% (0,1 mg DNA) der diastereomeren Addukte 5.1 und 5.2 wiedergefunden. Weitere 7% (1 mg DNA) bzw. 6% (0,1 mg DNA) wurden in der X-A-Elutionsfraktion wiedergefunden (**Tab. 11**). Somit erfolgte keine Anreicherung an der SAX-Phase, was jedoch unabhängig von der verwendeten DNA-Menge war. Da insgesamt nur ca. 11% der eingesetzten Addukte wiedergefunden wurden, war von einem Verlust der Addukte während der Aufarbeitung auszugehen.

Da die eingesetzte DNA-Menge keinen Einfluss auf die Anreicherung der PAT-Adenin-Addukte hatte und der Nachweis der GSH-PAT-Adenin-Addukte durch Einsatz einer größeren DNA-Menge wahrscheinlicher war, wurde die Inkubation mit 1 mg DNA durchgeführt, wodurch ca. 4 mM DNA-Basen zur Verfügung standen (Kapitel 3.2.2.1). Damit die DNA-Basen im mehrfachen Überschuss vorlagen, wurde eine PAT-Konzentration von 0,8 mM eingesetzt. Um den Einfluss von GSH auf die Adduktbildung zu untersuchen, wurden die Inkubationen auch in Gegenwart von GSH, mit einem GSH/PAT-Verhältnisse von 0,5, 1 und 2, durchgeführt.

Im Folgenden wurde das Inkubations- und Aufarbeitungs-Protokoll nun angewandt, um die direkte Reaktion von PAT mit DNA unter Bildung potentieller (GSH-)PAT-Adenin/Guanin Addukte zu untersuchen.

### 3.2.2.3 Identifizierung von Addukten aus DNA

Die Inkubation von PAT mit DNA wurde gemäß dem zuvor entworfenen Inkubations- und Aufarbeitungs-Protokoll (Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2) durchgeführt (Kapitel 6.2.11.3). Die Adduktbildung mit DNA wurde zunächst in Abwesenheit von GSH im Inkubationsansatz betrachtet (Kapitel 3.2.2.3.1). Anschließend wurde in Anwesenheit von GSH die Bildung von GSH-PAT-DNA-Basen-Addukten, sowie der Einfluss verschiedener GSH-Konzentrationen auf das Adduktbildungspotential untersucht (Kapitel 3.2.2.3.2). Weiterhin wurde das Muster der gebildeten Addukte mit dem Adduktmuster nach Reaktion von PAT mit DNA-Basen bzw. dNuS verglichen.

#### 3.2.2.3.1 Patulin-DNA-Basen-Addukte in Abwesenheit von Glutathion

In Abwesenheit von GSH im Inkubationsansatz wurden keine GSH-PAT-DNA-Basen-Mischaddukte, sondern nur PAT-DNA-Basen-Addukte erwartet. Zu deren Anreicherung wurde die SPE mit der X-A-Phase angewandt (**Abb. 71**) und die X-A-Elutionsfraktion, nach Einengen und Resuspension, auf das Vorhandensein der PAT-Adenin/Guanin-Addukte mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus überprüft.

Bei Bindung der potentiellen Addukte an die X-A-Phase, waren in der Fraktion der Spülschritte keine Addukte zu erwarten. Zur Überprüfung der Anreicherung wurde auch die X-A-Spülfraction auf das Vorhandensein der PAT-Adenin/Guanin-Addukte untersucht.

#### PAT-Adenin-Addukte

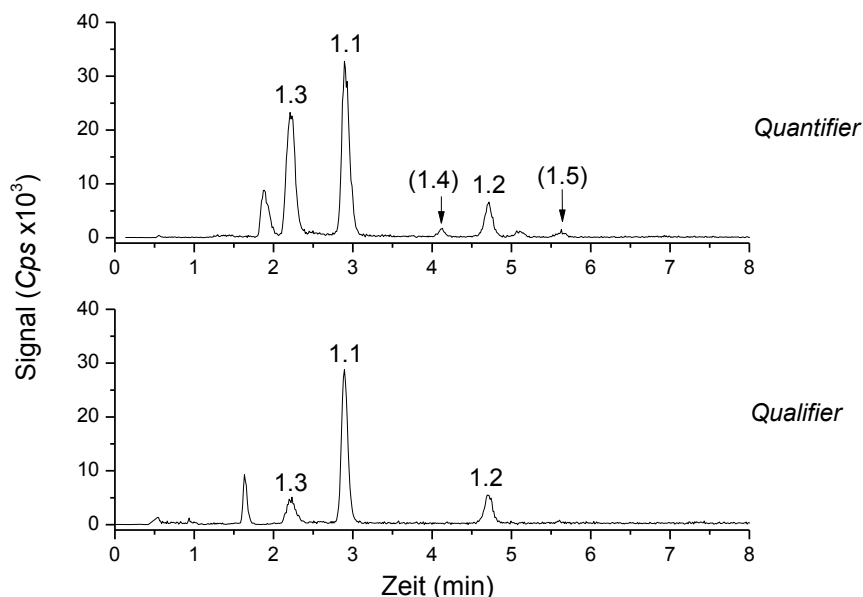
##### *Identifizierung in den SPE-Fractionen*

Für die Identifizierung von PAT-Adenin-Addukten wurde zunächst die Elutionsfraktion der SPE mit der X-A-Phase analysiert. Durch die zusammengestellte MRM-Methode (Kapitel 3.2.1.3.3) war eine Identifizierung der Haupt-PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2 und 1.3 anhand der Retentionszeiten und der PFV möglich. Für die Minor-Addukte 1.4 und 1.5 wurde nur ein Signal auf der *Quantifier*-Spur erwartet, so dass neben der Retentionszeit kein charakteristisches PFV für die Identifizierung dieser Addukte zur Verfügung stand. Die Anwesenheit von entsprechenden Signalen auf der *Quantifier*-Spur konnte folglich nur als Hinweis für die Bildung dieser Addukte angesehen werden.

Im Chromatogramm der *Quantifier*- und *Qualifier*-Spur für PAT-Adenin-Addukte waren Peaks zu den Retentionszeiten der PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2 und 1.3 detektierbar (**Abb. 72**). Das PFV dieser Peaks stimmte mit dem erwarteten PFV (**Abb. 72**, Kapitel 3.2.1.3.3) überein, so dass die Peaks eindeutig den Addukten 1.1 - 1.3 zugeordnet wurden. Daneben wurden auf der *Quantifier*-Spur kleine Peaks detektiert, die zu den Retentionszeiten der PAT-Adenin-



Addukte 1.4 und 1.5 eluierten. Wie zu erwarten, waren auf der *Qualifier*-Spur keine Peaks zu den Retentionszeiten der Addukte 1.4 und 1.5 vorhanden. Die Peaks auf der *Quantifier*-Spur gaben somit einen Hinweis auf die Bildung der Addukte 1.4 und 1.5.



**Abb. 72:** PAT-Adenin-Addukte, welche nach 48-stündiger Inkubation von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Abwesenheit von GSH, Aufarbeitung gemäß **Abb. 71** und nach Elution von der X-A-Phase detektiert wurden. Dargestellt ist das Chromatogramm des *Quantifiers* mit  $m/z$  280>136, CE 35 V (oben) und des *Qualifiers* mit  $m/z$  280>206, CE 27 V (unten). HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Identifizierung der Addukte über Retentionszeit und *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis. Die eingeklammerten Adduktpeaks wurden nur anhand der Retentionszeit (Rt) zugeordnet.

PAT-Adenin-Addukte: 1.1: Rt 2,9 min, PFV 1,3; 1.2: Rt 4,7 min, PFV 1,1; 1.3: Rt 2,2 min, PFV 5,1; 1.4: Rt 4,1 min; 1.5: Rt 5,6 min. Rohdaten im Anhang A8.2.

Um zu überprüfen, ob die Addukte durch Bindung an das SPE-Sorbens nicht angereichert wurden, wurde auch die Spülfraction der SPE mit der X-A-Phase auf PAT-Adenin-Addukte untersucht.

Im Chromatogramm der *Quantifier*- und der *Qualifier*-Spur waren die PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2 und 1.3 anhand der Retentionszeit und der PFV eindeutig identifizierbar (Anhang A8.3). Im Chromatogramm der *Quantifier*-Spur waren jedoch keine Peaks zu den Retentionszeiten der PAT-Adenin-Addukte 1.4 und 1.5 vorhanden.

Der Anteil der PAT-Adenin-Adduktpeakfläche lag in der Spülfraction bei ca. 85% für Addukt 1.1, 58% für Addukt 1.2 und 79% für Addukt 1.3 bezogen auf die Gesamtadduktpeakfläche und somit höher als in der eigentlichen Elutionsfraction. Die fehlende Anreicherung deutete auf eine ungenügende Haftung der Addukte am SPE-Sorbens und somit eine Elution der Addukte bereits während der Spülschritte hin. Eine mögliche Überladung der SPE-Säule durch die Menge der infolge der DNA-Hydrolyse abgespaltenen Basen Adenin und Guanin

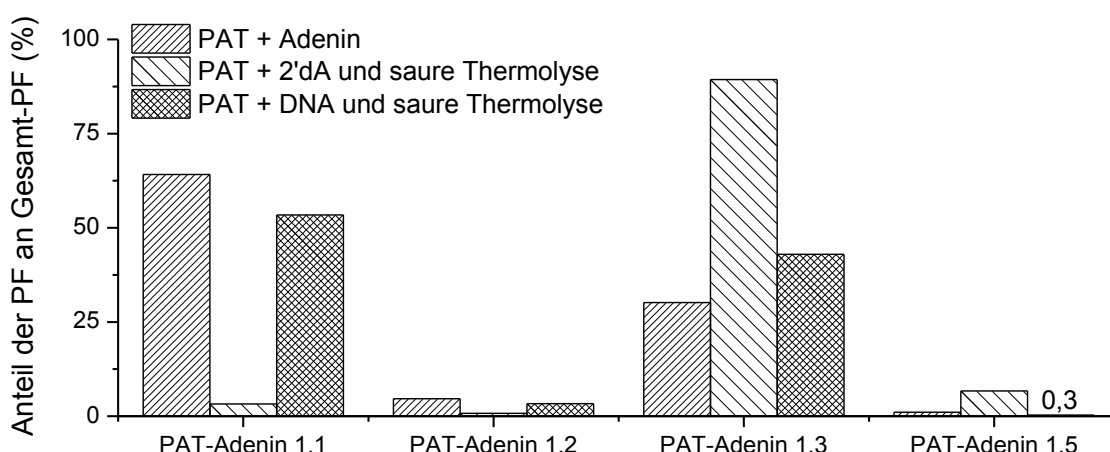
wurde durch die erzielten Wiederfindungen in Kapitel 3.2.2.2 ausgeschlossen. Bei der Probenaufarbeitung wurde der pH-Wert der Lösung für die Probenaufgabe zur SPE überprüft, weshalb ein falscher pH-Wert als Ursache der fehlenden Bindung an das SPE-Sorbens ebenso ausgeschlossen wurde. Da die Gesamtadduktpeakflächen doppelt so hoch waren wie die Gesamtpeakflächen der für die Wiederfindung eingesetzten Addukte, käme eine Überladung der Säule durch die Adduktmenge als Grund für die geringe Anreicherung der Addukte durch fehlende Bindung am SPE-Sorbens in Frage.

Durch die SPE-Methode wurde keine optimale Anreicherung der PAT-Adenin-Addukte erzielt, so dass die Bildung der Addukte ggf. unterschätzt wurde.

#### Beurteilung des Adduktusters

Das Adduktmuster der PAT-Adenin-Addukte, welche nach Inkubation mit DNA gebildet wurden, wurde anschließend mit dem Adduktmuster nach Reaktion von PAT mit Adenin, sowie nach Reaktion von PAT mit 2'dA und saurer Thermolyse zu den entsprechenden PAT-Adenin-Addukten verglichen. Dabei wurde für die Addukte, die durch Reaktion mit DNA gebildet wurden, die Gesamtpeakflächen der X-A-Elutions- und Spülfraktionen herangezogen, sowie die Wiederfindungen (Kapitel 3.2.2.2) mit einberechnet.

Durch die Reaktion von PAT mit DNA wurden die PAT-Adenin-Addukte 1.1 und 1.3 als Hauptaddukte gebildet (**Abb. 73**), wie auch durch die Reaktion von PAT mit Adenin. Im Gegensatz dazu wurde durch Reaktion mit 2'dA das Addukt 1.1 nur als Minor-Addukt gebildet. Weiterhin waren die prozentualen Anteile der Adduktpeakflächen der anderen Addukte 1.2 und 1.5, die durch Reaktion von PAT mit DNA gebildet wurden, ähnlicher zu denen, die durch Reaktion mit Adenin gebildet wurden (**Abb. 73**).



**Abb. 73:** Vergleich der prozentuale Anteile der Peakflächen der PAT-Adenin-Addukte, welche i) nach Reaktion von PAT mit Adenin (Kapitel 3.1.1), ii) nach Reaktion von PAT mit 2'dA und anschließender saurer Thermolyse (Kapitel 3.1.4.2) und iii) nach Reaktion von PAT mit DNA und saurer Thermolyse (Kapitel 3.2.2.3.1) gebildet wurden.

### Identifizierung von PAT-Guanin-Addukten

#### *Identifizierung in den SPE-Fraktionen*

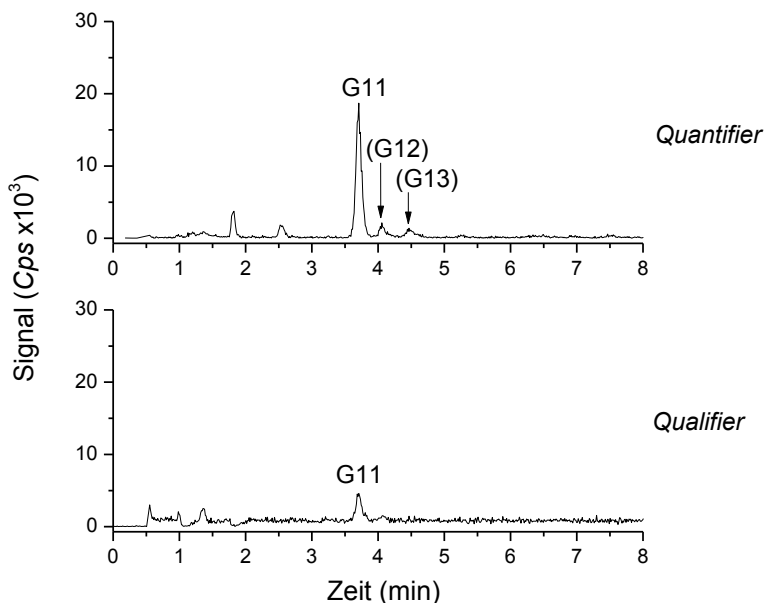
Für die Identifizierung von PAT-Guanin-Addukten wurde ebenfalls die Elutionsfraktion der SPE mit der X-A-Phase analysiert (**Abb. 71**). Durch die zusammengestellte MRM-Methode (Kapitel 3.2.1.3.3) ist die eindeutige Identifizierung der PAT-Guanin-Addukte G11 und G12 anhand der Retentionszeit und des PFV möglich. Für das Minor-Addukt G13 wird nur ein Signal auf der *Quantifier*-Spur erwartet, so dass neben der Retentionszeit kein charakteristisches PFV für die Identifizierung des Addukts zur Verfügung stand. Die Anwesenheit eines entsprechenden Signals auf der *Quantifier*-Spur kann folglich nur als Hinweis für die Bildung des Addukts angesehen werden.

Im den Chromatogrammen der *Quantifier*- und der *Qualifier*-Spur war ein Peak zur Retentionszeit des Addukts G11 vorhanden (**Abb. 74**), der zudem das erwartete PFV (Kapitel 3.2.1.3.3) aufwies. Das PAT-Guanin-Addukt G11 wurde somit eindeutig identifiziert.

Daneben waren im Chromatogramm des *Quantifier*-Übergangs in geringer Intensität Peaks bei den Retentionszeiten der Addukte G12 und G13 vorhanden. Aufgrund der geringen Intensität des Peaks von Addukt G12 und einem erwarteten PFV im Bereich von 2,1 - 2,4, war im *Qualifier*-Übergang kein Signal für Addukt G12 zu erwarten. Im entsprechenden Chromatogramm wurde kein Peak zur Retentionszeit von Addukt G12 detektiert (**Abb. 74**), so dass nur eine Identifizierung über die Retentionszeit im *Quantifier*-Übergang möglich war. Für das Addukt G13 hingegen stand kein PFV zur Identifizierung zur Verfügung, so dass der Peak auf der *Quantifier*-Spur nur einen Hinweis auf die Bildung des Addukts G13 gab.

Auch hier wurde die Bindung der Addukte an das SPE-Sorbens überprüft, indem die Spülfraktion der X-A-SPE auf PAT-Guanin-Addukte untersucht wurde.

Im Chromatogramm der *Quantifier*- und *Qualifier*-Spur für PAT-Guanin-Addukte war nur das PAT-Guanin-Addukt G11 eindeutig identifizierbar (Anhang A8.4). Im Gegensatz zu den PAT-Adenin-Addukten war der Anteil der Fläche des PAT-Guanin-Adduktpeaks G11 in der Spülfraktion nur ca. 10% der Gesamtpeakfläche, was somit nicht auf eine fehlende Bindung der Addukte am SPE-Sorbens hinwies.

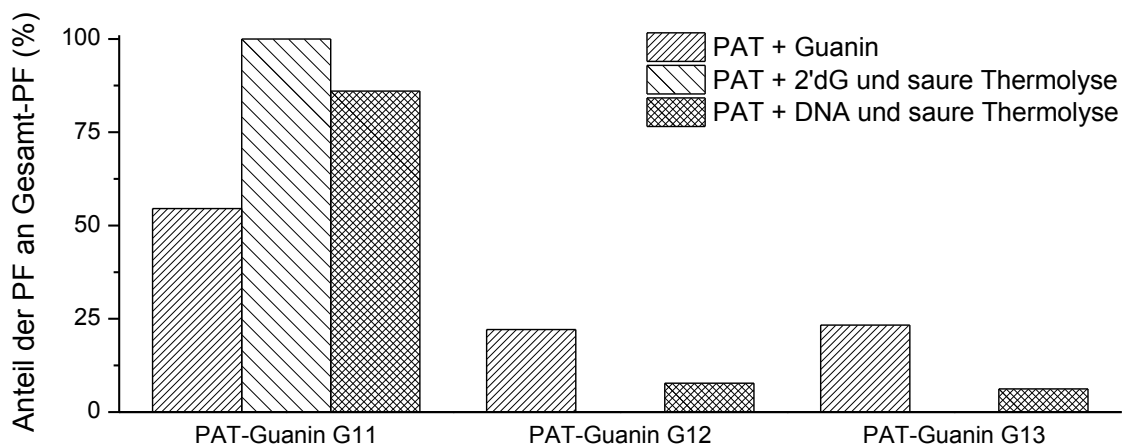


**Abb. 74:** PAT-Guanin-Addukte, welche nach 48-stündiger Inkubation von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Abwesenheit von GSH, Aufarbeitung gemäß **Abb. 71** und nach Elution von der X-A-Phase detektiert wurden. Dargestellt ist das Chromatogramm des *Quantifiers* mit  $m/z$  296>152, CE 33 V (oben) und des *Qualifiers* mit  $m/z$  296>222, CE 22 V (unten). HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Identifizierung der Addukte über Retentionszeit und *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis. Die eingeklammerten Adduktpeaks wurden nur anhand der Retentionszeit (Rt) zugeordnet.

PAT-Guanin-Addukte: G11: Rt 3,7 min, PFV 4,4; Addukt G12: Rt 4,1 min; Addukt G13: Rt 4,5 min. Rohdaten im Anhang A8.2.

*Beurteilung des Adduktusters*

Sowohl durch Reaktion von PAT mit DNA als auch durch Reaktion von PAT mit Guanin oder 2'dG wurde das PAT-Guanin-Addukt G11 als Hauptaddukt gebildet (**Abb. 75**).



**Abb. 75:** Vergleich der prozentuale Anteile der Peakflächen der PAT-Guanin-Addukte, welche i) nach Reaktion von PAT mit Guanin (Kapitel 3.1.5.2), ii) nach Reaktion von PAT mit 2'dG und anschließender saurer Thermolyse (Kapitel 3.1.5.3) und iii) nach Reaktion von PAT mit DNA und saurer Thermolyse (Kapitel 3.2.2.3.1) gebildet wurden.

Die durch Reaktion von PAT mit Guanin gebildeten Minor-Addukte G12 und G13 nahmen ca. 50% der Gesamtadduktpeakfläche ein (**Abb. 75**). Durch Reaktion mit 2'dG und anschließender sauren Thermolyse waren die Minoraddukte nicht nachweisbar. Durch Reaktion mit DNA und anschließender sauren Thermolyse, wurden die Minor-Addukte zwar gebildet, nahmen aber zusammen nur rund 14% der Gesamtadduktpeakfläche ein. Das Adduktmuster war somit sowohl unterschiedlich zu dem Adduktmuster nach Reaktion von PAT mit Guanin als auch mit 2'dG.

#### 3.2.2.3.2 (Glutathion-)Patulin-DNA-Basen-Addukte in Anwesenheit von Glutathion

In Anwesenheit von GSH im Inkubationsansatz von PAT mit DNA wurde neben PAT-DNA-Basen-Addukten auch die Bildung von GSH-PAT-DNA-Basen-Mischaddukten erwartet (Kapitel 3.1.1.2). Zur Anreicherung der Addukte wurden zwei aufeinanderfolgende SPE-Methoden mit verschiedenen stationären Phasen durchgeführt: die Anreicherung der GSH-PAT-DNA-Basen-Addukte an einer SAX-Phase und der PAT-DNA-Basen-Addukte an einer X-A-Phase (**Abb. 71**). Die Elutionsfraktionen der SPE-Methoden wurden, nach Einengen und Resuspension, auf das Vorhandensein der (GSH-)PAT-Adenin/Guanin-Addukte mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus überprüft. Um den Einfluss von GSH auf die Adduktbildung zu untersuchen, wurde diese zudem in Abhängigkeit von der GSH-Konzentrationen (GSH/PAT = 0,5, 1 bzw. 2) betrachtet.

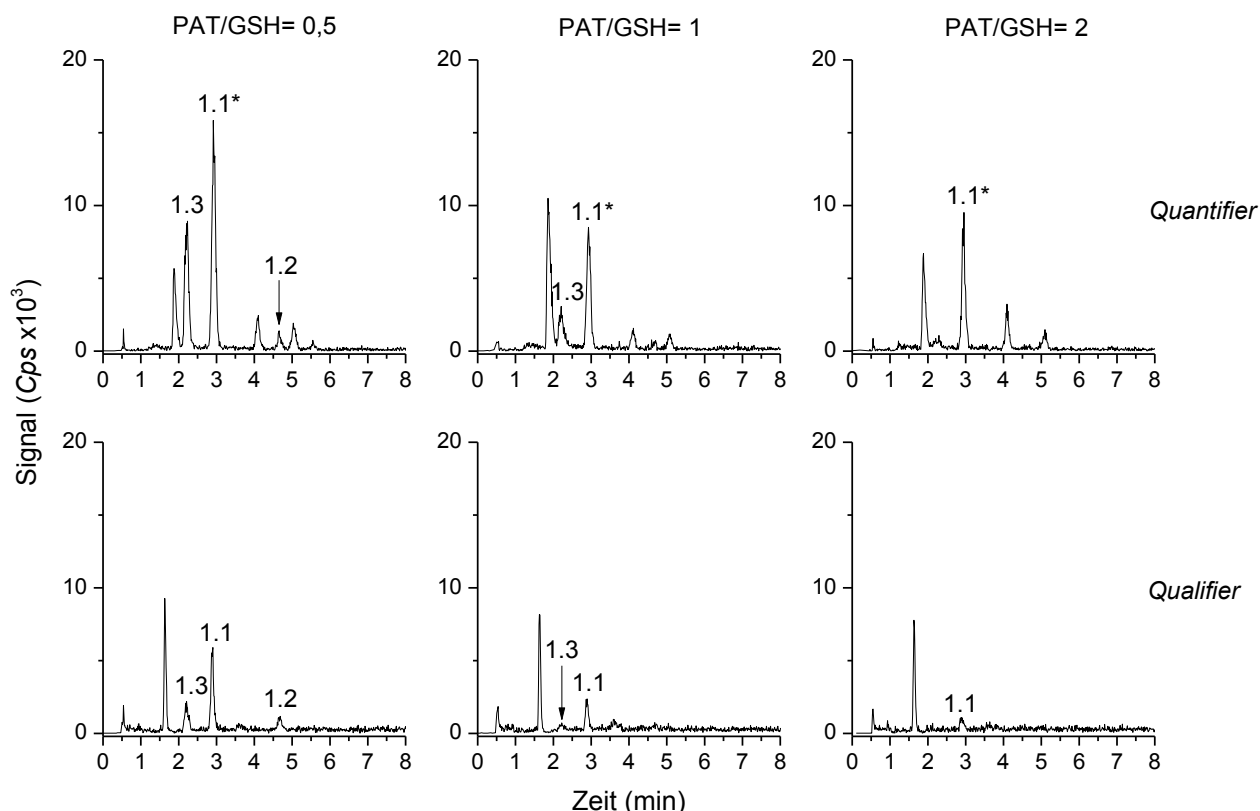
Bei Bindung der potentiellen Addukte an die SPE-Phasen, waren in der Fraktion der Spülschritte keine Addukte zu erwarten. Zur Überprüfung der Anreicherung wurde auch die X-A-Spülfraction auf das Vorhandensein der (GSH-)PAT-Adenin/Guanin-Addukte untersucht.

#### Identifizierung von PAT-Adenin-Addukten

##### *Identifizierung in den SPE-Fractionen*

Für die Identifizierung der PAT-Adenin-Addukten nach Inkubation von PAT mit DNA bei unterschiedlichen GSH-Konzentrationen wurden die Elutionsfraktionen der SPE mit der X-A-Phase analysiert. Mit Hilfe der MRM-Methode (Kapitel 3.2.1.3.3) sollten die Haupt-PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2 und 1.3 eindeutig anhand der Retentionszeiten und der PFV identifiziert werden. Für die Minor-Addukte 1.4 und 1.5 wurde nur ein Signal auf der *Quantifier*-Spur erwartet, so dass neben der Retentionszeit kein charakteristisches PFV für die Identifizierung dieser Addukte zur Verfügung stand. Die Anwesenheit von entsprechenden Signalen auf der *Quantifier*-Spur sollte folglich nur als Hinweis für die Bildung dieser Addukte angesehen werden.

Das PAT-Adenin-Addukt 1.3 wurde bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 0,5 und 1 in den Chromatogrammen der *Quantifier*- und *Qualifier*-Spur anhand der Retentionszeit und des PFV (Kapitel 3.2.1.3.3) eindeutig identifiziert (**Abb. 76**). In den MRM-Chromatogramm mit GSH/PAT=2 war kein Peak zur Retentionszeit des Addukts 1.3 mehr nachweisbar.



**Abb. 76:** PAT-Adenin-Addukte, welche nach 48-stündiger Inkubation von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Anwesenheit von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,4, 0,8 und 1,6 mM), Aufarbeitung gemäß **Abb. 71** und nach Elution von der X-A-Phase detektiert wurden. Dargestellt ist das Chromatogramm des *Quantifiers* mit  $m/z$  280>136, CE 35 V (oben) und des *Qualifiers* mit  $m/z$  280>206, CE 27 V (unten). HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Identifizierung der Addukte über Retentionszeit und *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis. \*, Der Adduktpeak 1.1 wurde in der *Quantifier*-Spur vermutlich von einem Matrixpeak überlagert, weshalb das PFV vom erwarteten PFV abwich.  
 PAT-Adenin-Addukte: 1.1: Rt 2,9 min, PFV 3,3 (GSH/PAT=0,5), 5,2 (GSH/PAT=1), 8,0 (GSH/PAT=2); 1.2: Rt 4,7 min, PVF 1,1 (GSH/PAT=0,5); 1.3: Rt 2,2 min, PVF 4,8 (GSH/PAT=0,5), 4,6 (GSH/PAT=1). Rohdaten im Anhang A8.2.

Zur Retentionszeit des Adduktes 1.1 (2,9 min) war in den Chromatogrammen der *Quantifier*- und *Qualifier*-Spur, bei allen GSH/PAT-Verhältnissen, ein Peak vorhanden (**Abb. 76**). Dieser Peak wies jedoch ein drei- bis achtfach höheres PFV auf als das erwartete PFV des Adduktpeaks 1.1 nach Umsetzung mit Adenin (PVF 3,3 - 8,0 statt 1,0, Kapitel 3.2.1.3.3). Somit wird das PFV entweder durch die Co-Elution mit einem Matrixpeak verändert, oder aber es handelte sich bei diesem Peak nicht um das PAT-Adenin-Addukt 1.1.

Das PAT-Adenin-Addukt 1.2 wurde bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 0,5 in den Chromatogrammen der *Quantifier*- und *Qualifier*-Spur anhand der Retentionszeit und des PFV (Kapitel 3.2.1.3.3) eindeutig identifiziert (**Abb. 76**). Bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 1 und 2 war kein Peak zur Retentionszeit des Addukts 1.2 mehr nachweisbar.

Bei allen GSH/PAT-Verhältnissen war zur Retentionszeit des PAT-Adenin-Addukts 1.4 ein Peak in der *Quantifier*-Spur detektierbar (**Abb. 76**). Das nach Umsetzung von PAT mit Adenin entstandene Addukt 1.4 ergibt kein Signal beim zweiten Übergang (Kapitel 3.2.1.3.3) und folglich war auch kein Peak zur Retentionszeit des Addukts 1.4 in der *Qualifier*-Spur detektierbar. Somit wurde der Peak in der *Quantifier*-Spur nur als Hinweis auf die Bildung des Addukts 1.4 angesehen.

Das PAT-Adenin-Addukt 1.5 war bei keinem GSH/PAT-Verhältnis detektierbar.

Die PAT-Adenin-Addukte, die in Abwesenheit von GSH entstanden sind, wurden durch die SPE nicht angereichert. Um zu überprüfen, ob dies auch auf die PAT-Adenin-Addukte zutrifft, die in Anwesenheit von GSH entstanden waren, wurden auch die Spülfractionen der SPE mit der X-A-Phase auf PAT-Adenin-Addukte untersucht.

Nach Analyse der X-A-Spülfractionen wurden bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 0,5 in den Chromatogrammen der *Quantifier*- und *Qualifier*-Spur sowohl die Addukte 1.2 und 1.3, als auch Addukt 1.1 anhand der Retentionszeit und des PFV eindeutig identifiziert (Anhang A8.5). Bei höheren GSH/PAT-Verhältnissen war nur noch das PAT-Adenin-Addukt 1.1 nachweisbar. Wie auch schon bei der Inkubation ohne GSH beobachtet (Kapitel 3.2.2.3.1), lag der Anteil der PAT-Adenin-Adduktpeakfläche in der Spülfraction an der Gesamtadduktfläche höher als in der eigentlichen Elutionsfraction (ca. 62 - 94% für Addukt 1.1; 82% für Addukt 1.2 und 81% für Addukt 1.3). Da die Gesamtadduktpeakflächen bei jedem GSH-Gehalt unter der Gesamtpeakflächen der für die Wiederfindung eingesetzten Addukte lagen, war in diesem Fall eine Überladung der Säule durch die Adduktmenge als Grund für die geringe Anreicherung der Addukte auszuschließen. Ein Grund für die geringe Bindung der Addukte am SPE-Sorbens wurde abschließend nicht gefunden.

Aufgrund der eindeutigen Identifizierung des Addukts 1.1 nach Analyse der X-A-Spülfractionen wurde vermutet, dass es sich bei dem Peak zur Retentionszeit des Addukts 1.1 nach Analyse der X-A-Elutionsfractionen ebenfalls um das Addukt 1.1 handelte, dessen PFV infolge der Co-Elution mit einem Matrixbestandteil verändert wurde.

### *Einfluss des GSH-Gehalts*

Da die PAT-Adenin-Addukte nicht in den X-A-Elutionsfractionen angereichert wurden, wurde für die Betrachtung des Einflusses der GSH-Konzentration auf die Adduktbildung die Gesamtpeakflächen der X-A-Elutions- und Spülfractionen herangezogen. Das Addukt 1.1 wies im Gegensatz zu den Spülfractionen, in den X-A-Elutionsfractionen ein anderes PFV als

für dieses Addukt erwartet auf. Weshalb eine Überlagerung der Signale im MRM-Übergang durch Matrixpeaks vermutet wurde. Deswegen wurde für das Addukt 1.1 die Veränderung der Adduktpeakfläche in Abhängigkeit von der GSH-Konzentration nur nach Analyse der X-A-Spülfractionen betrachtet.

Während den Versuchen zur Untersuchung der Adduktbildung von PAT mit Adenin bei verschiedenen GSH-Konzentrationen wurde beobachtet, dass die Flächen der PAT-Adenin-Adduktpeaks durch Anhebung des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5 auf 1 um 60 - 74% reduziert wurden und nach Anhebung des GSH/PAT-Verhältnisses auf 2 nur noch 0,1 - 0,3% der Adduktpeakflächen vorhanden waren (Kapitel 3.1.3.1). Basierend darauf war zu erwarten, dass auch die Adduktbildung von PAT mit den DNA-Basen des DNA-Strangs durch die GSH-Konzentration zu beeinflussen ist.

Bei der Reaktion von PAT mit Adenin wurde das Addukt 1.3 durch Erhöhung des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5 auf 1 um ca. 73% verringert (Anhang A2.2). Auch mit DNA führte die Anhebung des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5 auf 1 zu einer Abnahme der Gesamtpeakfläche des Addukts 1.3 um 81% (Anhang A8.2).

Durch eine Erhöhung des GSH/PAT-Verhältnisses auf 2 waren von dem Addukt 1.3 nach Reaktion von PAT mit Adenin nur noch 0,2% der anfänglichen Peakfläche vorhanden (Anhang A2.2). Wenn sich die Adduktbildung mit DNA genauso verhält, dann wäre, abgeleitet von der Adduktpeakfläche bei GSH/PAT=0,5, der Adduktpeak 1.3 nicht mehr nachweisbar. Mit DNA und einem GSH/PAT-Verhältnis von 2 war kein Addukt 1.3 mehr detektierbar (**Abb. 76**). Unter Berücksichtigung der minimal integrierbaren Peakfläche war die Bildung des Addukts 1.3 durch Anhebung des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5 auf 2 um mindestens 99% zurückgegangen (Anhang A8.2).

Der Einfluss von GSH auf die Bildung des Addukts 1.3 nach Reaktion von PAT mit DNA war somit vergleichbar mit der Reaktion von PAT mit Adenin in Anwesenheit von GSH.

Die Bildung des Addukts 1.2 durch Reaktion von PAT mit Adenin wurde und Anhebung des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5 auf 1 um ca. 73% verringert (Anhang A2.2). Wenn sich die Adduktbildung mit DNA genauso verhält, dann wäre der Adduktpeak 1.2 ausgehend von der Peakintensität des Addukts 1.2 bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 0,5 noch nachweisbar. Jedoch wurde mit DNA das Addukt 1.2 schon ab einem GSH/PAT-Verhältnis von 1 nicht mehr detektiert (**Abb. 76**). Ausgehend von der minimal integrierbaren Peakfläche war die Bildung des Addukts 1.2 durch Anhebung des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5 auf 1 bzw. 2 um mindestens 90% zurückgegangen (Anhang A8.2).

Die Erhöhung der GSH-Konzentration auf zu PAT äquimolare Konzentrationen schien somit die Bildung des Addukts 1.2 durch Reaktion von PAT mit DNA etwas stärker zu verhindern als bei der Reaktion von PAT mit Adenin beobachtet.



Bei der Reaktion von PAT mit Adenin wurde das Addukt 1.1 durch Erhöhung des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5 auf 1 um ca. 74% verringert (Anhang A2.2). Mit DNA führte die Anhebung des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5 auf 1 zu einer Abnahme der Gesamtpeakfläche um 89% (Anhang A8.2).

Durch eine weitere Erhöhung des GSH/PAT-Verhältnisses auf 2 waren von dem Addukt 1.3, welches durch Reaktion von PAT mit Adenin gebildet wurde, nur noch 0,1% der anfänglichen Peakfläche vorhanden. Wenn sich die Adduktbildung mit DNA genauso verhält, dann wäre, abgeleitet von der Adduktpeakfläche bei GSH/PAT=0,5, der Adduktpeak 1.1 nicht mehr nachweisbar. Mit DNA und einem GSH/PAT-Verhältnis von 2 war das Addukt 1.1 jedoch noch detektierbar (**Abb. 76**), wobei, ausgehend von der Peakfläche des Addukts 1.1 bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 0,5, die Adduktbildung um ca. 98% reduziert wurde (Anhang A8.2).

Die Erhöhung der GSH-Konzentration auf zu PAT äquimolare Konzentrationen schien somit die Bildung des Addukts 1.1 durch Reaktion von PAT mit DNA in etwa gleich zu beeinflussen wie bei der Reaktion von PAT mit Adenin in Anwesenheit von GSH.

#### *Beurteilung des Adduktusters*

Das Adduktmuster, welches durch Reaktion von PAT mit DNA und einem GSH/PAT-Verhältnis von 0,5 entstanden war, glich dem Adduktmuster, welches in Abwesenheit von GSH gebildet wurde. Lediglich das Minor-PAT-Adenin-Addukt 1.5 wurde in Anwesenheit von GSH nicht mehr detektiert. Folglich waren die prozentualen Anteile der Adduktpeakflächen, die durch Reaktion von PAT mit DNA gebildet wurden, ähnlich zu denen, die durch Reaktion mit Adenin gebildet wurden.

#### Identifizierung von PAT-Guanin-Addukten

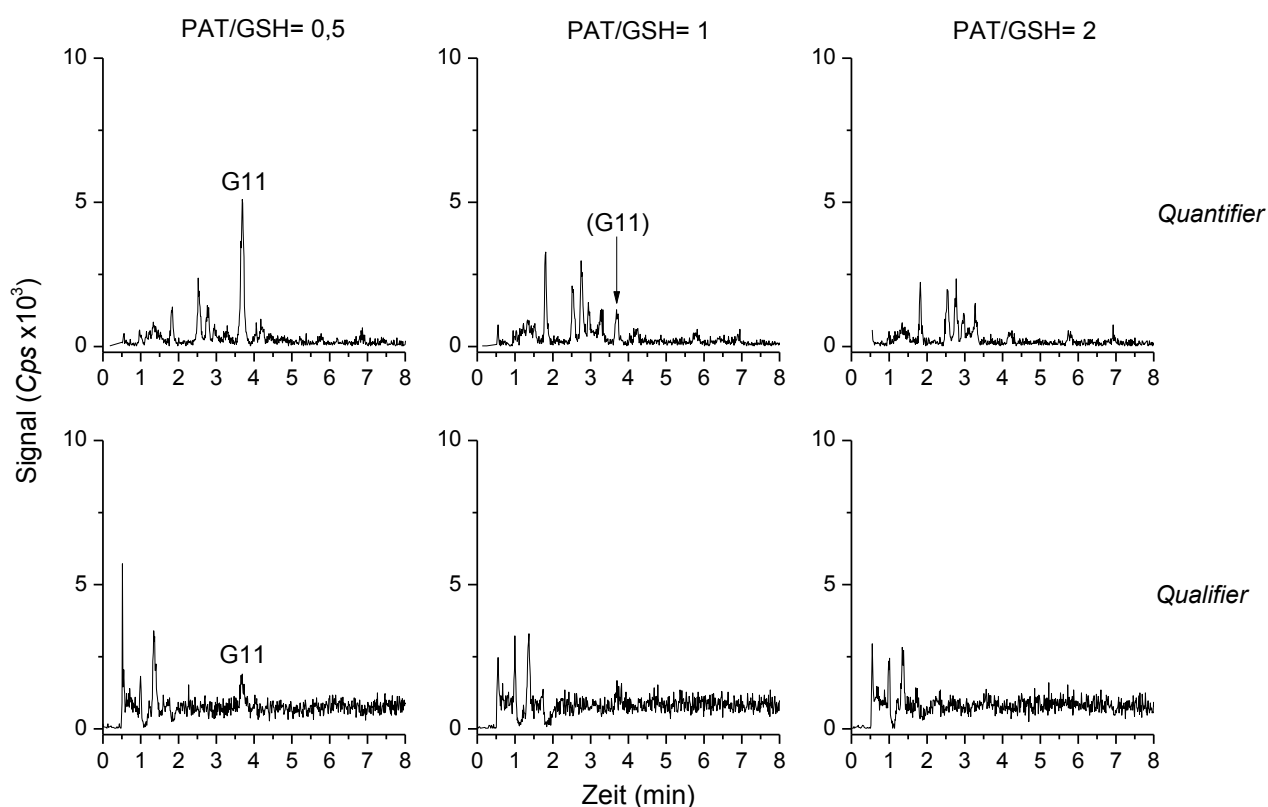
##### *Identifizierung in den SPE-Fraktionen*

Für die Identifizierung von PAT-Guanin-Addukten der DNA-Inkubationen mit verschiedenen GSH/PAT-Verhältnissen wurden die Elutionsfraktionen der SPE mit der X-A-Phase analysiert (**Abb. 71**). Durch die zusammengestellte MRM-Methode (Kapitel 3.2.1.3.3) sollten die PAT-Guanin-Addukte G11 und G12 eindeutige anhand der Retentionszeit und des PFV identifiziert werden. Für das Minor-Addukt G13 war nur ein Signal auf der *Quantifier*-Spur zu erwarten, so dass neben der Retentionszeit kein charakteristisches PFV für die Identifizierung des Addukts zur Verfügung stand. Die Anwesenheit eines entsprechenden Signals auf der *Quantifier*-Spur kann folglich nur als Hinweis für die Bildung des Addukts angesehen werden.

Bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 0,5 wurde in den Chromatogrammen der *Quantifier*- und *Qualifier*-Spur anhand der Retentionszeit und des PFV (Kapitel 3.2.1.3.3) das PAT-Guanin-

Addukt G11 eindeutig identifiziert (**Abb. 77**). Bei dem GSH/PAT-Verhältnis von 1 war nur noch im Chromatogramm der *Quantifier*-Spur ein kleiner Peak bei der Retentionszeit des Addukts G11 vorhanden. Aufgrund der geringen Peakfläche und eines PFV des Addukts G11 von 4,1-4,7 (Kapitel 3.2.1.3.3) war auf der *Qualifier*-Spur kein Adduktpeak mehr zu erwarten.

Bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 2 war kein Addukt mehr nachweisbar.



**Abb. 77:** PAT-Guanin-Addukte, welche nach 48-stündiger Inkubation von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Anwesenheit von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,4, 0,8 und 1,6 mM), Aufarbeitung gemäß **Abb. 71** und nach Elution von der X-A-Phase detektiert wurden. Dargestellt ist das Chromatogramm des *Quantifiers* mit  $m/z$  296>152, CE 33 V (oben) und des *Qualifiers* mit  $m/z$  296>222, CE 22 V (unten). HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Identifizierung der Addukte über Retentionszeit und *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis. Der eingeklammerte Adduktpeak wurde nur anhand der Retentionszeit (Rt) zugeordnet.

PAT-Guanin-Addukte: G11: Rt 3,7 min, PFV 3,5 (GSH/PAT=0,5). Rohdaten im Anhang A8.2.

Bei Analyse der Spülfraktion der SPE mit der X-A-Phase waren in den Chromatogrammen der *Quantifier*- und *Qualifier*-Spur für PAT-Guanin-Addukte keine Addukte nachweisbar (Anhang A8.6). Folglich wurden alle gebildeten PAT-Guanin-Addukte nur durch den Elutionsschritt von der SPE-Säule freigesetzt.

### *Einfluss des GSH-Gehalts*

Während den Versuchen zur Untersuchung der Adduktbildung von PAT mit Adenin bei verschiedenen GSH-Konzentrationen wurde beobachtet, dass die Flächen der PAT-Adenin-Adduktpeaks durch Anhebung des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5 auf 1 um 60 - 74% reduziert wurden. Ausgehend von der Peakfläche bei GSH/PAT=0,5, wurde mit DNA durch die Erhöhung der GSH-Konzentration von 0,5 auf 1 die Bildung des Addukts G11 um 73% verringert.

Durch eine Erhöhung des GSH/PAT-Verhältnisses auf 2 waren von den durch Reaktion von PAT mit Adenin gebildeten PAT-Adenin-Addukten nur noch 0,1 - 0,3% der anfänglichen Peakflächen vorhanden (Anhang A2.2). Wenn sich die Adduktbildung mit DNA genauso verhält, dann wäre, abgeleitet von der Adduktpeakfläche bei GSH/PAT=0,5, der Adduktpeak G11 nicht mehr nachweisbar. Mit DNA und einem GSH/PAT-Verhältnis von 2 war kein Addukt G11 mehr detektierbar (**Abb. 77**). Ausgehend von der noch detektierbaren Fläche lag die Abnahme der Adduktbildung somit bei mindestens 83%.

Der Einfluss von GSH auf die Bildung des Addukts G11 nach Reaktion von PAT mit DNA war somit vergleichbar mit der Reaktion von PAT mit Adenin in Anwesenheit von GSH.

### *Beurteilung des Adduktusters*

Durch Reaktion von PAT mit DNA und einem GSH/PAT-Verhältnis von 0,5 war nur das PAT-Guanin-Addukt G11 entstanden. Die Minor-Addukt G12 und G13 wurden nicht detektiert. Wie in Abwesenheit von GSH (Kapitel 3.2.2.3.1) war das PAT-Guanin-Addukt G11 somit das Hauptaddukt und war hinsichtlich dessen vergleichbar mit dem Adduktmuster nach Reaktion von PAT mit Guanin als auch mit 2'dG.

### *Identifizierung von GSH-PAT-Adenin-Addukten*

#### *Identifizierung in den SPE-Fractionen*

Bei der Analyse der Elutionsfraktionen der SPE mit der SAX-Phase (**Abb. 71**) waren in den Chromatogrammen der *Quantifier*-Spur für GSH-PAT-Adenin-Addukte, bei allen GSH/PAT-Verhältnissen, nur kleine Signalspuren zur Retentionszeit der Addukte 5.1 und 5.2 vorhanden (Daten nicht gezeigt).

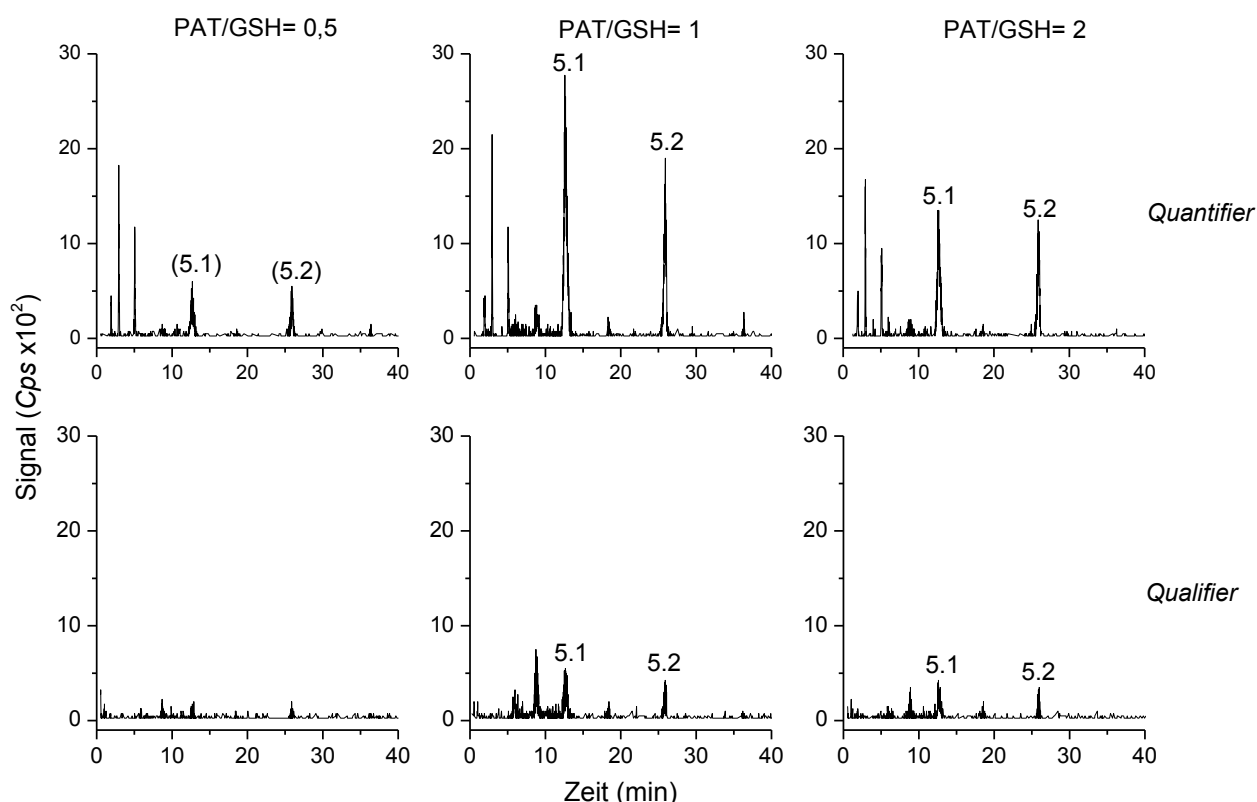
Da in der Elutionsfraktion der SPE mit der SAX-Phase keine GSH-PAT-Adenin-Addukte detektierbar waren, wurde sowohl die Spülfraktion als auch die Elutionsfraktion der nachfolgenden SPE mit der X-A-Phase auf die entsprechenden Addukte analysiert.

Durch die Analyse der X-A-Spülfraktion wurden die Peaks der diastereomeren GSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 nur in den Ansätzen mit GSH/PAT=0,5 und 2 und nur in den Chromatogrammen der *Quantifier*-Spur detektiert (Anhang A8.7). Bei einem GSH/PAT-

Verhältnis von 1 waren nur kleine Signalspuren zur Retentionszeit der Addukte 5.1 und 5.2 vorhanden.

Im Gegensatz dazu wurden in den X-A-Elutionsfraktionen der Ansätze mit einem GSH/PAT-Verhältnis von 1 und 2 die GSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 in den Chromatogrammen der *Quantifier*- und *Qualifier*-Spur anhand der Retentionszeit und des PFV (Kapitel 3.2.1.3.3) eindeutig identifiziert (**Abb. 78**). Bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 0,5 wurden die beiden Addukte nur in der *Quantifier*-Spur detektiert. Aufgrund der geringen Adduktpeakflächen und der PFV der Addukte von 4,1-4,9 bzw. 4,4 - 5,1 (Kapitel 3.2.1.3.3) waren auf der *Qualifier*-Spur keine Adduktpeaks mehr zu erwarten.

Die Elution der Mischaddukte in der falschen Elutionsfraktion (keine Elution an der SAX-Phase, ca. 42 - 45% in der X-A-Spülfraktion und ca. 55 - 58% in der X-A-Elutionsfraktion) deutete auf eine unvollständige Bindung an der SAX-Phase hin. Dies wurde bereits bei der Bestimmung der Wiederfindung (Kapitel 3.2.2.2) beobachtet.



**Abb. 78:** cGSH-PAT-Adenin-Addukte, welche nach 48-stündiger Inkubation von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Anwesenheit von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,4, 0,8 und 1,6 mM), Aufarbeitung gemäß **Abb. 71** und nach Elution von der X-A-Phase detektiert wurden. Dargestellt ist das Chromatogramm des *Quantifiers* mit  $m/z$  551>136, CE 31 V (oben) und des *Qualifiers*  $m/z$  551>341, CE 27 V (unten). HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Identifizierung der Addukte über Retentionszeit und *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis. Die eingeklammerten Adduktpeaks wurden nur anhand der Retentionszeit (Rt) zugeordnet.

cGSH-PAT-Adenin-Addukte: 5.1: Rt 12,7 min, PFV 5,3 (GSH/PAT=1), 5,4 (GSH/PAT=2); 5.2: Rt 25,9 min, PVF 5,8 (GSH/PAT=1), 5,2 (GSH/PAT=2). Rohdaten im Anhang A8.2.

Die GSH-PAT-Adenin-Mischaddukte 5.1 und 5.2 wurden folglich auch durch Reaktion von PAT mit DNA in Anwesenheit von GSH gebildet. Die maximale Signalintensität der Mischaddukte aus DNA war mit  $3 \times 10^3$  cps sehr gering und war vermutlich auf die geringe Wiederfindung der Mischaddukte von ca. 11% infolge der Aufarbeitung zurückzuführen. Trotz der Verluste infolge der Aufarbeitung und der unzureichender Anreicherung der GSH-PAT-Adenin-Addukte durch die SPE-Methode wurde die Mischaddukte identifiziert, deren Bildung jedoch gegebenenfalls unterschätzt.

### *Einfluss des GSH-Gehalts*

Da die GSH-PAT-Adenin-Addukte nicht in den SAX-Elutionsfraktionen angereichert wurden, sondern in der X-A-Spülfraction und -Elutionsfraktion eluierten, wurde für die Betrachtung des Einflusses der GSH-Konzentration auf die Adduktbildung die Gesamtpeakflächen der X-A-Elutions- und Spülfractionen herangezogen.

Während den Versuchen zur Untersuchung der Adduktbildung von PAT mit Adenin bei verschiedenen GSH-Konzentrationen war die Bildung der diastereomeren GSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 mit äquimolaren GSH-Konzentrationen am größten und ca. 1,7-fach höher als bei  $\text{GSH/PAT}=0,5$  (Kapitel 3.1.3.1). Mit DNA nahmen die Peakflächen der diastereomeren Addukte durch die Anhebung des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5 auf 1 um ca. das 2,5-fache zu.

Ein GSH/PAT-Verhältnis von 2 reduzierte die Peakflächen der durch die Reaktion von PAT mit Adenin und GSH gebildeten GSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 wieder auf das Niveau des GSH/PAT-Verhältnisses von 0,5. Mit DNA war jedoch bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 2 keine Peakflächenabnahme zu verzeichnen. Die Adduktbildung blieb stattdessen in etwa auf dem Niveau der Adduktbildung bei einem GSH/PAT-Verhältnis von 1.

Somit wurde zwar nach Reaktion von PAT mit DNA die maximale Adduktausbeute ebenfalls bei äquimolaren GSH-Konzentrationen erreicht, jedoch führte eine weitere Erhöhung der GSH-Konzentration nicht zu einem Rückgang der Adduktbildung und war somit unterschiedlich zur Reaktion von PAT mit Adenin und GSH.

### *Beurteilung des Adduktusters*

Durch Reaktion von PAT mit DNA in Anwesenheit von GSH waren nur die diastereomeren GSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 entstanden. Die Minor-Addukte 5.3 - 5.7 wurden nicht detektiert. Die GSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 waren auch die Hauptaddukte der Reaktion von PAT mit Adenin und GSH. Im Gegensatz dazu war durch die Reaktion von PAT mit 2'dA und GSH, neben den Addukten 5.1 und 5.2, ebenfalls das Addukt 5.7 als Hauptaddukt entstanden. Folglich war das Adduktmuster der Reaktion von PAT mit DNA vergleichbar mit dem Adduktmuster der Reaktion von PAT mit Adenin.

Identifizierung von GSH-PAT-Guanin-Addukten

Da, unabhängig von der GSH-Konzentration, nach Analyse der SAX-Elutionsfraktionen keine cGSH-PAT-Guanin-Mischaddukte detektiert wurden (Anhang A8.8), wurde sowohl die Spülfraction als auch die Elutionsfraction der nachfolgenden SPE mit der X-A-Phase auf die entsprechenden Addukte analysiert.

Durch die Analyse der X-A-Spülfraction wurden keine GSH-PAT-Guanin-Addukte detektiert (Anhang A8.9). In den Chromatogrammen der *Quantifier*-Spur nach Analyse der X-A-Elutionsfraction waren, bei allen GSH/PAT-Verhältnissen, nur kleine Signalspuren zu den Retentionszeiten der Addukte G1, G3, G4 und G5, jedoch keine eindeutigen Peaks, vorhanden (Daten nicht gezeigt).

Somit wurde kein GSH-PAT-Guanin-Addukt nach Inkubation von PAT mit DNA und GSH eindeutig identifiziert. Abgeleitet von der geringen Wiederfindung für GSH-PAT-Adenin-Addukte (ca. 11%, Kapitel 3.2.2.2) war davon auszugehen, dass infolge der Aufarbeitung auch Verluste an GSH-PAT-Guanin-Addukten aufgetreten waren. Die Tatsache, dass aber dennoch Mischaddukte mit Adenin gebildet wurden, sprach dafür, dass die Reaktion mit Adenin bevorzugt abläuft. Die bevorzugte Reaktion des GSH-PAT-Intermediats mit Adenin unter Bildung der Mischaddukte wurde zuvor schon mit den freien DNA-Basen beobachtet (Kapitel 3.1.5.1)

Um zukünftig mögliche Verluste an potentiellen Addukten während der Aufarbeitung zu erkennen, ist die Zugabe von stabilisotopen-markierten Adduktstandards vor der Aufarbeitung nötig (Kapitel 1.2.3). Diese können durch Reaktion von PAT mit markierten DNA-Basen sowie Glutathion generiert und mittels semipräparativer HPLC-UV (Kapitel 6.2.4) isoliert werden.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

Als Sekundärmetabolit verschiedener Schimmelpilze gehört das Mykotoxin Patulin zu den als Kanzerogene diskutierten Lebensmittelinhaltsstoffen natürlichen Ursprungs und kommt vor allem in braunfaulen Äpfeln und daraus verarbeiteten Lebensmitteln vor. Trotz zahlreicher *in vitro*- und *in vivo*-Studien zur Genotoxizität von Patulin, ist der Wirkmechanismus für das genotoxische Potential von Patulin weitgehend unbekannt.

Um die direkte DNA-Reaktivität von Patulin als mögliche genotoxische Wirkung zu betrachten, wurde im ersten Teil der Arbeit zunächst die direkte Reaktion von Patulin mit DNA-Basen untersucht.

Nach Inkubation von Patulin mit der DNA-Base Adenin wurden mittels (U)HPLC-Massenspektrometrie im Vollscan-Modus insgesamt fünf Addukte von Patulin mit Adenin identifiziert. Anhand der Fragmentierungsmuster ohne und nach Methylierung freier Carboxyl- und Ketogruppen wurde für drei Patulin-Adenin-Addukte eine Ketoheptansäure-Derivat-Struktur des Patulin-Rückgrates und die Bindung des Adenin-Moleküls an C6 (C5) abgeleitet. Zusätzlich wurden zwei Addukte identifiziert, welche die gleiche Patulin-Struktur aufwiesen, jedoch je ein Molekül Adenin an C5 und C6 gebunden haben. Patulin reagierte folglich mit Adenin unter Bildung von Mono- und Diaddukten.

In Gegenwart von einer zu Adenin äquimolarer Konzentrationen an Glutathion im Inkubationsansatz wurden mittels (U)HPLC-Massenspektrometrie im Vollscan-Modus die gleichen Patulin-Adenin-Addukte wie in Abwesenheit von Glutathion beschrieben beobachtet. Weiterhin wurden drei bisher unbekannte Glutathion-Patulin-Addukte identifiziert. Es handelte sich, abgeleitet von deren Fragmentierungsverhalten ohne und nach Methylierung, um C6-monosubstituierte Addukte mit Ketoheptansäure-Derivat-Struktur. In einem dieser Addukte lag das Glutathion-Molekül linear gebunden vor, wohingegen in den beiden anderen Addukten die  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutaminsäurerestes zudem an C1 oder C7 von Patulin verknüpft war und es sich somit um 6,1- bzw. 6,7-cyclische Glutathion-Patulin-Addukte handelte.

Interessanterweise, wurden sieben weitere Produktpeaks nur bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Nukleophilkomponenten im Inkubationsansatz gebildet, was folglich auf gemischte Addukte aus Patulin, Glutathion und Adenin hinwies. Das Fragmentierungsmuster bestätigte

die Anwesenheit von Adenin und Glutathion in der Adduktstruktur und zeigte zudem, dass die neuartigen Addukte Regioisomere mit Keto-hexansäure-Derivat-Struktur waren, die ein 6,7-cyclisch gebundenes Glutathion-Molekül aufwiesen. Durch Methylierung der freien Carboxylgruppen innerhalb der Adduktstruktur und Analyse der Molekül- und Fragmentionen wurde die Bindung des Adenin-Moleküls lokalisiert. In zwei diastereomeren Adduktpaaren war das Adenin-Molekül an C1 über eine Amidbindung gebunden. In geringerer Intensität wurden auch zwei diastereomere gemischte Glutathion-Patulin-Adenin-Addukte mit linearem Glutathion-Molekül und C1-gebundenem Adenin-Molekül identifiziert.

Die Summenformeln aller postulierten Strukturen wurden mittels hochauflösender Massenspektrometrie bestätigt. Zudem wurde ein Reaktionsmechanismus für die Bildung der neuen (Glutathion-)Patulin(-Adenin)-Addukte hergeleitet. Die Bildung gemischter Glutathion-DNA-Basen-Addukte wurde bisher weder für Patulin noch für andere  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonyle beschrieben. Die Reaktion der Mischadduktbildung unterscheidet sich zudem mechanistisch von den Reaktionen, welche zur Bildung bereits bekannter Glutathion-DNA-Basen-Addukte von 1,2-Dihaloalkanen, sowie 1,2,3,4-Diepoxybutan führen.

Die Inkubationen von Patulin mit 2'-Deoxyadenosin, als eigentlicher nukleophiler Zielstruktur im DNA-Strang, führte in An- und Abwesenheit von Glutathion ebenfalls zur Bildung von drei Patulin-Adenosin- und zwei Glutathion-Patulin-Adenosin-Addukten. Da die N-glykosidische Bindung der Glutathion-Patulin-Adenosin-Addukte nur mittels saurer Thermolyse gespalten wurde und somit stabil war, handelte es sich folglich um Addukte an der N<sup>1</sup>- oder N<sup>6</sup>-Position von Adenin.

Bei Inkubation von Patulin mit Adenin mit unterschiedlichen Glutathion/Patulin-Verhältnissen wurde die direkte Reaktion von Patulin mit Adenin in Gegenwart eines Überschusses an Glutathion verhindert, wohingegen deutlich höhere Glutathion-Konzentrationen nötig waren, um die Bildung der Glutathion-Patulin-Adenin-Addukte zu verhindern.

Die Bildung von Glutathion-Patulin-Adenin-Addukten wurde in Gegenwart von hitze-inaktiviertem Rattenleber-Cytosol gegenüber einer Kontrolle mit Puffer verringert, was vermutlich auf die Reaktion von Patulin mit cytosolischem Protein zurückzuführen war. Durch Inkubation mit nativem Cytosol mit aktiver Glutathion-S-Transferase wurde die Bildung der Glutathion-Patulin-Adenin-Addukte zwar weiter reduziert, jedoch nicht verhindert.

Die Reaktion von Patulin mit den DNA-Basen Guanin, Thymin und Cytosin, sowie den 2'-Deoxynukleosiden führte ebenso zur Bildung der entsprechenden (Glutathion-)Patulin-Nukleobasen/Nukleosid-Addukte. Bei gleichzeitiger Inkubation mit allen vier DNA-Basen wurde eine bevorzugte Adduktbildung mit den Purinbasen, wobei Adenin > Guanin, festgestellt.



Die hohe Reaktivität von Patulin gegenüber DNA-Basen und 2'-Deoxynukleosiden unter Bildung von Addukten stellt somit einen möglichen Wirkmechanismus für das genotoxische Potential von Patulin dar. Durch die Identifizierung von neuartigen Addukten von Patulin, DNA-Basen und Glutathion wurde die Annahme einer universellen Entgiftung von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylen infolge der Glutathion-Konjugation widerlegt. Stattdessen führte die Glutathion-Konjugation von Patulin zur Bildung eines reaktiven Intermediats, welches mit den nukleophilen Zentren der DNA-Basen reagieren kann.

Für die Identifizierung dieser potentiellen DNA-Addukte in DNA wurden im zweiten Teil der Arbeit zunächst Methoden für die Hydrolyse der Addukte aus dem DNA-Strang, für deren Anreicherung und für die Detektion mittels UHPLC-Massenspektrometrie entwickelt.

Für die DNA-Hydrolyse wurde die saure Thermolyse durch Variation von Säure, Temperatur und Hydrolysezeit optimiert. Die verschiedenen Bedingungen wurden hinsichtlich Wiederfindungsraten der Analyten und Effizienz der Spaltung miteinander verglichen. Die höchsten Ausbeuten an Spaltprodukten, sowie hohe Wiederfindungen der Addukte wurden mit 1-molarer Salzsäure bei 70°C für 30 Minuten erzielt.

Durch die Entwicklung einer Festphasenextraktion mit zwei verschiedenen Anionenaustauscher-Phasen gelang die Anreicherung von isolierten (Glutathion-)Patulin-DNA-Basen-Addukten, sowie deren Abtrennung von einer Mischung freier DNA-Basen.

Für die empfindliche und spezifische Detektion der Addukte mittels UHPLC-Massenspektrometrie wurde eine Methode im *multiple reaction monitoring*-Modus entwickelt. Neben der Bestimmung der intensivsten Vorläufer- und Fragmentionen wurden die Signalintensitäten durch Optimierung weiterer Geräteeinstellungen, wie den substanzspezifischen und quellenspezifischen Parametern, maximal erhöht. Mit den optimierten Parametern wurde eine Methode erstellt und für die Identifizierung der Addukte deren Retentionszeiten sowie *Quantifier*-zu-*Qualifier*-Verhältnisse charakterisiert.

Für den Nachweis von Addukten nach Inkubation von Patulin mit DNA wurde zunächst ein Inkubations- und Aufarbeitungs-Protokoll durch Zusammenführen der zuvor entwickelten Methoden erstellt. Die mit diesem Protokoll erzielten absoluten Wiederfindungen waren für die empfindliche Detektion der meisten Patulin-DNA-Basen-Addukte akzeptabel, während bei den Glutathion-Patulin-DNA-Basen-Addukten hohe Verluste zu verzeichnen waren, welche die Empfindlichkeit der Methode verringern und deshalb für eine Quantifizierung der Addukte die Verwendung stabilisotopen-markierter Standards voraussetzen. Nach Inkubation von DNA mit Patulin in An- und Abwesenheit von Glutathion wurden einige Patulin-Adenin- und -Guanin-Addukte identifiziert, was somit die direkte Reaktion von Patulin mit DNA bestätigte. In Anwesenheit von Glutathion wurde die Adduktbildung reduziert.

Weiterhin waren in Anwesenheit von Glutathion, trotz großer Verluste während der Aufarbeitung, auch gemischte Glutathion-Patulin-Adenin-Addukte detektierbar.

Da die Adduktbildung von Patulin auch mit genomischer DNA nachgewiesen wurde, kommt die direkte DNA-Reaktivität von Patulin als möglicher genotoxischer Wirkmechanismus durchaus in Frage. Die Erkenntnisse zum Adduktbildungspotential von Patulin, sowie die entwickelten Aufarbeitungs- und Detektionsmethoden bilden somit eine gute Grundlage für die Identifizierung und Quantifizierung von potentiellen Patulin-DNA-Addukten aus Patulin-behandelten Säugerzellen im Rahmen von Genmutationsstudien.

## 5 SUMMARY

As a secondary metabolite of various widespread fungi, the mycotoxin patulin belongs to the diet derived mutagens of natural origin and is mainly found in moldy apples and products derived thereof. Despite numerous studies investigating the *in vitro*- and *in vivo*-genotoxicity of patulin, the mode of action of the genotoxic potential of patulin is not yet completely clarified.

To consider the direct reaction with DNA as a possible cause of patulin-induced genotoxicity, the reactivity of patulin against DNA bases was investigated in the first part of this thesis.

Incubation of patulin with the DNA base adenine followed by HPLC-mass spectrometry analysis in full scan mode revealed a total of five adducts of patulin with adenine. Based on their fragmentation patterns without and after methylation of free carboxyl- and keto groups, a ketohexanoic acid derivative-type structure of the patulin backbone and the linkage of adenine to C6 (C5) were suggested for three patulin-adenine adducts. In addition, two adducts were identified exhibiting the same patulin structure, but possessing two molecules of adenine at C5 and C6 of patulin. Consequently, patulin reacted with adenine forming mono- and diadducts.

The influence of glutathione on the reactivity of patulin towards adenine was investigated by adding glutathione in a concentration equimolar to adenine, revealing the same patulin-adenine adducts as in the absence of glutathione. Furthermore, three hitherto unknown glutathione-patulin adducts were identified. Based on their collision-induced fragmentation pattern without and after methylation, they were suggested to be C6-monosubstituted ketohexanoic acid derivative adducts, with one adduct exhibiting a linearly bound glutathione moiety, whereas in both other adducts the  $\alpha$ -amino group of the glutamic acid residue was additionally linked to C1 or C7 of patulin, presenting a 6,1 or 6,7-cyclic glutathione moiety.

Interestingly, seven additional product peaks were formed only by simultaneous incubation of patulin with adenine and glutathione together, indicating to be mixed adducts of patulin, glutathione and adenine, which was finally confirmed by means of their fragmentation patterns. The novel adducts were identified to be regioisomers with ketohexanoic acid derivative structure, exhibiting a 6,7-cyclic glutathione moiety. The position of adenine within the adduct structure was assigned by determining the number of carboxyl groups via

methylation and subsequent mass spectrometry analysis of the resulting molecular and fragment ions. In two diastereomeric pairs of adducts the adenine molecule was linked at C1 of patulin via an amide bond. In addition, two diastereomeric mixed glutathione-patulin-adenine adducts were detected at lower intensities, possessing a linear glutathione moiety and a C1-bound adenine molecule.

The molecular formulas of all proposed structures were confirmed by high resolution mass spectrometry. In addition, a reaction scheme for the formation of (glutathione-)patulin(-adenine) adducts was postulated. The formation of mixed glutathione-DNA base adducts has neither been described for patulin nor for any other  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compound. Furthermore, the chemical reaction leading to the formation of mixed glutathione-patulin-DNA base adducts differs mechanistically from the one leading to mixed glutathione-DNA base adducts of 1,2-dihaloalkanes as well as of 1,2,3,4-diepoxybutane.

By reaction of patulin with 2'-deoxyadenosine in the presence of glutathione three patulin-2'-deoxyadenosine and two glutathione-patulin-2'-deoxyadenosine adducts were formed. Since the N-glycosidic bond of glutathione-patulin-2'-deoxyadenosine adducts were identified to be stable during neutral thermolysis and was only cleaved by means of acid thermolysis, those adducts were most likely bound at N<sup>1</sup> or N<sup>6</sup> of adenine.

In reaction mixtures with an excess of glutathione, the direct reaction of patulin with adenine was prevented, whereas considerably higher glutathione concentrations were necessary to impede the formation of glutathione-patulin-adenine adducts.

The formation of glutathione-patulin-adenine adducts was reduced in the presence of heat-deactivated rat liver cytosol compared to a control with buffer, probably due to the reaction of patulin with cytosolic protein. Active cytosolic glutathione-S-transferase further reduced the formation of glutathione-patulin-adenine adducts, but did not completely prevent their formation.

Most of the reactions observed with patulin and adenine in the absence and presence of glutathione also occurred with guanine, thymine and cytosine, as well as with their respective 2'-deoxynucleosides. Simultaneous reactions of patulin with all DNA bases showed a preferred adduct formation with the purine bases, whereby adenine > guanine.

The high reactivity of patulin towards DNA bases and 2'-deoxynucleosides represents a possible mechanism for the genotoxicity of patulin. Interestingly, conjugation to glutathione not abolishes the reactivity of patulin against DNA bases, but rather forms a reactive intermediate, which is able to react with the nucleophilic centers of DNA bases. This reaction mechanism could be a mode of action to consider for other reactive  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds relevant for the human exposure.

In the second part of this thesis, methods for the identification of those potential patulin-DNA base adducts in genomic DNA were developed, namely for hydrolysis of adducts from the DNA strand, for adduct enrichment and detection of adducts by UHPLC-mass spectrometry.

For DNA hydrolysis, the acidic thermolysis method was optimized by variation of acid, temperature, and time. The different conditions were compared in recoveries of the analytes and the efficiency of DNA base cleavage. The highest yields of cleavage products, as well as high recoveries of the adducts were obtained by hydrolysis with 1-molar hydrochloric acid at 70°C for 30 minutes.

By developing a solid phase extraction with two different anion exchange phases the enrichment of isolated (glutathione-)patulin-DNA base adducts, and their separation from a mixture of free DNA bases was possible.

A UHPLC-mass spectrometry method in the *multiple reaction monitoring* mode was developed for sensitive and specific detection of adducts. Besides the determination of the most intense precursor and fragment ions, the signal intensities were increased by optimizing the substance-specific and source-specific device parameters. Finally, the retention times and quantifier-to-qualifier ratios were characterized for the identification of adducts.

An incubation and work-up protocol for the identification of adducts in patulin-incubated DNA was created by merging the previously developed methods. The adduct recoveries during the work-up were acceptable for the sensitive detection of the most patulin-DNA base adducts, whereas high losses of the mixed glutathione-patulin-DNA base adducts during the work-up reduced the sensitivity of the method. Thus, the use of stable isotope-labeled standards for the quantification of those adducts will be required. After incubation of DNA with patulin in the presence and absence of glutathione some patulin-adenine and -guanine adducts were identified, which confirmed the direct reaction of patulin with DNA. In the presence of glutathione, adduct formation was reduced. Furthermore, despite the loss of mixed glutathione-patulin-adenine adducts during the work-up, those adducts were detectable in the presence of glutathione.

In summary, DNA base adducts were also formed by reaction of patulin with genomic DNA, supporting the direct DNA reactivity as a possible mechanism of patulin-induced genotoxicity. The new insights into the adduct formation of patulin with DNA bases, as well as the work-up and detection methods serve as preliminary work for the identification and quantification of potential patulin-DNA adducts in patulin-exposed mammalian cells in the context of gene mutations studies.

## 6 MATERIAL UND METHODEN

### 6.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

#### 6.1.1 Geräte und Hilfsmittel

**Autoklav:** Systec DX-90 2D (Systec GmbH, Wettenberg, DE)

**Brutschrank:** CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank, CB 150 (Binder GmbH, Tuttlingen, DE)

**Direktverdrängungspipetten:** MICROMAN® 10-100 µl, 100-1000 µl, 50-250 µl (Gilson Inc., Middleton, TN, USA)

**Evaporator:** Christ Evaporator RVC 2-25 CD plus mit Kühlfalle CT 04-50 SR (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, DE) mit Membranvakuumpumpe MZ 2C (Vakuubrand GmbH + Co. KG, Wertheim, DE)

**Feinwaage:** Mettler AT21 Comparator PL 300 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE)

**Gefriertrocknung:** Christ Alpha 1-4 LSC (Leistung 4 kg und Eiskondensatortemperatur 55°C; Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, DE) mit Hybrid-Vakuumpumpe RZ 6 (Vakuubrand GmbH + Co. KG)

**Heiz- und Magnetprüher:** IKA® RCT basic (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE)

**HPLC (analytisch):** Agilent Technologies Series 1200 HPLC-System (Agilent Technologies, Waldbronn, DE)

- Quaternäre Pumpe (G1311A)
- Autosampler ALS (G1379A)
- Degasser (G1322A)
- Säulenofen TCC (G1316A)
- Variabler Wellenlängendetektor VWD (G1314B)
- ChemStation for LC Systems (Rev. B.03.02)

**HPLC-Massenspektrometer-System:**

Agilent Technologies Series 1200 HPLC-System (Agilent Technologies)

gekoppelt mit Agilent Technologies 6460 Triplequadrupol Massenspektrometer mit Jet Stream Ionenquelle (Agilent Technologies)

- HPLC (semipräparativ):** HPLC-System (Knauer GmbH, Berlin, DE)
- 4-Kanal Degasser
  - WellChrom Pump Maxi-Star K-1000
  - Dynamic Mixing Chamber
  - WellChrom Spektralphotometer K-2500
  - Interface
  - Rheodyne 6-Wege Injektionsventil mit 100 µl Injektionschleife (Ventil 7125)
  - Software EuroChrom 2000
- HPLC-Säulen:** Luna C18 (2), 250 x 4,6 mm, 5 mm, 100 Å (Phenomenex, Aschaffenburg, DE)
- Luna C18 (2), 250 x 10 mm, 5 mm, 100 Å (Phenomenex)
- Hypersil GOLD, 100 mm x 4,6 mm, 3 µm, 175 Å, (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE)
- Kinetex C18, 100 mm x 2,1 mm, 2,6 µm, 100 Å, (Phenomenex)
- Kinetex C18, 100 mm x 3 mm, 2,6 µm, 100 Å, (Phenomenex)
- Waters ACQUITY UPLC BEH C18, 2,1 × 100 mm, 1,7 µm (Waters GmbH, Eschborn, DE)
- Kolbenhubpipetten:** Rotilabo®-Mikroliterpipetten Proline®, variabel, 5-50 µl, 50-200 µl, 0,5-10 µl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE)
- Eppendorf Research®, variabel, 100-1000 µl, 1000-5000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, DE)
- NanoQuant-Platte:** Infinite 200 PRO NanoQuant (Tecan Austria Group, Grödig/Salzburg, Österreich)
- pH-Meter:** Inolab pH 720 (WTW GmbH, Weilheim, DE)
- Photometer:** Varian, Cary 50 Bio (Agilent Technologies)
- Plattenlesegerät:** Tecan Infinite F-200 (Tecan Austria GmbH)
- QTrap 5500 Massenspektrometer:**
- QTrap 5500 LC/MS/MS System mit Turbo VTM-Ionenquelle und Turbulonspray®-Sonde (ABSciex GmbH, Darmstadt, DE) mit Stickstoffgenerator NGM11-S (CMC Instruments GmbH, Eschborn, DE)
- Rotator:** Rotator-Mixer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE)
- SPE-Kammer:** Supelco Visiprep™ SPE Vacuum Manifold 12-port model (Supelco Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
- Sterilwerkbank:** Nu-480, Klasse 2 (Integra Biosciences GmbH, Fernwald, DE)
- Thermomixer:** Eppendorf Thermomixer compact (Eppendorf AG)
- UHPLC-System 1:** Ekspert ultraLC 100-System (ABSciex GmbH)

- ULC 100 Pump A/B
- ULC 100-XL A/S W/Thermostat Control Autosampler
- ULC 100 Column Oven

**UHPLC-System 2:** Shimadzu Nexera X2 UHPLC-System (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, DE)

- DGU-20A 5R Degasser
- SIL-30AC Autosampler
- CTO-30A Säulenoven
- LC-30AD Liquid Chromatograph
- LC-30AD Liquid Chromatograph
- CBM-20A Communications Bus Module

**Ultraschallbad:** Ultraschallreiniger Bandelin SONOREX SUPER RK 100 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE)

**Ultrazentrifuge:** Beckmann L8-60M (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE)

**UPLC-qTOF-System:** Waters ACQUITY Ultra Performance UPLC-System (UPLC, Waters GmbH) gekoppelt mit einem Waters SYNAPT GS HDMS Hybrid Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (qTOF) mit Elektrospray-Ionisierung (Waters GmbH)

**Vortex:** Vortex-Genie®2 (Scientific Industries, New York, USA)

**Waagen:** Denver Instrument SI-2002 (Sartorius AG, Goettingen, DE)  
Mettler AE 240 (Mettler-Toledo GmbH)

**Wasserbad:** Julabo SW 22 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, DE)  
Julabo MWB (Julabo Labortechnik GmbH)

**Zentrifugen:** Heraeus fresco 21 Zentrifuge (Thermo Fisher Scientific)  
Heraeus Multifuge 3SR+ Zentrifuge (Thermo Fisher Scientific)

## 6.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Glaskulturröhrchen:** GL 18, 100x16 mm mit Schraubverschluss (# RG09, A. Hartenstein, Laborbedarf GmbH, Würzburg, DE)

**Halb-Mikro-Küvetten:** 10x4 mm, Lichtweg 10 mm, Polystyrol (# 67.746, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE)

**Kanülen:** 100 Sterican®, Einmal-Injektions-Kanülen (# 465 7519, B. Braun Medical AG, Emmenbrücke, DE)

**Lochplatte (96-Well plate):** Microtest Plate 96-Well, flat bottom (# 82.1581, Sarstedt AG & Co.)

**Molekularfilter:** Amicon Ultra 0.5 ml centrifugal filters, MWCO 3 kDa (# Z677094-24EA, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE)



**Pipettenspitzen:**

Für Kolbenhubpipetten:

- 10 µl farblos (# 70.1115, Sarstedt AG & Co.)
- 200 µl gelb (# 70.760.002, Sarstedt AG & Co.)
- 1000 µl blau (# 70.762, Sarstedt AG & Co.)
- 100-5000 µl epT.I.P.S. (# , Eppendorf AG)

Für Direktverdrängungspipetten:

- Microman® Kolben mit Kapillaren CP100 (# 7-4376, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, DE)
- Microman® Kolben mit Kapillaren CP250 (# 7-7372, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH)
- Microman® Kolben mit Kapillaren CP1000 (# 7-4373, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH)

**Plastikpasteurpipetten:** 5 ml, non sterile (# 612-1684, VWR International GmbH, Darmstadt, DE)

**Reagiergefäße:** SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml aus PP, mit breitem Rand (# 72.706, Sarstedt AG & Co.)  
SafeSeal Reagiergefäß 2,0 ml aus PP, mit breitem Rand (# 72.695.500, Sarstedt AG & Co.)

**SPE-Säulen:** Strata SAX 55µm 70A 100 mg/3 ml (# 8B-S008-EBJ, Phenomenex)  
Strata X-A 33 u Polymeric Strom Anion 100 mg/3 ml (# 8B-S123-EBJ, Phenomenex)

**Vials:** Gewindeflasche 1,5 ml, 12x32 mm, braun (# 451101211), Schraubkappe PP,8-425, NK/TEF rot 1,3 mm (# 3011S1015), Mikroinserte 5x30 mm ca. 100 µl, konisch (# 501105021), Federn 5x20 (# 501167012, CZT Klaus Trott Chromatographie-Zubehör, Kriftel, DE)  
Gewindeflasche braun 6mm Öffnung (# 45110101), Schraubkappe NK/PTFE für 6 mm (# 3111B1011), Mikroinsert 6x30 mm, ca 150 µl konisch (# 501106015, CZT Klaus Trott Chromatographie-Zubehör)  
Roll-/Schnapprandflasche 1,5 ml (# 401100061), Snap-On Kappe PE klar (# 2511C1020)/ Bördelverschluss Sil/PTFE weiß-rot MS/ECD (# 101123020, CZT Klaus Trott Chromatographie-Zubehör)

**Zellkulturflaschen:** Cellstar® Tissue culture flasks 175 cm<sup>2</sup>, 650 ml, PS, red filter cap, sterile (# 661175, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE)

**Zentrifugenröhrchen:** Röhre 15 ml 120x17mm PP (# 62.554.512, Sarstedt AG & Co.)  
Cellstar® Tubes 50 ml (# 227261, Greiner Bio-One GmbH)

### 6.1.3 Chemikalien

**2'-Deoxyadenosin Monohydrat:** 99-100% (# D7400, Sigma Aldrich Chemie GmbH)

**2'-Deoxycytidin-Hydrochlorid:** Biochemica, min. 98% (# A2151, AppliChem GmbH)

**2'-Deoxyguanosin Hydrat:** 99% (# 85499, Sigma Aldrich Chemie GmbH)

- 2'-Deoxythymidin:** BioReagenz, für Zellkultur geeignet, ≥ 99%, (# T1895, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- 2-Propanol:** ROTIPURAN®, ≥99,8 %, p.a., ACS, ISO (# 6752.2, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB):** ≥98%, BioReagent (# D8130, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Acetonitril:** HiPerSolv® CHROMANORM® für LC-MS (# 83640.320, VWR International GmbH)
- Adenin:** > 99% (# A8626, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Ameisensäure:**  
 ≥ 98%, puriss. p.a., (# 33015, Sigma Aldrich Chemie GmbH)  
 LC-MS Grade: puriss. p.a., für Massenspektrometrie (# 94318, Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Ammoniumacetat:** für HPLC ≥99% (#17836, Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Ammoniumformiat-Lösung:** 10 M in Wasser, ultra (# 78314, Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Ammoniumhydroxid-Lösung:** puriss. pa., für LC/MS, (#44273, Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Chlordinitrobenzol (CDNB):** ≥99% (# 23,732-9, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Chloroform:** reinst (# 24216, Riedel-de Haën, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Coffein:** ≥ 99% (HPLC), purum, wasserfrei (# 27600, Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Cytosin:** 97%, BioChemica (# A0815, AppliChem GmbH)
- Diethylether:** peroxidfrei (# 1732, Chemikalienausgabe Uni WÜ)
- Dikaliumhydrogenphosphat:** ≥ 99%, p.a., ACS, wasserfrei (# P749.1, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- Dinatriumhydrogenphosphat:** ≥ 99%, p.a., ACS, wasserfrei (# P030.2, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- EDTA Dinatriumsalz Dihydrat:** Titierkomplex III, ≥ 99%, p.a., ACS (Produktnr. 8043.1, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- Essigsäure:** p.a. (# 1858, Chemikalienausgabe Uni WÜ)
- Essigsäure-ethylester:** CHROMASOLV® for HPLC ≥99,7% (# 34858, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Ethanol, absolut:** ≥ 99,5% (Produktnr. 5054.2, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- γ-Glutamyl-L-Cystein:** ≥80% (HPLC) (# 0903, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- L-Glutathion, reduziert:** ≥ 98% (# G6012, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Guanin:** > 99% (# 0702 AppliChem GmbH, Darmstadt, DE)
- Kalbsthymus-DNA:** Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus, Type I, fibers (# D1501, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Kaliumchlorid:** p.a. (# 2116, Chemikalienausgabe Uni WÜ)

- Kaliumdihydrogenphosphat:**  $\geq 99\%$ , p.a., ACS, wasserfrei (# 3904.1, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- Kaliumhydroxid:** Plätzchen, p.a. (# 2159, Chemikalienausgabe Uni WÜ)
- Magnesiumsulfat:** p.a. (# 2338, Chemikalienausgabe Uni WÜ)
- Methanol:** *Gradient Grade* für Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv®, Reag. Ph Eur (# 1.06007.2500, VWR International GmbH, Darmstadt, DE)  
*LC-MS Grade* mind. 99,9 % (# 22490.4700, Bernd Kraft, Duisburg, DE)
- Natriumacetat:**  $\geq 98,5\%$ , reinst, wasserfrei (# X891.1, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- Natriumchlorid:** Bio Reagent,  $\geq 99,5\%$  (Titration), geeignet für die Zellkultur, (# 95886, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Natriumdodecylsulfat (SDS):** ultra pure,  $\geq 99\%$  für Elektrophorese (# 2326.1, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- Natriumhydroxid:** Plätzchen AnalaR NORMAPUR® ACS, ISO, Reag.Ph.Eur. zur Analyse (# 28244.364, VWR International GmbH, Darmstadt, DE)
- N-Nitroso-N-Methylharnstoff:** ISOPAC® (# N1517, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Patulin:** isoliert und aufgereinigt von Fliege und Metzler (1999)
- Penicillin-Streptomycin:** 100 ml, Zellkultur erprobt, sterilfiltriert mit 5 U Penicillin und 5 mg Streptomycin/ml (# P4458, Sigma Aldrich GmbH)
- Pferdeserum:** Horse Serum, Heat inactivated, Sterile-filtered, cell culture tested (# H1138-500 ml, Sigma Aldrich GmbH)
- Proteinase K:** Tritirachium album serine, Aktivität 44,4 mAnsonU/mg (# A3830, AppliChem GmbH)
- RPMI-1640 Medium:** With L-glutamine and sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (# 8758, Sigma Aldrich GmbH)
- Salzsäure:** 37% (# 2967, Chemikalienausgabe Uni WÜ)
- Theobromin:** Ph.Eur. II (# 2302, Mainland Pharmazeutische Fabrik GmbH, Frankfurt, DE)
- Thioharnstoff:** p.a. (# 3095, Chemikalienausgabe Uni WÜ)
- Thymin:** mind. 97% (# A0670, AppliChem GmbH)
- Trichloressigsäure:** 99%, extra pure (# 3141, Chemikalienausgabe Uni WÜ)
- Trifluoressigsäure:** 99%, extra pure (# 139721000, Acros Organics, Geel, Belgien)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan:** PUFFERAN®,  $\geq 99,9\%$ , p.a. (# 4855.1, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- Wasser:** Millipore®-Wasser (interne Anlage)  
 HiPerSolv® CHROMANORM® für LC-MS (# 83645.320, VWR International GmbH, Darmstadt, DE)

## 6.1.4 Biologisches Material

### *Rattenlebercytosol*

Hergestellt durch Ultrazentrifugation (9.000 g, 15 min, 4°C; 100.000 g, 1 h, 4°C) von ca. 1 g einer in MIC I-Puffer homogenisierten Leber (unbehandelte Sprague Dawly Ratte, weiblich). Aufbewahrung (gelöst in MIC I-Puffer) bei -80°C. Der Proteingehalt betrug  $19,1 \pm 0,8$  mg/ml (Quantifizierung nach Bradford, 1976).

## 6.1.5 Verwendet Zelllinie und Kultivierung

### *Tk+/- L5178Y Mouse-Lymphoma Cells*

Die verwendeten Mauslymphomzellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und in einer Wasser-gesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden bis ca. 80-90% Konfluenz kultiviert, pelletiert, schockgefroren in flüssigem Stickstoff und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Wachstumsmedium: 500 ml RPMI-Medium + 50 ml hitzeinaktiviertes Pferdeserum + 10 ml Penicillin-Streptomycin (2%)

## 6.1.6 Puffer und Lösungen

### *6.1.6.1 Puffer*

#### **Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 5,9)**

##### *Reagenzien*

6,81 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

8,71 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

##### *Durchführung*

Das KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> jeweils in 500 ml Wasser lösen. Die K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung vorlegen und mit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung auf pH 5,9 einstellen.

#### **Kaliumphosphat-Puffer (1 M bzw. 0,1 M, pH 7,4)**

##### *Reagenzien*

13,62 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

17,42 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

##### *Durchführung*

Das KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> jeweils in 100 ml Wasser lösen. Die K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung vorlegen und

mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung auf pH 7,4 einstellen ( $c = 1 \text{ M}$ ). 1 Volumenteil des 1 molaren Puffers mit 9 Volumenteilen Wasser verdünnen ( $c = 0,1 \text{ M}$ ) und den pH-Wert überprüfen.

#### **MIC I-Puffer (Tris (50mM)-EDTA (1 mM)-Puffer, pH 7,4)**

##### *Reagenzien*

- 11,8 g KCl
- 6,06 g Tris
- 372 mg EDTA-di-Natrium-Salz (Dihydrat)

##### *Durchführung*

In ca. 900 ml Wasser lösen, auf pH 7,4 einstellen und mit Wasser auf 1 l auffüllen.

#### **Natriumacetat (NaOAc)-Puffer (pH 5)**

##### *Reagenzien*

- 7,49 g Natriumacetat
- 1,99 g Magnesiumsulfat
- 5,82 g NaCl

##### *Durchführung*

Das NaOAc in 80 ml Wasser lösen, auf pH 5 mit konz. Essigsäure einstellen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen. Das Magnesiumsulfat und das NaCl jeweils in 100 ml Wasser lösen. 91 ml NaOAc-Lösung, 5 ml Magnesiumsulfatlösung und 2 ml NaCl-Lösung mischen und auf 100 ml mit Wasser auffüllen ( $c(\text{NaOAc}) = 83 \text{ mM}$ ,  $c(\text{MgSO}_4) = 8,3 \text{ mM}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 20 \text{ mM}$ ).

#### **Phosphate Buffered Saline/Calcium Magnesium Free-Puffer (PBS/CMF-Puffer)**

##### *Reagenzien*

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 11,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

##### *Durchführung*

In 1 l Wasser lösen (10-facher Puffer). 1 Volumenteil des 10-fachen Puffers mit 9 Volumenteilen Wasser auffüllen und auf pH 7,4 einstellen (1-facher Puffer).

#### **Saline-EDTA (SE)-Puffer (pH 8)**

##### *Reagenzien*

- 4,38 g NaCl
- 9,306 g EDTA-di-Natrium-Salz (Dihydrat)
- 10 g Natriumdodecylsulfat (SDS)

#### *Durchführung*

Das EDTA-di-Natrium-Salz in 20 ml Wasser lösen, auf pH 8 einstellen und mit Wasser auf 50 ml auffüllen. Das SDS in 100 ml Wasser lösen (10% SDS (w/v)). Das NaCl mit 50 ml EDTA-di-Natrium-Salz-Lösung, 100 ml 10%-iges SDS und 650 ml Wasser lösen. Auf pH 8 einstellen und auf 1 l mit Wasser auffüllen ( $c(\text{NaCl}) = 75 \text{ mM}$ ,  $c(\text{EDTA-di-Natrium-Salz}) = 25 \text{ mM}$ , 1% SDS (w/v)).

#### **Tris (1 mM)-EDTA (50 mM)-Puffer (pH 8)**

##### *Reagenzien*

60,57 g Tris

9,31 g Na<sub>2</sub>EDTA

1 g NaOH

#### *Durchführung*

Das Tris in 250 ml Wasser lösen und auf pH 8 einstellen und auf 500 ml auffüllen (Tris-Lösung). Das Na<sub>2</sub>EDTA mit dem NaOH in 30 ml Wasser lösen und auf 50 ml auffüllen (EDTA-Lösung). 250 ml der Tris-Lösung mit 10 ml der EDTA-Lösung vereinen und auf pH 8 einstellen und mit Wasser auf 500 l auffüllen (10-facher Puffer). 1 Volumenteil des 10-fachen Puffers mit 9 Volumenteilen Wasser auffüllen und auf pH 8 einstellen (1-facher Puffer).

#### **Tris-HCl-Puffer (10 mM, pH 8)**

##### *Reagenzien*

121,14 g Tris

#### *Durchführung*

In ca. 800 ml Wasser lösen, auf pH 8 einstellen und mit Wasser auf 1 l auffüllen ( $c = 1 \text{ M}$ ). 1 Volumenteil des 1 molaren Puffers mit 99 Volumenteilen Wasser verdünnen ( $c = 0,01 \text{ M}$ ) und den pH-Wert überprüfen.

#### **6.1.6.2 Fließmittel für die Flüssigchromatographie**

Je nach Gerät wurde das Fließmittel mit *Millipore*-Wasser und Lösungsmittel in *Gradient Grade* (HPLC-UV) oder Wasser und Lösungsmittel in *LC-MS Grade* (HPLC-MS) hergestellt.

#### **Ammoniumformiatlösung (10 mM)**

5 ml einer 10 M fertigen Ammoniumformiat-Lösung mit Wasser (*Millipore*) auf 250 ml auffüllen (200 mM). Daraus 25 ml entnehmen und mit Wasser (*Millipore*) auf 500 ml auffüllen.

**Methanol 15% (v/v) mit 1% bzw. 0,1% Ameisensäure**

840 ml Wasser (*Millipore* bzw. *LC-MS Grade*) mit 10 ml bzw. 1 ml Ameisensäure (98%-ig bzw. *LC-MS Grade*) und 150 ml Methanol (*Gradient Grade* bzw. *LC-MS Grade*) mischen.

**Wasser mit 1% bzw. 0,1% Ameisensäure**

Wasser (*Millipore* bzw. *LC-MS Grade*) in einem 1 l-Messkolben vorlegen, 10 ml bzw. 1 ml Ameisensäure (98%-ig bzw. *LC-MS Grade*) zugeben und mit Wasser auffüllen.

**6.1.6.3 Lösungen für die Festphasenextraktion**

**Ammoniumacetatlösung (25 mM)**

192,2 g Ammoniumacetat in ca. 80 ml Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen. pH 6-7.

**Wasser mit 5% Ameisensäure**

Wasser (*LC-MS Grade*) in einem 100 ml-Messkolben vorlegen, 5 ml Ameisensäure (*LC-MS Grade*) zugeben und mit Wasser auffüllen.

**Methanol mit 5% Ameisensäure**

Methanol (*LC-MS Grade*) in einem 100 ml-Messkolben vorlegen, 5 ml Ameisensäure (*LC-MS Grade*) zugeben und mit Methanol auffüllen.

**1%-, 3%-, 5%-, 10%-, 50%-iges Methanol mit 5% Ameisensäure**

Herstellung der Lösungen durch Mischen von Methanol mit 5% Ameisensäure mit Wasser mit 5% Ameisensäure.

**6.1.6.4 Sonstige Lösungen**

**NaCl-Lösung (6 M)**

350,64 g NaCl in 1 l Wasser lösen. Gesättigte Lösung vom ungelösten NaCl abdekantieren.

**Natriumhydroxid-Lösung (0,1 N)**

Es werden 400 mg NaOH-Plätzchen abgewogen in einen 100 ml-Messkolben überführt, in Wasser gelöst und anschließend mit Wasser auf 100 ml bis zur Marke aufgefüllt.

**Salzsäure-Lösung (1 M)**

Es werden 3 ml Salzsäure in einen 100 ml-Messkolben überführt und anschließend mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

**Wasser mit 0,1% Ameisensäure**

Wasser (*LC-MS Grade*) in einem 100 ml-Messkolben vorlegen, 0,1 ml Ameisensäure (*LC-MS Grade*) zugeben und mit Wasser auffüllen.

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Analytik

#### 6.2.1.1 HPLC-UV/VIS

Analytisches Agilent Technologies Series 1200 HPLC System, mit Degasser, quarternärer Pumpe, Autosampler und UV/Vis-Detektor; die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software ChemStation (Rev B.03.02).

➤ Methode 1

Säule: Phenomenex Luna C18(2), 5 µm, 250 x 4,6 mm, 100 Å

Fluss: 0,75 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Eluent A: Millipore-Wasser mit 1% FA

Eluent B: 15% Methanol mit 1% FA

Gradient:

|              |    |    |    |    |    |
|--------------|----|----|----|----|----|
| Zeit (min)   | 0  | 20 | 22 | 23 | 35 |
| Eluent A (%) | 95 | 90 | 90 | 95 | 95 |
| Eluent B (%) | 5  | 10 | 10 | 5  | 5  |

Detektion: 260 nm

➤ Methode 2

Säule: Phenomenex Luna C18 (2), 5 µm, 250 x 4,6 mm, 100 Å

Fluss: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 10 µl

Eluent A: Ammoniumformiat-Lösung, 10 mM

Eluent B: Methanol

Gradient:

|              |    |     |    |    |    |    |
|--------------|----|-----|----|----|----|----|
| Zeit (min)   | 0  | 7,5 | 15 | 20 | 25 | 40 |
| Eluent A (%) | 95 | 95  | 65 | 65 | 95 | 95 |
| Eluent B (%) | 5  | 5   | 35 | 35 | 5  | 5  |

Detektion: 260 nm

➤ Methode 3

Säule: Phenomenex Luna C18 (2), 5 µm, 250 x 4,6 mm, 100 Å

Fluss: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 10 µl



Eluent A: Ammoniumformiat-Lösung, 10 mM

Eluent B: Methanol

Gradient:

|              |    |    |    |    |    |    |
|--------------|----|----|----|----|----|----|
| Zeit (min)   | 0  | 10 | 25 | 30 | 33 | 45 |
| Eluent A (%) | 95 | 95 | 50 | 50 | 95 | 95 |
| Eluent B (%) | 5  | 5  | 50 | 50 | 5  | 5  |

Detektion: 260 nm

➤ Methode 4

Säule: Thermo Scientific Hypersil Gold, 3 µm, 100 x 4,6 mm, 175 Å

Fluss: 0,5 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

bzw. Injektionsprogramm: 20 µl Probe mischen mit 20 µl IS vor Injektion (40 µl)

Eluent A: Millipore-Wasser mit 1% FA

Eluent B: Methanol

Gradient:

|              |    |    |    |    |    |    |
|--------------|----|----|----|----|----|----|
| Zeit (min)   | 0  | 10 | 20 | 23 | 25 | 35 |
| Eluent A (%) | 99 | 99 | 40 | 40 | 99 | 99 |
| Eluent B (%) | 1  | 1  | 60 | 60 | 1  | 1  |

Detektion: 260 nm

**6.2.1.2 Semipräparative HPLC-UV/VIS**

Knauer HPLC-System mit Degasser, WellChrom quartenärer Pumpe und WellChrom UV/Vi-Detektor. Manuelle Injektion mit einem Rheodyne Injektionsventil mit einer 100 µl-Schleife. Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software Euro2000.

➤ Methode 1

Säule: Phenomenex Luna C18(2), 5 µm, 250 x 10 mm, 100 Å

Injektionsvolumen: 100 µl

Eluent A: Millipore-Wasser mit 1% FA

Eluent B: 15% Methanol mit 1% FA

Gradient und Fluss:

|                |      |      |      |     |     |      |      |      |      |
|----------------|------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|
| Zeit (min)     | 0    | 20   | 30   | 31  | 50  | 51   | 60   | 63   | 75   |
| Eluent A (%)   | 95   | 90   | 0    | 95  | 95  | 95   | 0    | 95   | 95   |
| Eluent B (%)   | 5    | 10   | 32   | 35  | 77  | 80   | 100  | 5    | 5    |
| Fluss (ml/min) | 3,75 | 3,75 | 3,75 | 2,5 | 2,5 | 3,75 | 3,75 | 3,75 | 3,75 |

Detektion: 260 nm

➤ Methode 2

Säule: Phenomenex Luna C18(2), 5 µm, 250 x 10 mm, 100 Å

Injektionsvolumen: 100 µl

Eluent A: Millipore-Wasser mit 1% FA

Eluent B: 15% Methanol mit 1% FA

Gradient:

|                |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Zeit (min)     | 0    | 30   | 31   | 35   | 40   | 42   | 50   |
| Eluent A (%)   | 95   | 90   | 90   | 0    | 0    | 95   | 95   |
| Eluent B (%)   | 5    | 10   | 10   | 100  | 100  | 5    | 5    |
| Fluss (ml/min) | 3,75 | 3,75 | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 |

Detektion: 260 nm

➤ Methode 3

Säule: Phenomenex Luna C18(2), 5 µm, 250 x 10 mm, 100 Å

Fluss: 3,75 ml/min

Injektionsvolumen: 100 µl

Eluent A: Millipore-Wasser mit 1% FA

Eluent B: 15% Methanol mit 1% FA

Gradient:

|              |    |    |     |     |    |    |
|--------------|----|----|-----|-----|----|----|
| Zeit (min)   | 0  | 20 | 60  | 65  | 67 | 75 |
| Eluent A (%) | 95 | 90 | 0   | 0   | 95 | 95 |
| Eluent B (%) | 5  | 10 | 100 | 100 | 5  | 5  |

Detektion: 300 nm

**6.2.1.3 HPLC-ESI-MS/MS**

HPLC-MS/MS-System bestehend aus einem Agilent Technologies 6460 Triplequadrupole Massenspektrometer mit einer Jet Stream Elektrospray-Ionenquelle gekoppelt mit einem

Agilent Technologies Series 1200 HPLC-System mit Degasser, einem HiP-ALS SL+ Autosampler und zwei binären Pumpen. Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software MassHunter *LCMS Data Acquisition* und *Qualitative Analysis* (Rev. B.04.01.).

**HPLC-Bedingungen:**

Säule: Phenomenex Kinetex 2,6 µm, C18, 100 mm x 2,1 mm, 100 Å

Fluss: 0,2 ml/min

Injektionsvolumen: 3 µl

Eluent A: Wasser mit 1% FA

Eluent B: 15% Methanol mit 1% FA

Gradient:

|              |    |    |     |    |    |
|--------------|----|----|-----|----|----|
| Zeit (min)   | 0  | 20 | 60  | 65 | 80 |
| Eluent A (%) | 95 | 90 | 0   | 95 | 95 |
| Eluent B (%) | 5  | 10 | 100 | 5  | 5  |

**MS-Parameter:**

| Parameter                     | Einstellung    |
|-------------------------------|----------------|
| Ionenquelle                   |                |
| Polarität                     | positiv        |
| <i>drying gas</i> Temperature | 300°C          |
| <i>drying gas</i> Fluss       | 8 l/min        |
| <i>nebulizer gas</i> Druck    | 45 psi         |
| <i>sheat gas</i> Temperature  | 250°C          |
| <i>sheat gas</i> Fluss        | 11 l/min       |
| Kapillarspannung              | 3,5 kV         |
| Gase                          |                |
| <i>drying gas</i>             | N <sub>2</sub> |
| <i>sheat gas</i>              | N <sub>2</sub> |
| <i>nebulizer gas</i>          | Luft           |
| <i>collision gas</i>          | N <sub>2</sub> |

**Messmodi:**

- Vollscan-Modus: Fragmentorspannung 135 V, *m/z*-Bereich 100 - 1000
- Produktionenscan-Modus: Einstellungen zu Vorläuferion und Kollisionsenergien werden in Abbildungs- und Tabellenbeschriftungen aufgeführt.
- MRM-Modus: *m/z*-Übergänge der Vorläuferionen auf die Fragmentionen, sowie Kollisionsenergien werden in Abbildungs- und Tabellenbeschriftungen aufgeführt.

**6.2.1.4 ESI-MS/MS**

MS/MS-System bestehend aus einem ABSciex 5500 QTrap Hybrid-System aus Tripel-Quadrupol und linearer Ionenfalle mit einer TurboV™-Ionenquelle mit TurbolonSpray-Sonde zur Elektrospray-Ionisation. Injektion mit einer im Gerät integrierten Spritzenpumpe. Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software Analyst (Version 1.6.1).

*Einstellungen Spritzenpumpe:*

Kontinuierliche Injektion: 10 µl/min

*MS-Parameter:*

| Parameter | Einstellung |
|-----------|-------------|
| Polarität | positiv     |
| CUR       | 20 psi      |
| IS        | 5500 V      |
| TEM       | 0°C         |
| GS1       | 15 psi      |
| GS2       | 0 psi       |
| CAD       | medium      |
| EP        | 10 V        |

*Messmodus:*

automatische *Compound Optimization* im Tune Modus

**6.2.1.5 UHPLC-ESI-MS/MS**

UHPLC-MS/MS-System bestehend aus einem ABSciex 5500 QTrap Hybrid-System aus Tripel-Quadrupol und linearer Ionenfalle mit einer TurboV™-Ionenquelle mit TurbolonSpray-Sonde zur Elektrospray-Ionisation, gekoppelt mit einem UHPLC-System:

## UHPLC-System 1)

Eksigent ultraLC 100 UHPLC-System mit Degasser, einem ekspert 100-XL Autosampler und zwei binären ekspert 100 Pumpen. Die Injektion erfolgte mit den Modi *Partial loopfill* (1-10 µl, mit 15 µl *Flush volume*) oder *µl-Pickup* (direkte Injektion von 1-3 µl). Waschmethode der Injektionsnadel: 100 µl Wasser, 100 µl Methanol, 100 µl Wasser. Die Temperatur des Autosamplers betrug 12°C.

## UHPLC-System 2)

Shimadzu Nexera X2 UHPLC-System mit Degasser, einem Autosampler und zwei binären

Pumpen. Die Injektion von 1-50 µl erfolgte direkt, wobei vor und nach der Injektion das Nadeläußere für 2 sek mit einer Wasser/Methanol-Mischung (50:50, v/v) und anschließend mit 500 µl Wasser gespült wurde. Die Temperatur des Autosamplers betrug 4°C.

Die Auftrennung der Analyten erfolgte mit zwei verschiedenen Trennmethoden:

Methode 1)

Säule: Phenomenex Kinetex 2,6 µm, C18, 100 mm x 2,1 mm, 100 Å

Fluss: 0,2 ml/min

Eluent A: Wasser mit 1% FA

Eluent B: 15% Methanol mit 1% FA

Gradient:

|              |    |    |     |     |    |    |
|--------------|----|----|-----|-----|----|----|
| Zeit (min)   | 0  | 20 | 60  | 63* | 65 | 75 |
| Eluent A (%) | 95 | 90 | 0   | 0   | 95 | 95 |
| Eluent B (%) | 5  | 10 | 100 | 100 | 5  | 5  |

\* Umschalten des Eluentenflusses über ein Umschaltventil zum Lösemittel-Abfall.

Methode 2)

Säule: Phenomenex Kinetex 2,6 µm, C18, 100 mm x 3,0 mm, 100 Å

Fluss: 0,2 ml/min

Eluent A: Wasser mit 1% FA

Eluent B: 15% Methanol mit 1% FA

Gradient:

|              |    |    |     |     |     |    |
|--------------|----|----|-----|-----|-----|----|
| Zeit (min)   | 0  | 5  | 23  | 25  | 27* | 35 |
| Eluent A (%) | 95 | 90 | 0   | 0   | 95  | 95 |
| Eluent B (%) | 5  | 10 | 100 | 100 | 5   | 5  |

\* Umschalten des Eluentenflusses über ein Umschaltventil zum Lösemittel-Abfall.

Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software Analyst (Version 1.6.1).

MS-Parameter:

| Parameter | Einstellung    |
|-----------|----------------|
| Polarität | positiv        |
| CUR       | 40 bzw. 35 psi |
| IS        | 5000 V         |
| TEM       | 550°C          |
| GS1       | 40 psi         |
| GS2       | 70 psi         |
| CAD       | medium         |
| EP        | 10 V           |

*Messmodi:*

- *Enhanced* Produktionenscan-Modus und MS<sup>3</sup>-Experimente: Einstellungen zu Vorläuferion bzw. erstem und zweitem Vorläuferion, sowie den Kollisionsenergien werden in Abbildungs- und Tabellenbeschriftungen aufgeführt; *Scan Rate*: 10000 Da/s; Q3 als lineare Ionenfalle: *Dynamic fill time*.
- MRM-Modus: *m/z*-Übergänge der Vorläuferionen auf die Fragmentionen, sowie Kollisionsenergien, werden in Abbildungs- und Tabellenbeschriftungen aufgeführt; *Scan Rate*: 10 Da/s.

**6.2.1.6 UPLC-ESI-qTOF**

UPLC-qTOF-System bestehend aus einem Waters ACQUITY Ultra Performance UPLC-System gekoppelt mit einem Waters SYNAPT GS HDMS Hybrid Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (qTOF) mit Elektrospray-Ionisierung. Sowohl im negativen als auch im positiven ESI-Modus wurde eine *capillary*-Spannung von 0,8 kV und einer *cone*-Spannung und 25 V verwendet. Die Strömungsgeschwindigkeit des Desolvatisierungsgases (Stickstoff) betrug 800 l/h und die Desolvatisierungstemperatur wurde auf 350°C gehalten. Das q-TOF-System war mit einer integralen Lockspray-Einheit mit eigenem Referenzsprayer und Leucin-Enkephalin (*m/z* 554,261 im ESI neg. und *m/z* 556,277 im ESI pos.), welches als interne Referenz verwendet wurde, ausgestattet. Vor der Messung wurde die qTOF-MS unter Verwendung eines Natriumformiat-Clusters (0,5 mM in Wasser: Acetonitril (50:50, v/v)) kalibriert. Der Quadrupol wurde im Breitband-*radio frequency* (RF)-Modus betrieben. Die Datenerfassung erfolgte über den Massenbereich von 50-1200 Da durch die Anwendung des Resolution Modus (Rs 23000). Zwei diskrete und unabhängige verschachtelte Erfassungsfunktionen wurden automatisch erstellt. Die erste Funktion sammelte die *low energy*-Daten wobei Molekülionen generiert wurden, während die zweite Funktion die Fragmente des Molekülions (*high energy*-Daten) unter Verwendung einer Kollisionsenergie-Rampe von 15 bis 35 eV sammelte. In beiden Fällen wurde Argon als Stoßgas verwendet. Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der MassLynx Software (Version 4.1, Waters, Manchester, U.K.).

*UPLC-Parameter:*

Säule: Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>, 1,7 µm, 2,1 × 100 mm

Temperatur: 30°C

Injektionsvolumen: 5 µl

Fluss: 0,3 ml/min

Eluent A: Wasser mit 0,1% FA

Eluent B: 15% Methanol mit 0,1% FA

Gradient:

|              |     |    |
|--------------|-----|----|
| Zeit (min)   | 0   | 5  |
| Eluent A (%) | 100 | 85 |
| Eluent B (%) | 0   | 15 |

## 6.2.2 Charakterisierung eines Rattenlebercytosol

### 6.2.2.1 Glutathion-Quantifizierung nach Ellmann

#### Reagenzien

PBS/CMF-Puffer, pH 7,4

Tris-EDTA-Puffer (10-fach), pH 8

5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) gelöst in Ethanol absolut, 2,5 mM

GSH, Kalibrierlösungen mit  $c(\text{GSH}) = 10 - 50 \mu\text{M}$  in PBS/CMF-Puffer

Trichloressigsäure (TCA)-Lösung, 15% (v/v)

Rattenlebercytosol, verdünnt 1+2 (v+v) mit PBS/CMF-Puffer

#### Durchführung

Die Quantifizierung erfolgte basierend auf dem Assay von Ellmann (Ellman, 1959) durch Absorptionsmessung (405 nm) mit einem Tecan Infinite® F200 Plattenlesegerät.

Zum Ausfällen der Proteine wurden 150  $\mu\text{l}$  des verdünnten Cytosols mit 15  $\mu\text{l}$  TCA-Lösung versetzt und anschließend zentrifugiert (5 min bei 272 g). Der Überstand wurde 1:8 (v/v) mit Tris-EDTA-Puffer verdünnt und 200  $\mu\text{l}$  dieser Lösung in eine 96-Lochplatte pipettiert. Ebenso wurden je 200  $\mu\text{l}$  der GSH-Kalibrierlösungen in die Lochplatte pipettiert. Die Absorption wurde bei  $405 \pm 10 \text{ nm}$  vor und nach der Injektion von 5  $\mu\text{l}$  DTNB-Lösung gemessen und die Differenz zwischen den beiden Werten für die Berechnungen verwendet. Es wurde eine Dreifachbestimmung sowohl der Kalibriergeraden, als auch der Probe durchgeführt.

### 6.2.2.2 Aktivitätsbestimmung der Glutathion-S-Transferase in Rattenlebercytosol

#### Reagenzien

Ethanol absolut

Kaliumphosphatpuffer, 0,1 M, pH 5,9

Chlordinitrobenzol (CDNB) gelöst in Ethanol absolut, 20 mM

GSH-Lösung in Kaliumphosphat-Puffer, 75 mM

Rattenlebercytosol, 1+94 (v+v) verdünnt mit Kaliumphosphat-Puffer (Proteinkonzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$ )

### *Durchführung*

Die GST-Aktivität wurde anhand der Bildung farbiger Konjugate aus GSH und CDNB bei einer Absorptionswellenlänge von 340 nm untersucht. Die Absorptionsmessung erfolgte in Halbmikro-Plastikküvetten am Varian-Photometer.

50 µl des verdünnten Cytosols und 20 µl GSH-Lösung wurden in 880 µl Puffer gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl CDNB-Lösung gestartet. Für den Blindwert der Reaktion wurde Ethanol statt der CDNB-Lösung zugegeben. Zudem wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der das Cytosol durch Puffer ersetzt wurde und die somit die spontane Reaktion von CDNB mit GSH abbildete. Die Produktbildung wurde bei 340 nm für 10 min (0,5 min/Zyklus) bei 37°C beobachtet. Zur Berechnung der GST-Aktivität wurde die enzym-katalysierte Reaktion um die spontane Reaktion korrigiert und der molare Extinktionskoeffizient von 9,6 l/mmol\*cm verwendet (Habig et al., 1974).

Für die Überprüfung der vollständigen Denaturierung der Proteine des Cytosols nach Erhitzen bei 90°C für 3 min, erfolgte die Aktivitätsbestimmung wie zuvor beschrieben auch mit dem denaturierten Cytosol.

Es wurde je eine Dreifachbestimmung sowohl der Spontanreaktion, als auch der Probe bzw. hitzeinaktivierten Probe durchgeführt.

## **6.2.3 Inkubationen mit Patulin**

### **6.2.3.1 Inkubationen von Patulin mit Adenin und Glutathion oder $\gamma$ -Glutamyl-L-Cystein**

#### *Reagenzien*

- Kaliumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,4
- PAT, 3,25 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)
- GSH, 3 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)
- $\gamma$ -Glu-Cys, 3 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)
- Adenin, 3 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)
- Ameisensäure, 98%-ige

#### *Durchführung*

Die Inkubationen von PAT + Adenin, PAT + Adenin + GSH sowie PAT + GSH und Adenin + GSH wurden nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt (**Tab. 12**), wobei PAT zum Start der Inkubation zuletzt zu dem Ansatz pipettiert wurde. Bei Inkubationen mit nur zwei Komponenten wurde das entsprechende Volumen der fehlenden Komponente durch Puffer ersetzt.



Die Reaktionsansätze wurden für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 10 µl Ameisensäure pro 100 µl Ansatz abgestoppt. Bis zur HPLC-MS/MS-Analyse wurden die Inkubationen bei -24°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Für die Kinetik der Adduktbildung wurden die Ansätze nach definierten Inkubationszeiten wie oben beschrieben abgestoppt und bis zur HPLC-MS/MS-Analyse im Gefrierschrank aufbewahrt.

**Tab. 12:** Pipettierschema für die Inkubation von PAT mit Adenin und/oder GSH

|        | Konzentration der Stammlösung (mM) | Volumenteile | Endkonzentration im Inkubationsansatz (mM) |
|--------|------------------------------------|--------------|--|
| Adenin | 3,0                                | 1            | 0,75                                       |
| GSH    | 3,0                                | 1            | 0,75                                       |
| PAT    | 3,25                               | 2            | 1,625                                      |

Die Inkubationen mit γ-Glu-Cys anstelle von GSH erfolgten wie oben beschrieben für 72 Stunden.

### **6.2.3.2 Inkubationen von Patulin und Adenin mit variierenden Glutathionkonzentrationen**

#### *Reagenzien*

Kaliumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,4

PAT, 8 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)

Adenin, 8 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)

GSH-Stammlösung (SL), 16 mM (SL 1), 160 mM (SL 2), in Kaliumphosphatpuffer  
Ameisensäure (*LC-MS Grade*)

#### *Durchführung*

Die Inkubationen von PAT mit Adenin und variierenden GSH-Konzentrationen wurden nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt (**Tab. 13**), wobei PAT zum Start der Inkubation zuletzt zu dem Inkubationsansatz (IA) pipettiert wurde.

Die IA wurden für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 10 µl Ameisensäure pro 100 µl Ansatz abgestoppt. Anschließend wurden die Ansätze 1+99 bzw. 1+9 mit Wasser verdünnt. Bis zur HPLC-MS/MS Analyse wurden die Inkubationen bei -24°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

**Tab. 13:** Pipettierschema für die Inkubation von PAT mit Adenin bei verschiedenen GSH-Konzentrationen.

|                       |              | IA 1<br>0,5xGSH    |                 | IA 2<br>1xGSH      |                 | IA 3<br>2xGSH      |                 | IA 4<br>4xGSH      |                 | IA 5<br>8xGSH      |                 |
|-----------------------|--------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
|                       | c SL<br>(mM) | Vol.<br>( $\mu$ l) | c in IA<br>(mM) | Vol.<br>( $\mu$ l) | c in IA<br>(mM) | Vol.<br>( $\mu$ l) | c in IA<br>(mM) | Vol.<br>( $\mu$ l) | c in IA<br>(mM) | Vol.<br>( $\mu$ l) | c in IA<br>(mM) |
| PAT                   | 8            | 50,0               | 0,8             | 25,0               | 0,8             | 25,0               | 0,8             | 25,0               | 0,8             | 25,0               | 0,8             |
| GSH SL 1              | 16           | 12,5               | 0,4             | 12,5               | 0,8             | 25,0               | 1,6             | 50,0               | 3,2             | 100,0              | 6,4             |
| Ade                   | 8            | 200,0              | 3,2             | 100,0              | 3,2             | 100,0              | 3,2             | 100,0              | 3,2             | 100,0              | 3,2             |
| Puffer                |              | 237,5              |                 | 112,5              |                 | 100,0              |                 | 75,0               |                 | 25,0               |                 |
| Gesamtvol. ( $\mu$ l) |              | 500,0              |                 | 250,0              |                 | 250,0              |                 | 250,0              |                 | 250,0              |                 |
|                       |              | IA 6<br>16xGSH     |                 | IA 7<br>32xGSH     |                 | IA 8<br>64xGSH     |                 |                    |                 |                    |                 |
|                       | c SL<br>(mM) | Vol.<br>( $\mu$ l) | c in IA<br>(mM) | Vol.<br>( $\mu$ l) | c in IA<br>(mM) | Vol.<br>( $\mu$ l) | c in IA<br>(mM) |                    |                 |                    |                 |
| PAT                   | 8            | 25,0               | 0,8             | 25,0               | 0,8             | 25,0               | 0,8             |                    |                 |                    |                 |
| GSH SL 2              | 160          | 20,0               | 12,8            | 40,0               | 25,6            | 80,0               | 51,2            |                    |                 |                    |                 |
| Ade                   | 8            | 100,0              | 3,2             | 100,0              | 3,2             | 100,0              | 3,2             |                    |                 |                    |                 |
| Puffer                |              | 105,0              |                 | 85,0               |                 | 45,0               |                 |                    |                 |                    |                 |
| Gesamtvol. ( $\mu$ l) |              | 250,0              |                 | 250,0              |                 | 250,0              |                 |                    |                 |                    |                 |

### 6.2.3.3 Inkubation von Patulin mit weiteren DNA-Basen

#### Reagenzien

- Kaliumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,4
- PAT, 3,25 mM, in Kaliumphosphatpuffer
- GSH, 3 mM, in Kaliumphosphatpuffer
- Guanin, 7,5 mM in 0,1 N NaOH-Lsg.
- Thymin, 3 mM, in Kaliumphosphatpuffer
- Cytosin, 3 mM, in Kaliumphosphatpuffer
- Ameisensäure, 98%-ige

#### Durchführung

Die Inkubationen PAT + Basen (+ GSH) wurden nach dem folgenden Pipettierschemata hergestellt (für Guanin **Tab. 14**; für Thymin/Cytosin **Tab. 15**), wobei PAT zum Start der Inkubation zuletzt zu dem Ansatz pipettiert wurde. Bei Inkubationen mit nur zwei Komponenten wurde das entsprechende Volumen der fehlenden Komponente durch Puffer ersetzt.

Die Reaktionsansätze wurden für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 10  $\mu$ l Ameisensäure pro 100  $\mu$ l Ansatz abgestoppt. Bis zur HPLC-MS/MS Analyse wurden die Inkubationen bei -24°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

**Tab. 14:** Pipettierschema für die Inkubation von PAT mit Guanin in An- und Abwesenheit von GSH.

|        | Konzentration der Stammlösung (mM) | Volumenteil            | Endkonzentration im Inkubationsansatz (mM) |
|--------|------------------------------------|------------------------|--|
| Guanin | 7,5                                | 1/10                   | 0,750                                      |
| GSH    | 3,0                                | 1                      | 0,750                                      |
| PAT    | 3,25                               | 2                      | 1,625                                      |
| Puffer | ---                                | 9/10 bzw. 1 (ohne GSH) | ---  |

**Tab. 15:** Pipettierschema für die Inkubation von PAT mit Thymin/Cytosin in An- und Abwesenheit von GSH.

|                | Konzentration der Stammlösung (mM) | Volumenteile | Endkonzentration im Inkubationsansatz (mM) |
|----------------|------------------------------------|--------------|--|
| Thymin/Cytosin | 3,0                                | 1            | 0,750                                      |
| GSH            | 3,0                                | 1            | 0,750                                      |
| PAT            | 3,25                               | 2            | 1,625                                      |

#### **6.2.3.4 Inkubation von Patulin mit 2'-Deoxynukleosiden**

##### *Reagenzien*

Kaliumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,4

PAT, 3,25 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)

GSH, 3 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)

dA/dG/dT/dC, je 3 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)

Ameisensäure, 98%-ige

##### *Durchführung*

Die Inkubationen PAT + dNuS bzw. PAT + dNuS + GSH wurden nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt (**Tab. 16**), wobei PAT zum Start der Inkubation zuletzt zu dem Ansatz pipettiert wurde. Bei Inkubationen mit nur zwei Komponenten wurde das entsprechende Volumen der fehlenden Komponente durch Puffer ersetzt.

Die Reaktionsansätze wurden für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 10 µl Ameisensäure pro 100 µl Ansatz abgestoppt. Bis zur HPLC-MS/MS Analyse wurden die Inkubationen bei -24°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

**Tab. 16:** Pipettierschema für die Inkubation von PAT mit dNuS in An- und Abwesenheit von GSH.

|      | Konzentration der Stammlösung (mM) | Volumenteile | Endkonzentration im Inkubationsansatz (mM) |
|------|------------------------------------|--------------|--|
| dNuS | 3,00                               | 1            | 0,750                                      |
| GSH  | 3,00                               | 1            | 0,750                                      |
| PAT  | 3,25                               | 2            | 1,625                                      |

### 6.2.3.5 Inkubation von Patulin mit allen DNA-Basen in Anwesenheit von Glutathion

#### Reagenzien

Kaliumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,4

PAT, 4,875 mM, in Kaliumphosphatpuffer

GSH, 11,25 mM, in Kaliumphosphatpuffer

Adenin, Thymin, Cytosin, je 4,5 mM, in Kaliumphosphatpuffer

Guanin, 7,5 mM in 0,1 N NaOH-Lsg.

Ameisensäure, 98%-ige

#### Durchführung

Die Inkubationen PAT + GSH + alle Basen wurden nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt (Tab. 17), wobei PAT zum Start der Inkubation zuletzt zu dem Ansatz pipettiert wurde.

**Tab. 17:** Pipettierschema für die Inkubation von PAT mit allen DNA-Basen in Anwesenheit von GSH.

|         | Konzentration der Stammlösung (mM) | eingesetztes Volumen (µl) | Endkonzentration im Inkubationsansatz (mM) |
|---------|------------------------------------|---------------------------|--|
| GSH     | 11,25                              | 20                        | 0,750                                      |
| PAT     | 4,875                              | 100                       | 1,625                                      |
| Adenin  | 4,5                                | 50                        | 0,750                                      |
| Guanin  | 7,5                                | 30                        | 0,750                                      |
| Thymin  | 4,5                                | 50                        | 0,750                                      |
| Cytosin | 4,5                                | 50                        | 0,750                                      |

Die Reaktionsansätze wurden für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 10 µl Ameisensäure pro 100 µl Ansatz abgestoppt. Bis zur HPLC-MS/MS Analyse wurden die Inkubationen bei -24°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

### **6.2.3.6 Inkubation von Patulin mit Adenin in Gegenwart von Rattenlebercytosol**

#### *Reagenzien*

Kaliumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,4  
MIC I-Puffer, pH 7,4  
PAT, 2,5 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)  
Adenin, 5 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)  
Rattenlebercytosol, gelöst in MIC I-Puffer (pH 7,4)  
GSH-Lösung, 946 µM, in MIC I-Puffer (pH 7,4)  
Ameisensäure, 98%-ige  
Acetonitril (*LC-MS Grade*)

#### *Durchführung*

Je 15 µl PAT (250 µM Endkonzentration) und 30 µl Adenin (1 mM Endkonzentration) wurden mit 79 µl Cytosol bzw. 79 µl hitze-denaturiertem Cytosol (Wasserbad 90°C, 3 min) und 26 µl Kaliumphosphatpuffer gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach bestimmten Zeiten (5 min bis 4 h) wurden die Inkubationen durch die Zugabe von 15 µl Ameisensäure gestoppt. Für den 0 min-Wert wurden 15 µl PAT mit 56 µl Kaliumphosphatpuffer und 79 µl MIC I-Puffer gemischt. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 450 µl Acetonitril ausgefällt. 584 µl des nach Zentrifugation (5 min bei 10.000 g) erhaltenen Überstands wurde abgenommen, das organische Lösemittel abevaporiert (1 h bei 60 mbar) und das Volumen der übrigen Lösung mit Wasser auf 200 µl eingestellt. Bis zur HPLC-MS/MS Analyse wurden die Lösungen bei -24°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Als Blindwert wurde PAT und Adenin mit einer GSH-Lösung (498 µM Endkonzentration) unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

## **6.2.4 Isolierung von Addukten mit Patulin**

### **6.2.4.1 Inkubationen zur Generierung von (Glutathion-)Patulin-Adenin-Addukten**

#### *Reagenzien*

Kaliumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,4  
PAT, 10 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)  
GSH, 20 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)  
Adenin, 7 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)  
Essigsäureethylester  
Ameisensäure, 98%-ige

#### *Durchführung*

Ein Inkubationsansatz von PAT und Adenin mit bzw. ohne GSH wurde nach dem folgenden

Pipettierschema hergestellt (**Tab. 18**), wobei PAT zum Start der Inkubation zuletzt zu dem Ansatz pipettiert wurde. Bei Inkubationen ohne GSH wurde das entsprechende Volumen durch Puffer ersetzt.

**Tab. 18:** Pipettierschema für die Inkubation von PAT mit Adenin in An- und Abwesenheit von GSH zur Isolierung von (GSH-)PAT-Adenin-Addukten.

|        | Konzentration der<br>Stocklösung (mM) | Eingesetztes<br>Volumen (µl) | Endkonzentration im<br>Inkubationsansatz (mM) |
|--------|---------------------------------------|------------------------------|---|
| Adenin | 7                                     | 786                          | 4,4   |
| GSH    | 20                                    | 125                          | 2,0   |
| PAT    | 10                                    | 250                          | 2,0   |
| Puffer |                                       | 89                           |   |
|        |                                       | Σ 1250                       |   |

Beide Reaktionsansätze werden für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Ansatz PAT + Adenin wird durch Zugabe von 125 µl Ameisensäure abgestoppt und anschließend zu je 100 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -24°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Der Ansatz PAT + Adenin + GSH wird durch Zugabe von 500 µl Essigsäureethylester gestoppt, nach dem Mischen der Lösung wird, um Phasentrennung zu erreichen, für drei Minuten zentrifugiert (7,5 x 1000 U/min) und die obere organische Phase, welche das nicht-umgesetzte PAT enthält, abgenommen und verworfen. Die untere wässrige Phase wird zwei weitere Male mit je 500 µl Essigsäureethylester extrahiert. Die wässrige Phase wird zu je 100 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -24°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

#### **6.2.4.2 Inkubationen zur Generierung von Glutathion-Patulin-Addukten**

##### *Reagenzien*

- Kaliumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,4
- PAT, 6,5 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)
- GSH, 6 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)
- Ameisensäure, 98%-ige

##### *Durchführung*

Ein Inkubationsansatz von PAT und GSH wurde nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt (**Tab. 19**), wobei PAT zum Start der Inkubation zuletzt zu dem Ansatz pipettiert wurde.

**Tab. 19:** Pipettierschema für die Inkubation von PAT mit GSH zur Isolierung von GSH-PAT-Addukten.

|        | Konzentration der<br>Stocklösung (mM) | Eingesetztes<br>Volumen (µl) | Endkonzentration im<br>Inkubationsansatz (mM) |
|--------|---------------------------------------|------------------------------|---|
| GSH    | 20                                    | 375                          | 5,0   |
| PAT    | 10                                    | 750                          | 5,0   |
| Puffer |                                       | 375                          |   |
|        |                                       | Σ 1500                       |   |

Der Reaktionsansatz wurde für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 150 µl Ameisensäure abgestoppt und anschließend zu je 100 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -24°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

#### 6.2.4.3 Isolierung der generierten Addukte

##### Reagenzien

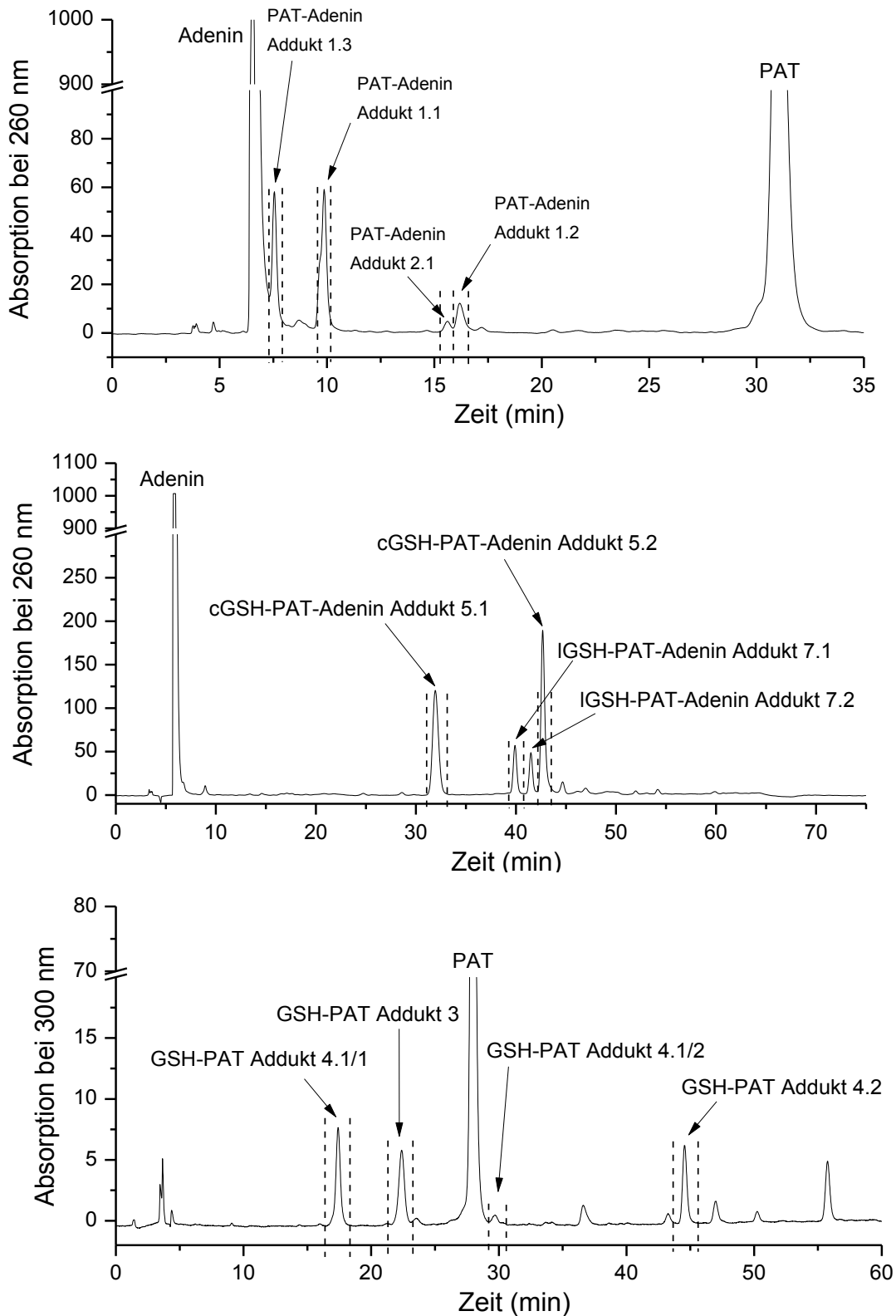
72-stündige Inkubationsmischung von PAT mit Adenin und/oder GSH (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.2)

##### Durchführung

Die Isolierung erfolgte nach Auftrennung der in 100 µl Ansatz bzw. wässriger Phase enthaltener Reaktionsprodukte mittels semipräparativer HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.2 Methode 1 zur Isolierung der GSH-PAT-Adenin-Addukte, Methode 2 zur Isolierung der PAT-Adenin-Addukte, Method 3 zur Isolierung der GSH-PAT-Addukte) durch das Auffangen des entsprechenden Peaks (**Abb. 79**) am Detektorausgang. Die Fraktion wurde bei -24°C tiefgefroren und über Nacht gefriergetrocknet (Druck 0,2 mbar, Stellflächentemperatur 25°C, Eiskondensatortemperatur -55°C). Um zwei oder mehr Fraktionen in einem Gläschen zu sammeln wurden zwei Fraktionen des entsprechenden Adduktes in einem Gläschen aufgefangen und gefriergetrocknet bzw. weitere Male in ein Gläschen mit trockenen Fraktionen isoliert.

Für die Herstellung von zwei (a und b) bzw. vier (a-d) gleichen Aliquots des isolierten Addukts, wurden eine oder mehrere zusammengemischte Fraktionen in vier neue Gläschen aliquotiert und diese erneut gefriergetrocknet. Die Probenaliquote a bzw. a-c wurden dann für Versuche weiter behandelt, während das Kontrollaliquot b bzw. d im Gefrierschrank verblieb.

Die trockenen Fraktionen der Addukte verblieben bis zu deren Verwendung bei -24°C im Gefrierschrank.



**Abb. 79:** Oben: HPLC-UV-Chromatogramm der im Ansatz enthaltenen Reaktionsprodukte nach Inkubation von PAT und Adenin zur Isolierung der PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2, 1.3 und 2.1. Mitte: HPLC-UV-Chromatogramm der in der wässrigen Phase enthaltenen Reaktionsprodukte nach Inkubation von PAT mit GSH und Adenin zur Isolierung des cyclischen GSH-PAT-Adenin-Adduktes 5.1. Unten: HPLC-UV-Chromatogramm der im Ansatz enthaltenen Reaktionsprodukte nach Inkubation von PAT mit GSH zur Isolierung der GSH-PAT-Addukte 3 und 4.1/1, 4.1/2 und 4.2. Die gestrichelten Linien kennzeichnen jeweils den Bereich der am Detektorausgang aufgefangen wird.



## 6.2.5 Methylierung isolierter Addukte mit Diazomethan

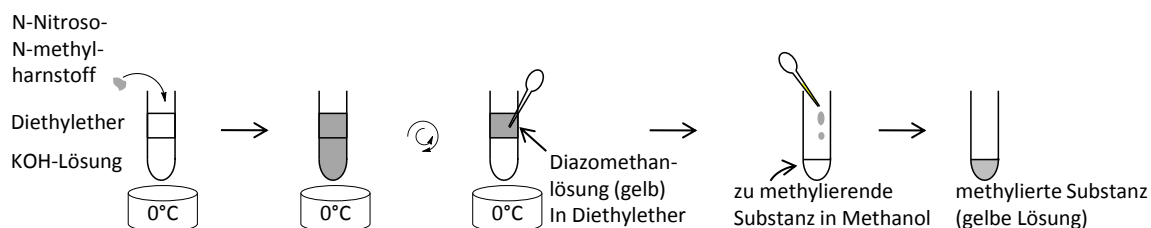
### Reagenzien

(GSH-)PAT(-Adenin)-Adduktfraktionen (Kapitel 6.2.4)  
 72-stündige Inkubationsmischung von PAT + Adenin (Kapitel 6.2.3.1)  
 MeOH (LC-MS Grade)  
 Kaliumhydroxid-Plätzchen (KOH)  
 Diethylether  
 N-Nitroso-N-methylharnstoff  
 Essigsäure konz.

### Durchführung

Die gefriergetrockneten (GSH-)PAT(-Adenin)-Adduktfraktionen wurden in 500 µl MeOH aufgenommen. Ein gefriergetrockneter Ansatz von PAT (1,6 mM) mit Adenin (0,8 mM, Gesamtvolumen des Ansatzes 200 µl) wurde in 1 ml MeOH aufgenommen.

Ca. 0,8 g festes KOH wurden in 2 ml dest. Wasser gelöst, im Eisbad auf 0°C gekühlt und mit 5 ml Diethylether überschichtet (**Abb. 80**). Es wurden 2 kleine Spatel an N-Nitroso-N-methylharnstoff zugegeben und so lange geschüttelt bis die Wasserphase farblos und keine gelöste Substanz mehr vorhanden ist. Das entstandene Diazomethan in der Diethyletherphase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und zu den in MeOH gelösten zu methylierenden Substanzen gegeben bis diese Lösung deutlich gelb blieb (**Abb. 80**). Überschüssiges Diazomethan wurde durch Zugabe einiger Tropfen konz. Essigsäure entört. Nach Verdampfen des Diethylethers wurde die verbleibende Lösung in ein HPLC-Vial überführt, ggf. verdünnt und mittels HPLC-MS/MS analysiert.



**Abb. 80:** Schematische Durchführung der Methylierung mit einer etherischen Diazomethan-Lösung. Grau eingefärbte Teile sind während der Durchführung als gelb gefärbt.

## 6.2.6 Thermolyse der Reaktionsmischung von Patulin mit 2'-Deoxyadenosin und Glutathion

### Reagenzien

72-stündige Inkubationsmischung von PAT + dA + GSH (Kapitel 1726.2.3.4)

Essigsäureethylester

HCl konz. (37%-ig)

HCl-Mischung: 120 µl HCl konz + 80 µl H<sub>2</sub>O

#### *Durchführung*

Eine nicht sauer abgestoppte Reaktionsmischung (0,75 ml) der 72-stündigen Inkubation von PAT mit dA und GSH (Kapitel 6.2.3.4) wurde mit 300 µl Essigsäureethylester inkubiert um überschüssiges PAT zu extrahieren und somit die Reaktion zu stoppen. Die wässrige Reaktionsmischung wurde auf vier gleiche Aliquote (150 µl) aufgeteilt, wie folgt behandelt und anschließend 1+9 (v+v) verdünnt:

- 1) Ohne Thermolyse: Zugabe von 25 µl H<sub>2</sub>O // 100 µl + 900 µl H<sub>2</sub>O
- 2) Neutrale Thermolyse: Zugabe von 25 µl H<sub>2</sub>O und Erhitzen auf 100°C im Wasserbad für 10 min. Unter fließendem Wasser abkühlen. // 100 µl + 900 µl H<sub>2</sub>O
- 3) Saure Thermolyse: Zugabe von 25 µl HCl-Lösung und Erhitzen auf 70°C im Wasserbad für 30 min. Unter fließendem Wasser abkühlen. // 100 µl + 900 µl H<sub>2</sub>O
- 4) Neutrale und saure Thermolyse: Erhitzen auf 100°C im Wasserbad für 10 min. Unter fließendem Wasser abkühlen. Zugabe von 25 µl HCl-Lösung und Erhitzen auf 70°C im Wasserbad für 30 min. Unter fließendem Wasser abkühlen. // 100 µl + 900 µl H<sub>2</sub>O

Die verdünnten Lösungen wurden in ein HPLC-Vial pipettiert und sofort bei -24°C weggefroren und bis zur HPLC-MS/MS-Analyse aufbewahrt.

## **6.2.7 DNA-Isolation und -Quantifizierung**

### **6.2.7.1 Chloroform-Isopropanol-Extraktion**

#### *Reagenzien*

Chloroform

NaCl, 6 M

2-Propanol

Proteinase K, Aktivität: 44,4 mAnsonU/mg

SE-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS (w/v)), pH 8

Tris-HCl Puffer, 10 mM, pH 8

EtOH, 70%-ig (v/v)

#### *Durchführung*

Die DNA wurde aus kultivierten Mauslymphomzellen oder V79-Zellen isoliert. Hierzu wurden die eingefrorenen Zellpellets (-80°C) mit SE-Puffer versetzt (5 ml/10 Mio. Zellen), der

200 µg/ml Proteinase K enthielt. Die Proben wurden im Wasserbad über Nacht bei 55°C verdaut. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 6 M NaCl (2 ml/10 Mio. Zellen). Anschließend wurde Chloroform hinzugefügt (7 ml/10 Mio. Zellen) und 30 s lang kräftig geschüttelt, um die DNA zu extrahieren. Bei 4°C und 1.800 g wurde 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit einer Pasteurpipette entnommen und in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zugabe von 2-Propanol (7 ml/10 Mio. Zellen) wurde vorsichtig geschwenkt.

Die Lösung mit der ausgefallenen DNA wurde für 5 min bei 4°C und 1.800 g zentrifugiert, das DNA-Pellet vorsichtig mit einer Plastikpasteurpipette aufgesaugt und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min bei 4°C, 1.800 g) wurde der Überstand mit einer Spritze mit Kanüle abgesaugt. Das DNA-Pellet wurde in 1 ml 70%-igem Ethanol resuspendiert und für eine halbe Stunde in den Kühlschrank gestellt. Anschließend wurde nochmals zentrifugiert (5 min bei 4°C, 1.800 g) und der Überstand mit Spritze und Kanüle abgesaugt. Das verbleibende DNA-Pellet wurde über Nacht an der Luft oder in einem N<sub>2</sub>-Strom getrocknet. Danach wurden die trockenen DNA-Pellets in Puffer aufgenommen und zum Lösen am Rotator-Mixer geschüttelt.

Wenn die DNA nach Zugabe von 2-Propanol nicht ausfällt, wurde die Probe in den Kühlschrank gestellt, bis die DNA ausfällt. Die weiteren Schritte erfolgten dann wie oben beschrieben.

### 6.2.7.2 DNA-Quantifizierung

#### Reagenzien

Tris-HCl Puffer, 10 mM, pH 8

Isolierte, genomische DNA aus Mauslymphomzellen oder V79-Zellen (DNA-Isolation s. Kapitel 6.2.7.1)

#### Durchführung

Die gelöste DNA wurde am Tecan Infinite® F200 Plattenlesegerät mit einer NanoQuant™ Platte photometrisch quantifiziert. Mit 2 µl Tris-HCl Puffer wurde zunächst ein Blindwert bestimmt. Anschließend wurden 2 µl der in Puffer gelösten, ggf. verdünnten DNA auf die Platte gegeben und die Absorptionen bei 260, 280 und 340 nm gemessen.

Der Gehalt an DNA wurde von der Software des Plattenlesegerätes automatisch nach der folgenden Formel berechnet:

$$A_{\text{Blindwert}} = A_{260 \text{ nm}} - A_{340 \text{ nm}}$$

$$A_{\text{Probe } 260 \text{ nm}} = (A_{260 \text{ nm}} - A_{340 \text{ nm}}) - A_{\text{Blindwert}}$$

$$c_{dsDNA\ 260\ nm} = A \times 1000(\text{ng}/\mu\text{l})$$

*A*: Absorption; *c*: Konzentration (ng/μl)

Das Verhältnis der Nucleinsäure-Absorption zur Protein-Absorption gibt Auskunft über die Reinheit einer DNA-Lösung. Die *Ratio* wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Ratio} = \frac{A_{\text{Probe } 260\ \text{nm}}}{A_{\text{Probe } 280\ \text{nm}}}$$

Die DNA-Lösung wurde nur weiterverwendet, wenn die *Ratio* innerhalb der für reine dsDNA angegebenen *Ratio* von 1,8 bis 2,0 lag. Bei einer Proteinkontamination ist die *Ratio* geringer, bei einer Kontamination mit RNA oder organischen Lösemitteln höher.

## 6.2.8 DNA-Hydrolysen

### 6.2.8.1 Kalibriergeraden für die thermischen Hydrolysen mit Säuren bei milden Temperaturen

#### Reagenzien

Guanin-Stammlösung, 397 μM, in 0,1 M NaOH

Adenin-Stammlösung, 444 μM, in dest. Wasser

Theobromin, 1,665 mM in dest. Wasser

#### Durchführung

Für Guanin und Adenin wurden drei unabhängige Stammlösungen jeweils zu 9 äquidistanten Kalibrierlösungen im Bereich von 12 ng - 60 ng pro 10 μl Injektionsvolumen verdünnt. Jeder Verdünnungsschritt umfasste zudem die Zugabe des Internen Standards Theobromin (Endkonzentration 33,3 μM). Die Lösungen wurden mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 2) vermessen.

Der Kalibrierbereich wurde auf Varianzenhomogenität überprüft (F-Test,  $p < 0,05$ ). Die drei unabhängigen Kalibriergeraden für Guanin und Adenin wurden mit Hilfe von Origin® 8.6 gemittelt. Ein Linearitätstest wurde mit Valoo® durchgeführt (Linearitätstest nach Mandel,  $p < 0,05$ ).

### 6.2.8.2 Thermische Hydrolyse mit Trifluoressigsäure bei milden Temperaturen

#### Reagenzien

DNA aus Mauslymphomzellen in Tris-HCl Puffer (10 mM, pH 8)

EtOH absolut

Trifluoressigsäure (TFA), 98%-ig

Theobromin, 1,665 mM, in dest. Wasser

*Durchführung*

Am Tag vor der Durchführung der Hydrolyse wurde die Konzentration der verwendeten DNA-Lösung zunächst gemäß Kapitel 6.2.7.2 bestimmt und das entsprechende Volumen für 270 µg DNA aus der DNA-Lösung entnommen. Durch Zugabe von 1 ml Ethanol absolut wurde die DNA erst ausgefällt, anschließend für 5 min bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand mit einer Kanüle abgesaugt. Die Pellets wurden über Nacht an der Luft getrocknet. Zu den trockenen Pellets wurden am nächsten Tag je 200 µl 98%ige TFA gegeben und die Ansätze im Wasserbad bei den in **Tab. 20** aufgeführten Temperaturen und Inkubationszeiten hydrolysiert. Für jede Hydrolyse wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

**Tab. 20:** Temperaturen und Inkubationszeiten der DNA-Hydrolyse mit 98%-iger TFA. Das Symbol X kennzeichnet die jeweils kombinierte Hydrolysezeit und -temperatur.

|      | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min | 90 min |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 60°C | X      |        | X      |        |        |
| 70°C | X      | X      | X      | X      | X      |
| 80°C | X      |        | X      |        |        |

Im Anschluss an die Hydrolysen und nach kurzem Abkühlen der Lösungen auf Raumtemperatur, erfolgte die Zugabe von 200 µl dest. Wasser und 100 µl Internem Standard Theobromin (Endkonzentration 33,3 µM). Die Lösungen wurden anschließend zur Abtrennung von größeren DNA-Fragmenten durch Molekularfilter (3 kDa) zentrifugiert (90 min bei 14.000 g). Das Filtrat wurde mit dest. Wasser 1:10-verdünnt und mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 2) vermessen. Die Menge an Spaltprodukt wurde durch Einsetzen in die entsprechende Geradengleichung der Kalibriergeraden unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Ansatzvolumens bestimmt und in µg angegeben.

**6.2.8.3 Thermische Hydrolyse mit Salzsäure bei milden Temperaturen**

*Reagenzien*

- DNA aus Mauslymphomzellen in TRIS-HCl Puffer (10 mM, pH 8)
- EtOH absolut
- HCl, 0,1 M, 0,2 M und 1 M
- Theobromin, 1,665 mM in dest. Wasser

*Durchführung*

Die Vorbereitung der DNA-Pellets am Tag vor der Durchführung der Hydrolyse erfolgte wie unter Kapitel 6.2.8.2 beschrieben.

Nach Zugabe von 200 µl Salzsäure zu den trockenen Pellets erfolgte die Hydrolyse im Wasserbad. **Tab. 21** zeigt die verwendeten Hydrolysebedingungen für Molarität der Salzsäurelösung, Temperatur und Inkubationsdauer und deren Kombination. Für jede Hydrolyse wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Im Anschluss an die Hydrolysen und nach kurzem Abkühlen der Lösungen auf Raumtemperatur, erfolgte die Zugabe von 200 µl dest. Wasser und 100 µl Internem Standard Theobromin (Endkonzentration 33,3 µM). Die Lösungen wurden anschließend zur Abtrennung von größeren DNA-Fragmenten durch Molekularfilter (3 kDa) zentrifugiert (60 min bei 14.000 g). Das Filtrat wurde mit dest. Wasser 1:10-verdünnt und mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 2) vermessen. Die Menge an Spaltprodukt wurde durch Einsetzen in die entsprechende Geradengleichung der Kalibriergeraden unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Ansatzvolumens bestimmt und in µg angegeben.

**Tab. 21:** Temperaturen und Inkubationszeiten der DNA-Hydrolyse mit HCl. Die Angaben 0,1 M, 0,2 M und 1 M beziehen sich auf die bei der entsprechenden Kombination von Hydrolysezeit und -temperatur verwendete Molarität der Salzsäure.

|      | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min        | 90 min |
|------|--------|--------|--------|---------------|--------|
| 60°C | ---    | ---    | ---    | ---           | ---    |
| 70°C | 1 M    | 1 M    | ---    | 0,1; 0,2; 1 M | 1 M    |
| 80°C | 1 M    | 1 M    | ---    | 1 M           | 1 M    |

**6.2.8.4 Thermische Hydrolyse mit Ameisensäure bei milden Temperaturen**

*Reagenzien*

DNA aus Mauslymphomzellen in TRIS-HCl Puffer (10 mM, pH 8)

EtOH absolut

Ameisensäure, 88%-ige

Theobromin, 1,665 mM, in dest. Wasser

*Durchführung*

Die Vorbereitung der DNA-Pellets am Tag vor der Durchführung der Hydrolyse erfolgte wie unter Kapitel 6.2.8.2 beschrieben.

Zu den trockenen Pellets wurden 200 µl 88%-ige FA gegeben und die Ansätze im Wasserbad bei den in **Tab. 22** aufgeführten Temperaturen und Inkubationszeiten hydrolysiert. Für jede Hydrolyse wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

**Tab. 22:** Temperaturen und Inkubationszeiten der DNA-Hydrolyse mit 88%-iger Ameisensäure. Das Symbol X kennzeichnet die jeweils kombinierte Hydrolysezeit und -temperatur.

|      | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min | 90 min |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 60°C |        |        |        |        |        |
| 70°C | X      | X      | X      |        |        |
| 80°C | X      | X      | X      |        |        |

Im Anschluss an die Hydrolysen und nach kurzem Abkühlen der Lösungen auf Raumtemperatur, erfolgte die Zugabe von 200 µl dest. Wasser und 100 µl Internem Standard Theobromin (Endkonzentration 33,3 µM). Die Lösungen wurden anschließend zur Abtrennung von größeren DNA-Fragmenten durch Molekularfilter (3 kDa) zentrifugiert (60 min bei 14.000 g). Das Filtrat wurde mit dest. Wasser 1:10-verdünnt und mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 2) vermessen. Die Menge an Spaltprodukt wurde durch Einsetzen in die entsprechende Geradengleichung der Kalibriergeraden unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Ansatzvolumens bestimmt und in µg angegeben.

## 6.2.9 Stabilitätsuntersuchungen

### 6.2.9.1 Untersuchung in wässrigen Medien

#### Reagenzien

(GSH-)PAT-Adenin-Adduktfraktionen (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3)

Kaliumphosphat (KP)-Puffer, 0,1 M, pH 7,4

Tris-HCl Puffer, 10 mM, pH 8

NaOAc-Puffer, pH 5

Coffeinlösung, 10 mg/l in dest. Wasser

Adenosinlösung, 7,5 µM in dest. Wasser

#### Durchführung

Von den nach der Isolierung (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3) in einem Reagenzglas vorliegenden gefriergetrockneten vier Aliquots der (GSH-)PAT-Adenin-Adduktfraktionen wurden drei Aliquote (a-c) für die Dreifachbestimmung der Wiederfindung herangezogen. Das vierte Aliquot (d) wurde als Kontrolle im Gefrierfach zurückgehalten.

Nach Zugabe der wässrigen Lösungen zu den Aliquots (a-c) wurden diese unter den in **Tab. 23** (für GSH-PAT-Adenin-Addukte) und **Tab. 24** (für PAT-Adenin-Addukte) angegebenen Bedingungen bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad inkubiert.

**Tab. 23:** Bedingungen der Inkubationen von isolierten GSH-PAT-Adenin-Adduktfraktionen in wässrigen Medien zur Untersuchung der Wiederfindung der Addukte. KP-puffer, Kaliumphosphatpuffer; Rt, Raumtemperatur.

| Medium                | pH-Wert | zugegebenes Volumen | Zeit    | Temperatur |
|-----------------------|---------|---------------------|---------|------------|
| 0,1 M KP-puffer       | 7,4     | 300 µl              | 10 min  | 100°C      |
| 10 mM Tris-HCl-Puffer | 8,0     | 200 µl              | 16 h    | 37°C       |
| NaOAc-Puffer          | 5,0     | 500 µl              | 115 min | 37°C       |

**Tab. 24:** Bedingungen der Inkubationen von isolierten PAT-Adenin-Adduktfraktionen in wässrigen Medien zur Untersuchung der Wiederfindung der Addukte. KP-puffer, Kaliumphosphatpuffer.

| Medium                | pH-Wert | zugegebenes Volumen | Zeit    | Temperatur |
|-----------------------|---------|---------------------|---------|------------|
| 0,1 M KP-puffer       | 7,4     | 300 µl              | 10 min  | 100°C      |
| 10 mM Tris-HCl-Puffer | 8,0     | 300 µl              | 16 h    | 37°C       |
| NaOAc-Puffer          | 5,0     | 300 µl              | 115 min | 37°C       |

Im Anschluss an die Inkubationen und nach kurzem Abkühlen der Lösungen auf Raumtemperatur wurden die Gläschen zentrifugiert (3 min bei 3500 rpm). Die Aliquote a-c wurden bei -24°C tiefgefroren und über Nacht gefriergetrocknet (Druck 0,2 mbar, Stellflächentemperatur 25°C, Eiskondensatortemperatur -55°C).

Die trockenen Fraktionen a-c der PAT-Adenin-Addukte, sowie die dazugehörige Kontrolle d wurden in 300 µl der Adenosinlösung gelöst.

Die trockenen Fraktionen a-c der GSH-PAT-Adenin-Addukte wurden anschließend in 200 µl Coffeinlösung aufgenommen (Inkubationen in NaOAc-Puffer) bzw. direkt nach der Inkubation mit Coffeinlösung 1+9 (Inkubationen in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer und Tris-HCl-Puffer) bzw. 1+1 (Inkubation in 1 M HCl in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer neutralisiert mit 1 M NaOH) verdünnt. Die im Gefrierfach zurückgehaltene Kontrolle d wird in 200 µl Coffeinlösung gelöst bzw. in dem entsprechenden Puffer gelöst und ebenso mit Coffeinlösung 1+9 bzw. 1+1 verdünnt. Das Lösen erfolgt hier jeweils 10 Minuten vor Beginn der HPLC-Messung.

Die Analyse der Proben erfolgt mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 1 für PAT-Adenin-Addukte bzw. Methode 4 für GSH-PAT-Adenin-Addukte). Die Wiederfindung wird ermittelt indem die Flächenverhältnisse Addukt/IS der behandelten Aliquote a-c auf das Flächenverhältnis der jeweiligen Kontrolle d bezogen werden.



### **6.2.9.2 Untersuchung in organischen Medien**

#### *Reagenzien*

GSH-PAT-Adenin-Adduktfraktionen (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3)

DMSO

Methanol

NaOAc-Puffer, pH 5

Coffeinlösung, 10 mg/l, in dest. Wasser

#### *Durchführung*

Von den nach der Isolierung (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3) in einem Reagenzglas vorliegenden gefriergetrockneten vier Aliquots der GSH-PAT-Adenin-Adduktfraktionen wurden drei Aliquote (a-c) für die Dreifachbestimmung der Wiederfindung herangezogen. Das vierte Aliquot (d) wurde als Kontrolle im Gefrierfach zurückgehalten.

Zu den Aliquots (a-c) wurden zeitversetzt je 200 µl DMSO bzw. MeOH gegeben und für 3 h inkubiert. Danach wurden unverzüglich 50 µl entnommen, mit 450 µl Coffeinlösung gemischt und sofort mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 4) analysiert. Die Kontrollprobe d wurde mit 200 µl einer Mischung von 9 Teilen Coffeinlösung und 1 Teil DMSO bzw. MeOH gelöst, davon 50 µl mit 450 µl der Mischung verdünnt und sofort analysiert. Die Wiederfindung wurde ermittelt indem die Flächenverhältnisse Addukt/IS der behandelten Aliquote a-c auf das Flächenverhältnis der jeweiligen Kontrolle d bezogen wurden.

### **6.2.9.3 Einfluss der DNA-Hydrolysen**

#### *Reagenzien*

(GSH-)PAT-Adenin-Adduktfraktionen (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3)

Trifluoressigsäure (TFA), 98-%ig

Salzsäure, 1 M

Ameisensäure, 88%-ig

Coffeinlösung, 10 mg/l in dest. Wasser

Adenosinlösung, 7,5 µM in dest. Wasser

#### *Durchführung*

Von den nach der Isolierung (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3) in einem Reagenzglas vorliegenden gefriergetrockneten vier Aliquots der (GSH-)PAT-Adenin-Adduktfraktionen wurden drei Aliquote (a-c) für die Dreifachbestimmung der Stabilität des herangezogen. Das vierte Aliquot (d) wurde als Kontrolle im Gefrierfach zurückgehalten.

Zu den Aliquots (a-c) wurden je 200 µl der entsprechenden Säure gegeben und mit den in **Tab. 25** (für GSH-PAT-Adenin-Addukte) und **Tab. 26** (für PAT-Adenin-Addukte) angegebenen

Säuren und unter den angegebenen Bedingungen im Wasserbad bzw. im Heizblock inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubationen und nach kurzem Abkühlen der Lösungen auf Raumtemperatur wurden die Gläschen zentrifugiert (3 min bei 3500 rpm). Nach Zugabe von jeweils 2 ml (bzw. 1 ml bei Verwendung von Glas-Vials) dest. Wasser wurden die Aliquote a-c bei -24°C tiefgefroren und über Nacht gefriergetrocknet (Druck 0,2 mbar, Stellflächentemperatur 25°C, Eiskondensatortemperatur -55°C). Die gefriergetrockneten Aliquote a-c und die im Gefrierfach zurückgehaltene Kontrolle d wurden in 300 µl Coffeinelösung (für GSH-PAT-Adenin-Addukte, Lösen erfolgt jeweils 10 Minuten vor Beginn der HPLC-Messung) bzw. in 300 µl Adenosinlösung (für PAT-Adenin-Addukte) gelöst und mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 1 für PAT-Adenin-Addukte bzw. Methode 4 für GSH-PAT-Adenin-Addukte) vermessen. Die Wiederfindung wurde ermittelt indem die Flächenverhältnisse Addukt/IS der behandelten Aliquote a-c auf das Flächenverhältnis der jeweiligen Kontrolle d bezogen wurden.

**Tab. 25:** Zeiten und Temperaturen der Inkubationen von isolierten GSH-PAT-Adenin-Adduktfraktionen mit Säuren zur Untersuchung der Wiederfindung der Addukte. Die Angaben TFA, HCl und FA beziehen sich auf die bei der entsprechenden Kombination von Inkubationszeit und -temperatur verwendete Säure.

|       | 15 min   | 30 min   | 45 min   | 60 min | 90 min    |
|-------|----------|----------|----------|--------|-----------|
| 60°C  | TFA      |          |          |        |           |
| 70°C  | TFA / FA | HCl / FA | TFA / FA | HCl    | TFA / HCl |
| 80°C  | TFA      | HCl      |          |        | HCl       |
| 140°C | FA*      |          |          |        |           |

\* Durchführung der Hydrolyse in Borosilikat-Vials mit Aluminium-Bördeldeckel (Sil/PTFE-Septum) im Heizblock.

**Tab. 26:** Zeiten und Temperaturen der Inkubationen von isolierten PAT-Adenin-Adduktfraktionen mit Säuren zur Untersuchung der Wiederfindung der Addukte. Die Angaben TFA, HCl und FA beziehen sich auf die bei der entsprechenden Kombination von Inkubationszeit und -temperatur verwendete Säure.

|       | 15 min | 30 min | 45 min |
|-------|--------|--------|--------|
| 70°C  | FA     | HCl    | TFA    |
| 140°C | FA*    |        |        |

\* Durchführung der Hydrolyse in Borosilikat-Vials mit Aluminium-Bördeldeckel (Sil/PTFE-Septum) im Heizblock.

## 6.2.10 Festphasenextraktionen

### 6.2.10.1 Festphasenextraktion mit einer SAX-Phase

#### Reagenzien

(GSH-)PAT-Adenin-Adduktfraktionen (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3)

Mischung von DNA-Basen (Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin), je 10 µM

Methanol (*LC-MS Grade*)

Ammoniumacetat-Lösung, 25 mM

Wasser (*LC-MS Grade*)

Wasser mit 5% Ameisensäure (beides *LC-MS Grade*)

Wasser mit 0,1% Ameisensäure (beides *LC-MS Grade*)

Theobrominlösung, 20 µM, in dest. Wasser

#### Durchführung

Die Strata SAX-SPE-Säule wurde zunächst mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert, um die Säule für die Probenaufgaben vorzubereiten.

Das Aliquot a der Adduktfraktionen gelöst in je 1 ml Wasser bzw. 1 ml der DNA-Basemischung wurden auf die SPE-Säule gegeben. Es wurde zunächst mit 1 ml Ammoniumacetat-Lösung (25 mM) und anschließend mit 1 ml Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 ml Wasser mit 5% FA. Die Fraktionen nach der Probenaufgabe und den beiden Waschsritten sowie der Elution wurden jeweils in einem Glasröhrchen aufgefangen, eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet (Druck 0,2 mbar, Stellflächentemperatur 25°C, Eiskondensatortemperatur -55°C).

Die trockenen SPE-Fraktionen der Addukte sowie die Kontrollfraktion b wurden in je 500 µl Wasser mit 0,1% FA aufgenommen und anschließend 1+99 (für GSH-PAT-Adenin-Addukte) bzw. 1+9 (PAT-Adenin-Addukte) verdünnt. Jeweils 5 µl dieser Lösungen wurden anschließend mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus vermessen.

Die trockenen SPE-Fraktionen der DNA-Basemischung sowie deren gefriergetrockneten Kontrolle b (ebenso aus 1 ml der DNA-Basemischung) wurden in je 100 µl Theobrominlösung gelöst und mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 3) analysiert.

### 6.2.10.2 Festphasenextraktion mit einer X-A-Phase

#### Reagenzien

PAT-Adenin-Adduktfraktionen (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3)

Mischung von DNA-Basen (Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin), je 20 µM

Methanol (*LC-MS Grade*)

Ammoniumacetat-Lösung, 25 mM

Wasser (*LC-MS Grade*)

Wasser mit 5% Ameisensäure (beides *LC-MS Grade*)

1%, 3%, 5%, 10%, 50%, 100% Methanol mit 5% Ameisensäure (beides *LC-MS Grade*)

Wasser mit 0,1% Ameisensäure (beides *LC-MS Grade*)

Theobrominlösung, 33,3 µM, in dest. Wasser

#### *Durchführung*

Die Strata X-A-SPE-Säule wurde mit 2 ml Methanol und 2 ml Wasser konditioniert, um die Säule für die Probenaufgaben vorzubereiten.

Das Aliquot a der Adduktfraktionen bzw. das Aliquot a der gefriergetrockneten DNA-Basenmischung (aus 950 µl DNA-Basenmischung) wurde gelöst in je 1 ml Wasser und auf die SPE-Säule gegeben. Es wurde zunächst mit 1 ml Ammoniumacetat-Lösung (25 mM) und anschließend mit 2 ml Methanol gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 ml Wasser mit 5% FA und mit je 1 ml der Elutionslösungen mit ansteigendem Anteil an Methanol und 5% FA (für PAT-Adenin-Addukte) bzw. mit 1 ml 3% Methanol mit 5% FA (für die DNA-Basenmischung). Die Fraktionen nach der Probenaufgabe und den beiden Waschschrritten sowie der Elutionen wurden jeweils in einem Glasröhrchen aufgefangen.

Die Fraktionen der Probenaufgabe und des Waschschrittes Ammoniumacetat, sowie die Fraktionen der Elution mit Wasser wurden eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet (Druck 0,2 mbar, Stellflächentemperatur 25°C, Eiskondensatortemperatur -55°C). Die Fraktionen des Waschschrittes mit Methanol und der Elutionen mit organischem Anteil wurden zunächst 1-2 h bei 30 mbar evaporiert und die verbleibende wässrige Lösung anschließende wie oben beschrieben gefriergetrocknet.

Die trockenen SPE-Fraktionen der Addukte sowie die Kontrollfraktion b wurden in je 500 µl Wasser mit 0,1% FA aufgenommen und anschließend 1+9 verdünnt. Jeweils 5 µl dieser Lösungen wurden anschließend mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus vermessen.

Die trockenen SPE-Fraktionen der DNA-Basenmischung sowie deren gefriergetrockneten Kontrolle b (aus 950 µl der DNA-Basenmischung) wurden in je 500 µl Theobrominlösung gelöst und mittels HPLC-UV (Kapitel 6.2.1.1 Methode 2) analysiert.

#### **6.2.10.3 Zweidimensionale Festphasenextraktion mit einer SAX- und X-A-Phase**

##### *Reagenzien*

Aliquote a und b von vereinten GSH-PAT-Adenin- und PAT-Adenin-Adduktfraktionen (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3)

Methanol (*LC-MS Grade*)

Ammoniumacetat-Lösung, 25 mM

Wasser (*LC-MS Grade*)

Wasser mit 5% Ameisensäure (beides *LC-MS Grade*)

3% und 100% Methanol mit 5% Ameisensäure (beides *LC-MS Grade*)

Wasser mit 0,1% Ameisensäure (beides *LC-MS Grade*)

#### *Durchführung*

Die Strata SAX-SPE-Säule wurde zunächst mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert, um die Säule für die Probenaufgaben vorzubereiten.

Das Aliquot a der vereinten Adduktfraktion gelöst in je 1 ml Wasser wurde auf die SPE-Säule gegeben. Es wurde zunächst mit 1 ml Ammoniumacetat-Lösung (25 mM) und anschließend mit 1 ml Wasser gewaschen. Die Eluate nach der Probenaufgabe und den beiden Waschsritten wurden zusammen in einem Glasröhrchen aufgefangen (SAX-Spülfraktion). Die Elution der GSH-PAT-Adenin-Addukte erfolgte dann mit 5 ml Wasser mit 5% FA in einem neuen Glasröhrchen (SAX-Elution).

Die Strata X-A-SPE-Säule wurde mit 2 ml Methanol und 2 ml Wasser konditioniert und die gesammelten SAX-Eluate nach Probenaufgabe und Waschen (3 ml) auf die SPE-Säule gegeben. Es wurde zunächst mit 1 ml Ammoniumacetat-Lösung (25 mM) und anschließend mit 2 ml Methanol gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 ml Wasser mit 5% FA und mit 1 ml 3% Methanol mit 5% FA. Anschließend wurde mit 1 ml Methanol mit 5% FA nacheluiert (Post-Elution). Die Eluate nach der Probenaufgabe und den beiden Waschsritten sowie der Elutionen wurden jeweils in einem Glasröhrchen aufgefangen.

Die Fraktion der SAX-Elution sowie alle Fraktionen der SPE mit der X-A-Säule wurden eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet (Druck 0,2 mbar, Stellflächentemperatur 25°C, Eiskondensatortemperatur -55°C) bzw. die Fraktionen mit organischem Anteil zunächst 1-2 h bei 30 mbar evaporiert und die verbleibende wässrige Lösung anschließend wie oben beschrieben gefriergetrocknet.

Die trockenen SPE-Fraktionen der Addukte sowie die Kontrollfraktion b wurden in je 500 µl Wasser mit 0,1% FA aufgenommen und anschließend 1+99 (für GSH-PAT-Adenin-Addukte) bzw. 1+9 (PAT-Adenin-Addukte) verdünnt. Jeweils 5 µl dieser Lösungen wurden anschließend mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus vermessen.

## 6.2.11 Inkubationen von Patulin mit genomischer DNA

### 6.2.11.1 Vorversuche zur Extraktion von Patulin mit Ethylacetat

#### Reagenzien

- Kaliumphosphatpuffer, 0,1 M, pH 7,4
- PAT, 2 mM, in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M)
- GSH, 4 mM, in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M)
- Guanin, 7,5 mM, in 0,1 M NaOH
- Adenin, 4 mM, in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M)
- Essigsäureethylester
- HCl-Lösung: 41 µl HCl konz. + 59 µl Wasser
- Ammoniumhydroxid-Lösung: 1+1 mit Wasser verdünnt
- Ammoniumacetat-Lösung, 25 mM

#### Durchführung

Die Inkubation wurde nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt (**Tab. 27**), wobei PAT zum Start der Inkubation zuletzt zu dem Ansatz pipettiert wurde.

**Tab. 27:** Pipettierschema für die Inkubation von PAT mit Adenin, Guanin und GSH.

|        | Konzentration der Stammlösung (mM) | Volumen (µl) | Endkonzentration im Inkubationsansatz (mM) |
|--------|------------------------------------|--------------|--|
| Adenin | 4,0                                | 200          | 1,00                                       |
| Guanin | 7,5                                | 54           | 0,50                                       |
| GSH    | 4,0                                | 100          | 0,50                                       |
| PAT    | 2,0                                | 100          | 0,25                                       |
| Puffer | ---                                | 346          | ---  |

Der Reaktionsansatz wurde für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf zwei Aliquote (400 µl) aufgeteilt. Das eine Aliquot (Kontrolle) wurde bei -24°C im Gefrierschrank gefroren und anschließend gefriergetrocknet (Druck 0,2 mbar, Stellflächentemperatur 25°C, Eiskondensatortemperatur -55°C). Das zweite Aliquot wurde zweimal mal mit je 300 µl Essigsäureethylester extrahiert und die organische Phase jeweils verworfen. Anschließend wurden 100 µl der HCl-Lösung zugegeben und bei 70°C für 30 min im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Hydrolyselösung (500 µl) auf einen Molekularfilter (MWCO 3 kDa) gegeben und bei 14.000 g für ca. 1 h zentrifugiert. Zu 400 µl des Hydrolyse-Filtrats wurden anschließend 80 µl der Ammoniumhydroxid-Lösung und

520 µl Ammoniumacetat-Lösung gegeben (pH 6-8). Diese Lösung wurde auf eine SPE-Säule (SAX-Phase) gegeben und die zweidimensionale SPE-Methode wie in Kapitel 6.2.10.3 beschrieben durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen evaporiert bzw. gefriergetrocknet. Das unbehandelte erste Aliquot (Kontrolle) wurde in 500 µl Wasser aufgenommen und 1+9 verdünnt (//50 µl + 450 µl). Die trockenen Fraktionen wurden in 400 µl Wasser aufgenommen (berücksichtigt die Entnahme von 400 µl des Filtrats für die Neutralisation) und ebenfalls 1+9 verdünnt (//50 µl + 450 µl). Die Lösungen (Injektionsvolumen 5 µl) wurden anschließend mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus analysiert. Die Peakflächen der SPE-Fraktionen wurden mit den Peakflächen der Kontrolle (100%) verglichen.

### **6.2.11.2 Bestimmung der Wiederfindungen der (Glutathion-)Patulin-Adenin-Addukte während der DNA-Aufarbeitung**

#### *Reagenzien*

(GSH-)PAT-Adenin-Adduktfraktionen (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3)

Kaliumphosphatpuffer, 0,1 M, pH 7,4

Kaliumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,4

Kalbstyhmus-DNA-Lösung, 5 mg/ml, in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M)

HCl-Lösung: 41 µl HCl konz. + 59 µl Wasser

Ammoniumhydroxid-Lösung: 1+1 mit Wasser verdünnt

Ammoniumacetat-Lösung, 25 mM

#### *Durchführung*

Von den nach der Isolierung (Kapitel 6.2.4.1 und 6.2.4.3) in einem Glasröhrchen vorliegenden gefriergetrockneten drei Aliquots der (GSH-)PAT-Adenin-Adduktfraktionen wurden zwei Aliquote (a, b) für die Bestimmung der Wiederfindung herangezogen. Das dritte Aliquot (c) wurde als Kontrolle im Gefrierfach zurückgehalten. Die beiden Aliquote a und b wurden in 200 µl Kaliumphosphatpuffer (1 M) gelöst. Aliquot a wurde zu 200 µl der DNA-Lösung gegeben (entspricht 1 mg DNA). Aliquot b wurde zu einer Mischung aus 20 µl der DNA-Lösung und 180 µl Kaliumphosphatpuffer (0,1 M) gegeben (entspricht 100 µg DNA). Anschließend wurden zu beiden Lösungen a und b je 100 µl der HCl-Lösung zugegeben und bei 70°C für 30 min im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Hydrolyselösungen a und b (je 500 µl) auf einen Molekularfilter (MWCO 3 kDa) gegeben und bei 14.000 g für 20 min zentrifugiert. Zu 400 µl der Hydrolyse-Filtrate a und b wurden anschließend je 80 µl der Ammoniumhydroxid-Lösung und 520 µl Ammoniumacetat-Lösung gegeben (pH 6-8). Die neutralisierten Lösung a und b (V=1 ml) wurde auf eine SPE-Säule (SAX-Phase) gegeben und die zweidimensionale SPE-Methode wie in Kapitel 6.2.10.3 beschrieben durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen evaporiert bzw. gefriergetrocknet.

Das unbehandelte Aliquot c (Kontrolle) wurde in 500 µl Wasser aufgenommen und 1+9 verdünnt (//50 µl + 450 µl). Die trockenen Fraktionen wurden in 400 µl Wasser aufgenommen (berücksichtigt die Entnahme von 400 µl des Filtrats für die Neutralisation) und ebenfalls 1+9 verdünnt (//50 µl + 450 µl). Die Lösungen (Injektionsvolumen 5 µl) wurden anschließend mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus analysiert. Die Peakflächen der SPE-Fractionen der Ansätze a und b wurden mit den Peakflächen der Kontrolle (100%) verglichen.

### 6.2.11.3 Inkubation von Patulin mit DNA in An- und Abwesenheit von Glutathion

#### Reagenzien

Kaliumphosphatpuffer, 0,1 M, pH 7,4

Kaliumphosphatpuffer, 1 M, pH 7,4

PAT, 8 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)

GSH, 16 mM, in Kaliumphosphatpuffer (1 M)

Kalbstyhmus-DNA-Lösung, 5 mg/ml, in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M)

Natriumacetat-Lösung, 3 M, in Wasser

EtOH absolut

EtOH, 70%-ig (v/v)

HCl-Lösung: 41 µl HCl konz. + 59 µl Wasser

Ammoniumhydroxid-Lösung: 1+1 mit Wasser verdünnt

Ammoniumacetat-Lösung, 25 mM

Wasser (LC-MS Grade)

#### Durchführung

Die Inkubationen wurden nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt (Tab. 28), wobei PAT zum Start der Inkubation zuletzt zu dem Ansatz pipettiert wurde (Reaktionsgefäß 1,5 ml).

**Tab. 28:** Pipettierschema für die Inkubation von PAT mit DNA in An- und Abwesenheit von GSH. V, pipettiertes Volumen; Konz., Konzentration in der Inkubationslösung; GSH/PAT, GSH/PAT-Verhältnis.

|        | ohne GSH |         | GSH/PAT=0,5 |         | GSH/PAT=1 |         | GSH/PAT=2 |         |
|--------|----------|---------|-------------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
|        | V (µl)   | Konz.   | V (µl)      | Konz.   | V (µl)    | Konz.   | V (µl)    | Konz.   |
| DNA    | 200      | 1 mg/ml | 200         | 1 mg/ml | 200       | 1 mg/ml | 200       | 1 mg/ml |
| PAT    | 40       | 0,8 mM  | 40          | 0,8 mM  | 40        | 0,8 mM  | 40        | 0,8 mM  |
| GSH    | ---      | ---     | 10          | 0,4 mM  | 20        | 0,8 mM  | 40        | 1,6 mM  |
| Puffer | 160      | ---     | 150         | ---     | 140       | ---     | 120       | ---     |



Dier Reaktionsansätze wurden für 48 h bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln im Thermomixer (400 rpm) inkubiert. Anschließend wurden zum Ausfällen der DNA 40 µl Natriumacetat-Lösung und 1 ml EtOH absolut zu den Inkubationslösungen gegeben und die Reaktionsgefäße vorsichtig über Kopf geschwenkt bis die ausgefallene DNA zu erkennen war. Zum Pelletieren der DNA wurden die Lösungen bei 14000 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Die verbleibenden DNA-Pellets wurden insgesamt dreimal mit je 500 µl 70%-igem EtOH versetzt, aufgeschlämmt und wieder zentrifugiert (14000 g, 5 min). Die Pellets wurden anschließend in 400 µl Kaliumphosphatpuffer (0,1 M) resuspendiert und am Rotator für 1 h rotiert. Anschließend wurden zu den DNA-Lösungen je 100 µl der HCl-Lösung zugegeben und bei 70°C für 30 min im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Hydrolyselösungen (500 µl) auf einen Molekularfilter (MWCO 3 kDa) gegeben und bei 14.000 g für ca. 1 h zentrifugiert. Zu 400 µl der Hydrolyse-Filtrate wurden anschließend je 80 µl der Ammoniumhydroxid-Lösung und 520 µl Ammoniumacetat-Lösung gegeben (pH 6-8). Diese Lösungen wurde je auf eine SPE-Säule (SAX-Phase) gegeben und die zweidimensionale SPE-Methode wie in Kapitel 6.2.10.3 beschrieben durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen evaporiert bzw. gefriergetrocknet. Die trockenen Fraktionen wurden in 200 µl *LC-MS Grade* Wasser aufgenommen. Die Lösungen (Injektionsvolumen 5 µl) wurden anschließend mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus analysiert.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Albertini, R. J., J. A. Nicklas, J. C. Fuscoe, T. R. Skopek, R. F. Branda und J. P. O'Neill (1993). In vivo mutations in human blood cells: biomarkers for molecular epidemiology. *Environmental health perspectives*, **99**, 135-141.
- Alves, I., N. G. Oliveira, A. Laires, A. S. Rodrigues und J. Rueff (2000). Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis*, **15**(3), 229-234.
- Anand, P., A. B. Kunnumakara, C. Sundaram, K. B. Harikumar, S. T. Tharakan, O. S. Lai, B. Y. Sung und B. B. Aggarwal (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, **25**(9), 2097-2116.
- Arimoto-Kobayashi, S., K. Kaji, G. M. Sweetman und H. Hayatsu (1997). Mutation and formation of methyl- and hydroxylguanine adducts in DNA caused by N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine with UVA irradiation. *Carcinogenesis*, **18**(12), 2429-2433.
- Ashoor, S. H. und F. S. Chu (1973). Inhibition of Muscle Aldolase by Penicillic Acid and Patulin in-Vitro. *Food and Cosmetics Toxicology*, **11**(6), 995-1000.
- Ayed-Boussema, I., H. Abassi, C. Bouaziz, W. B. Hlima, Y. Ayed und H. Bacha (2013). Antioxidative and antigenotoxic effect of vitamin E against patulin cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells. *Environ Toxicol*, **28**(6), 299-306.
- Baillie, T. A. und M. R. Davis (1993). Mass spectrometry in the analysis of glutathione conjugates. *Biol Mass Spectrom*, **22**(6), 319-325.
- Baillie, T. A. und J. G. Slatter (1991). Glutathione - a Vehicle for the Transport of Chemically Reactive Metabolites In vivo. *Accounts of Chemical Research*, **24**(9), 264-270.
- Barhoumi, R. und R. C. Burghardt (1996). Kinetic analysis of the chronology of patulin- and gossypol-induced cytotoxicity in vitro. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*, **30**(2), 290-297.
- Becci, P. J., F. G. Hess, W. D. Johnson, M. A. Gallo, J. G. Babish, R. E. Dailey und R. A. Parent (1981). Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. *J Appl Toxicol*, **1**(5), 256-261.
- Bennett, J. W. und M. Klich (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, **16**(3), 497-516.
- Berhane, K., M. Widersten, A. Engstrom, J. W. Kozarich und B. Mannervik (1994). Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(4), 1480-1484.
- Bigorra, J., J. Font, C. Jaime, R. M. Ortuno und F. Sanchez-Ferrando (1985). Studies on structurally simple  $\alpha,\beta$ -butenolides V. Reactions of protoanemonin with piperidine and C-nucleophiles. A general approach to its behaviour as electrophilic acceptor. *Tetrahedron*, **41**(23), 5577-5587.
- Birkinshaw, J. H., S. E. Michael, A. Bracken und H. Raistrick (1943). Patulin in the common cold collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier. II. Biochemistry and Chemistry. *Lancet*, **245**, 625.
- Bizanek, R., B. F. McGuinness, K. Nakanishi und M. Tomasz (1992). Isolation and structure of an intrastrand cross-link adduct of mitomycin C and DNA. *Biochemistry*, **31**(12), 3084-3091.

- Blair, I. A. (2006). Endogenous glutathione adducts. *Curr Drug Metab*, **7**(8), 853-872.
- Boylard, E. und L. F. Chasseau (1967). Enzyme-Catalysed Conjugations of Glutathione with Unsaturated Compounds. *Biochemical Journal*, **104**(1), 95-102.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Cardellach, J., C. Estopa, J. Font, M. Moreno-Manas, R. M. Ortuno, F. Sanchez-Ferrando, S. Valle und L. Vilamajo (1982). Studies on structurally simple  $\alpha,\beta$ -butenolides I. New syntheses of racemic  $\gamma$ -hydroxymethyl- $\alpha,\beta$ -butenolidd and derivatives. *Tetrahedron*, **38**(15), 2377-2394.
- Cavallito, C. J. und T. H. Haskell (1945). The Mechanism of Action of Antibiotics. The Reaction of Unsaturated Lactones with Cysteine and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **67**(11), 1191-1194.
- Chargaff, E. (1950). Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia*, **6**(6), 201-209.
- Chaudhary, A. K., G. R. Reddy, I. A. Blair und L. J. Marnett (1996). Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis*, **17**(5), 1167-1170.
- Cho, S.-H. und F. P. Guengerich (2012). Conjugation of Butadiene Diepoxide with Glutathione Yields DNA Adducts in Vitro and in Vivo. *Chem Res Toxicol.*, **25**(3), 706-712.
- Cho, S. H., E. M. Loecken und F. P. Guengerich (2010). Mutagenicity of a glutathione conjugate of butadiene diepoxide. *Chem Res Toxicol*, **23**(10), 1544-1546.
- Ciegler, A. (1977) Mycotoxins in human and animal health: Patulin. *U. S. D. o. Agriculture*, <http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/28527/1/CAIN789062296.pdf>.
- Ciegler, A., A. C. Beckwith und L. K. Jackson (1976). Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl Environ Microbiol*, **31**(5), 664-667.
- Coles, B. (1985). Effects of Modifying Structure on Electrophilic Reactions with Biological Nucleophiles. *Drug Metabolism Reviews*, **15**(7), 1307-1334.
- da Costa, G. G., M. I. Churchwell, L. P. Hamilton, L. S. Von Tungeln, F. A. Beland, M. M. Marques und D. R. Doerge (2003). DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chemical Research in Toxicology*, **16**(10), 1328-1337.
- Dailey, R. E., A. M. Blaschka und E. A. Brouwer (1977). Absorption, distribution, and excretion of [<sup>14</sup>C]patulin by rats. *J Toxicol Environ Health*, **3**(3), 479-489.
- de Melo, F. T., I. M. de Oliveira, S. Greggio, J. C. Dacosta, T. N. Guecheva, J. Saffi, J. A. Henriques und R. M. Rosa (2012). DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food Chem Toxicol*, **50**, 3548-3555.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*, **1830**(5), 3217-3266.
- Dickens, F. und J. Cooke (1965). Rates of Hydrolysis and Interaction with Cysteine of Some Carcinogenic Lactones and Related Substances. *Br J Cancer*, **19**, 404-410.
- Dickens, F. und H. E. Jones (1961). Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. *Br J Cancer*, **15**, 85-100.
- Drusch, S. und W. Ragab (2003). Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *J Food Prot*, **66**(8), 1514-1527.
- Eder, E. und C. Hoffman (1993). Identification and characterization of deoxyguanosine adducts of mutagenic beta-alkyl-substituted acrolein congeners. *Chemical Research in Toxicology*, **6**(4), 486-494.
- Eisenbrand, G., J. Schuhmacher und P. Golzer (1995). The influence of glutathione and detoxifying enzymes on DNA damage induced by 2-alkenals in primary rat hepatocytes and human lymphoblastoid cells. *Chem Res Toxicol*, **8**(1), 40-46.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, **82**(1), 70-77.

- Esterbauer, H., H. Zollner und N. Scholz (1975). Reaction of Glutathione with Conjugated Carbonyls. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, **30**(7-8), 466-473.
- Empfehlung der Kommission vom 11. August 2003 zur Prävention und Reduzierung der Patulinkontamination von Apfelsaft und Apfelsaftzutaten in anderen Getränken. (2003/598/EG), ABI 2003 L 203, 54-59.
- Farmer, P. B., K. Brown, E. Tompkins, V. L. Emms, D. J. Jones, R. Singh und D. H. Phillips (2005). DNA adducts: mass spectrometry methods and future prospects. *Toxicol Appl Pharmacol*, **207**(2 Suppl), 293-301.
- Farmer, P. B. und G. M. A. Sweetman (1995). Mass-Spectrometric Detection of Carcinogen Adducts. *Journal of Mass Spectrometry*, **30**(10), 1369-1379.
- Fliege, R. (1999). Zum molekularen Wirkmechanismus des Mykotoxins Patulin: Charakterisierung der spontanen Reaktivität gegenüber nucleophilen Modells-substanzen und biologischen Makromolekülen in vitro. *Dissertation*, Universität Karlsruhe.
- Fliege, R. und M. Metzler (1999). The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and alpha-amino groups. *Chemico-biological interactions*, **123**(2), 85-103.
- Fliege, R. und M. Metzler (2000a). Electrophilic properties of patulin. Adduct structures and reaction pathways with 4-bromothiophenol and other model nucleophiles. *Chemical research in toxicology*, **13**(5), 363-372.
- Fliege, R. und M. Metzler (2000b). Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts. *Chemical research in toxicology*, **13**(5), 373-381.
- Frank, H. K., R. Orth und R. Hermann (1976). Patulin in Foods of Vegetable Origin .1. Pomaceous Fruit and Products Made out of It. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **162**(2), 149-157.
- Gates, K. S. (2009). An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals. *Chemical Research in Toxicology*, **22**(11), 1747-1760.
- Gates, K. S., T. Nooner und S. Dutta (2004). Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. *Chemical research in toxicology*, **17**(7), 839-856.
- Geiger, W. B. und J. E. Conn (1945). The Mechanism of the Antibiotic Action of Clavacin and Penicillic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, **67**(1), 112-116.
- Glaab, V., A. R. Collins, G. Eisenbrand und C. Janzowski (2001). DNA-damaging potential and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals. *Mutat Res*, **497**(1-2), 185-197.
- Glaser, N. und H. Stopper (2012). Patulin: Mechanism of genotoxicity. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **50**(5), 1796-1801.
- Guengerich, F. P. (2003). Activation of dihaloalkanes by thiol-dependent mechanisms. *J Biochem Mol Biol*, **36**(1), 20-27.
- Gutsche, C. D. (1954). The Reaction of Diazomethane and Its Derivatives with Aldehydes and Ketones. *Organic Reactions*, **8**, 364-429.
- Habig, W. H., M. J. Pabst und W. B. Jakoby (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, **249**(22), 7130-7139.
- Hakala, K., S. Auriola, A. Koivisto und H. Lonnberg (1999). Mass spectrometric (HPLC/ESI-MS/MS) quantification of pyrimido[1,2-a]purin-10(3H)-one, a guanine adduct formed by reaction of malondialdehyde with DNA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **21**(5), 1053-1061.
- Harrison, M. A. (1989). Presence and stability of patulin in apple products: A review. *J Food Safety*, **9**(3), 147-153.
- Hemminki, K. (1983). Nucleic acid adducts of chemical carcinogens and mutagens. *Archives of toxicology*, **52**(4), 249-285.
- Himmelstein, M. W., P. J. Boogaard, J. Cadet, P. B. Farmer, J. H. Kim, E. A. Martin, R. Persaud und D. E. Shuker (2009). Creating context for the use of DNA adduct data in

- cancer risk assessment: II. Overview of methods of identification and quantitation of DNA damage. *Crit Rev Toxicol*, **39**(8), 679-694.
- Hoosier, G. L. v. (1987). Laboratory hamsters. *Academic Press*, Orlando.
- Houtgraaf, J. H., J. Versmissen und W. J. van der Giessen (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med*, **7**(3), 165-172.
- Huang, H., I. D. Kozekov, A. Kozekova, H. Wang, R. S. Lloyd, C. J. Rizzo und M. P. Stone (2010). DNA cross-link induced by trans-4-hydroxynonenal. *Environ Mol Mutagen*, **51**(6), 625-634.
- IARC (1986). Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, **40**, 1-444.
- IARC (1993). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, **56**, 1-599.
- IARC (2002). Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, **82**, 1-590.
- Inagaki, S., Y. Esaka, Y. Deyashiki, M. Sako und M. Goto (2003). Analysis of DNA adducts of acetaldehyde by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A FIELD Full Journal Title:Journal of Chromatography, A*, **987**(1-2), 341-347.
- Inagaki, S., H. Hirashima, Y. Esaka, T. Higashi, J.-Z. Min und T. Toyo-Oka (2010). Screening DNA adducts by LC-ESI-MS-MS: Application to screening new adducts formed from acrylamide. *Chromatographia FIELD Full Journal Title:Chromatographia*, **72**(11-12), 1043-1048.
- Janzowski, C., V. Glaab, C. Mueller, U. Straesser, H. G. Kamp und G. Eisenbrand (2003). Alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mutagenesis*, **18**(5), 465-470.
- Jarabek, A. M., L. H. Pottenger, L. S. Andrews, D. Casciano, M. R. Embry, J. H. Kim, R. J. Preston, M. V. Reddy, R. Schoeny, D. Shuker, J. Skare, J. Swenberg, G. M. Williams und E. Zeiger (2009). Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: I. Data organization. *Critical Reviews in Toxicology*, **39**(8), 659-678.
- Jones, C. R. und G. Sabbioni (2003). Identification of DNA adducts using HPLC/MS/MS following in vitro and in vivo experiments with arylamines and nitroarenes. *Chem Res Toxicol*, **16**(10), 1251-1263.
- Jones, G. D., R. C. Le Pla und P. B. Farmer (2010). Phosphotriester adducts (PTEs): DNA's overlooked lesion. *Mutagenesis*, **25**(1), 3-16.
- Jones, J. B. und J. M. Young (1966). Carcinogenicity of Lactones .1. Reaction of 4-Methylbuteno- and 4-Methylbutano-Gamma-Lactones with Primary Amines. *Canadian Journal of Chemistry*, **44**(9), 1059-1068.
- Jones, J. B. und J. M. Young (1968). Carcinogenicity of Lactones .3. Reactions of Unsaturated Gamma-Lactones with L-Cysteine. *Journal of Medicinal Chemistry*, **11**(6), 1176-1182.
- Koc, H. und J. A. Swenberg (2002). Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **778**(1-2), 323-343.
- Koskinen, M. und K. Pina (2000). Specific DNA adducts induced by some mono-substituted epoxides in vitro and in vivo. *Chemico-Biological Interactions*, **129**(3), 209-229.
- Koskinen, M., P. Vodicka und K. Hemminki (2000). Adenine N3 is a main alkylation site of styrene oxide in double-stranded DNA. *Chemico-biological interactions*, **124**(1), 13-27.
- Kunz, C., Y. Saito und P. Schar (2009). DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell Mol Life Sci*, **66**(6), 1021-1038.
- Lee, K. S. (1991). Cytotoxicity of patulin and its effect on the lambda DNA cleavage by restriction endonuclease. *Korean J. Toxicol.*, **7**(2), 157-163.
- Liao, P. C., C. M. Li, C. W. Hung und S. H. Chen (2001). Quantitative detection of N-7-(2-hydroxyethyl)guanine adducts in DNA using high-performance liquid

- chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **36**(3), 336-343.
- Liebich, H. M. und C. Forst (1985). N-Methylation and N,N-dimethylation of amino acids. An artifact production in the analysis of organic acids using diazomethane as derivatizing agent. *J Chromatogr*, **338**(1), 33-40.
- Liu, B. H., F. Y. Yu, T. S. Wu, S. Y. Li, M. C. Su, M. C. Wang und S. M. Shih (2003). Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol Appl Pharmacol*, **191**(3), 255-263.
- Loeb, L. A. und B. D. Preston (1986). Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu Rev Genet*, **20**, 201-230.
- LoPachin, R. M. und T. Gavin (2014). Molecular Mechanisms of Aldehyde Toxicity: A Chemical Perspective. *Chem Res Toxicol*, **27**(7), 1081-1091.
- Lopachin, R. M., T. Gavin, A. Decaprio und D. S. Barber (2012). Application of the Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) theory to toxicant--target interactions. *Chem Res Toxicol*, **25**(2), 239-251.
- Majerus, K. und K. Kapp (2002). Assessment of dietary intake of Patulin by the population of EU Member States. *Reports on tasks for scientific cooperation*, Brüssel.
- Marsch, G. A., R. G. Mundkowski, B. J. Morris, M. L. Manier, M. K. Hartman und F. P. Guengerich (2001). Characterization of nucleoside and DNA adducts formed by S-(1-acetoxymethyl)glutathione and implications for dihalomethane-glutathione conjugates. *Chemical research in toxicology*, **14**(5), 600-608.
- Mate, U., J. J. Solomon und A. Segal (1977). In vitro binding of beta-propiolactone to calf thymus DNA and mouse liver DNA to form 1-(2-carboxyethyl) adenine. *Chem Biol Interact*, **18**(3), 327-336.
- Mathison, B. H., S. E. Murphy und R. C. Shank (1994). Hydralazine and other hydrazine derivatives and the formation of DNA adducts. *Toxicol Appl Pharmacol*, **127**(1), 91-98.
- McKinley, E. R. und W. W. Carlton (1991). Patulin. *Mycotoxins Phytoalexins*, 191-236.
- Moore, S. A., O. Xeniou, Z. T. T. Zeng, E. Humphreys, S. Burr, E. Gottschalg, S. A. Bingham und D. E. G. Shuker (2010). Optimizing immunoslot blot assays and application to low DNA adduct levels using an amplification approach. *Analytical Biochemistry*, **403**(1-2), 67-73.
- Neale, J. R., N. B. Smith, P. W.M. und H. D.W. (2008). Methods for aromatic and heterocyclic amine carcinogen-DNA adduct analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Polycycl Aromat Compd.*, **28**(4-5), 402-417.
- Obeid, S., N. Blatter, R. Kranaster, A. Schnur, K. Diederichs, W. Welte und A. Marx (2010). Replication through an abasic DNA lesion: structural basis for adenine selectivity. *Embo Journal*, **29**(10), 1738-1747.
- Pearson, R. G. und J. Songstad (1967). Application of Principle of Hard and Soft Acids and Bases to Organic Chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, **89**(8), 1827-1836.
- Pfeiffer, E., K. Gross und M. Metzler (1998). Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis*, **19**(7), 1313-1318.
- Puel, O., P. Galtier und I. P. Oswald (2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins (Basel)*, **2**(4), 613-631.
- Rundle, A. (2006). Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. *Mutat Res*, **600**(1-2), 23-36.
- Rychlik, M. und P. Schieberle (1999). Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**(9), 3749-3755.
- Rychlik, M. und P. Schieberle (2001). Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. *European Food Research and Technology*, **212**(3), 274-278.
- Schebb, N. H., H. Faber, R. Maul, F. Heus, J. Kool, H. Irth und U. Karst (2009). Analysis of glutathione adducts of patulin by means of liquid chromatography (HPLC) with biochemical detection (BCD) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Analytical and bioanalytical chemistry*, **394**(5), 1361-1373.

- Schultz, T. W., J. W. Yarbrough und E. L. Johnson (2005). Structure-activity relationships for reactivity of carbonyl-containing compounds with glutathione. *Sar and Qsar in Environmental Research*, **16**(4), 313-322.
- Schumacher, D. M., M. Metzler und L. Lehmann (2005a). Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Archives of toxicology*, **79**(2), 110-121.
- Schumacher, D. M., C. Muller, M. Metzler und L. Lehmann (2006). DNA-DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin. *Toxicology letters*, **166**(3), 268-275.
- Schumacher, D. M., J. Wagner, M. Metzler und L. Lehmann (2005b). Influence of decreased intracellular glutathione level on the mutagenicity of patulin in cultured mouse lymphoma cells. *Mycotoxin Research*, **21**(2), 150-152.
- Shapiro, R. und M. Danzig (1972). Acidic hydrolysis of deoxycytidine and deoxyuridine derivatives. The general mechanism of deoxyribonucleoside hydrolysis. *Biochemistry*, **11**(1), 23-29.
- Shephard, G. S. und N. L. Leggott (2000). Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *Journal of Chromatography A*, **882**(1-2), 17-22.
- Silva, E. M. P. und A. M. S. Silva (2012). 1,6-Conjugate Addition of Nucleophiles to alpha,beta,gamma,delta-Diunsaturated Systems. *Synthesis-Stuttgart*, **44**(20), 3109-3128.
- Singh, R. und P. B. Farmer (2006). Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis*, **27**(2), 178-196.
- Speijers, G. J. A. (2004). Patulin. *Mycotoxins in food. Detection and control*. Woodhead Publishing Ltd England, 14, 339-352.
- Stinson, E. E., S. F. Osman, C. N. Huhtanen und D. D. Bills (1978). Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *Appl Environ Microbiol*, **36**(4), 620-622.
- Stone, M. P., Y. J. Cho, H. Huang, H. Y. Kim, I. D. Kozekov, A. Kozekova, H. Wang, I. G. Minko, R. S. Lloyd, T. M. Harris und C. J. Rizzo (2008). Interstrand DNA cross-links induced by alpha,beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. *Acc Chem Res*, **41**(7), 793-804.
- Sugimura, T. (2000). Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*, **21**(3), 387-395.
- Sutandyo, N. (2010). Nutritional carcinogenesis. *Acta Med Indones*, **42**(1), 36-42.
- Swarts, S. G., G. S. Smith, L. Miao und K. T. Wheeler (1996). Effects of formic acid hydrolysis on the quantitative analysis of radiation-induced DNA base damage products assayed by gas chromatography/mass spectrometry. *Radiat Environ Biophys*, **35**(1), 41-53.
- Tarun, M. und J. F. Rusling (2005). Measuring DNA nucleobase adducts using neutral hydrolysis and liquid chromatography-mass spectrometry. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **15**(4), 295-316.
- Tretyakova, N., S. Y. Chiang, V. E. Walker und J. A. Swenberg (1998). Quantitative analysis of 1,3-butadiene-induced DNA adducts in vivo and in vitro using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, **33**(4), 363-376.
- Tretyakova, N., R. Sangaiah, T. Y. Yen, A. Gold und J. A. Swenberg (1997). Adenine adducts with diepoxybutane: isolation and analysis in exposed calf thymus DNA. *Chem Res Toxicol*, **10**(10), 1171-1179.
- Tretyakova, N., P. W. Villalta und S. Kotapati (2013). Mass spectrometry of structurally modified DNA. *Chem Rev*, **113**(4), 2395-2436.
- van Bladeren, P. J. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-Biological Interactions*, **129**(1-2), 61-76.
- Van Duuren, B. L. (1988). Direct-acting alkylating and acylating agents. DNA adduct formation, structure-activity, and carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, **534**, 620-634.
- Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. ABI 2006 L 364, 5-24.

- Vroomen, L. H., M. C. Berghmans, J. P. Groten, J. H. Koeman und P. J. van Bladeren (1988). Reversible interaction of a reactive intermediate derived from furazolidone with glutathione and protein. *Toxicol Appl Pharmacol*, **95**(1), 53-60.
- Vu, V. T., P. H. Grantham, P. P. Roller, W. D. Hankins, P. J. Wirth und S. S. Thorgeirsson (1986). Formation of DNA Adducts from N-Acetoxy-2-Acetylaminofluorene and N-Hydroxy-2-Acetylaminofluorene in Rat Hematopoietic Tissues In vivo. *Cancer Research*, **46**(1), 233-238.
- Witz, G. (1989). Biological interactions of alpha,beta-unsaturated aldehydes. *Free Radic Biol Med*, **7**(3), 333-349.
- Wolf, C. (2008). Racemization, Enantiomerization and Diastereomerization. Dynamic stereochemistry of chiral compounds: principles and applications. *RSC Publ.*, Cambridge, Chapter 3, 29-135.
- Wouters, M. F. A. und G. J. A. Speijers (1996). Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food, Patulin. *WHO Food Additives Series*, **35**, 377-402.
- Yang, G., L. Zhong, L. Jiang, C. Geng, J. Cao, X. Sun, X. Liu, M. Chen und Y. Ma (2011). 6-gingerol prevents patulin-induced genotoxicity in HepG2 cells. *Phytother Res*, **25**(10), 1480-1485.
- Yang, J., J. Li, Y. Jiang, X. Duan, H. Qu, B. Yang, F. Chen und D. Sivakumar (2014). Natural occurrence, analysis, and prevention of mycotoxins in fruits and their processed products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **54**(1), 64-83.
- Zhou, S. M., L. P. Jiang, C. Y. Geng, J. Cao und L. F. Zhong (2009). Patulin-induced genotoxicity and modulation of glutathione in HepG2 cells. *Toxicol*, **53**(5), 584-586.
- Zhou, S. M., L. P. Jiang, C. Y. Geng, J. Cao und L. F. Zhong (2010). Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. *Toxicol*, **55**(2-3), 390-395.



## 8 ANHANG

### A1 (GSH-)PAT(-Adenin)-Addukte

A1.1 Exakte Massenbestimmung isolierter (GSH-)PAT(-Adenin)-Addukte mittels UPLC-qTOF (Kapitel 6.2.1.6). Die Molekülonen wurden sowohl im positiven als auch im negativen ESI erfasst, die Fragmentationen resultieren aus der Fragmentierung nach positiver Ionisierung. NI, negative Ionisation; PI, positive Ionisation; -, kein Addukt detektiert. Die Summenformel wurde nur dann von der Software akzeptiert, wenn die Abweichung zwischen des erfassten  $m/z$ -Verhältnisses und des kalkulierten  $m/z$ -Verhältnisses nicht mehr als 3,0 mDa betrug.

| PAT-Adenin-Monoaddukte |                 |               |                  |                  |                      |                      |
|------------------------|-----------------|---------------|------------------|------------------|----------------------|----------------------|
| Peaknr.                | Polarität       | $m/z$ erfasst | $m/z$ kalkuliert | Abweichung (mDa) | Summenformel         |                      |
| 1.1                    | NI              | 278,0888      | 278,0889         | -0,1             | $C_{11}H_{12}N_5O_4$ |                      |
|                        | PI              | 280,1049      | 280,1046         | +0,3             | $C_{11}H_{14}N_5O_4$ |                      |
|                        | Fragmentationen |               |                  |                  |                      |                      |
|                        |                 |               | 262,0939         | 262,0940         | -0,1                 | $C_{11}H_{12}N_5O_3$ |
|                        |                 |               | 244,0838         | 244,0834         | +0,4                 | $C_{11}H_{10}N_5O_2$ |
|                        |                 |               | 234,0992         | 234,0991         | +0,1                 | $C_{10}H_{12}N_5O_2$ |
|                        |                 |               | 216,0901         | 216,0885         | +1,6                 | $C_{10}H_{10}N_5O$   |
|                        |                 |               | 206,1043         | 206,1042         | +0,1                 | $C_9H_{12}N_5O$      |
|                        |                 |               | 136,0625         | 136,0623         | +0,2                 | $C_5H_6N_5$          |
|                        |                 |               | 127,0395         | 127,0395         | +0,0                 | $C_6H_7O_3$          |
|                        |                 | 109,0290      | 109,0290         | +0,0             | $C_6H_5O_2$          |                      |
| 1.2                    | NI              | -             | -                | -                | -                    |                      |
|                        | PI              | 280,1046      | 280,1046         | +0,0             | $C_{11}H_{14}N_5O_4$ |                      |
|                        | Fragmentationen |               |                  |                  |                      |                      |
|                        |                 |               | 262,0944         | 262,0940         | +0,4                 | $C_{11}H_{12}N_5O_3$ |
|                        |                 |               | 234,0989         | 234,0991         | +0,2                 | $C_{10}H_{12}N_5O_2$ |
|                        |                 |               | 206,1046         | 206,1042         | +0,4                 | $C_9H_{12}N_5O$      |
|                        |                 |               | 136,0623         | 136,0623         | +0,0                 | $C_5H_6N_5$          |
|                        |                 |               | 127,0396         | 127,0395         | +0,1                 | $C_6H_7O_3$          |
|                        |                 | 109,0288      | 109,0290         | -0,2             | $C_6H_5O_2$          |                      |
| 1.3                    | NI              | 278,0885      | 278,0889         | -0,4             | $C_{11}H_{12}N_5O_4$ |                      |
|                        | PI              | 280,1047      | 280,1046         | +0,1             | $C_{11}H_{14}N_5O_4$ |                      |
|                        | Fragmentationen |               |                  |                  |                      |                      |

ANHANG

|  |  |          |          |      |   |
|--|--|----------|----------|------|---|
|  |  | 262,0941 | 262,0940 | +0,1 | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> |
|  |  | 244,0833 | 244,0834 | -0,1 | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> |
|  |  | 234,0988 | 234,0991 | -0,3 | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> |
|  |  | 206,1045 | 206,1042 | +0,3 | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O               |
|  |  | 136,0626 | 136,0623 | +0,3 | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub>                  |
|  |  | 127,0395 | 127,0395 | +0,0 | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>                  |
|  |  | 109,0290 | 109,0290 | +0,0 | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>                  |

PAT-Adenin-Diaddukte

| Peaknr. | Polarität | m/z erfasst     | m/z kalkuliert | Abweichung (mDa) | Summenformel   |
|---------|-----------|-----------------|----------------|------------------|--|
| 2.1     | NI        | -               | -              | -                | -  |
|         | PI        | 397,1492        | 397,1499       | -0,7             | C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>3</sub> |
|         |           | Fragmentationen |                |                  |  |
|         |           | 262,0942        | 262,0940       | +0,2             | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>  |
|         |           | 244,0819        | 244,0834       | -1,5             | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>  |
|         |           | 234,1021        | 234,0991       | -3,0             | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>  |
|         |           | 206,1059        | 206,1042       | +1,7             | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O                |
|         |           | 136,0623        | 136,0623       | +0,0             | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub>                   |
|         |           | 127,0359        | 127,0395       | -3,6             | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>                   |
|         |           | 109,0285        | 109,0290       | -0,5             | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>                   |

cyclische GSH-PAT-Adenin-Addukte

| Peaknr. | Polarität | m/z erfasst     | m/z kalkuliert | Abweichung (mDa) | Summenformel  |
|---------|-----------|-----------------|----------------|------------------|---|
| 5.1     | NI        | 549,1511        | 549,1516       | -0,5             | C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> S |
|         | PI        | 551,1671        | 551,1673       | -0,2             | C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> S |
|         |           | Fragmentationen |                |                  |   |
|         |           | 476,1339        | 476,1352       | -1,3             | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> S |
|         |           | 416,1132        | 416,1128       | +0,4             | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S |
|         |           | 398,1045        | 398,1022       | +2,3             | C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S |
|         |           | 341,0798        | 341,0807       | -0,9             | C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S |
|         |           | 323,0699        | 323,0702       | -0,3             | C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S |
|         |           | 313,0866        | 313,0858       | +0,8             | C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S |
|         |           | 295,0754        | 295,0753       | +0,1             | C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S |
|         |           | 287,0708        | 287,0702       | +0,6             | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S |
|         |           | 269,0599        | 269,0596       | +0,3             | C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S |
|         |           | 136,0623        | 136,0623       | +0,0             | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub>                    |

lineares GSH-PAT-Addukt

| Peaknr. | Polarität | m/z erfasst     | m/z kalkuliert | Abweichung (mDa) | Summenformel   |
|---------|-----------|-----------------|----------------|------------------|--|
| 3       | NI        | 450,1170        | 450,1182       | -1,2             | C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S |
|         | PI        | 452,1336        | 452,1339       | -0,3             | C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S |
|         |           | Fragmentationen |                |                  |  |
|         |           | 377,0994        | 377,1019       | -2,5             | C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S  |
|         |           | 287,0700        | 287,0702       | -0,2             | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S  |
|         |           | 269,0589        | 269,0596       | -0,7             | C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S  |

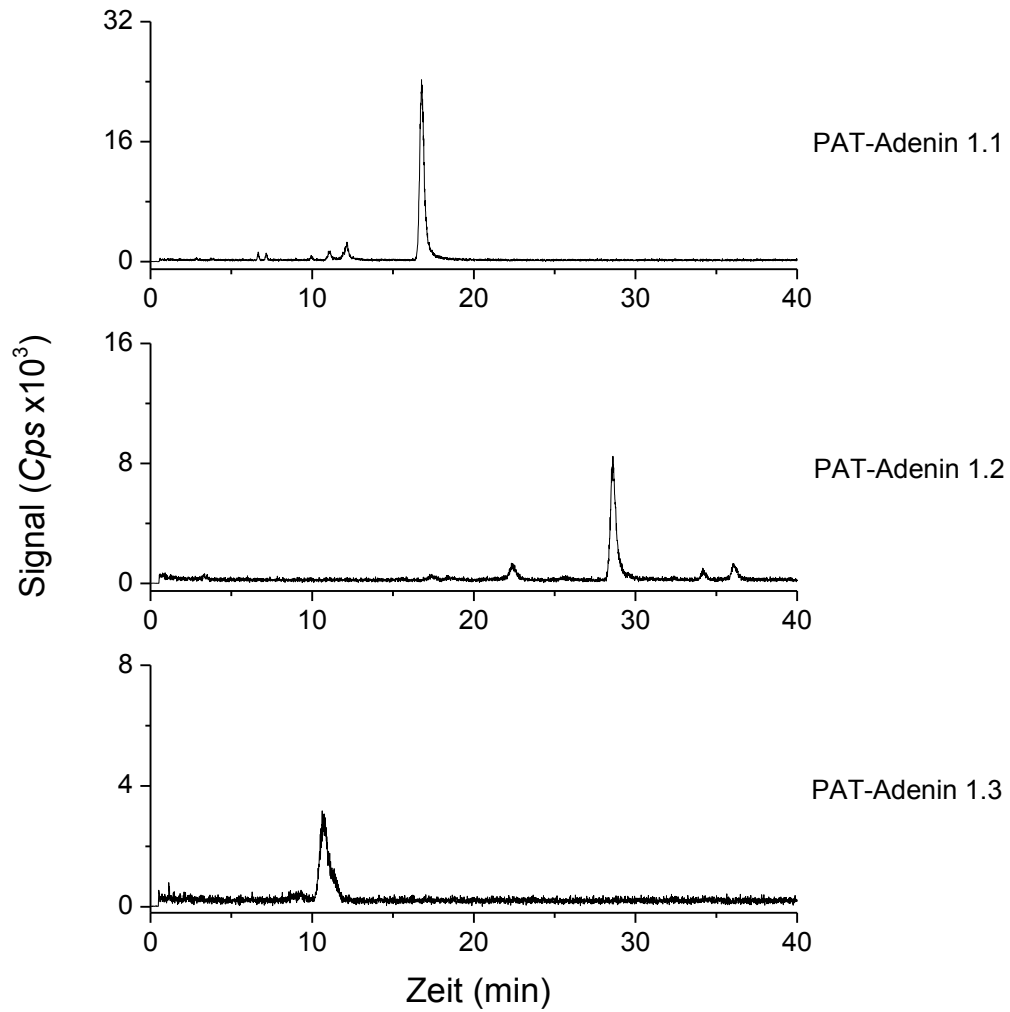
ANHANG

---

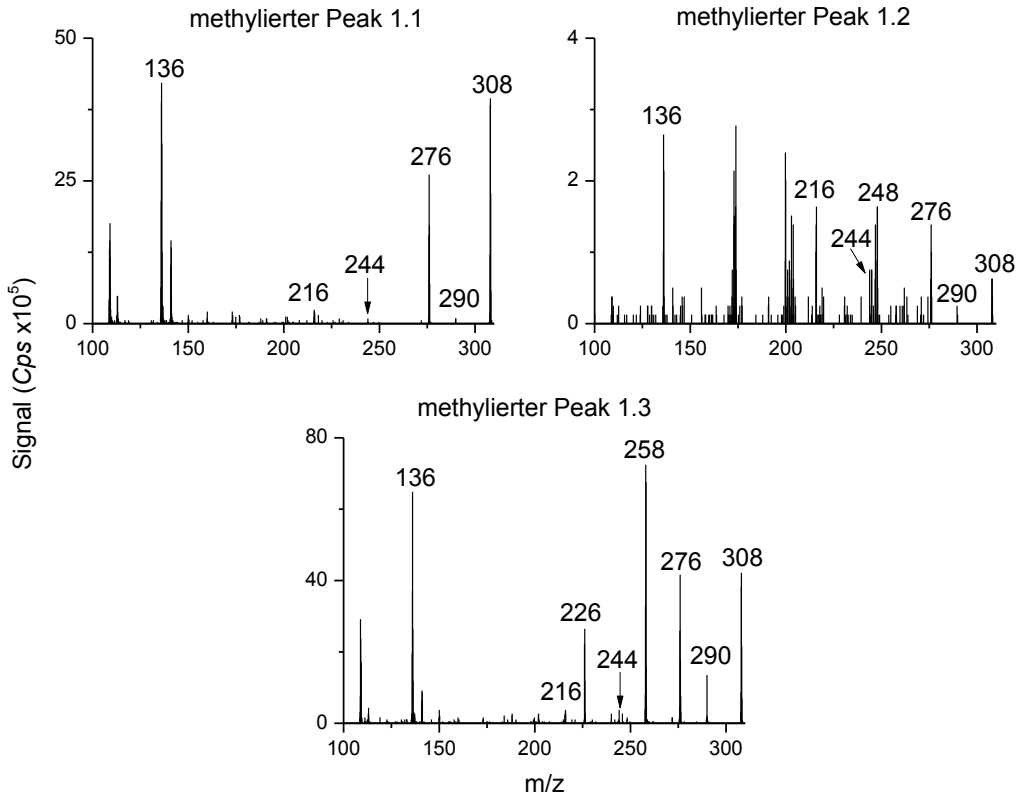
cyclisches GSH-PAT-Addukt

| Peaknr. | Polarität       | <i>m/z</i> erfasst | <i>m/z</i> kalkuliert | Abweichung (mDa) | Summenformel  |
|---------|-----------------|--------------------|-----------------------|------------------|---|
| 4.1/2   | NI              | 432,1075           | 432,1077              | -0,2             | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S |
|         | PI              | 434,1224           | 434,1233              | -0,9             | C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S |
|         | Fragmentationen |                    |                       |                  |   |
|         |                 | 416,1139           | 416,1128              | +1,1             | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S |
|         |                 | 359,0904           | 359,0913              | -0,9             | C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S |
|         |                 | 341,0800           | 341,0807              | -0,7             | C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S |
|         |                 | 331,0943           | 331,0964              | -2,1             | C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S |
|         |                 | 313,0838           | 313,0858              | -2,0             | C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S |
|         |                 | 295,0743           | 295,0853              | -1,0             | C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S |
| 4.2     | NI              | 432,1078           | 432,1077              | +0,1             | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S |
|         | PI              | 434,1217           | 434,1233              | -1,6             | C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S |

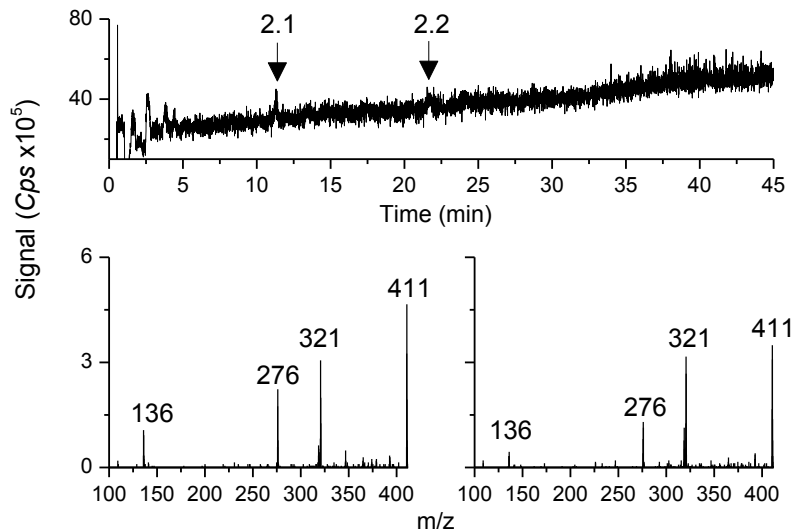
A1.2 MRM-Chromatogramme ( $m/z$  308  $[M + H]^+ > 136$  [Adenin + H] $^+$ , Kollisionsenergie 35 V, Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1) der zweifach-methylierten PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2 und 1.3.



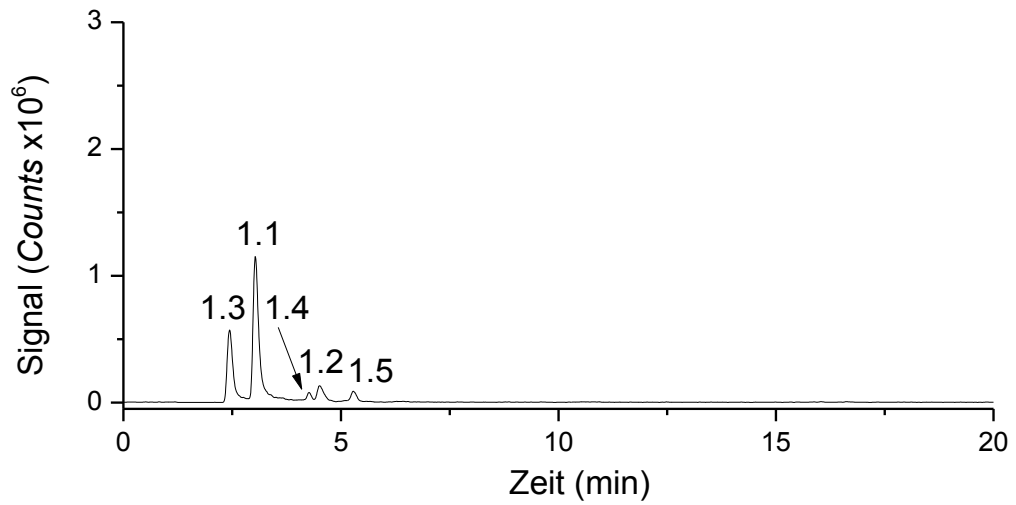
A1.3 Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions der methylierten PAT-Adenin-Addukte 1.1, 1.2 und 1.3 mit  $m/z$  308 (*enhanced* Produktionscan, CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Fragmentationen:  $m/z$  308  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  290  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  276  $[M+H-OCH_3]^+$ ,  $m/z$  258  $[M+H-OCH_3-H_2O]^+$ ,  $m/z$  248  $[M+H-OCH_3-CO]^+$ ,  $m/z$  244  $[M+H-2OCH_3]^+$ ,  $m/z$  226  $[M+H-2OCH_3-H_2O]^+$ ,  $m/z$  216  $[M+H-2OCH_3-CO]^+$ ,  $m/z$  136  $[Adenin+H]^+$ .



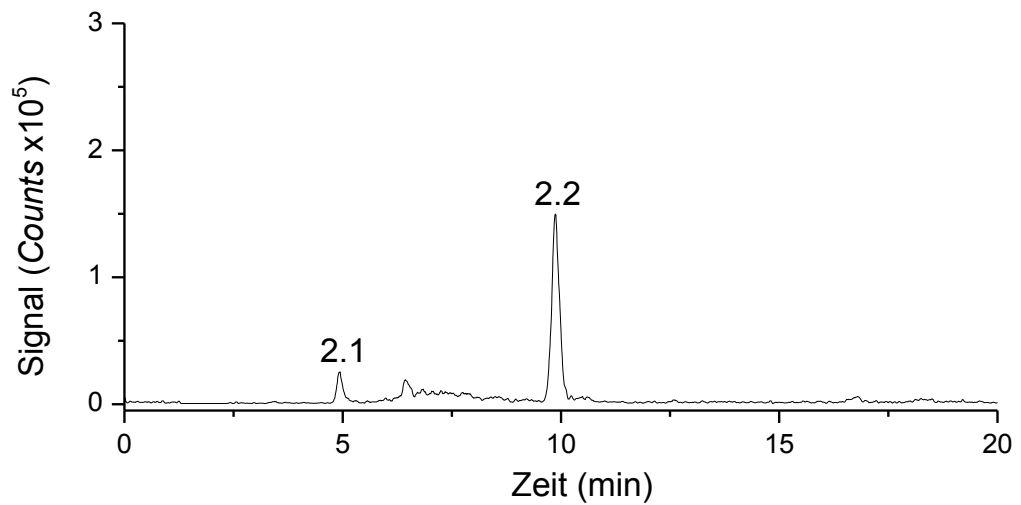
A1.4 TIC des *enhanced* Produktionscans mit  $m/z$  411 und Produktionsmassenspektren nach Methylierung eines Inkubationsansatzes von PAT und Adenin mit den einfach-methylierten Diaddukten 2.1 und 2.2. Fragmentationen:  $m/z$  411  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  276  $[M+H-Adenin]^+$ ,  $m/z$  136  $[Adenin+H]^+$ . Das Fragmentation mit  $m/z$  321 war auch im Rauschen vorhanden und ist somit kein spezifisches Fragmentation der PAT-Adenin Diaddukte. HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1.



- A1.5 (A) EIC mit  $m/z$  280 der PAT-Adenin-Reaktionsprodukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit Adenin und GSH (je 0,8 mM) gebildet wurden. Extraktion aus den Vollscan-Daten (**Abb. 6**).



- (B) EIC mit  $m/z$  397 der PAT-Adenin-Reaktionsprodukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit Adenin und GSH (je 0,8 mM) gebildet wurden. Extraktion aus den Vollscan-Daten (**Abb. 6**).



ANHANG

A1.6 Peakflächen der PAT-Adenin-Monoaddukten (PA) bei zeitabhängiger Bildung nach Inkubation von PAT mit Adenin und GSH über 48 h.

| Zeit (h) | Analyse | Peakflächen (counts*sek) |                        |                        |                        |                  | MW    | Stabw |
|----------|---------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------|-------|-------|
|          |         | PA 1.3<br>(Rt 2,4 min)   | PA 1.1<br>(Rt 2,9 min) | PA 1.2<br>(Rt 4,6 min) | PA 1.5<br>(Rt 5,2 min) | Summe<br>Addukte |       |       |
| 0        | 1       | n.d.                     | n.d.                   | n.d.                   | n.d.                   | -                |       |       |
|          | 2       | n.d.                     | n.d.                   | n.d.                   | n.d.                   | -                | -     | -     |
|          | 3       | n.d.                     | n.d.                   | n.d.                   | n.d.                   | -                |       |       |
| 0,2      | 1       | n.d.                     | n.d.                   | n.d.                   | n.d.                   | -                |       |       |
|          | 2       | n.d.                     | n.d.                   | n.d.                   | n.d.                   | -                | -     | -     |
|          | 3       | n.d.                     | n.d.                   | n.d.                   | n.d.                   | -                |       |       |
| 0,5      | 1       | 11                       | 24                     | n.d.                   | 30                     | 65               |       |       |
|          | 2       | n.d.                     | 60                     | n.d.                   | 26                     | 86               | 113   | 66    |
|          | 3       | 36                       | 109                    | n.d.                   | 43                     | 188              |       |       |
| 1        | 1       | 26                       | 43                     | n.d.                   | 99                     | 168              |       |       |
|          | 2       | 31                       | 56                     | n.d.                   | 121                    | 208              | 189   | 20    |
|          | 3       | 23                       | 51                     | n.d.                   | 117                    | 191              |       |       |
| 2        | 1       | 264                      | 549                    | n.d.                   | 330                    | 1143             |       |       |
|          | 2       | 90                       | 229                    | n.d.                   | 345                    | 664              | 792   | 308   |
|          | 3       | 64                       | 193                    | n.d.                   | 312                    | 569              |       |       |
| 5        | 1       | 512                      | 1832                   | n.d.                   | 1122                   | 3466             |       |       |
|          | 2       | 501                      | 1590                   | n.d.                   | 1081                   | 3172             | 3364  | 167   |
|          | 3       | 501                      | 1804                   | n.d.                   | 1150                   | 3455             |       |       |
| 15       | 1       | 2181                     | 8904                   | n.d.                   | 2359                   | 13444            |       |       |
|          | 2       | 2425                     | 9967                   | n.d.                   | 2515                   | 14907            | 14176 | 732   |
|          | 3       | 2241                     | 9565                   | n.d.                   | 2370                   | 14176            |       |       |
| 24       | 1       | 4127                     | 14579                  | 3377                   | 3796                   | 25879            |       |       |
|          | 2       | 3827                     | 14782                  | 3045                   | 3330                   | 24984            | 25787 | 761   |
|          | 3       | 4131                     | 15683                  | 2982                   | 3701                   | 26497            |       |       |
| 48       | 1       | 11323                    | 38154                  | 9194                   | 6747                   | 65418            |       |       |
|          | 2       | 11495                    | 37558                  | 10841                  | 6811                   | 66705            | 66069 | 644   |
|          | 3       | 11527                    | 38725                  | 9154                   | 6677                   | 66083            |       |       |

A1.7 Peakflächen der PAT-Adenin-Monoaddukte und -Diaddukte in den Inkubationsmischungen PAT+Adenin und PAT+GSH+Adenin (Kapitel 6.2.3.1). Integration aus den entsprechenden EIC mit  $m/z$  280 (Monoaddukte) bzw 397 (Diaddukte). RT, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten.

| Addukt         | Rt (min) | Fläche (FE) im<br>Ansatz PAT+Adenin | Fläche (FE) im<br>Ansatz PAT+GSH+Adenin |
|----------------|----------|-------------------------------------|---|
| Monoaddukt 1.3 | 2,4      | 8839420                             | 4961290                                 |
| Monoaddukt 1.1 | 3,0      | 19236100                            | 10170600                                |
| Monoaddukt 1.4 | 4,2      | 766301                              | 328625                                  |
| Monoaddukt 1.2 | 4,5      | 3025730                             | 999304                                  |
| Monoaddukt 1.5 | 5,2      | 1232550                             | 631054                                  |
| Diaddukt 2.1   | 4,9      | 310499                              | 241128                                  |
| Diaddukt 2.2   | 9,9      | 3611660                             | 1842770                                 |

ANHANG

A1.8 Charakterisierung der GSH-PAT-Addukte, welche als isolierte Standardreferenzen (Fliege und Metzler, 2000b) zur Verfügung standen. Da die Standards mit zwei verschiedenen LC-MS-Geräten (Agilent HPLC-MS-System Kapitel 6.2.1.3, Shimadzu UHPLC mit ABSciex MS Kapitel 6.2.1.5) gearbeitet wurde, sind die Retentionszeiten für jedes System angegeben. Auflistung der *m/z*-Verhältnisse der Molekülonen und der intensivsten Fragmentionen. Adduktstrukturen siehe **Abb. 3**. TEEK, Thioenoletherketon; KHA, Ketohehexansäure-Derivat; DHP, Dihydropyranon; TEEI, Thioenoletherimin; n (SG), Anzahl an GSH-Molekülen im Addukt; MG, Molekulargewicht; Rt, Retentionszeit; Gly, Glycin; Glu, Glutaminsäure.

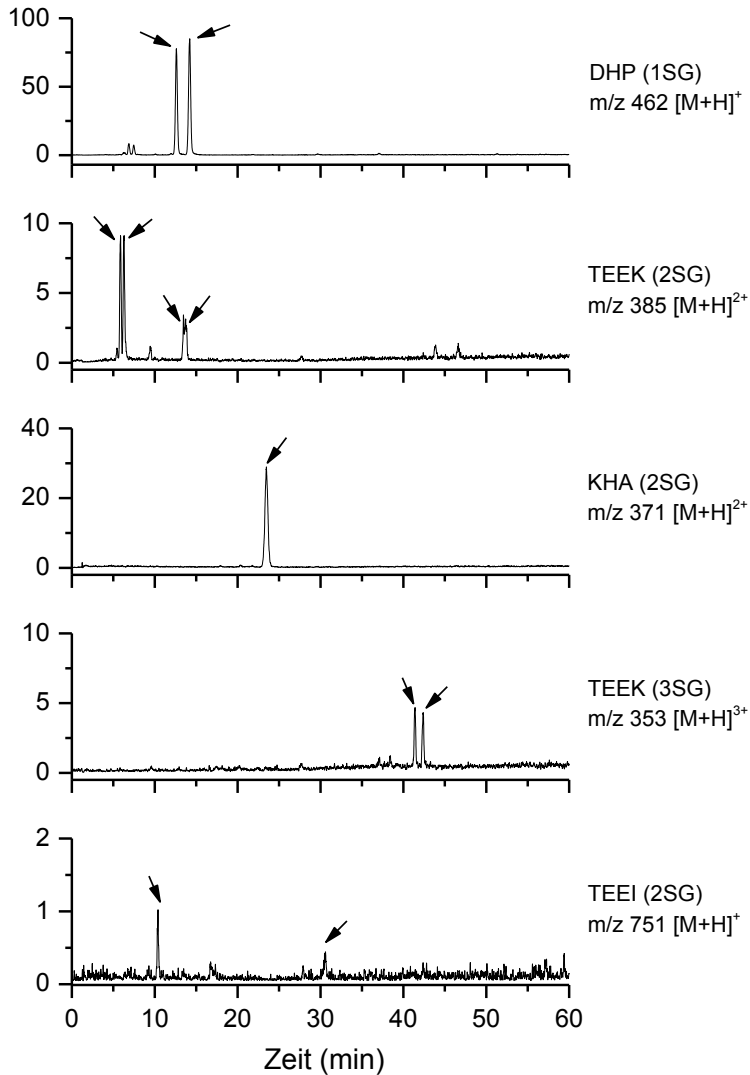
| Struktur | n (SG)   | MG   | Rt (min) HPLC-MS                  | Rt (min) UHPLC-MS                   | <i>m/z</i> Molekülon    | <i>m/z</i> Fragmentionen | Fragment  |
|----------|--|------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------|---|
| TEEK     | 2  | 769  | 5,9; 6,3; 9,3; 9,5;<br>13,5; 13,7 | 7,5; 8,1; 10,7; 11,5;<br>18,8; 19,4 | 385 [M+H] <sup>2+</sup> | 565                      | [M + H - Gly - Glu] <sup>+</sup>                    |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 475                      | [M + H - 2Glu - 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>     |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 462                      | [M + H - GSH] <sup>+</sup>                          |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 387                      | [M + H - GSH - Gly] <sup>+</sup>                    |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 369                      | [M + H - GSH - Gly - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 315                      | [M + H - GSH - Glu] <sup>+</sup>                    |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 298                      | [M + H - GSH - Glu - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 130                      | [Pyroglutamat + H] <sup>+</sup>                     |
| TEEK     | 3  | 1057 | 41,4; 42,4                        | 31,8; 33,8                          | 353 [M+H] <sup>3+</sup> | 130                      | [Pyroglutamat + H] <sup>+</sup>                     |
| KHA      | 2  | 740  | 23,5                              | 29,0                                | 371 [M+H] <sup>2+</sup> | 612                      | [M + H - Glu] <sup>+</sup>                          |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 594                      | [M + H - Glu - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>       |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 537                      | [M + H - Gly - Glu] <sup>+</sup>                    |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 434                      | [M + H - GSH] <sup>+</sup>                          |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 416                      | [M + H - GSH - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>       |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 359                      | [M + H - GSH - Gly] <sup>+</sup>                    |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 341                      | [M + H - GSH - Gly - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 308                      | [M + H - GSH] <sup>+</sup>                          |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 305                      | [M + H - GSH - Glu] <sup>+</sup>                    |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 287                      | [M + H - GSH - Glu - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> |
| 269      | [M + H - GSH - Glu - 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> |      |                                   |                                     |                         |                          |   |
|          |  |      |                                   |                                     |                         | 130                      | [Pyroglutamat + H] <sup>+</sup>                     |



ANHANG

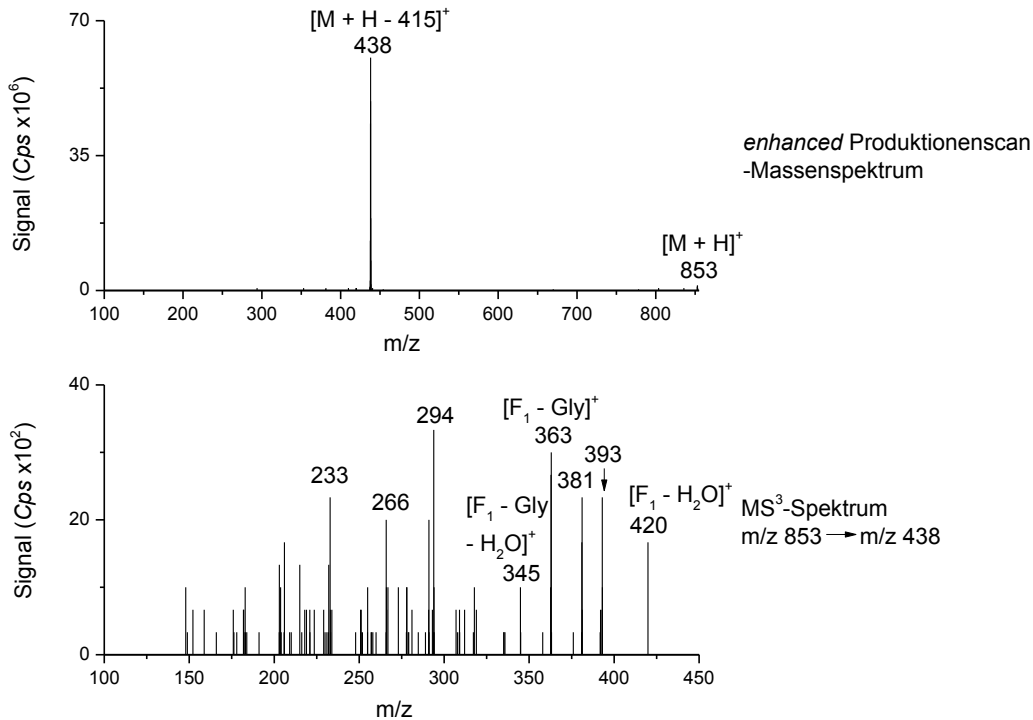
|        |                                 |     |            |                          |                         |     |  |
|--------|---------------------------------|-----|------------|--------------------------|-------------------------|-----|--|
| DHP    | 1                               | 461 | 12,6; 14,2 | 16,3; 18,5               | 462 [M+H] <sup>+</sup>  | 387 | [M + H - Gly] <sup>+</sup>   |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 369 | [M + H - Gly - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                          |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 333 | [M + H - Glu] <sup>+</sup>   |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 315 | [M + H - Glu - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                          |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 297 | [M + H - Glu - 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                         |
| TEEI   | 2                               | 750 | 10,5; 30,7 | 9,5; 13,8; 27,3;<br>31,9 | 376 [M+H] <sup>2+</sup> | 676 | [M + H - Gly] <sup>+</sup>   |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 658 | [M + H - Gly - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                          |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 622 | [M + H - Glu] <sup>+</sup>   |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 601 | [M + H - 2Gly] <sup>+</sup>  |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 547 | [M + H - Gly - Glu] <sup>+</sup>                                       |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 529 | [M + H - Gly - Glu - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                    |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 519 | [M + H - Gly - Glu - CO] <sup>+</sup>                                  |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 511 | [M + H - Gly - Glu - H <sub>2</sub> O - CO] <sup>+</sup>               |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 444 | [M + H - GSH] <sup>+</sup>   |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 426 | [M + H - GSH - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                          |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 390 | [M + H - GSH - 3H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                         |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 372 | [M + H - GSH - 4H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                         |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 323 | [M + H - GSH - Gly - H <sub>2</sub> O - CO] <sup>+</sup>               |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 308 | [GSH + H] <sup>+</sup>   |
| 130    | [Pyroglutamat + H] <sup>+</sup> |     |            |                          |                         |     |  |
| c-TEEK | 2                               | 621 | 30,9; 31,9 | 33,5; 34,3               | 622 [M+H] <sup>+</sup>  | 604 | [M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 547 | [M + H - Gly] <sup>+</sup>   |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 493 | [M + H - Glu] <sup>+</sup>   |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 475 | [M + H - Glu - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                          |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 347 | [M + H - γ-Glu-dehydroAla-Gly] <sup>+</sup>                            |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 315 | [M + H - GSH] <sup>+</sup>   |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 297 | [M + H - GSH - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                          |
|        |                                 |     |            |                          |                         | 287 | [M + H - γ-Glu-dehydroAla-Gly -<br>CH <sub>2</sub> -COOH] <sup>+</sup> |

A1.9 EIC der  $m/z$ -Verhältnisse der publizierten GSH-PAT-Addukte (Fliege und Metzler, 2000b), welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit Adenin und GSH (je 0,8 mM) gebildet wurden (Kapitel 6.2.3.1). Extraktion aus den Vollscan-Daten (**Abb. 6**). Adduktstrukturen siehe **Abb. 3**. TEEK, Thioenoletherketon; KHA, Ketohexansäure-Derivat; DHP, Dihydropyranon; TEEI, Thioenoletherimin. 1/2/3SG; Anzahl der konjugierten GSH-Moleküle. Die Pfeile markieren die identifizierten Addukte.

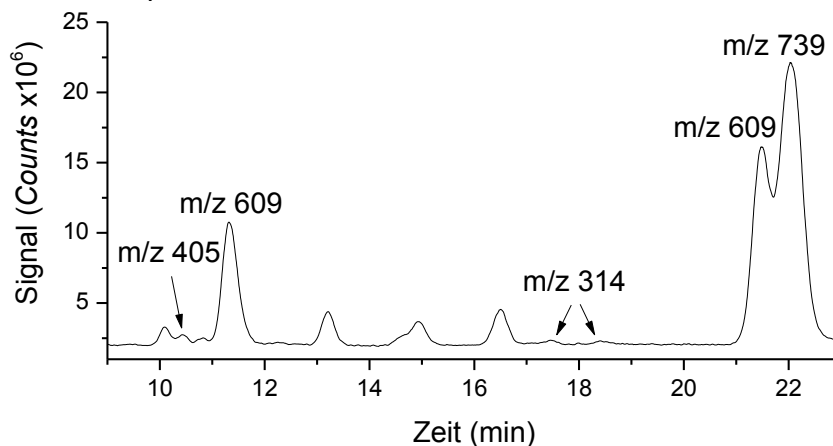


A1.10 Oben: Massenspektrum nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Moleküliions des GSH-PAT-Adduktes 8 mit  $m/z$  853 (*enhanced* Produktionenscan, CE 15 V). Fragmentationen:  $m/z$  438  $[M + H - 415]^+$ .

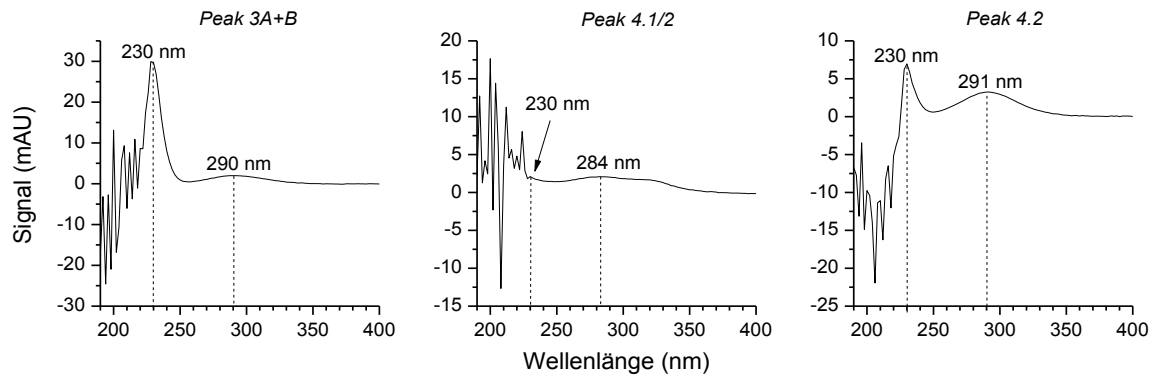
Unten: MS<sup>3</sup>-Spektren des GSH-PAT-Adduktes 8 mit  $m/z$  853  $\rightarrow$   $m/z$  438 (MS<sup>3</sup>-Experiment, CE 15 V). Aus dem primären Fragmentation ( $F_1$ )  $m/z$  438  $[M + H - Adenin]^+$  sind u.a. die sekundären Fragmentationen  $m/z$  363  $[F_1 - Gly]^+$  und  $m/z$  345  $[F_1 - Gly - H_2O]^+$  entstanden. Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 2.



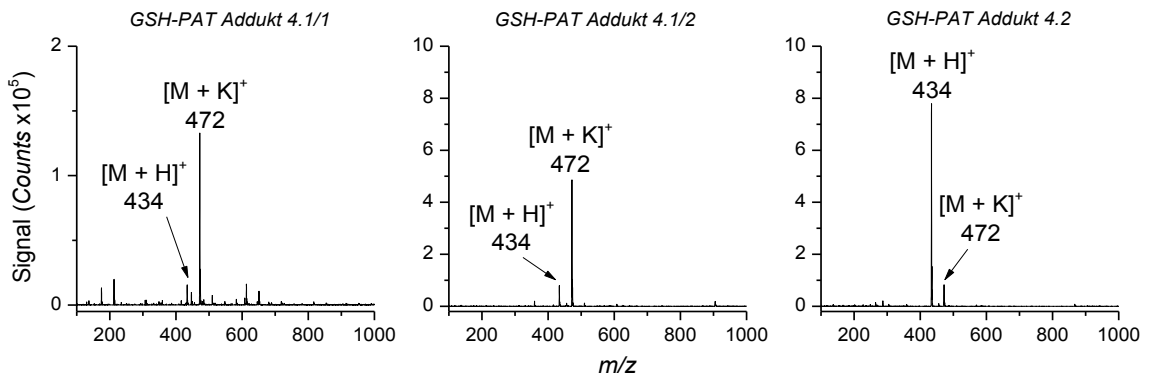
A1.11 TIC des Vollscans einer Inkubation von PAT mit  $\gamma$ -Glu-Cys. Im Bereich von 9-23 min eluieren: i) ein Addukt von PAT mit  $\gamma$ -Glu-Cys mit DHP-Struktur ( $m/z$  405), Differenz zum GSH-PAT Addukts ( $m/z$  462) = 57 Da; ii) die den 6,7- bzw. 5,7-cyclischen, disubstituierten Reaktionsprodukten 6.1 und 6.2 ( $m/z$  723) entsprechenden diastereomeren  $\gamma$ -Glu-Cys-PAT-Addukte, Differenz zum GSH-PAT Addukt = 114 Da ( $m/z$  609); iii) die disubstituierten  $\gamma$ -Glu-Cys-PAT-Addukte mit KHA-Struktur, Differenz des zweifach-geladene Molekülionen ( $m/z$  314) zum GSH-PAT-Addukt = 114 Da; iv) sowie ein Peak mit einem Moleküliion mit  $m/z$  739, Differenz zum GSH-PAT-Reaktionsprodukt 8 ( $m/z$  853) = 114 Da. HPLC-MS-Methode Kapitel 6.2.1.3.



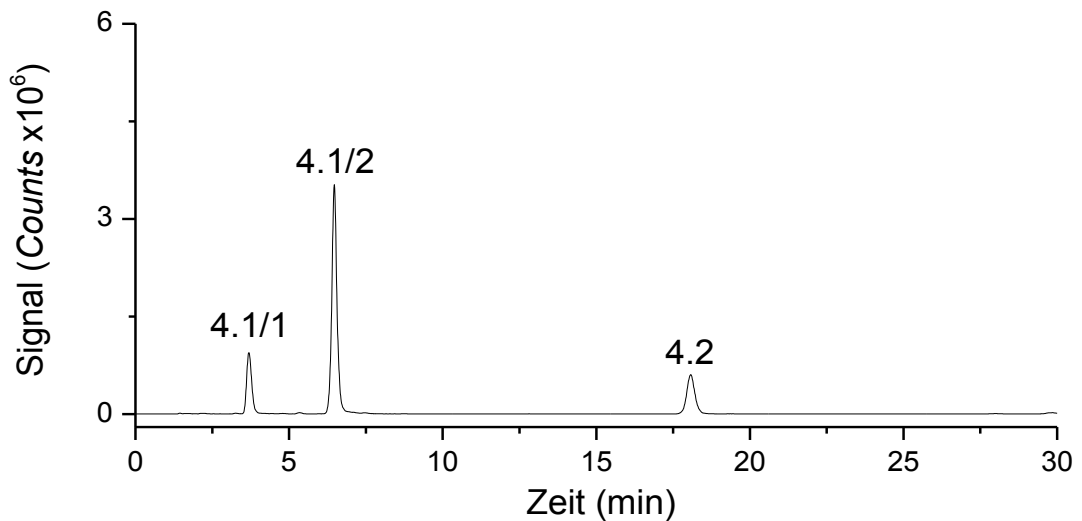
A1.12 UV-Spektren der GSH-PAT-Addukte 3, 4.1/2 und 4.2 aus **Abb. 6**.



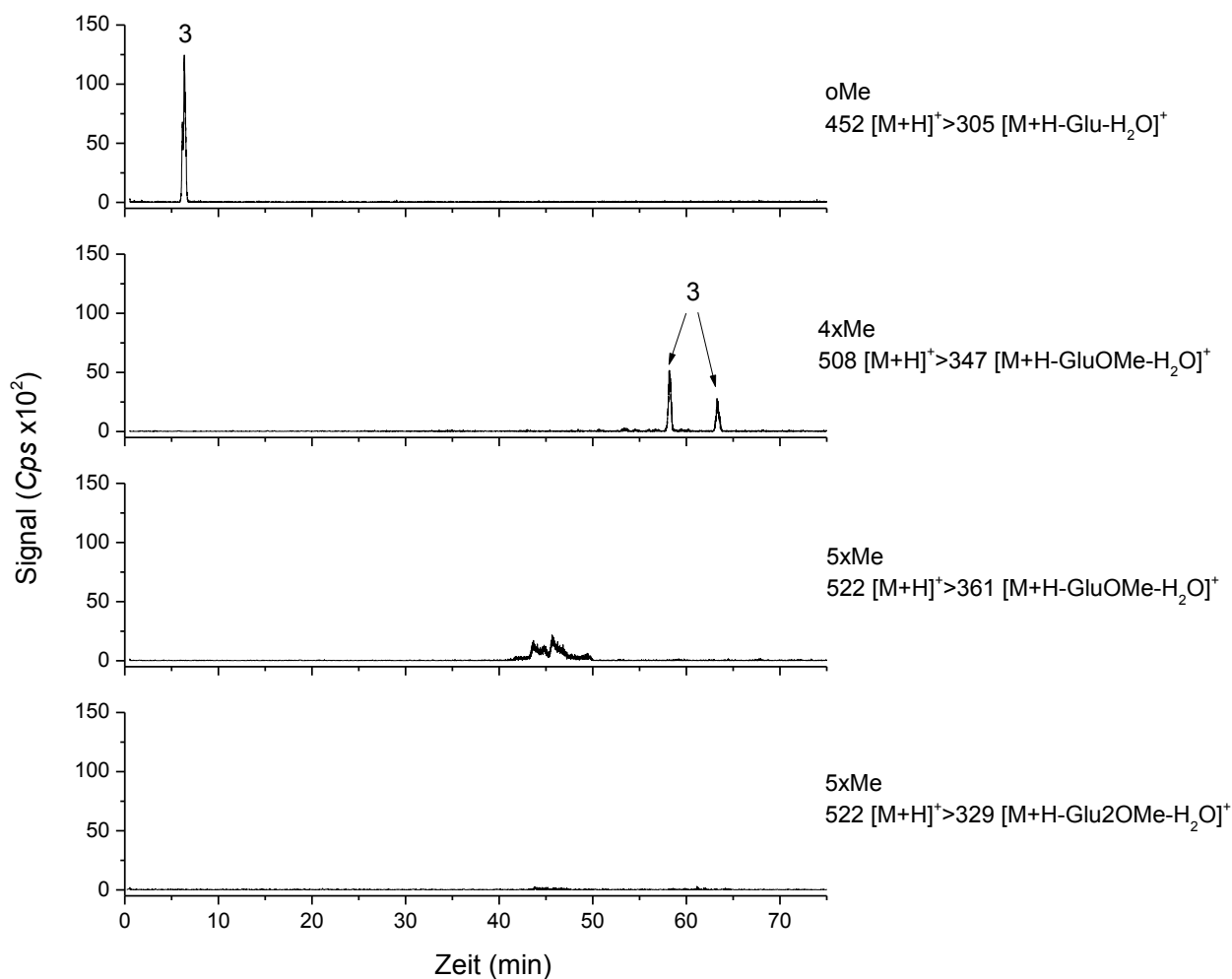
A1.13 Vollscan-Massenspektren der GSH-PAT-Addukt 4.1/1, 4.1/2 und 4.2 aus **Abb. 25**.



A1.14 EIC auf das Kaliumaddukt des Molekülon ([M + K]<sup>+</sup>, m/z 434) mit m/z 472 der GSH-PAT-Reaktionsprodukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) mit GSH (0,8 mM) gebildet wurden. Extraktion aus den Vollscan-Daten (**Abb. 6**). Die Peaknummer 4.1 und 4.2 entsprechen denen von **Abb. 25**. Bei 4.1/1 und 4.1/2 handelt es sich um Diastereomere.



A1.15 MRM-Chromatogramme des methylierten isolierten GSH-PAT-Addukts 3. Dargestellt sind jeweils die Reste des unmethylierten Addukts (oMe;  $m/z$  452>305 CE 23 V), sowie das an vier Positionen methylierte Addukt (4xMe; die diastereomeren Formen eluieren nach der Methylierung getrennt) mit dem entsprechenden methylierten Übergang ( $m/z$  508>347 CE 20 V). Zusätzlich wurde noch auf die Übergänge eines fünffach-methylierten Adduktes geschaut (5xMe), für den Fall dass neben den drei Carboxylgruppen und einer Ketogruppe noch eine weitere Carboxyl- oder Ketogruppe bzw. die freie Aminogruppe der Glutaminsäure methyliert wurde ( $m/z$  522>361 CE 20 V;  $m/z$  522>329 CE 20 V). HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1.



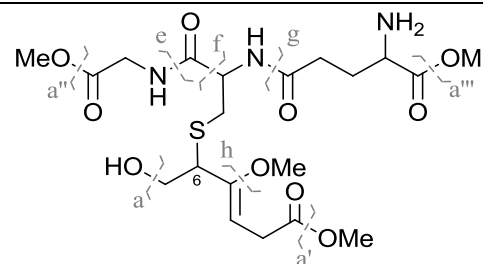
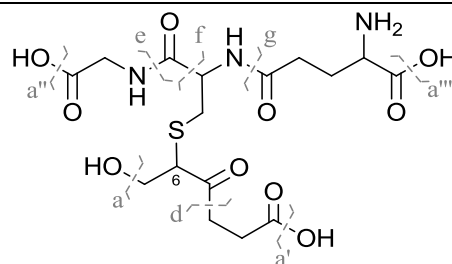
ANHANG

A1.16 Molekülonen ( $[M + H]^+$ ) und Fragmentionen des /GSH-PAT-Addukts 3 ohne und nach Methylierung mit Diazomethan und HPLC-MS/MS Analyse im enhanced Produktionenscan Modus (CE 15 V, Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Die Differenz ( $\Delta$ ) der Molekül- und Fragmentionen im  $m/z$ -Verhältnis von 56, 42 oder 28 Da weist auf zwei, drei bzw. vier methylierte funktionelle Gruppen in den Molekül- oder Fragmentionen hin. n.m., Fragmentierung nicht möglich. n.d., Fragmention nicht detektiert.

/GSH-PAT 3

Ohne Methylierung

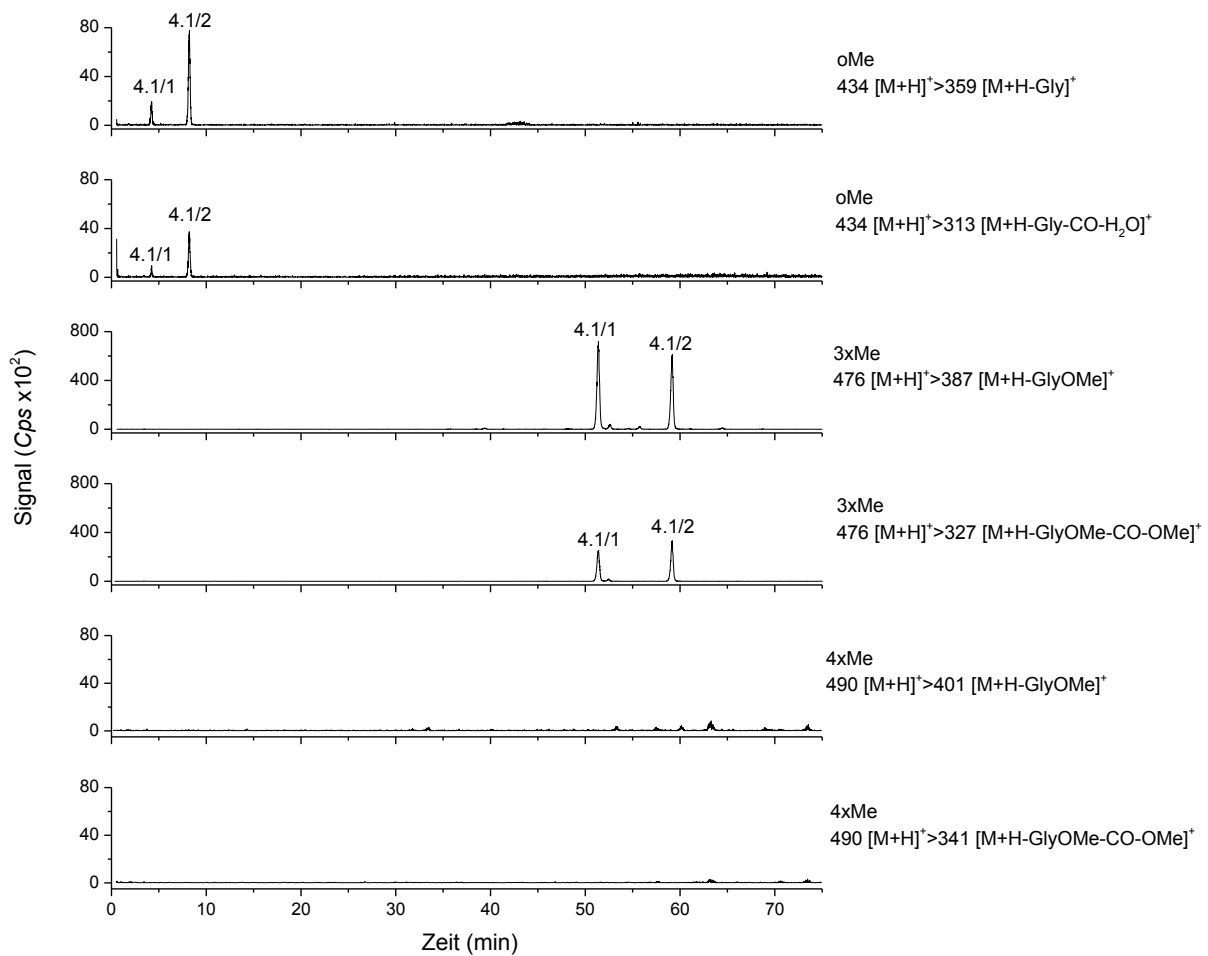
Mit Methylierung



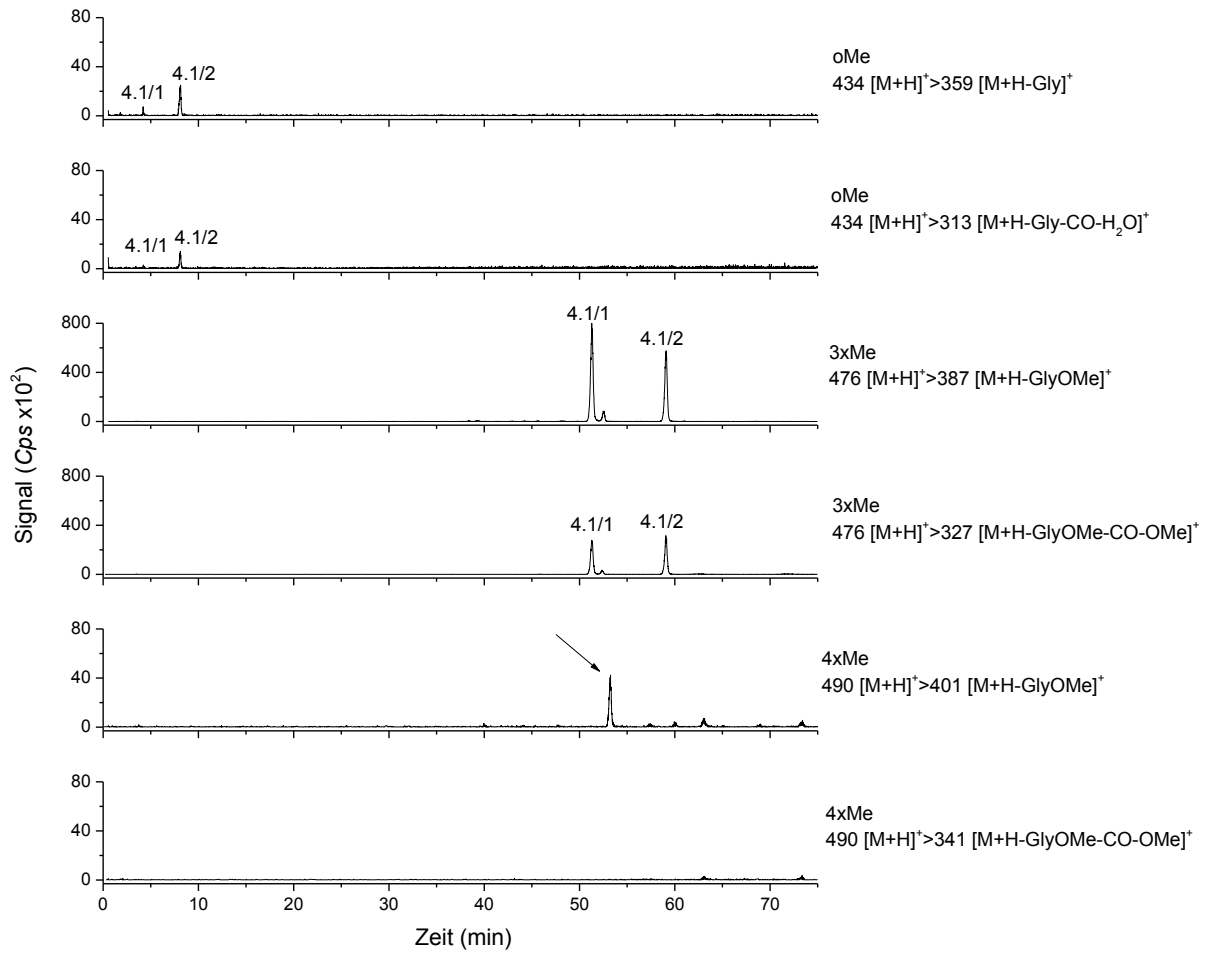
| Spaltposition | (Fragment)ion                 | $m/z$ | (Fragment)ion        | $m/z$ | $\Delta$ (Da) |
|---------------|-------------------------------|-------|----------------------|-------|---------------|
| ---           | $[M+H]^+$                     | 452   | $[M+H]^+$            | 508   | 56            |
| a             | $[-H_2O]^+$                   | 434   | $[-H_2O]^+$          | n.d.  | ---           |
| a', a'', a''' | $[-H_2O]^+$                   | 434   | $[-OMe]^+$           | n.d.  | ---           |
| e             | $[-Gly]^+$                    | 377   | $[-Gly]^+$           | 419   | 42            |
| e+a           | $[-Gly-H_2O]^+$               | 359   | $[-Gly-H_2O]^+$      | n.d.  | ---           |
| e+a'/a'''     | $[-Gly-H_2O]^+$               | 359   | $[-Gly-OMe]^+$       | 387   | 28            |
| e+f+d         | $[-Gly-CO-C_2H_4COOH]^+$      | 275   | n.m.                 |       |               |
| e+f+d+a/a'''  | $[-Gly-CO-C_2H_4COOH-H_2O]^+$ | 257   | n.m.                 |       |               |
| e+h           | n.m.                          |       | $[-Gly-OMe]^+$       | 387   | ---           |
| g             | $[-Glu]^+$                    | 323   | $[-Glu]^+$           | n.d.  | ---           |
| g+a           | $[-Glu-H_2O]^+$               | 305   | $[-Glu-H_2O]^+$      | 347   | 42            |
| g+a'/a'''     | $[-Glu-H_2O]^+$               | 305   | $[-Glu-OMe]^+$       | n.d.  | ---           |
| g+h           | n.m.                          |       | $[-Glu-OMe]^+$       | n.d.  | ---           |
| g+a+a'/a'''   | $[-Glu-2H_2O]^+$              | 287   | $[-Glu-H_2O-OMe]^+$  | 315   | 28            |
| g+a+h         | n.m.                          |       | $[-Glu-H_2O-OMe]^+$  | 315   | ---           |
| g+a+a'/a'''+h | n.m.                          |       | $[-Glu-H_2O-2OMe]^+$ | 283   | ---           |
| g             | n.m.                          |       | $[-OMe]^+$           | n.d.  | ---           |

A1.17 MRM-Chromatogramme der methylierten isolierten GSH-PAT-Addukte 4.1/1 (A) und 4.1/2 (B). Dargestellt sind jeweils die Reste des unmethylierten Addukts (oMe) in den zwei intensivsten Übergängen ( $m/z$  434>359 CE 15 V;  $m/z$  434>313 CE 23 V), sowie das an drei Positionen methylierte Addukt (3xMe) mit den entsprechenden methylierten Übergängen ( $m/z$  476>387 CE 15 V;  $m/z$  476>327 CE 20 V). Zusätzlich wurde noch auf die Übergänge eines vierfach-methylierten Adduktes geschaut (4xMe), für den Fall dass neben den drei Carboxylgruppen noch eine weitere Carboxyl- oder Ketogruppe bzw. eine Aminogruppe methyliert wurde ( $m/z$  490>401 CE 15 V;  $m/z$  490>341 CE 20 V). HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1.

(A)



(B)

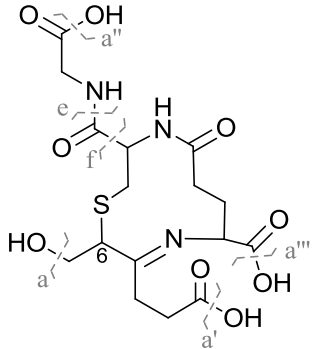
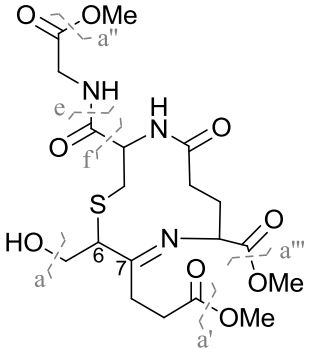


Da der markierte Peak in dem ersten Übergang der potentiellen vierfach-methylierten Addukten gleich bzw. früher als die dreifach-methylierten Addukte eluierten und zudem nur in einem Übergang auftraten, stellen diese Peaks vermutlich Verunreinigungen oder Systempeaks dar, jedoch keine vierfach-methylierten Addukte.

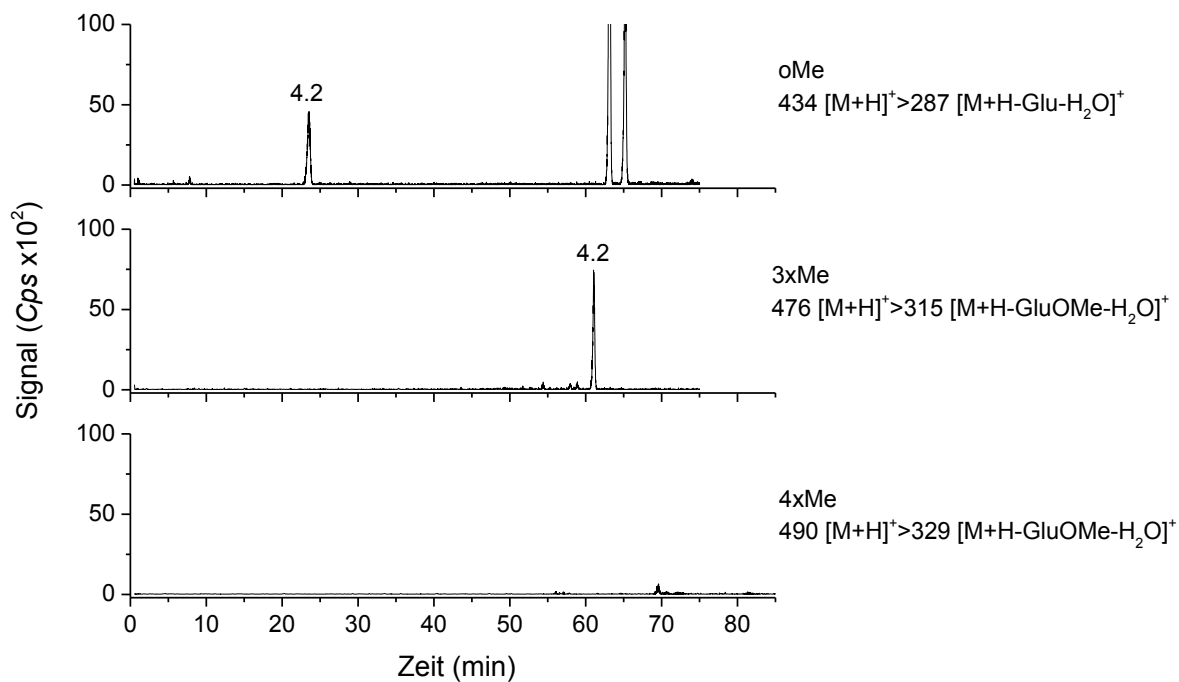


## ANHANG

A1.18 Molekülionen ( $[M + H]^+$ ) und Fragmentionen des cGSH-PAT-Addukts 4.1/2 ohne und nach Methylierung mit Diazomethan und HPLC-MS/MS Analyse im enhanced Produktionenscan Modus (CE 15 V, Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Die Differenz ( $\Delta$ ) der Molekül- und Fragmentionen im  $m/z$ -Verhältnis von 42, 28 oder 14 Da weist auf eine, zwei bzw. drei methylierte funktionelle Gruppen in den Molekül- oder Fragmentionen hin.

| cGSH-PAT 4.1/2   |                     |       |   |       |               |
|--|---------------------|-------|---|-------|---------------|
| Ohne Methylierung  |                     |       | Mit Methylierung  |       |               |
|  |                     |       |  |       |               |
| Spaltposition  | (Fragment)ion       | $m/z$ | (Fragment)ion   | $m/z$ | $\Delta$ (Da) |
| ---  | $[M+H]^+$           | 434   | $[M+H]^+$   | 476   | 42            |
| a  | $[-H_2O]^+$         | 416   | $[-H_2O]^+$   | 458   | 42            |
| a', a'', a'''  | $[-H_2O]^+$         | 416   | $[-OMe]^+$  | 444   | 28            |
| e  | $[-Gly]^+$          | 359   | $[-Gly]^+$  | 387   | 28            |
| e+a  | $[-Gly-H_2O]^+$     | 341   | $[-Gly-H_2O]^+$   | 369   | 28            |
| e+a'/a'''  | $[-Gly-H_2O]^+$     | 341   | $[-Gly-OMe]^+$  | 355   | 14            |
| e+f  | $[-Gly-CO]^+$       | 331   | $[-Gly-CO]^+$   | 359   | 28            |
| e+a+f  | $[-Gly-H_2O-CO]^+$  | 313   | $[-Gly-H_2O-CO]^+$  | 341   | 28            |
| e+a'/a'''+f  | $[-Gly-H_2O-CO]^+$  | 313   | $[-Gly-OMe-CO]^+$   | 327   | 14            |
| e+a+a'/a'''+f  | $[-Gly-2H_2O-CO]^+$ | 295   | $[-Gly-H_2O-OMe-CO]^+$  | 309   | 14            |

A1.19 MRM-Chromatogramme des methylierten isolierten GSH-PAT-Addukts 4.2. Dargestellt sind jeweils die Reste des unmethylierten Addukts (oMe) mit dem intensivsten Übergang ( $m/z$  434>287 CE 23 V), sowie das an drei Positionen methylierte Addukt (3xMe) mit den entsprechenden methylierten Übergängen ( $m/z$  476>315 CE 20 V). Zusätzlich wurde noch auf die Übergänge eines vierfach-methylierten Adduktes geschaut (4xMe), für den Fall dass neben den zwei Carboxylgruppen und einer Ketogruppe noch eine weitere Carboxyl- oder Ketogruppe bzw. eine Aminogruppe methyliert wurde ( $m/z$  490>329 CE 20 V). HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1.



ANHANG

A1.20 Molekülionen ( $[M + H]^+$ ) und Fragmentationen des cGSH-PAT-Addukts 4.2 ohne und nach Methylierung mit Diazomethan und HPLC-MS/MS Analyse im enhanced Produktionenscan Modus (CE 15 V, Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Die Differenz ( $\Delta$ ) der Molekül- und Fragmentationen im  $m/z$ -Verhältnis von 42, 28 oder 14 Da weist auf eine, zwei bzw. drei methylierte funktionelle Gruppen in den Molekül- oder Fragmentationen hin. n.m., Fragmentierung nicht möglich. n.d., Fragmentation nicht detektiert.

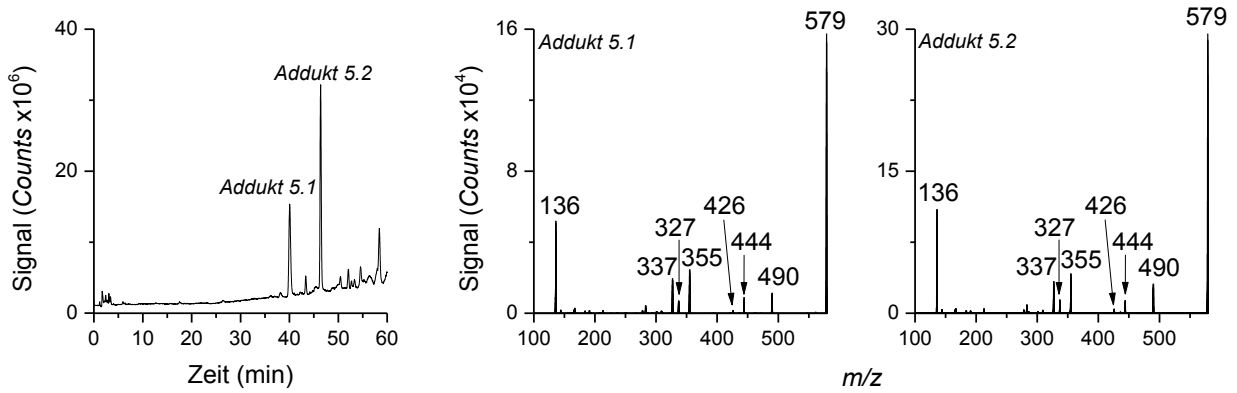
| cGSH-PAT 4.2      |                  |       |                      |       |               |
|-------------------|------------------|-------|----------------------|-------|---------------|
| Ohne Methylierung |                  |       | Mit Methylierung     |       |               |
|                   |                  |       |                      |       |               |
| Spaltposition     | (Fragment)ion    | $m/z$ | (Fragment)ion        | $m/z$ | $\Delta$ (Da) |
| ---               | $[M+H]^+$        | 434   | $[M+H]^+$            | 476   | 42            |
| a                 | $[-H_2O]^+$      | n.d.  | $[-H_2O]^+$          | n.d.  | ---           |
| a'', a'''         | $[-H_2O]^+$      | n.d.  | $[-OMe]^+$           | n.d.  | ---           |
| e                 | $[-Gly]^+$       | 359   | $[-Gly]^+$           | 387   | 28            |
| e+a               | $[-Gly-H_2O]^+$  | n.d.  | $[-Gly-H_2O]^+$      | 369   | ---           |
| e+a'''            | $[-Gly-H_2O]^+$  | n.d.  | $[-Gly-OMe]^+$       | n.d.  | ---           |
| e+h               | n.m.             |       | $[-Gly-OMe]^+$       | n.d.  | ---           |
| g+g'              | $[-Glu]^+$       | 305   | $[-Glu]^+$           | 333   | 28            |
| g+g'+a            | $[-Glu-H_2O]^+$  | 387   | $[-Glu-H_2O]^+$      | 315   | 28            |
| g+g'+a''          | $[-Glu-H_2O]^+$  | 387   | $[-Glu-OMe]^+$       | n.d.  | ---           |
| g+g'+h            | n.m.             |       | $[-Glu-OMe]^+$       | n.d.  | ---           |
| g+g'+a+a''        | $[-Glu-2H_2O]^+$ | 269   | $[-Glu-H_2O-OMe]^+$  | 283   | 14            |
| g+g'+a+h          | n.m.             |       | $[-Glu-H_2O-OMe]^+$  | 283   | ---           |
| g+g'+a+a''+h      | n.m.             |       | $[-Glu-H_2O-2OMe]^+$ | 251   | ---           |
| h                 | n.m.             |       | $[-OMe]^+$           | n.d.  | ---           |

ANHANG

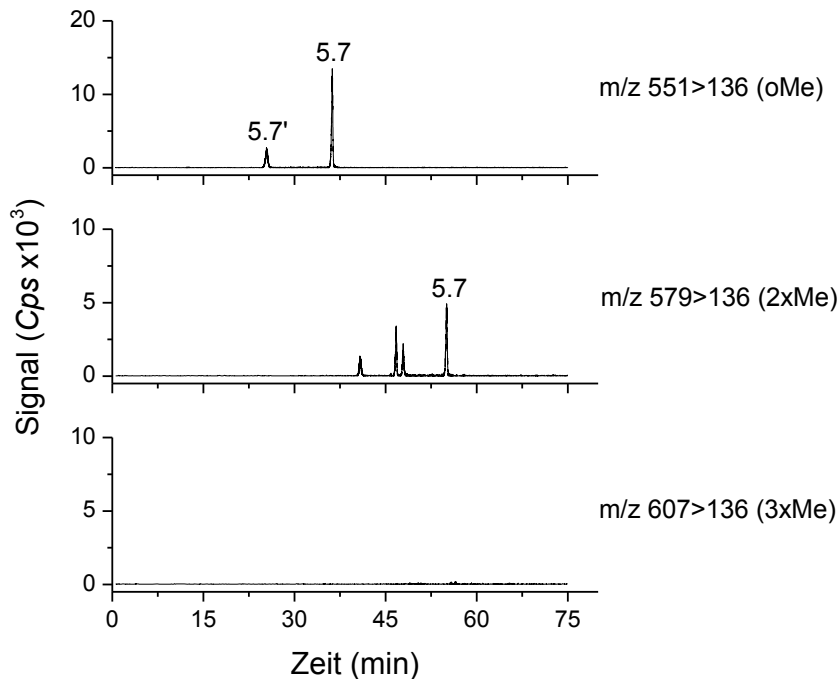
A1.21 Peakflächen der cGSH-PAT-Adenin-Mischaddukten (cGPA) bei zeitabhängiger Bildung nach Inkubation von PAT mit Adenin und GSH über 48 h.

| Zeit (h) | Analyse | Peakflächen (Counts*sek) |                         |                  | MW     | Stabw |
|----------|---------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------|-------|
|          |         | cGPA 5.1<br>(Rt 11 min)  | cGPA 5.2<br>(Rt 21 min) | Summe<br>Addukte |        |       |
| 0        | 1       | n.d.                     | n.d.                    | -                |        |       |
|          | 2       | n.d.                     | n.d.                    | -                | -      | -     |
|          | 3       | n.d.                     | n.d.                    | -                |        |       |
| 0,2      | 1       | 2615                     | 3377                    | 5992             |        |       |
|          | 2       | 3356                     | 4233                    | 7589             | -      | -     |
|          | 3       | 1891                     | 2494                    | 4385             |        |       |
| 0,5      | 1       | 7237                     | 10278                   | 17515            |        |       |
|          | 2       | 13962                    | 18447                   | 32409            | 32431  | 14928 |
|          | 3       | 19651                    | 27719                   | 47370            |        |       |
| 1        | 1       | 16024                    | 23984                   | 40008            |        |       |
|          | 2       | 17921                    | 25408                   | 43329            | 41344  | 1753  |
|          | 3       | 16571                    | 24125                   | 40696            |        |       |
| 2        | 1       | 56626                    | 93002                   | 149628           |        |       |
|          | 2       | 33831                    | 51751                   | 85582            | 104690 | 39062 |
|          | 3       | 31371                    | 47489                   | 78860            |        |       |
| 5        | 1       | 77527                    | 132870                  | 210397           |        |       |
|          | 2       | 78808                    | 137566                  | 216374           | 209310 | 7665  |
|          | 3       | 74971                    | 126189                  | 201160           |        |       |
| 15       | 1       | 95337                    | 158571                  | 253908           |        |       |
|          | 2       | 103956                   | 175783                  | 279739           | 259337 | 18302 |
|          | 3       | 92701                    | 151663                  | 244364           |        |       |
| 24       | 1       | 140917                   | 248108                  | 389025           |        |       |
|          | 2       | 142910                   | 258523                  | 401433           | 387267 | 15122 |
|          | 3       | 136407                   | 234936                  | 371343           |        |       |
| 48       | 1       | 157468                   | 295687                  | 453155           |        |       |
|          | 2       | 167378                   | 306716                  | 474094           | 452455 | 21997 |
|          | 3       | 152649                   | 277467                  | 430116           |        |       |

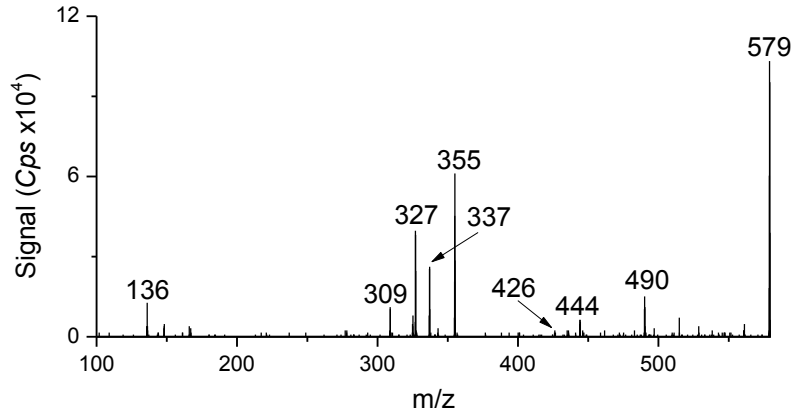
A1.22 TIC des Vollscans (links,  $m/z$  100-1000, HPLC-MS-Methode Kapitel 6.2.1.3) und die Fragmentierungsmuster (Mitte und rechts, Produktionenscan, CE 20 V, HPLC-MS/MS-METHode Kapitel 6.2.1.3) der methylierten cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2.



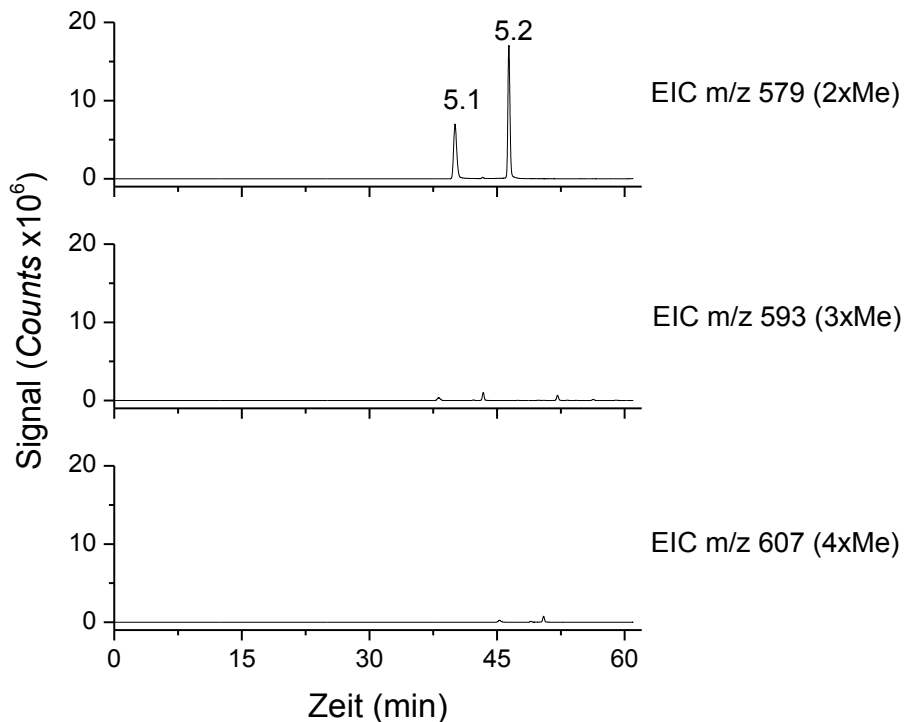
A1.23 MRM-Chromatogramme des methylierten isolierten GSH-PAT-Adenin-Addukts 5.7. Oben: Reste des unmethylierten Addukts (oMe,  $m/z$  551  $[M + H]^+ > 136$  [Adenin +  $H$ ] $^+$ ; CE 31 V); Mitte: An zwei Positionen methyliertes Addukt (2xMe,  $m/z$  579  $[M + H]^+ > 136$  [Adenin +  $H$ ] $^+$ ; CE 31 V); Unten: Ionenspur für Produkte nach Methylierung von drei Positionen im Addukt (3xMe,  $m/z$  593  $[M + H]^+ > 136$  [Adenin +  $H$ ] $^+$ ; CE 20 V). HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1. Peak 5.7', Diastereomer zu 5.7.



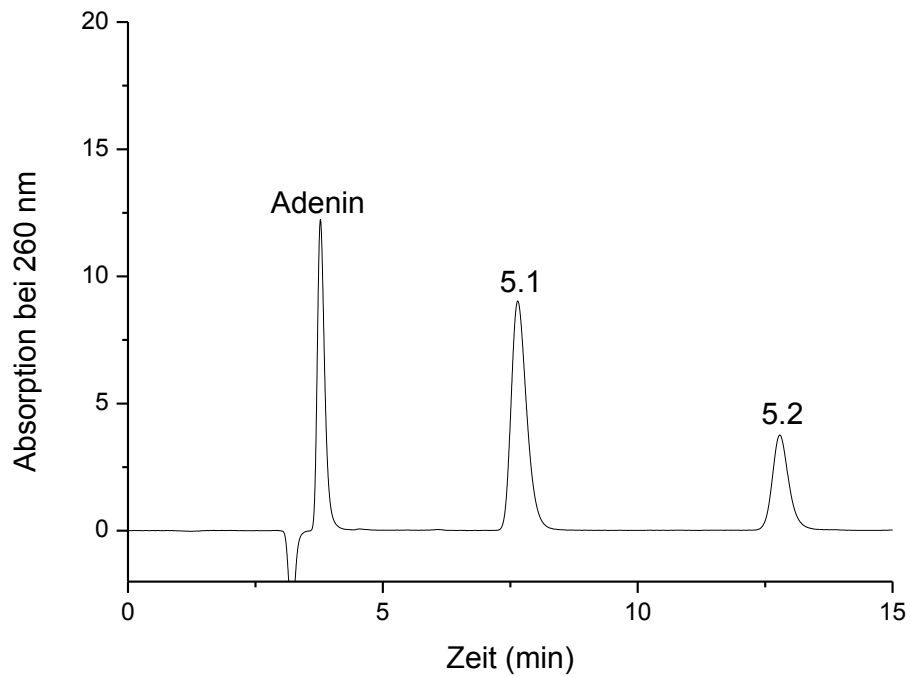
A1.24 Massenspektrum nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions des GSH-PAT-Adenin-Adduktes 5.7 mit  $m/z$  579 (*enhanced* Produktionenscan, CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Fragmentationen:  $m/z$  490 [M + H - Glycin]<sup>+</sup>;  $m/z$  444 [M + H - Adenin]<sup>+</sup>;  $m/z$  426 [M + H - Adenin - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>;  $m/z$  355 [M + H - Glycin - Adenin]<sup>+</sup>;  $m/z$  337 [M + H - Glycin - Adenin - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>;  $m/z$  327 [M + H - Glycin - Adenin - CO]<sup>+</sup>;  $m/z$  309 [M + H - Glycin - Adenin - H<sub>2</sub>O - CO]<sup>+</sup>;  $m/z$  136 [Adenin + H]<sup>+</sup>.



A1.25 EIC einer methylierten Fraktion der cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 nach Extraktion bestimmter  $m/z$ -Verhältnisse aus den Vollscan-Daten (Anhang A1.22):  $m/z$  579, Ionenspur für Produkte nach Methylierung von zwei Positionen im Addukt (2xMe);  $m/z$  593, Ionenspur für Produkte nach Methylierung von drei Positionen im Addukt (3xMe);  $m/z$  607, Ionenspur für Produkte nach Methylierung von vier Positionen im Addukt (4xMe). Nur das EIC mit  $m/z$  579 für zweifach methylierte Addukte weist zwei intensive Peaks auf.



A1.26 HPLC-UV-Chromatogramm der Umwandlung des isolierten cGSH-PAT-Adenin-Reaktionsprodukt 5.1 in 5.2 (Abb. 35) zum Zeitpunkt 27 h. Neben dem Diastereomer 5.1 entsteht noch ein weiterer Peak im Laufe der Umwandlung, welcher Adenin zugeordnet wurde. Ein Teil der Mischaddukte war folglich unter Abspaltung von Adenin zerfallen. Ein weiteres Spaltprodukt wurde mittels UV-Detektion nicht detektiert. HPLC-UV Methode 4 Kapitel 5.2.1.1.



ANHANG

A1.27 Peakflächenverhältnisse der cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 zum Internen Standard (IS), die prozentuale Anteile der Produkte 5.1 und 5.2 an dem Gesamtpeakflächenverhältnis ((5.1+5.2)/IS) und deren Mittelwerte (MW) mit Standardabweichungen (Stabw).

| Zeit<br>(h) | Bestimmung 1 |        |                  |         |         | Bestimmung 2 |        |                  |         |         | Bestimmung 3 |        |                  |         |         | MW<br>5.1<br>(%) | Stabw<br>5.1<br>(%) | MW<br>5.2<br>(%) | Stabw<br>5.2<br>(%) |      |
|-------------|--------------|--------|------------------|---------|---------|--------------|--------|------------------|---------|---------|--------------|--------|------------------|---------|---------|------------------|---------------------|------------------|---------------------|------|
|             | 5.1/IS       | 5.2/IS | (5.1+5.2)<br>/IS | 5.1 (%) | 5.2 (%) | 5.1/IS       | 5.2/IS | (5.1+5.2)<br>/IS | 5.1 (%) | 5.2 (%) | 5.1/IS       | 5.2/IS | (5.1+5.2)<br>/IS | 5.1 (%) | 5.2 (%) |                  |                     |                  |                     |      |
| 0           | 0,2785       | 0,0000 | 0,2785           | 100,00  | 0,00    | 0,2679       | 0,0000 | 0,2679           | 100,00  | 0,00    | 0,2933       | 0,0000 | 0,2933           | 100,00  | 0,00    | 100,00           | 0,00                | 0,00             | 0,00                | 0,00 |
| 3           | 0,2576       | 0,0259 | 0,2835           | 90,85   | 9,15    | 0,2284       | 0,0283 | 0,2567           | 88,97   | 11,03   | 0,2572       | 0,0273 | 0,2845           | 90,40   | 9,60    | 90,07            | 0,98                | 9,93             | 0,98                | 0,98 |
| 6           | 0,2440       | 0,0453 | 0,2893           | 84,33   | 15,67   | 0,2022       | 0,0508 | 0,2530           | 79,90   | 20,10   | 0,2311       | 0,0470 | 0,2781           | 83,09   | 16,91   | 82,44            | 2,29                | 17,56            | 2,29                | 2,29 |
| 9           | 0,2154       | 0,0613 | 0,2767           | 77,86   | 22,14   | 0,1818       | 0,0648 | 0,2466           | 73,72   | 26,28   | 0,2154       | 0,0619 | 0,2773           | 77,69   | 22,31   | 76,42            | 2,34                | 23,58            | 2,34                | 2,34 |
| 12          | 0,2017       | 0,0736 | 0,2752           | 73,27   | 26,73   | 0,1676       | 0,0769 | 0,2445           | 68,55   | 31,45   | 0,2008       | 0,0732 | 0,2740           | 73,29   | 26,71   | 71,70            | 2,73                | 28,30            | 2,73                | 2,73 |
| 15          | 0,1901       | 0,0832 | 0,2733           | 69,55   | 30,45   | 0,1568       | 0,0859 | 0,2427           | 64,60   | 35,40   | 0,1854       | 0,0843 | 0,2697           | 68,76   | 31,24   | 67,63            | 2,66                | 32,37            | 2,66                | 2,66 |
| 18          | 0,1788       | 0,0910 | 0,2698           | 66,26   | 33,74   | 0,1472       | 0,0934 | 0,2406           | 61,18   | 38,82   | 0,1743       | 0,0910 | 0,2653           | 65,69   | 34,31   | 64,38            | 2,79                | 35,62            | 2,79                | 2,79 |
| 21          | 0,1688       | 0,0980 | 0,2668           | 63,28   | 36,72   | 0,1389       | 0,0990 | 0,2379           | 58,38   | 41,62   | 0,1645       | 0,1004 | 0,2649           | 62,09   | 37,91   | 61,25            | 2,55                | 38,75            | 2,55                | 2,55 |
| 24          | 0,1600       | 0,1047 | 0,2647           | 60,44   | 39,56   | 0,1314       | 0,1036 | 0,2350           | 55,92   | 44,08   | 0,1537       | 0,1055 | 0,2592           | 59,29   | 40,71   | 58,55            | 2,35                | 41,45            | 2,35                | 2,35 |
| 27          | 0,1513       | 0,1100 | 0,2614           | 57,90   | 42,10   | 0,1245       | 0,1071 | 0,2315           | 53,75   | 46,25   | 0,1473       | 0,1113 | 0,2586           | 56,97   | 43,03   | 56,21            | 2,18                | 43,79            | 2,18                | 2,18 |
| 30          | 0,1457       | 0,1143 | 0,2600           | 56,05   | 43,95   | 0,1198       | 0,1114 | 0,2312           | 51,81   | 48,19   | 0,1398       | 0,1137 | 0,2535           | 55,13   | 44,87   | 54,33            | 2,23                | 45,67            | 2,23                | 2,23 |
| 33          | 0,1398       | 0,1181 | 0,2579           | 54,21   | 45,79   | 0,1159       | 0,1135 | 0,2294           | 50,52   | 49,48   | 0,1361       | 0,1184 | 0,2545           | 53,49   | 46,51   | 52,74            | 1,96                | 47,26            | 1,96                | 1,96 |
| 36          | 0,1438       | 0,1207 | 0,2645           | 54,37   | 45,63   | 0,1133       | 0,1153 | 0,2287           | 49,56   | 50,44   | 0,1319       | 0,1207 | 0,2526           | 52,21   | 47,79   | 52,05            | 2,41                | 47,95            | 2,41                | 2,41 |
| 39          | 0,1428       | 0,1229 | 0,2657           | 53,75   | 46,25   | 0,1110       | 0,1165 | 0,2275           | 48,78   | 51,22   | 0,1280       | 0,1223 | 0,2503           | 51,13   | 48,87   | 51,22            | 2,48                | 48,78            | 2,48                | 2,48 |
| 42          | 0,1458       | 0,1249 | 0,2707           | 53,87   | 46,13   | 0,1099       | 0,1179 | 0,2279           | 48,25   | 51,75   | 0,1241       | 0,1235 | 0,2476           | 50,12   | 49,88   | 50,75            | 2,87                | 49,25            | 2,87                | 2,87 |
| 45          | 0,1462       | 0,1266 | 0,2728           | 53,58   | 46,42   | 0,1092       | 0,1188 | 0,2280           | 47,88   | 52,12   | 0,1212       | 0,1254 | 0,2466           | 49,15   | 50,85   | 50,20            | 2,99                | 49,80            | 2,99                | 2,99 |
| 48          | 0,1414       | 0,1280 | 0,2694           | 52,48   | 47,52   | 0,1112       | 0,1192 | 0,2304           | 48,25   | 51,75   | 0,1179       | 0,1260 | 0,2439           | 48,34   | 51,66   | 49,69            | 2,42                | 50,31            | 2,42                | 2,42 |
| 51          | 0,1437       | 0,1291 | 0,2727           | 52,67   | 47,33   | 0,1138       | 0,1189 | 0,2327           | 48,89   | 51,11   | 0,1157       | 0,1268 | 0,2426           | 47,71   | 52,29   | 49,76            | 2,59                | 50,24            | 2,59                | 2,59 |
| 54          | 0,1402       | 0,1288 | 0,2690           | 52,11   | 47,89   | 0,1116       | 0,1189 | 0,2305           | 48,43   | 51,57   | 0,1167       | 0,1289 | 0,2456           | 47,51   | 52,49   | 49,35            | 2,44                | 50,65            | 2,44                | 2,44 |
| 57          | 0,1403       | 0,1300 | 0,2703           | 51,89   | 48,11   | 0,1092       | 0,1185 | 0,2277           | 47,95   | 52,05   | 0,1146       | 0,1283 | 0,2429           | 47,17   | 52,83   | 49,00            | 2,53                | 51,00            | 2,53                | 2,53 |



ANHANG

A1.28 Chromatographische Daten und Auswertungen zu den Stabilitätsuntersuchungen der cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 unter den aufgeführten Inkubationsbedingungen. Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; IS, Interner Standard; Wdf., Wiederfindung; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

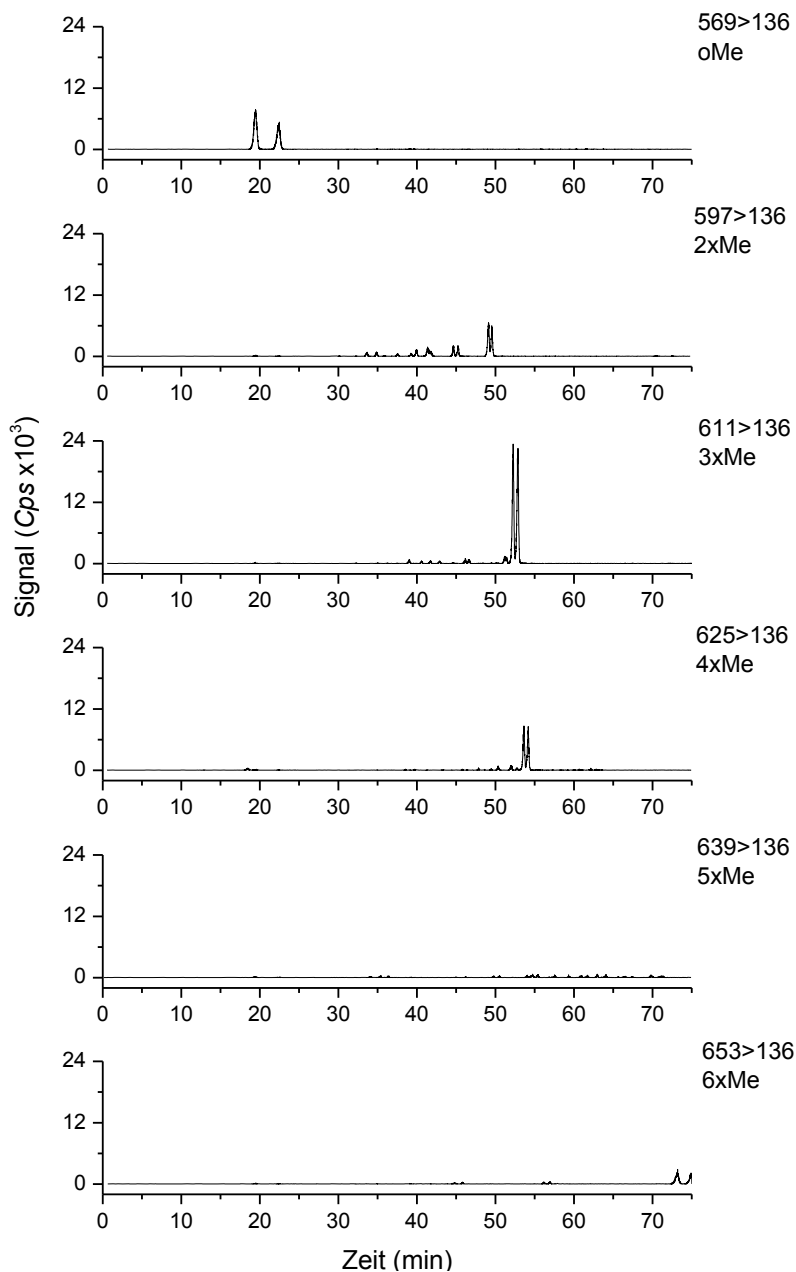
|                     |           | Addukt 5.1 |             | Addukt 5.2 |             | IS (Coffein) |             | Flächen-<br>verhältnis<br>Summe<br>Addukte/IS | Wdf. (%)<br>bezogen auf<br>die Kontrolle | MW<br>(%) | Stabw<br>(%) |
|---------------------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|--------------|-------------|---|--|-----------|--------------|
|                     |           | Rt (min)   | Fläche (FE) | Rt (min)   | Fläche (FE) | Rt (min)     | Fläche (FE) |   |  |           |              |
| Wasser<br>3 h<br>RT | Probe 1   | 6,6        | 1367,3502   | 10,7       | 197,6376    | 19,7         | 781,5029    | 2,002536049                                   | 98,33                                    | 95,00     | 4,38         |
|                     | Probe 2   | 6,4        | 1142,4359   | 10,4       | 287,4203    | 19,6         | 779,8242    | 1,833562223                                   | 90,03                                    |           |              |
|                     | Probe 3   | 6,6        | 1311,1013   | 10,5       | 229,8355    | 19,6         | 783,0680    | 1,967819908                                   | 96,62                                    |           |              |
|                     | Kontrolle | 6,5        | 1474,4019   | 10,4       | 121,7552    | 19,6         | 783,7518    | 2,036559471                                   |  |           |              |
| Puffer<br>3 h<br>RT | Probe 1   | 6,6        | 520,9766    | 10,7       | 508,8126    | 19,6         | 659,2588    | 1,562040925                                   | 78,73                                    | 87,87     | 7,92         |
|                     | Probe 2   | 6,7        | 617,7031    | 10,7       | 598,5823    | 19,7         | 663,0751    | 1,834310103                                   | 92,45                                    |           |              |
|                     | Probe 3   | 6,8        | 620,3854    | 10,9       | 602,7762    | 19,7         | 666,9910    | 1,833850254                                   | 92,43                                    |           |              |
|                     | Kontrolle | 6,6        | 1457,8637   | 10,6       | 99,2559     | 19,7         | 784,7803    | 1,984146991                                   |  |           |              |
| MeOH<br>3 h<br>RT   | Probe 1   | 6,5        | 171,8297    | 10,4       | 34,4924     | 19,5         | 718,1769    | 0,287285902                                   | 72,36                                    | 59,09     | 12,75        |
|                     | Probe 2   | 6,5        | 107,9165    | 10,5       | 25,7519     | 19,6         | 717,4494    | 0,186310561                                   | 46,93                                    |           |              |
|                     | Probe 3   | 6,6        | 135,5705    | 10,6       | 30,0292     | 19,6         | 719,4038    | 0,23019014                                    | 57,98                                    |           |              |
|                     | Kontrolle | 6,5        | 248,1408    | 10,5       | 36,4839     | 19,6         | 716,8915    | 0,397026172                                   |  |           |              |
| DMSO<br>3 h<br>RT   | Probe 1   | 6,6        | 55,1151     | 10,7       | 92,1858     | 19,6         | 719,4529    | 0,20474009                                    | 58,28                                    | 53,55     | 10,39        |
|                     | Probe 2   | 6,5        | 51,9730     | 10,6       | 100,6019    | 19,6         | 715,1782    | 0,213338236                                   | 60,73                                    |           |              |
|                     | Probe 3   | 6,5        | 33,3936     | 10,5       | 71,6728     | 19,6         | 718,3507    | 0,146260493                                   | 41,63                                    |           |              |
|                     | Kontrolle | 6,5        | 203,9983    | 10,6       | 44,7926     | 19,6         | 708,1962    | 0,351302112                                   |  |           |              |

ANHANG

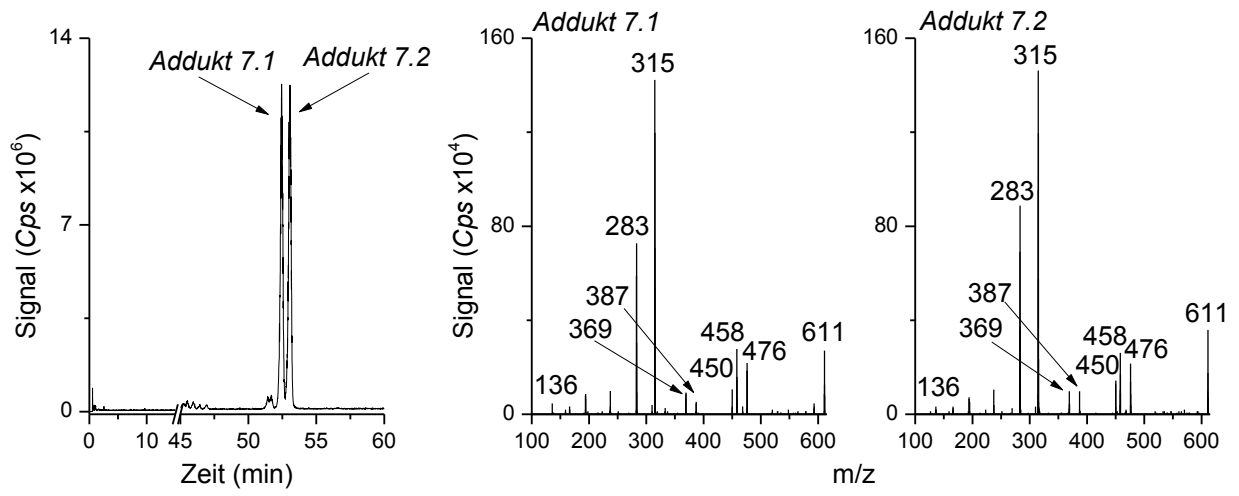
A1.29 Chromatographische Daten und Auswertungen zu den Stabilitätsuntersuchungen der cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 unter den aufgeführten Inkubationsbedingungen. Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; IS, Interner Standard; Wdf., Wiederfindung; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

|                        |             | Addukt 5.1 |             | Addukt 5.2 |             | IS (Coffein) |             | Flächen-<br>verhältnis<br>Summe<br>Addukte/IS | Wdf. (%)<br>bezogen auf<br>die Kontrolle | MW<br>(%) | Stabw<br>(%) |
|------------------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|--------------|-------------|---|--|-----------|--------------|
|                        |             | Rt (min)   | Fläche (FE) | Rt (min)   | Fläche (FE) | Rt (min)     | Fläche (FE) |   |  |           |              |
| Wasser<br>72 h<br>RT   | Probe 1     | 6,6        | 943,8882    | 10,4       | 952,2927    | 19,5         | 827,2292    | 2,2922  | 56,57                                    | 51,87     | 4,08         |
|                        | Kontrolle 1 | 6,5        | 2405,2920   | 10,3       | 947,9494    | 19,6         | 827,5252    | 4,0521  |  |           |              |
|                        | Probe 2     | 6,5        | 638,1847    | 10,2       | 808,9376    | 19,6         | 829,4520    | 1,7447  |  |           |              |
|                        | Kontrolle 2 | 6,4        | 1915,5065   | 10,1       | 982,8085    | 19,5         | 827,8747    | 3,5009  |  |           |              |
|                        | Probe 3     | 6,4        | 996,3940    | 10,0       | 1138,4230   | 19,5         | 826,8132    | 2,5820  |  |           |              |
|                        | Kontrolle 3 | 6,3        | 2827,9912   | 9,9        | 1523,6167   | 19,5         | 829,1697    | 5,2482  |  |           |              |
| Puffer<br>72 h<br>RT   | Probe 1     | 5,5        | 53,2000     | 7,9        | 50,2000     | 19,0         | 144,7000    | 0,7146  | 56,69                                    | 59,87     | 5,14         |
|                        | Kontrolle 1 | 5,4        | 609,7000    | 7,8        | 434,8000    | 19,1         | 828,7000    | 1,2604  |  |           |              |
|                        | Probe 2     | 3,6        | 166,5000    | 8,0        | 150,7000    | 19,1         | 626,2000    | 0,5065  |  |           |              |
|                        | Kontrolle 2 | 6,7        | 467,3000    | 10,8       | 270,0000    | 19,6         | 831,4000    | 0,8868  |  |           |              |
|                        | Probe 3     | 6,9        | 173,0000    | 11,1       | 154,1000    | 19,6         | 606,0000    | 0,5398  |  |           |              |
|                        | Kontrolle 3 | 6,9        | 450,7000    | 11,1       | 230,5000    | 19,6         | 830,5000    | 0,8202  |  |           |              |
| Puffer<br>72 h<br>37°C | Probe 1     | 7,6        | 153,0373    | 12,8       | 133,5087    | 19,5         | 354,2465    | 0,8089  | 47,84                                    | 54,70     | 7,56         |
|                        | Kontrolle 1 | 7,3        | 667,9760    | 12,4       | 135,6673    | 19,6         | 475,2497    | 1,6910  |  |           |              |
|                        | Probe 2     | 7,6        | 131,3571    | 12,7       | 114,0865    | 19,6         | 357,1688    | 0,6872  |  |           |              |
|                        | Kontrolle 2 | 7,4        | 431,3324    | 12,5       | 181,6595    | 19,6         | 476,9173    | 1,2853  |  |           |              |
|                        | Probe 3     | 7,6        | 113,3894    | 12,8       | 99,6707     | 19,5         | 355,3689    | 0,5995  |  |           |              |
|                        | Kontrolle 3 | 7,4        | 331,16403   | 12,5       | 124,6090    | 19,7         | 477,38776   | 0,9547  |  |           |              |

A1.30 MRM-Chromatogramme der methylierten isolierten GSH-PAT-Addukte 7.1 und 7.2. Ionenspuren der unmethylierten (oMe,  $m/z$  569  $[M + H]^+ > 136$  [Adenin + H] $^+$ ; CE 30 V) und zwei- bis sechsfach methylierte Addukte (2xMe,  $m/z$  597  $[M + H]^+ > 136$  [Adenin + H] $^+$ ; 3xMe,  $m/z$  611  $[M + H]^+ > 136$  [Adenin + H] $^+$ ; 4xMe,  $m/z$  625  $[M + H]^+ > 136$  [Adenin + H] $^+$ ; 5xMe,  $m/z$  639  $[M + H]^+ > 136$  [Adenin + H] $^+$ ; 6xMe,  $m/z$  653  $[M + H]^+ > 136$  [Adenin + H] $^+$ ; jeweils CE 30 V). HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1.



A1.31 TIC des *enhanced* Produktionenscans (links,  $m/z$  611, CE 20 V; Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1) und die Fragmentierungsmuster (Mitte und rechts) der methylierten /GSH-PAT-Adenin-Addukte 7.1 und 7.2.



**A2** Physiologische Einflussfaktoren auf die Bildung von (Glutathion-)Patulin-Adenin-Addukten

A2.1 Berechnungen zu den PAT-, GSH- und Adenin-Mengen gemäß den Bedingungen im hprt-Test (Schumacher et al., 2005a).

GSH:

GSH-Gehalt in unbehandelten V79-Zellen: 20 nmol/10x10<sup>6</sup> Zellen

→ bei 6x10<sup>6</sup> Zellen:  $\frac{6 \times 10^6}{10 \times 10^6} \times 20 \text{ nmol} = 12 \text{ nmol}$

GSH-Gehalt in GSH-depletierten V79-Zellen: 40% der ursprünglichen GSH-Menge

→ 0,4 x 12 nmol = 4,8 nmol ≈ 5 nmol

V79-Zellen mit erhöhtem GSH-Gehalt: ca. das dreifache der ursprünglichen GSH-Menge

→ 3 x 12 nmol = 36 nmol

PAT:

0,3 µM als niedrigste PAT-Konzentration, die noch zu Genmutationen im hprt-Lokus führte

Volumen des Inkubationsmediums: 20 ml

→ Stoffmenge PAT im Medium:  $0,3 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \times 0,02 \text{ l} = 0,006 \mu\text{mol} = 6 \text{ nmol}$

Adenin:

diploide Genom des chinesischen Hamsters: 4,96x10<sup>9</sup> Basenpaaren, entsprechend 5,4x10<sup>-12</sup> g (Hoosier, 1987)

Basenpaar-Verhältnisse im Genom von Säugetieren: 60% A/T und 40% G/C

→ Adeninmasse pro V79-Zelle:  $\frac{(0,6 \times 5,4 \times 10^{-12} \text{ g})}{2} = 1,62 \times 10^{-12} \text{ g}$

→ Adeninmasse von 6x10<sup>6</sup> Zellen:  $1,62 \times 10^{-12} \text{ g} \times 6 \times 10^6 = 9,72 \times 10^{-6} \text{ g}$

→ Adeninstoffmenge (M=135,13 g/mol):  $\frac{9,72 \times 10^{-6} \text{ g}}{135,13 \text{ g/mol}} = 72 \text{ nmol}$

ANHANG

A2.2 Peakflächen der (cGSH)-PAT-Adenin-Addukten nach Inkubation von PAT mit Adenin mit verschiedenen GSH-Konzentrationen für drei Tage bei RT. Der Inkubationsansatz wurde 1+99 (v+v) mit Wasser verdünnt und 2 µl für die HPLC-MS/MS-Analyse injiziert. Wenn kein Addukt mehr detektierbar war, wurden 10 µl einer 1+9 (v+v)-Verdünnung injiziert. Die hierdurch erhaltenen Flächen wurden auf die Verdünnung 1+99 durch Division mit 50 zurückgerechnet (\*). Werte von drei Messungen. c(GSH) / c(PAT), Verhältnis der Konzentration von GSH zu PAT im Inkubationsansatz; n.d., kein Peak detektierbar; MW, Mittelwert der summierten Peakflächen der Addukte der 1+99-Verdünnung; Stabw, Standardabweichung der summierten Peakflächen der Addukte der 1+99-Verdünnung.

cGSH-PAT-Adenin-Addukte

| c (GSH)<br>/c(PAT) | Addukt | Messung 1 (Fläche in Counts) |                             | Messung 2 (Fläche in Counts) |                             | Messung 3 (Fläche in Counts) |                             | MW      | Stabw  |
|--------------------|--------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------|--------|
|                    |        | Verd. 1+9 (v+v)<br>10 µl IV  | Verd. 1+99 (v+v)<br>2 µl IV | Verd. 1+9 (v+v)<br>10 µl IV  | Verd. 1+99 (v+v)<br>2 µl IV | Verd. 1+9 (v+v)<br>10 µl IV  | Verd. 1+99 (v+v)<br>2 µl IV |         |        |
| 0,5                | 5.1    |                              | 852820                      |                              | 834170                      |                              | 796470                      |         |        |
|                    | 5.2    |                              | 1010200                     |                              | 1186900                     |                              | 1011800                     |         |        |
|                    | Summe  |                              | 1863020                     |                              | 2021070                     |                              | 1808270                     | 1897453 | 110500 |
| 1                  | 5.1    |                              | 1494700                     |                              | 1502100                     |                              | 1479300                     |         |        |
|                    | 5.2    |                              | 1435900                     |                              | 2127300                     |                              | 1826300                     |         |        |
|                    | Summe  |                              | 2930600                     |                              | 3629400                     |                              | 3305600                     | 3288533 | 349712 |
| 2                  | 5.1    |                              | 817930                      |                              | 805380                      |                              | 787240                      |         |        |
|                    | 5.2    |                              | 1078200                     |                              | 1136700                     |                              | 983680                      |         |        |
|                    | Summe  |                              | 1896130                     |                              | 1942080                     |                              | 1770920                     | 1869710 | 88586  |
| 4                  | 5.1    |                              | 397510                      |                              | 430700                      |                              | 380570                      |         |        |
|                    | 5.2    |                              | 502750                      |                              | 541340                      |                              | 471140                      |         |        |
|                    | Summe  |                              | 900260                      |                              | 972040                      |                              | 851710                      | 908003  | 60538  |
| 8                  | 5.1    |                              | 267120                      |                              | 262680                      |                              | 263100                      |         |        |
|                    | 5.2    |                              | 327520                      |                              | 360990                      |                              | 322630                      |         |        |
|                    | Summe  |                              | 594640                      |                              | 623670                      |                              | 585730                      | 601347  | 19839  |
| 16                 | 5.1    |                              | 123730                      |                              | 130410                      |                              | 124660                      |         |        |
|                    | 5.2    |                              | 156320                      |                              | 159980                      |                              | 155080                      |         |        |
|                    | Summe  |                              | 280050                      |                              | 290390                      |                              | 279740                      | 283393  | 6061   |

ANHANG

|    |       |        |       |        |       |       |       |      |      |
|----|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|------|------|
| 32 | 5.1   | 244680 | *4894 | 141640 | *2833 | 95195 | *1904 | 6100 | 2691 |
|    | 5.2   | 207180 | *4144 | 133860 | *2677 | 92433 | *1849 |      |      |
|    | Summe |        | 9037  |        | 5510  |       | 3753  |      |      |
| 64 | 5.1   | n.d.   | n.d.  | n.d.   | n.d.  | n.d.  | n.d.  |      |      |
|    | 5.2   | n.d.   | n.d.  | n.d.   | n.d.  | n.d.  | n.d.  |      |      |
|    | Summe |        |       |        |       |       |       |      |      |

PAT-Adenin-Monoaddukte

| c (GSH)<br>/c(PAT) | Addukt | Messung 1 (Fläche in Counts) |                  | Messung 2 (Fläche in Counts) |                  | Messung 3 (Fläche in Counts) |                  | MW      | Stabw  |
|--------------------|--------|------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|---------|--------|
|                    |        | Verd. 1+9 (v+v)              | Verd. 1+99 (v+v) | Verd. 1+9 (v+v)              | Verd. 1+99 (v+v) | Verd. 1+9 (v+v)              | Verd. 1+99 (v+v) |         |        |
|                    |        | 10 µl IV                     | 2 µl IV          | 10 µl IV                     | 2 µl IV          | 10 µl IV                     | 2 µl IV          |         |        |
| 0,5                | 1.1    |                              | 1374700          |                              | 1746600          |                              | 1608900          | 2745145 | 349977 |
|                    | 1.2    |                              | 47522            |                              | 161930           |                              | 151440           |         |        |
|                    | 1.3    |                              | 842400           |                              | 1023000          |                              | 958680           |         |        |
|                    | 1.4    |                              | 49416            |                              | 60309            |                              | 61174            |         |        |
|                    | 1.5    |                              | 47522            |                              | 55237            |                              | 46606            |         |        |
|                    | Summe  |                              | 2361560          |                              | 3047076          |                              | 2826800          |         |        |
| 1                  | 1.1    |                              | 395000           |                              | 438020           |                              | 421460           | 762991  | 51013  |
|                    | 1.2    |                              | 40618            |                              | 45991            |                              | 40496            |         |        |
|                    | 1.3    |                              | 246130           |                              | 292910           |                              | 256960           |         |        |
|                    | 1.4    |                              | 14335            |                              | 20308            |                              | 24256            |         |        |
|                    | 1.5    |                              | 16556            |                              | 17411            |                              | 18523            |         |        |
|                    | Summe  |                              | 712639           |                              | 814640           |                              | 761695           |         |        |
| 2                  | 1.1    | 178900                       | *3578            | 140500                       | *2810            | 106800                       | *2136            | 5289    | 856    |
|                    | 1.2    | 33548                        | *671             | 26238                        | *525             | 20279                        | *406             |         |        |
|                    | 1.3    | 100900                       | *2018            | 88435                        | *1769            | 71737                        | *1435            |         |        |
|                    | 1.4    | n.d.                         |                  | n.d.                         |                  | n.d.                         |                  |         |        |
|                    | 1.5    | 8841                         | *177             | 10687                        | *214             | 6505                         | *130             |         |        |
|                    | Summe  |                              | 6444             |                              | 5317             |                              | 205321           |         |        |

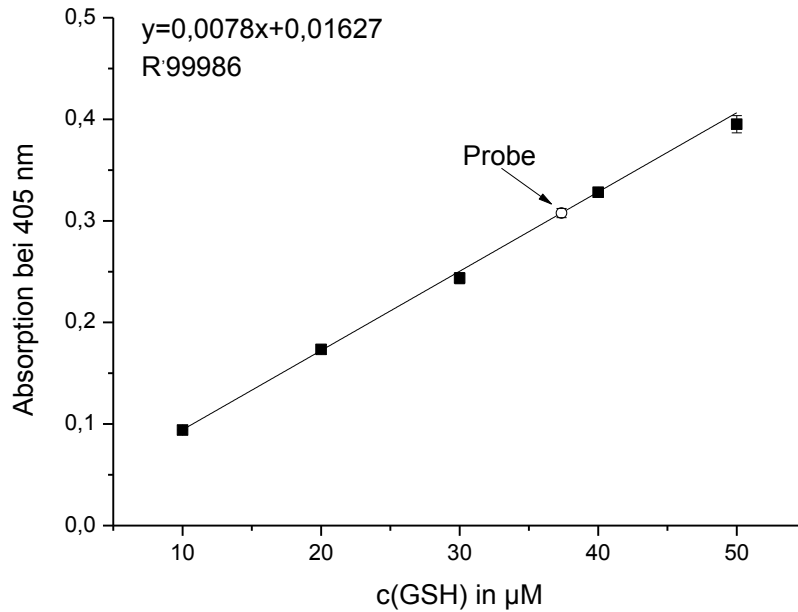






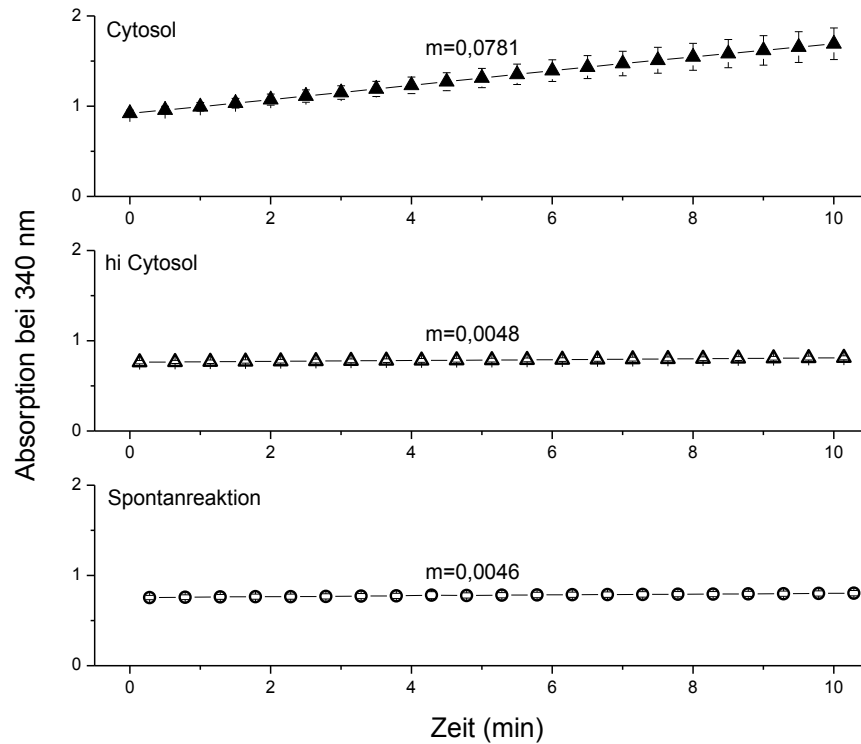
A2.3 Charakterisierung des Rattenlebercytosols

(A) Kalibriergerade und Probenwert der GSH-Quantifizierung nach Ellman



|                  |                 | Bestimmung |          |          |
|------------------|-----------------|------------|----------|----------|
|                  |                 | 1          | 2        | 3        |
| Absorption       | vor Injektion   | 0,0529     | 0,0498   | 0,0536   |
|                  | nach Injektion  | 0,3600     | 0,3623   | 0,3570   |
|                  | Differenz       | 0,3071     | 0,3125   | 0,3034   |
| Geradengleichung | GSH (µM)        | 37,2859    | 37,9782  | 36,8115  |
|                  | Probe 1+2 (v+v) | 111,8577   | 113,9346 | 110,4346 |
| Verdünnungen     | TCA-Zugabe      | 123,0435   | 125,3281 | 121,4781 |
|                  | 96µl+640 µl     | 943,3332   | 960,8486 | 931,3319 |
| Mittelwert (µM)  |                 | 945,17     |          |          |
| Stabw. (µM)      |                 | 14,84      |          |          |
| rel. Stabw (%)   |                 | 1,57       |          |          |

(B) Kinetik der GST-Aktivität



Aktivität Cytosol:

$m(\text{Cytosol}) - m(\text{Spontanreaktion}) = 0,0735$  (entspricht Absorptionsänderung pro min von 10,05 mg Protein)

Einberechnung des Extinktionskoeffizienten von 9,6 l/mmol\*cm

→ 0,762  $\mu\text{mol CDNB/min/mg Protein}$

Aktivität hi Cytosol:

$m(\text{Cytosol}) - m(\text{Spontanreaktion}) = 0,00015$  (entspricht Absorptionsänderung pro min von 10,05 mg Protein)

Einberechnung des Extinktionskoeffizienten von 9,6 l/mmol\*cm

→ 0,002  $\mu\text{mol CDNB/min/mg Protein}$

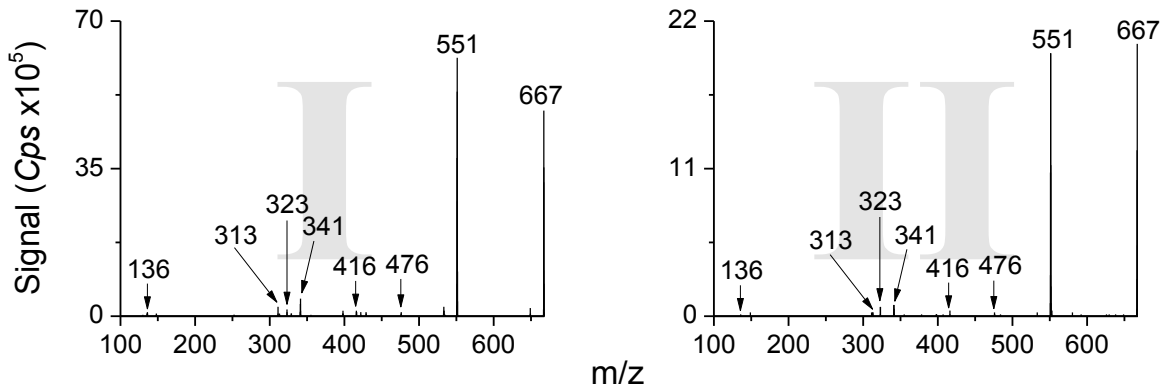
ANHANG

A2.4 Retentionszeiten und Peakflächen von PAT und den diastereomeren cGSH-PAT-Adenin (cGPA)-Mischaddukten 5.1 und 5.2 nach Inkubation in Gegenwart von nativem (n) oder hitzeinaktiviertem (hi) Rattenlebercytosol bzw. ohne (o) Cytosol bei verschiedenen Inkubationszeiten. Fläche in *Counts*; Rt, Retentionszeit in min; ---, kein Peak detektierbar.

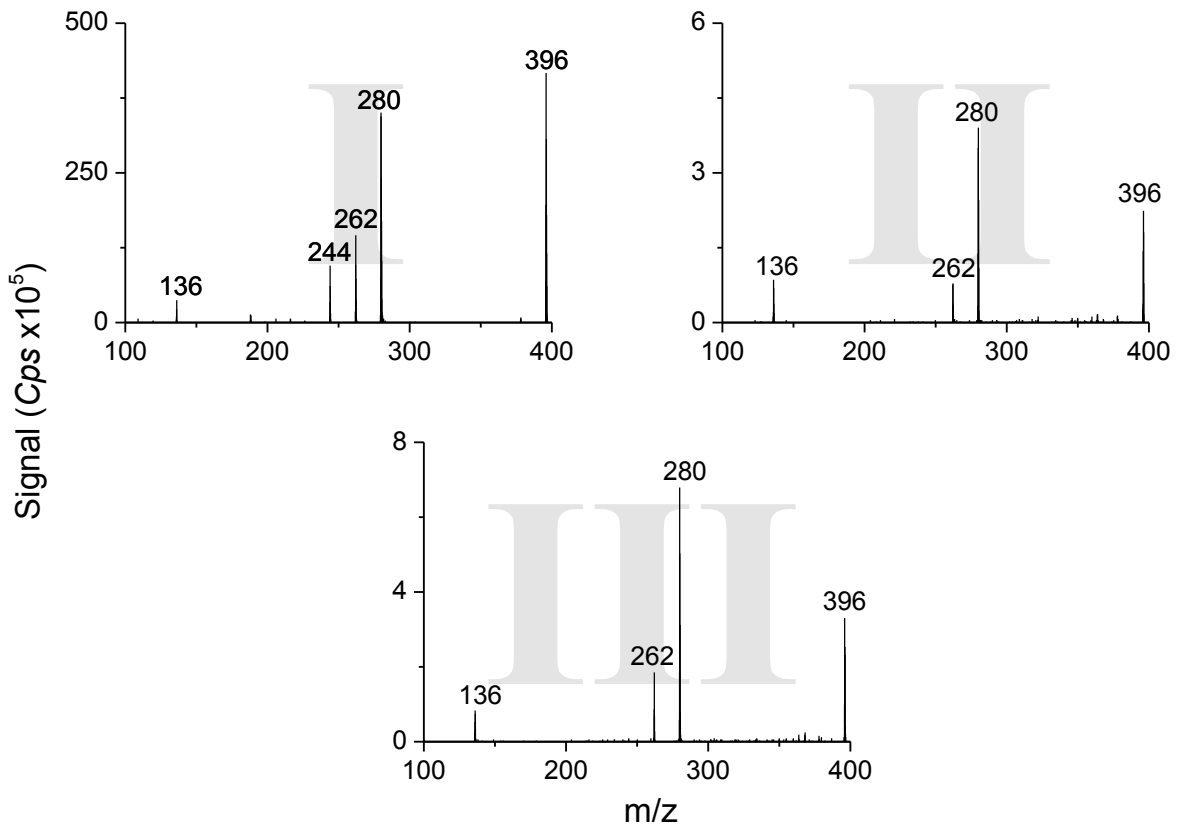
| Bestimmung        |       | Inkubationszeit (min) |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-------------------|-------|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                   |       | 0                     |          | 5        |          | 10       |          | 30       |          | 60       |          | 120      |          | 240      |          |
| nCytosol          |       | Rt                    | Fläche   | Rt       | Fläche   | Rt       | Fläche   | Rt       | Fläche   | Rt       | Fläche   | Rt       | Fläche   | Rt       | Fläche   |
| PAT               | 1     | 6,4                   | 8,46E+07 | 6,4      | 1,55E+07 | 6,4      | 8,83E+06 | 6,4      | 2,75E+06 | ---      | ---      | ---      | ---      | ---      | ---      |
|                   | 2     | 6,3                   | 9,37E+07 | 6,4      | 2,02E+06 | 6,4      | 2,09E+06 | 6,5      | 4,56E+05 | ---      | ---      | ---      | ---      | ---      | ---      |
| cGPA              | 1     | ---                   | ---      | 11,5     | 6,73E+03 | 11,7     | 2,07E+04 | 11,7     | 5,60E+04 | 11,4     | 7,76E+04 | 11,6     | 7,51E+04 | 11,5     | 1,31E+05 |
|                   | 2     | ---                   | ---      | 23,8     | 3,58E+03 | 24,0     | 2,18E+04 | 24,2     | 7,09E+04 | 24,0     | 9,13E+04 | 23,9     | 8,32E+04 | 24,1     | 1,36E+05 |
|                   | Summe | ---                   | ---      | ---      | 1,03E+04 | ---      | 4,25E+04 | ---      | 1,27E+05 | ---      | 1,69E+05 | ---      | 1,58E+05 | ---      | 2,67E+05 |
|                   | 2     | ---                   | ---      | 11,8     | 6,98E+03 | 11,9     | 1,66E+04 | 11,8     | 7,68E+04 | 11,7     | 9,02E+04 | 11,5     | 7,06E+04 | 11,2     | 1,33E+05 |
| Summe             | ---   | ---                   | 24,2     | 3,43E+03 | 24,3     | 1,47E+04 | 24,4     | 8,43E+04 | 24,3     | 9,50E+04 | 23,5     | 9,02E+04 | 23,2     | 1,34E+05 |          |
| Summe             | ---   | ---                   | ---      | 1,04E+04 | ---      | 3,13E+04 | ---      | 1,61E+05 | ---      | 1,85E+05 | ---      | 1,61E+05 | ---      | 2,67E+05 |          |
| <b>hi Cytosol</b> |       |                       |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| PAT               | 1     | 6,3                   | 8,83E+07 | 6,4      | 8,05E+07 | 6,4      | 5,47E+07 | 6,4      | 1,40E+07 | 6,4      | 1,08E+07 | 6,4      | 6,67E+06 | ---      | ---      |
|                   | 2     | 6,4                   | 9,50E+07 | 6,5      | 8,41E+07 | 6,4      | 7,83E+07 | 6,5      | 4,23E+07 | 6,4      | 6,30E+05 | 6,3      | 6,06E+06 | ---      | ---      |
| cGPA              | 1     | ---                   | ---      | 11,6     | 4,80E+03 | 11,6     | 2,97E+04 | 11,7     | 5,15E+04 | 11,6     | 3,35E+05 | 11,5     | 2,64E+05 | 11,6     | 6,88E+05 |
|                   | 2     | ---                   | ---      | 24,2     | 5,31E+03 | 24,0     | 3,65E+04 | 24,1     | 5,85E+04 | 23,7     | 3,86E+05 | 23,9     | 3,07E+05 | 24       | 7,50E+05 |
|                   | Summe | ---                   | ---      | ---      | 1,01E+04 | ---      | 6,62E+04 | ---      | 1,10E+05 | ---      | 7,21E+05 | ---      | 5,70E+05 | ---      | 1,44E+06 |
|                   | 2     | ---                   | ---      | 11,6     | 8,16E+03 | 11,8     | 2,49E+04 | 11,8     | 3,46E+05 | 11,6     | 7,15E+04 | 11,3     | 3,19E+05 | 11,2     | 4,49E+05 |
| Summe             | ---   | ---                   | 24,3     | 5,96E+03 | 24,3     | 2,26E+04 | 24,4     | 4,28E+05 | 23,9     | 8,32E+04 | 23,2     | 3,54E+05 | 22,9     | 4,45E+05 |          |
| Summe             | ---   | ---                   | ---      | 1,41E+04 | ---      | 4,75E+04 | ---      | 7,74E+05 | ---      | 1,55E+05 | ---      | 6,73E+05 | ---      | 8,94E+05 |          |
| <b>oCytosol</b>   |       |                       |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| cGPA              | 1     | ---                   | ---      | ---      | ---      | 11,4     | 9,65E+03 | 11,6     | 3,23E+05 | 11,2     | 6,42E+05 | 11,2     | 1,15E+06 | 11,3     | 1,30E+06 |
|                   | Summe | ---                   | ---      | ---      | ---      | 23,3     | 6,95E+03 | 24       | 3,03E+05 | 23,3     | 6,72E+05 | 23,1     | 1,30E+06 | 23,2     | 1,52E+06 |
| Summe             | ---   | ---                   | ---      | ---      | ---      | 1,66E+04 | ---      | 6,26E+05 | ---      | 1,31E+06 | ---      | 2,44E+06 | ---      | 2,81E+06 |          |

**A3** (Glutathion-)Patulin-2'-Deoxyadenosin-Addukte

A3.1 Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung der Molekülonen der cGSH-PAT-dNuS-Mischaddukte von PAT mit dA ( $m/z$  667; *enhanced* Produktionenscan, CE 15 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1).  
 cGSH-PAT-dA:  $m/z$  667  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  551  $[M+H\text{-Deoxyribose}]^+$ ,  $m/z$  476  $[M+H\text{-Deoxyribose-Glycin}]^+$ ,  $m/z$  416  $[M+H\text{-dA}]^+$ ,  $m/z$  341  $[M+H\text{-Glycin-dA}]^+$ ,  $m/z$  323  $[M+H\text{-Glycin-dA-H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  313  $[M+H\text{-Glycin-dA-CO}]^+$ ,  $m/z$  136  $[\text{Adenin+H}]^+$ .



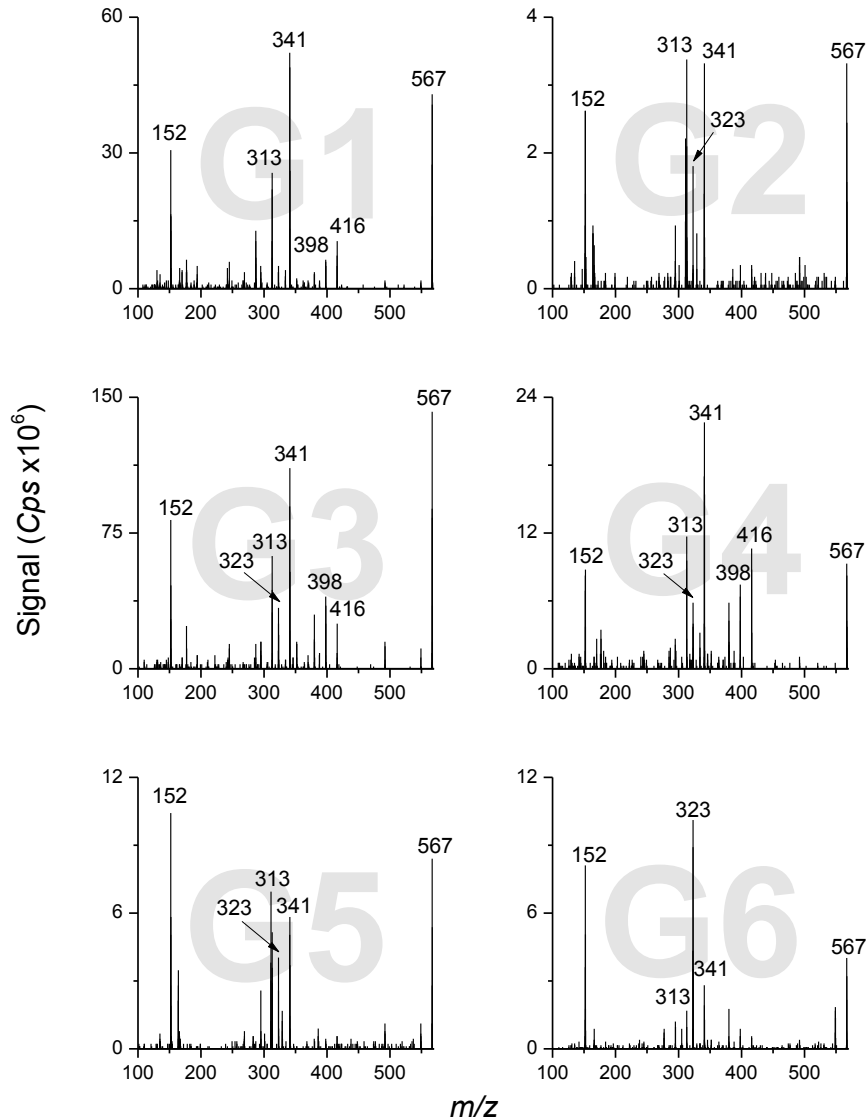
A3.2 Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung der Molekülonen der PAT-dNuS-Monoaddukte mit dA ( $m/z$  396; *enhanced* Produktionenscan, CE 15 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1).  
 PAT-dA:  $m/z$  396  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  280  $[M+H\text{-Deoxyribose}]^+$ ,  $m/z$  262  $[M+H\text{-Deoxyribose-H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  244  $[M+H\text{-Deoxyribose-2H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  136  $[\text{Adenin+H}]^+$ .



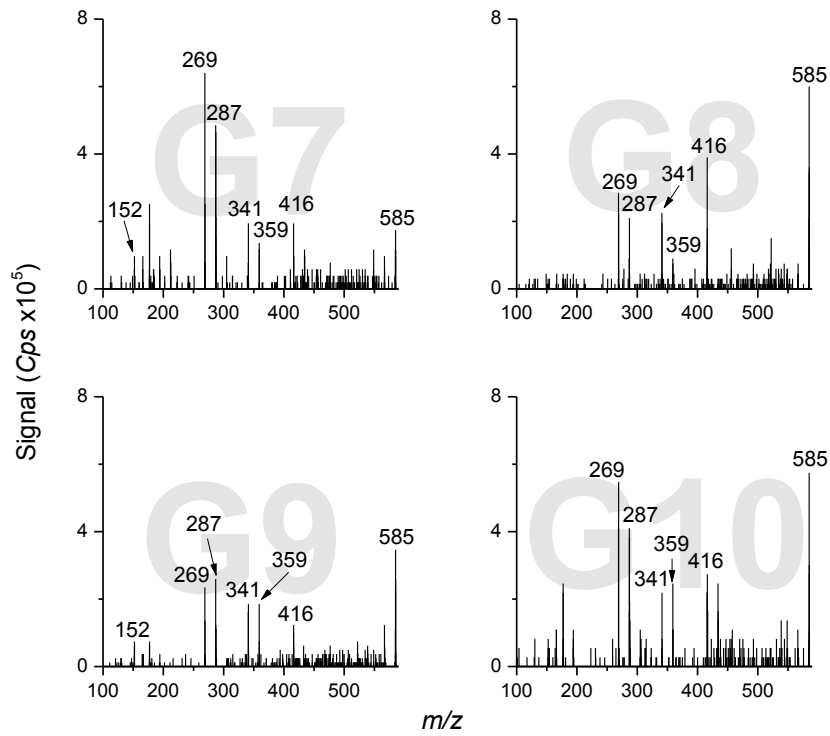
**A4** (Glutathion-)Patulin-DNA-Basen/-2'-Deoxynukleosid-Addukte

A4.1 Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Moleküliions der cyclischen GSH-PAT-Guanin-Reaktionsprodukte G1-G6 mit  $m/z$  567 (A) bzw. der linearen GSH-PAT-Guanin-Reaktionsprodukte G7-G10 mit  $m/z$  585 (B, enhanced Produktionenscan, CE 25 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1).

(A)  $m/z$  567  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  416  $[M+H-Guanin]^+$ ,  $m/z$  398  $[M+H-Guanin-H_2O]^+$ ,  $m/z$  341  $[M+H-Guanin-Glycin]^+$ ,  $m/z$  323  $[M+H-Guanin-Glycin-H_2O]^+$ ,  $m/z$  313  $[M+H-Guanin-Glycin-CO]^+$ ,  $m/z$  152  $[Guanin+H]^+$ .

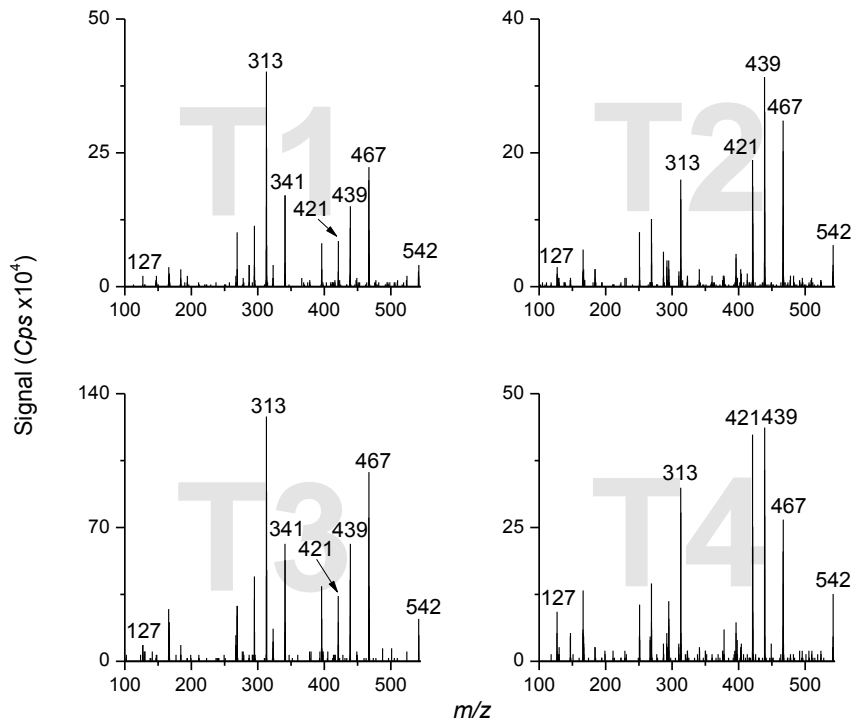


(B)  $m/z$  585  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  416  $[M+H-Guanin-H_2O]^+$ ,  $m/z$  359  $[M+H-Guanin-Glycin]^+$ ,  
 $m/z$  341  $[M+H-Guanin-Glycin-H_2O]^+$ ,  $m/z$  287  $[M+H-Guanin-Pyroglutamat-H_2O]^+$ ,  
 $m/z$  269  $[M+H-Guanin-Pyroglutamat-2H_2O]^+$ ,  $m/z$  152  $[Guanin+H]^+$ .

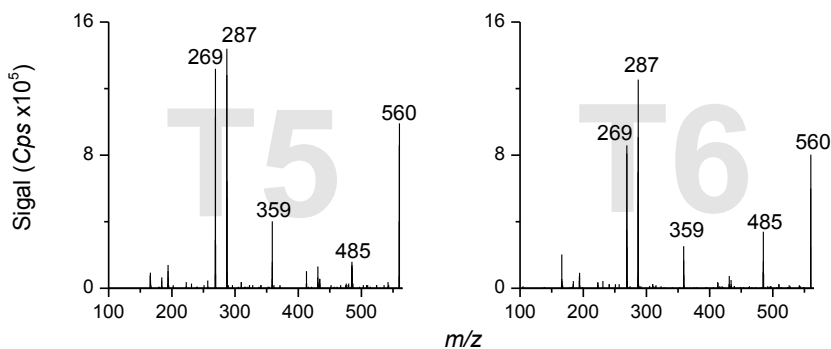


A4.2 Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions der cyclischen GSH-PAT-Thymin-Reaktionsprodukte T1-T4 mit  $m/z$  542 (A) bzw. der linearen GSH-PAT-Thymin-Reaktionsprodukte T5 und T6 mit  $m/z$  560 (B, enhanced Produktionsenscan, CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1).

(A)  $m/z$  542  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  467  $[M+H-Glycin]^+$ ,  $m/z$  439  $[M+H-Glycin-CO]^+$ ,  $m/z$  421  $[M+H-Glycin-COOH]^+$ ,  $m/z$  341  $[M+H-Thymin-Glycin]^+$ ,  $m/z$  313  $[M+H-Thymin-Glycin-CO]^+$ ,  $m/z$  127  $[Thymin+H]^+$ .



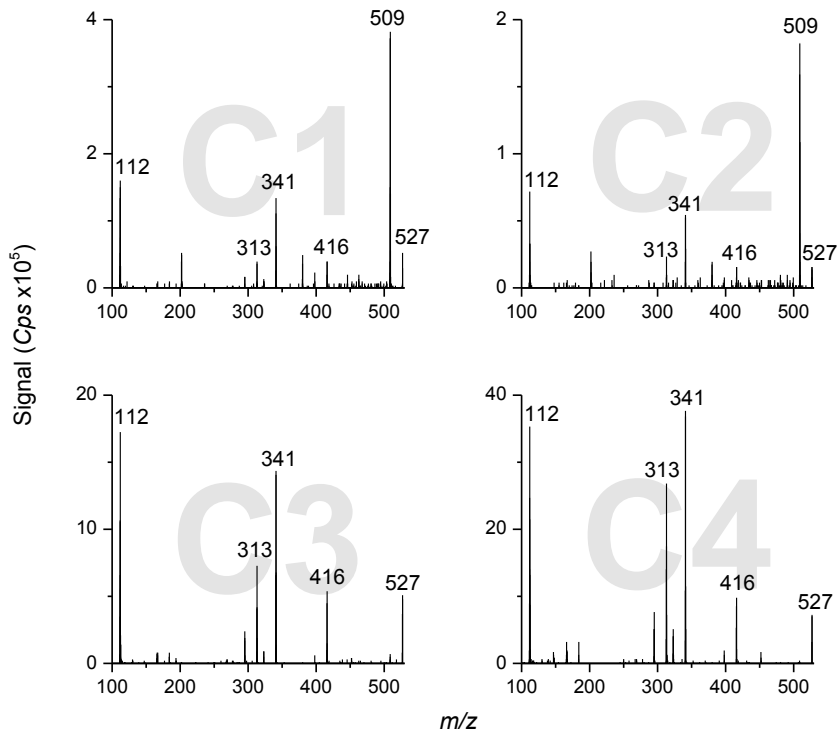
(B)  $m/z$  560  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  485  $[M+H-Glycin]^+$ ,  $m/z$  359  $[M+H-Thymin-Glycin]^+$ ,  $m/z$  287  $[M+H-Thymin-Pyroglutamat-H_2O]^+$ ,  $m/z$  269  $[M+H-Thymin-Pyroglutamat-2H_2O]^+$ .



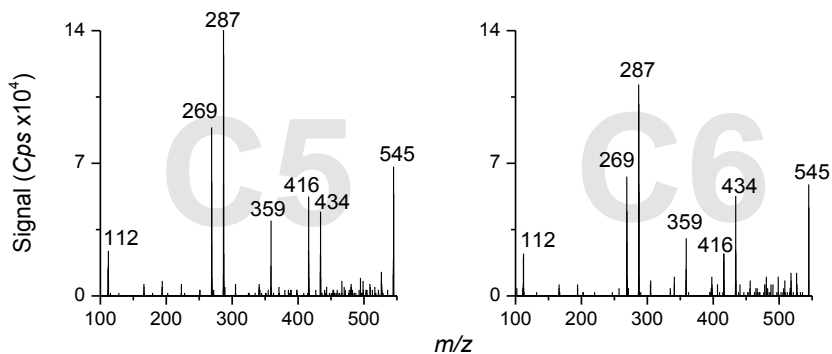


A4.3 Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung des Molekülions der cyclischen GSH-PAT-Cytosin-Reaktionsprodukte C1-C4 mit  $m/z$  527 (A) bzw. der linearen GSH-PAT-Cytosin-Reaktionsprodukte C5 und C6 mit  $m/z$  545 (B, enhanced Produktionsenscan, CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1).

(A)  $m/z$  527  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  509  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  416  $[M+H-Cytosin]^+$ ,  $m/z$  341  $[M+H-Cytosin-Glycin]^+$ ,  $m/z$  313  $[M+H-Cytosin-Glycin-CO]^+$ ,  $m/z$  112  $[Cytosin+H]^+$ .



(B)  $m/z$  545  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  434  $[M+H-Cytosin]^+$ ,  $m/z$  416  $[M+H-Cytosin-H_2O]^+$ ,  $m/z$  359  $[M+H-Cytosin-Glycin]^+$ ,  $m/z$  287  $[M+H-Cytosin-Pyroglutamat-H_2O]^+$ ,  $m/z$  269  $[M+H-Cytosin-Pyroglutamat-2H_2O]^+$ ,  $m/z$  112  $[Cytosin+H]^+$ .



ANHANG

A4.4 Retentionszeiten und Peakflächen der cyclischen und linearen GSH-PAT-DNA-Basen-Addukte mit Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin ermittelt durch Extraktion des entsprechenden *m/z*-Verhältnisses aus den Vollscan-Daten (HPLC-MS-Methode Kapitel 6.2.1.3). GSH-PAT-Adenin: cyclisch *m/z* 551, linear *m/z* 569. GSH-PAT-Guanin: cyclisch *m/z* 567, linear *m/z* 585. GSH-PAT-Thymin: cyclisch *m/z* 542, linear *m/z* 560. GSH-PAT-Cytosin: cyclisch *m/z* 527, linear *m/z* 545.

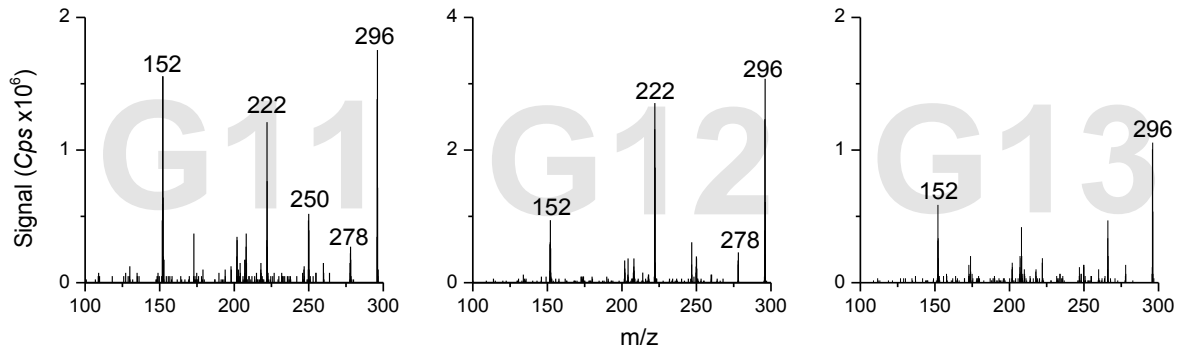
| GSH-PAT-Adenin |          |              |           |          |              | GSH-PAT-Guanin |          |              |           |          |              |
|----------------|----------|--------------|-----------|----------|--------------|----------------|----------|--------------|-----------|----------|--------------|
| cyclisch       |          |              | linear    |          |              | cyclisch       |          |              | linear    |          |              |
| Peak-Code      | Rt (min) | Fläche (Cps) | Peak-Code | Rt (min) | Fläche (Cps) | Peak-Code      | Rt (min) | Fläche (Cps) | Peak-Code | Rt (min) | Fläche (Cps) |
| 13             | 4,2      | 1298468      | 18A       | 13,7     | 1877864      | G1             | 11,0     | 15470987     | G7        | 15,6     | 410684       |
| 14             | 6,0      | 473110       | 18B       | 15,7     | 714129       | G2             | 18,0     | 738386       | G8        | 18,1     | 206371       |
| 5A             | 8,3      | 36214164     |           |          |              | G3             | 20,5     | 17137035     | G9        | 20,7     | 220648       |
| 15             | 11,6     | 446270       |           |          |              | G4             | 23,1     | 3148708      | G10       | 23,8     | 238173       |
| 5B             | 16,1     | 40862130     |           |          |              | G5             | 29,3     | 1341073      |           |          |              |
| 16             | 20,1     | 771633       |           |          |              | G6             | 34,3     | 1067351      |           |          |              |
| 17             | 29,1     | 976019       |           |          |              |                |          |              |           |          |              |
| Gesamtfläche   |          |              | 83633787  |          |              | Gesamtfläche   |          |              | 39979416  |          |              |

| GSH-PAT-Thymin |          |              |           |          |              | GSH-PAT-Cytosin |          |              |           |          |              |
|----------------|----------|--------------|-----------|----------|--------------|-----------------|----------|--------------|-----------|----------|--------------|
| cyclisch       |          |              | linear    |          |              | cyclisch        |          |              | linear    |          |              |
| Peak-Code      | Rt (min) | Fläche (Cps) | Peak-Code | Rt (min) | Fläche (Cps) | Peak-Code       | Rt (min) | Fläche (Cps) | Peak-Code | Rt (min) | Fläche (Cps) |
| T1             | 27,5     | 1905905      | T5        | 36,1     | 4176341      | C1+C2           | 2,9      | 1128545      | C5        | 6,0      | 835582       |
| T2             | 35,3     | 457517       | T6        | 39,5     | 3775304      | C3              | 4,1      | 6814141      | C6        | 6,6      | 542052       |
| T3             | 36,7     | 2588374      |           |          |              | C4              | 6,9      | 7403725      |           |          |              |
| T4             | 41,3     | 879368       |           |          |              |                 |          |              |           |          |              |
| Gesamtfläche   |          |              | 13782809  |          |              | Gesamtfläche    |          |              | 16724045  |          |              |

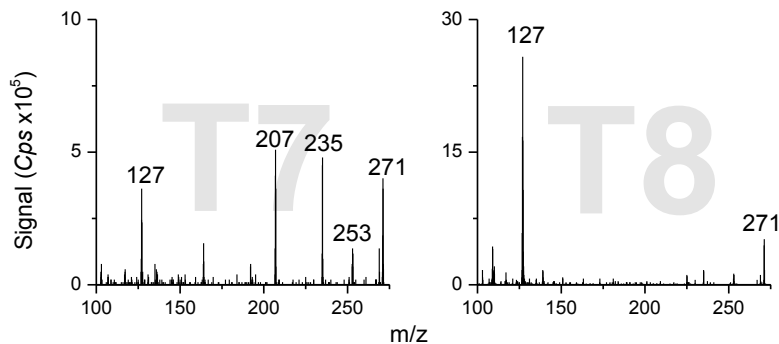
Gesamtadduktfläche 154120057  
 Anteil Adenin-Addukte (%) 54,3  
 Anteil Guanin-Addukte (%) 25,9  
 Anteil Thymin-Addukte (%) 8,9  
 Anteil Cytosin-Addukte (%) 10,9

A4.5 Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung der Molekülonen der Reaktionsprodukte PAT-Guanin G11-G13 mit  $m/z$  296 (A), PAT-Thymin T7 und T8 mit  $m/z$  271 (B) und PAT-Cytosin C7-C9 mit  $m/z$  256 (C, enhanced Produktionenscan, CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1).

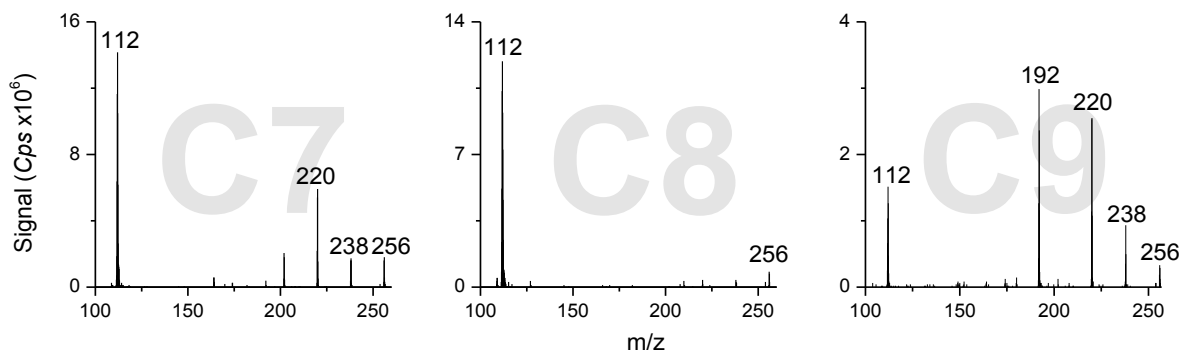
(A)  $m/z$  296  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  278  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  250  $[M+H-COOH]^+$ ,  $m/z$  222  $[M+H-C_2H_4COOH]^+$ ,  $m/z$  152  $[Guanin+H]^+$ .



(B)  $m/z$  271  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  253  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  235  $[M+H-2H_2O]^+$ ,  $m/z$  207  $[M+H-H_2O-COOH]^+$ ,  $m/z$  127  $[Thymin+H]^+$ .

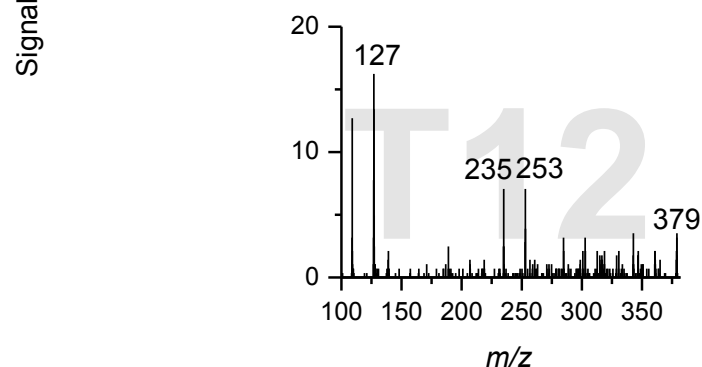
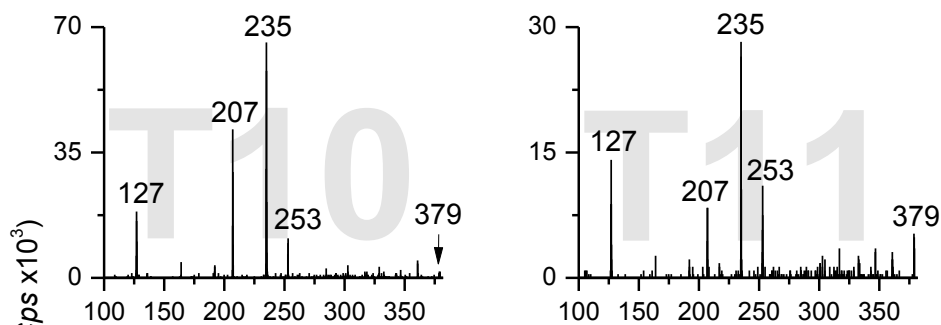
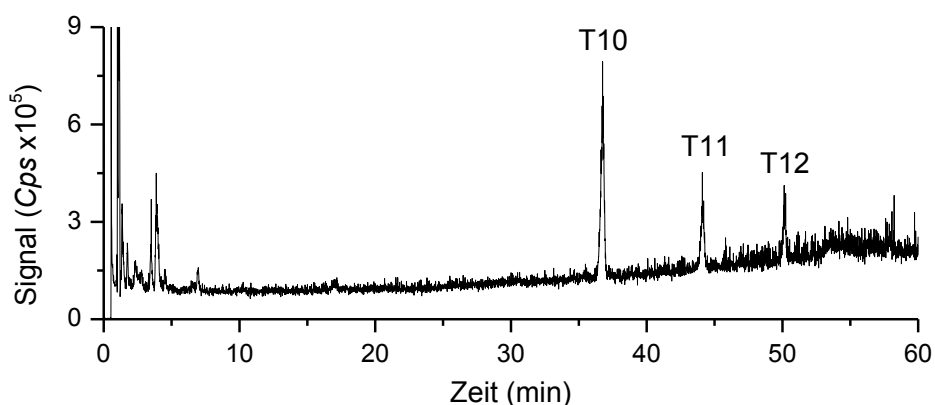


(C)  $m/z$  256  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  238  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  220  $[M+H-2H_2O]^+$ ,  $m/z$  192  $[M+H-H_2O-COOH]^+$ ,  $m/z$  112  $[Cytosin+H]^+$ .

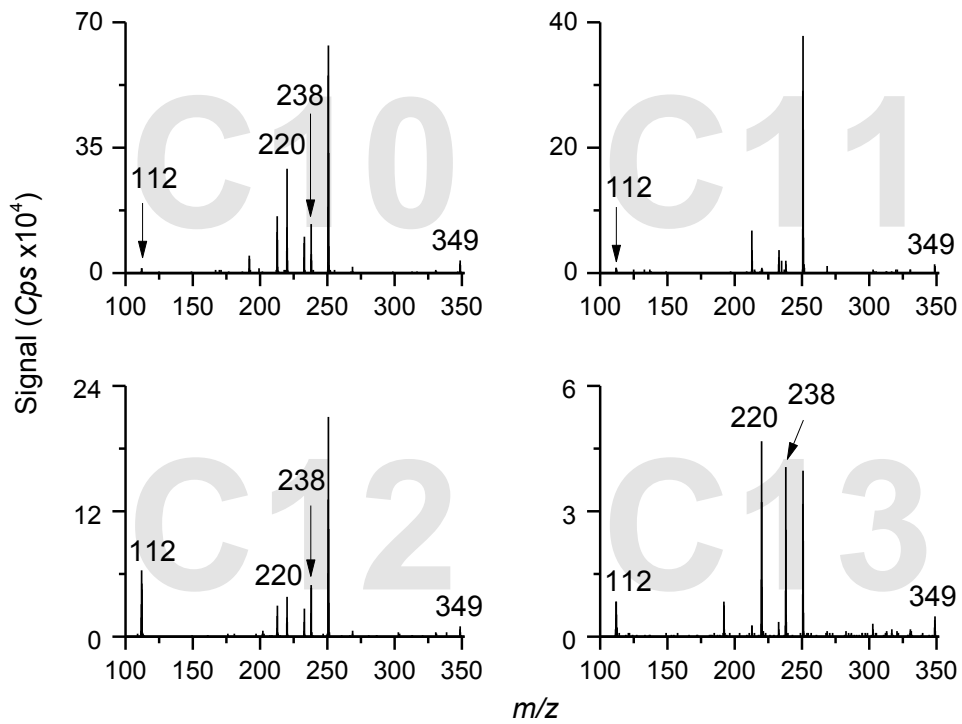
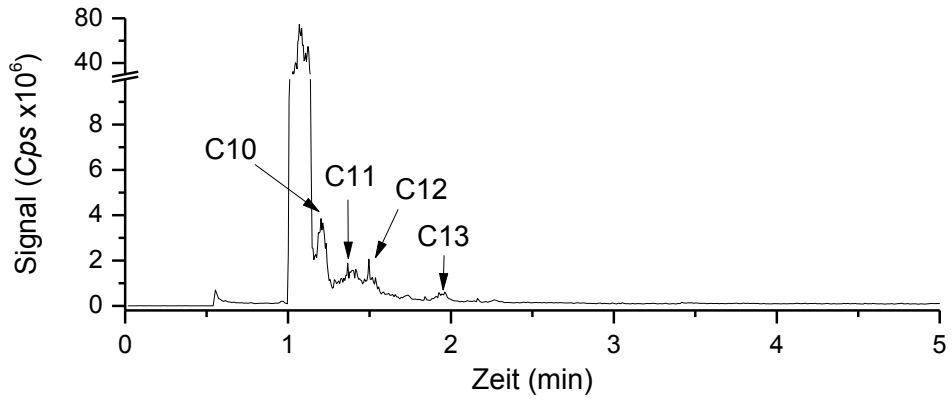


A4.6 TIC (oben) und Massenspektren (unten) nach kollisionsinduzierter Fragmentierung der Molekülonen der homogenen Diaddukte von PAT mit Thymin mit  $m/z$  379 (A) und PAT mit Cytosin mit  $m/z$  349 (B), sowie der heterogenen Diaddukte von PAT mit Adenin und Guanin mit  $m/z$  413 (C), PAT mit Adenin und Thymin mit  $m/z$  388 (D) und PAT mit Adenin und Cytosin mit  $m/z$  373 (E, enhanced Produktionenscan, CE 20 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1).

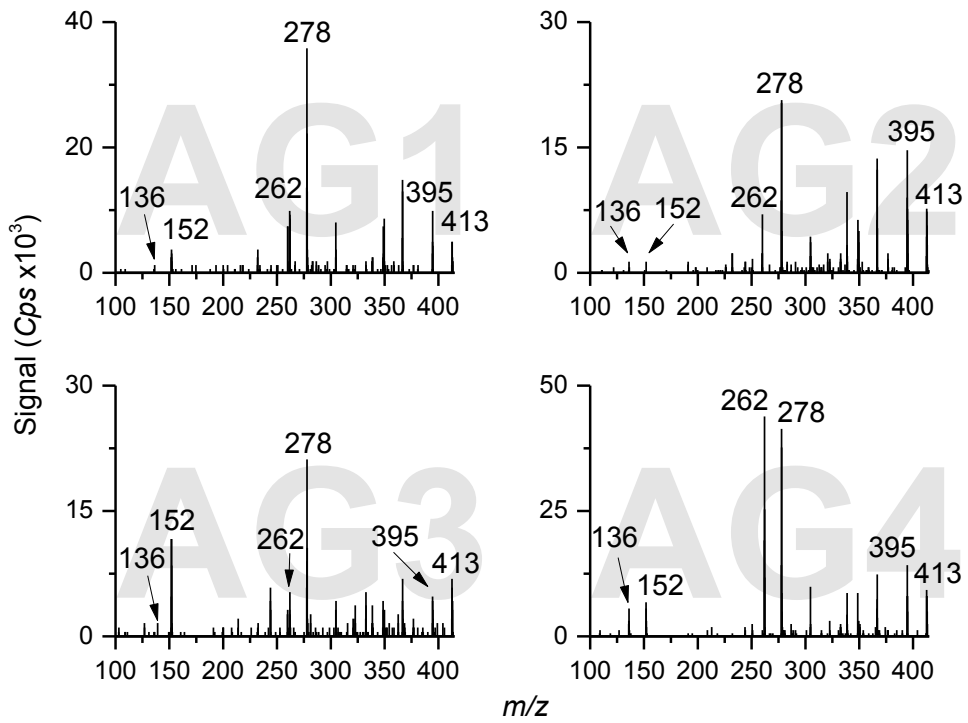
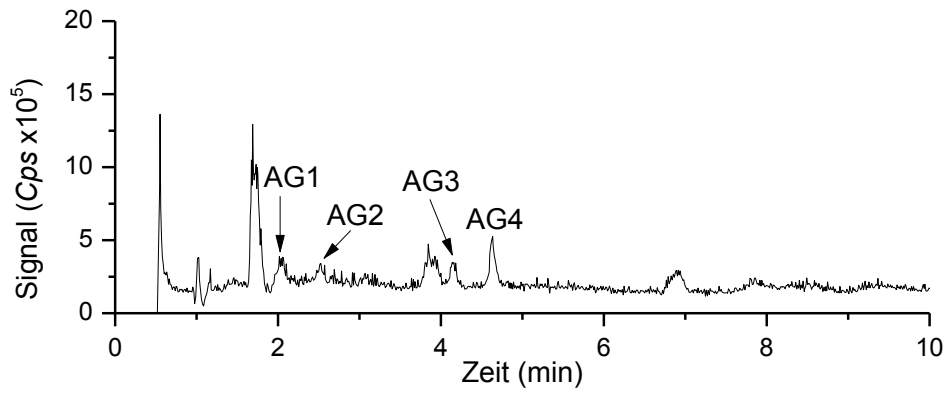
(A) PAT-Thymin (T):  $m/z$  379  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  253  $[M+H-Thymin]^+$ ,  $m/z$  235  $[M+H-Thymin-H_2O]^+$ ,  $m/z$  207  $[M+H-Thymin-COOH]^+$ ,  $m/z$  127  $[Thymin+H]^+$ .



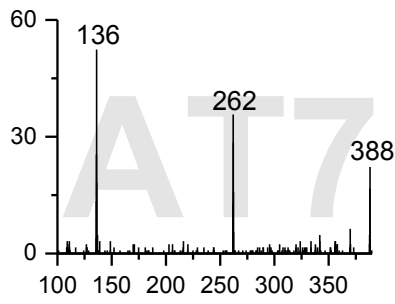
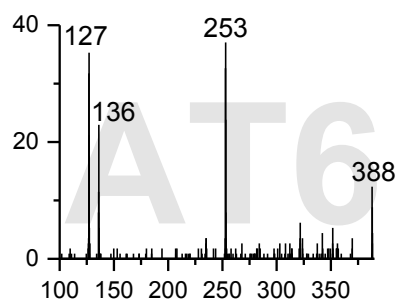
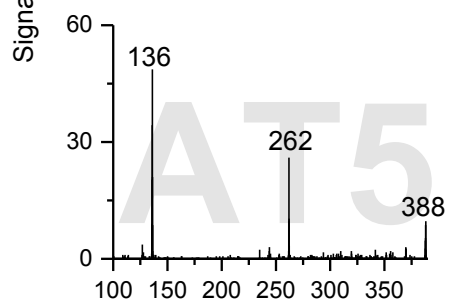
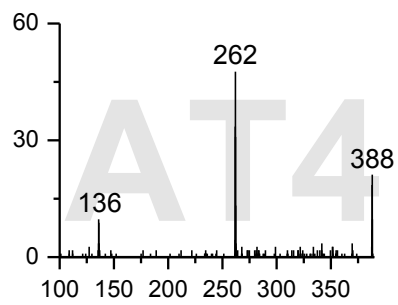
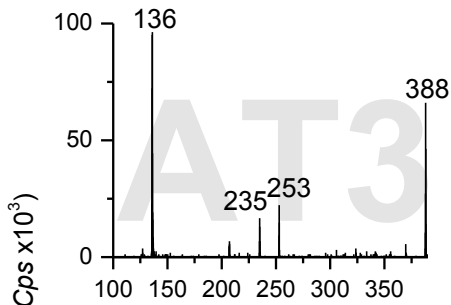
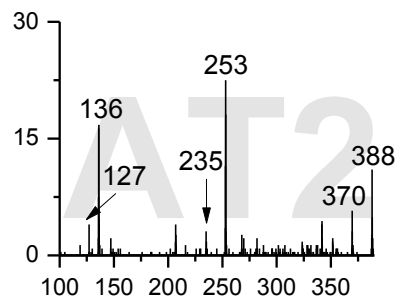
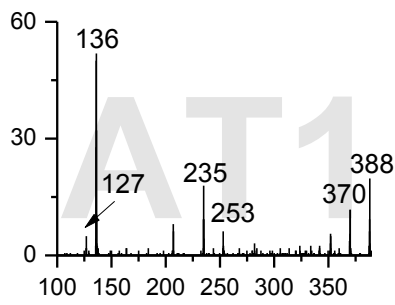
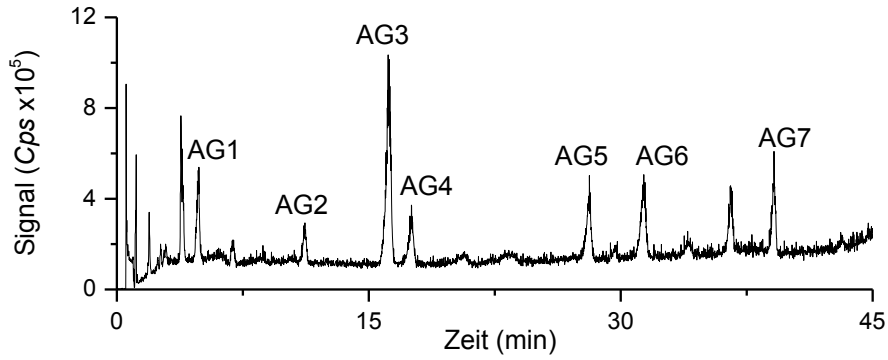
(B) PAT-Cytosin (C):  $m/z$  349  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  238  $[M+H-Cytosin]^+$ ,  $m/z$  220  $[M+H-Cytosin-H_2O]^+$ ,  $m/z$  112  $[Cytosin+H]^+$ .



(C) Adenin-PAT-Guanin (AG):  $m/z$  413  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  395  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  278  $[M+H-Adenin]^+$ ,  $m/z$  262  $[M+H-Guanin]^+$ ,  $m/z$  152  $[Guanin+H]^+$ ,  $m/z$  136  $[Adenin+H]^+$ .

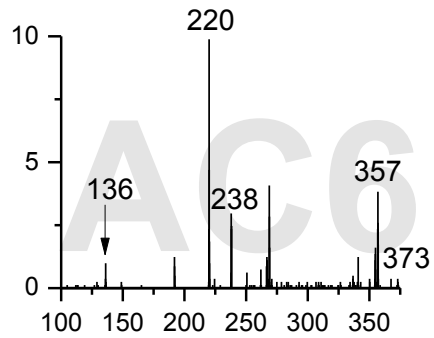
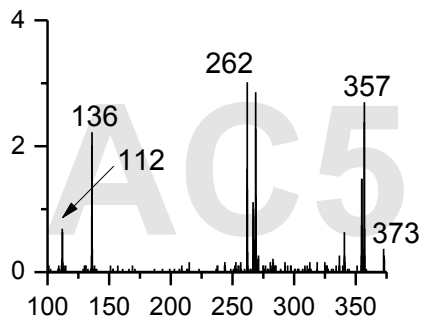
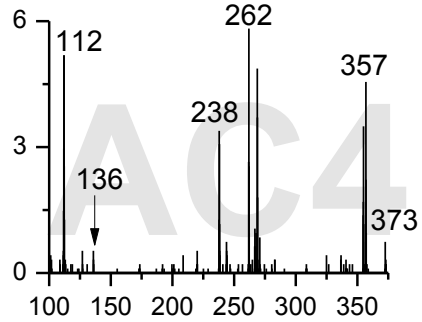
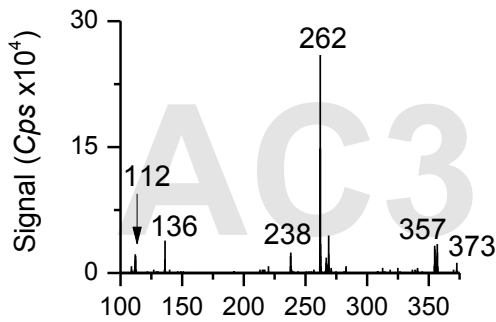
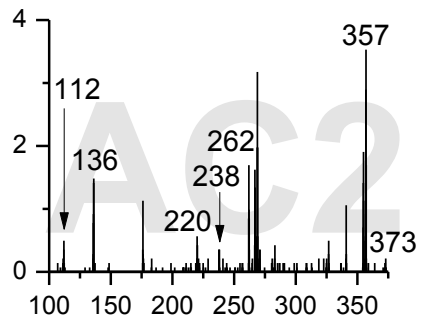
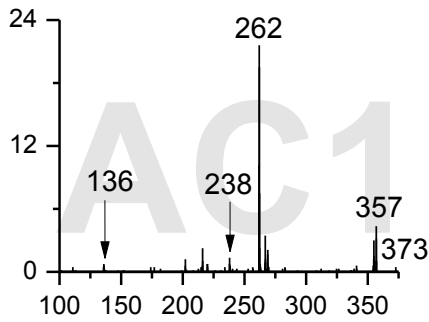
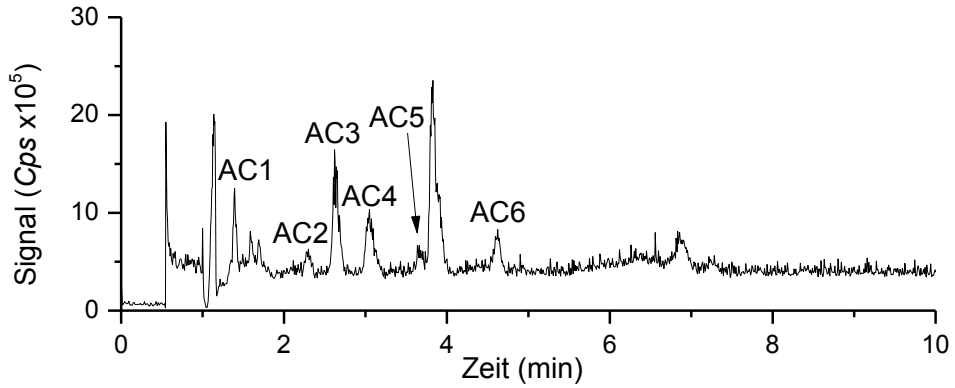


(D) Adenin-PAT-Thymin (AT):  $m/z$  388  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  370  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  262  $[M+H-$   
 Thymin] $^+$ ,  $m/z$  253  $[M+H-Adenin]^+$ ,  $m/z$  253  $[M+H-Adenin-H_2O]^+$ ,  $m/z$  136  
 $[Adenin+H]^+$ ,  $m/z$  127  $[Thymin+H]^+$ .



$m/z$

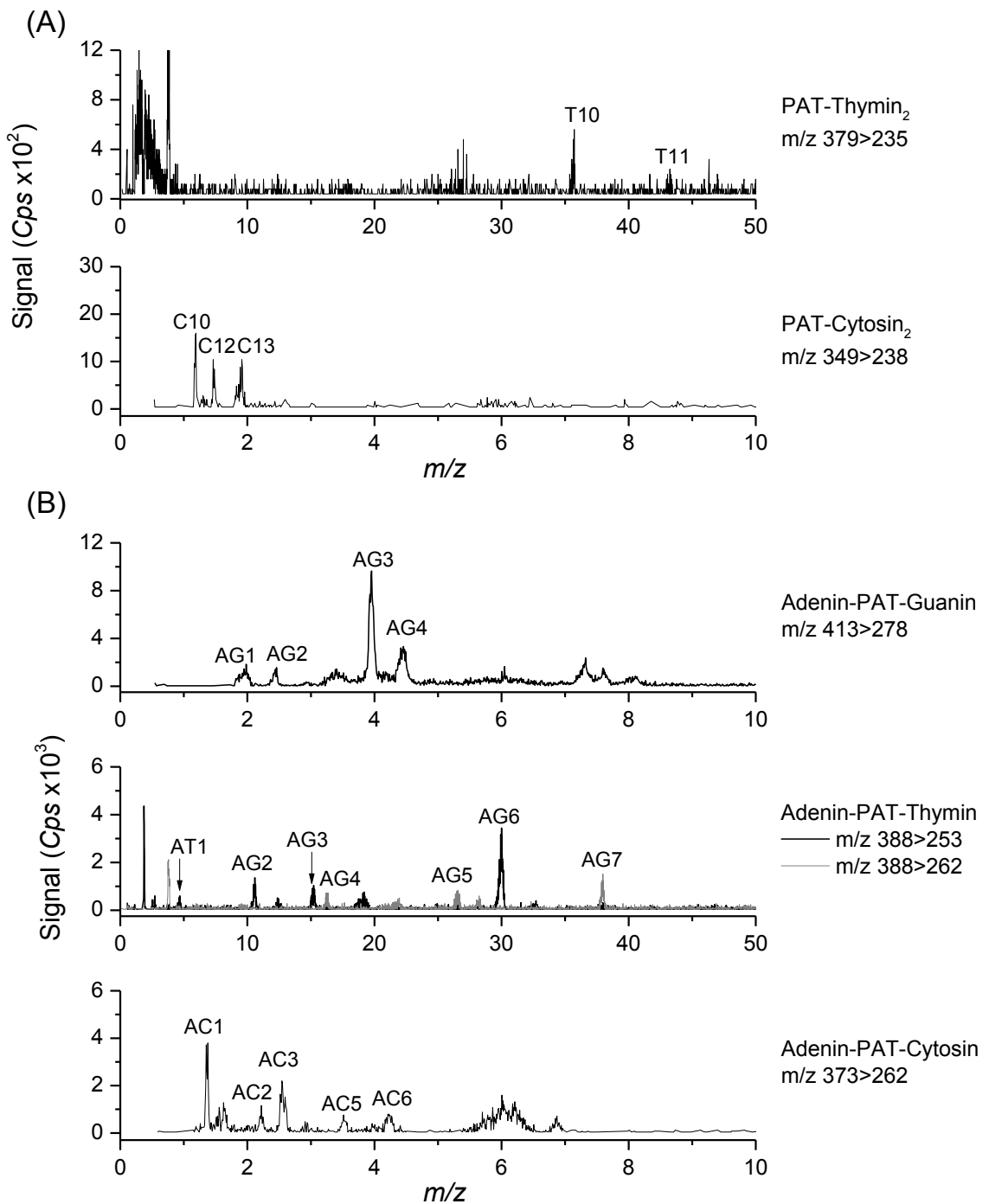
(E) Adenin-PAT-Cytosin (AC):  $m/z$  373  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  357  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  262  $[M+H-Cytosin]^+$ ,  $m/z$  238  $[M+H-Adenin]^+$ ,  $m/z$  220  $[M+H-Adenin-H_2O]^+$ ,  $m/z$  136  $[Adenin+H]^+$ ,  $m/z$  112  $[Cytosin+H]^+$ .



$m/z$

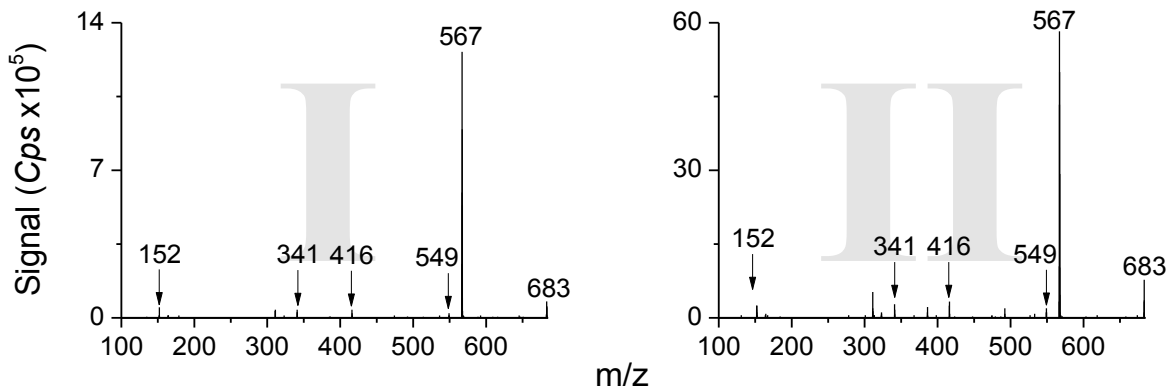


A4.7 MRM-Chromatogramme der (A) homosubstituierten PAT-Thymin (PAT-Thymin<sub>2</sub>:  $m/z$  379  $[M + H]^+ > 235 [M + H - \text{Thymin} - \text{H}_2\text{O}]^+$ ) und PAT-Cytosin (PAT-Cytosin<sub>2</sub>:  $m/z$  349  $[M + H]^+ > 238 [M + H - \text{Cytosin}]^+$ ) -Diaddukte und der (B) heterosubstituierten Adenin-PAT-Guanin ( $m/z$  413  $[M + H]^+ > 278 [M + H - \text{Adenin}]^+$ ), Adenin-PAT-Thymin ( $m/z$  388  $[M + H]^+ > 253 [M + H - \text{Adenin}]^+$ ,  $m/z$  388  $[M + H]^+ > 262 [M + H - \text{Thymin}]^+$ ) und Adenin-PAT-Cytosin ( $m/z$  373  $[M + H]^+ > 262 [M + H - \text{Cytosin}]^+$ ) -Diaddukte, welche durch Inkubation (3 Tage, RT, pH 7,4) von PAT (1,6 mM) in Anwesenheit von GSH (0,8 mM) und allen DNA Basen (je 0,8 mM) gebildet wurden. HPLC-MS/MS-Methode Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1.

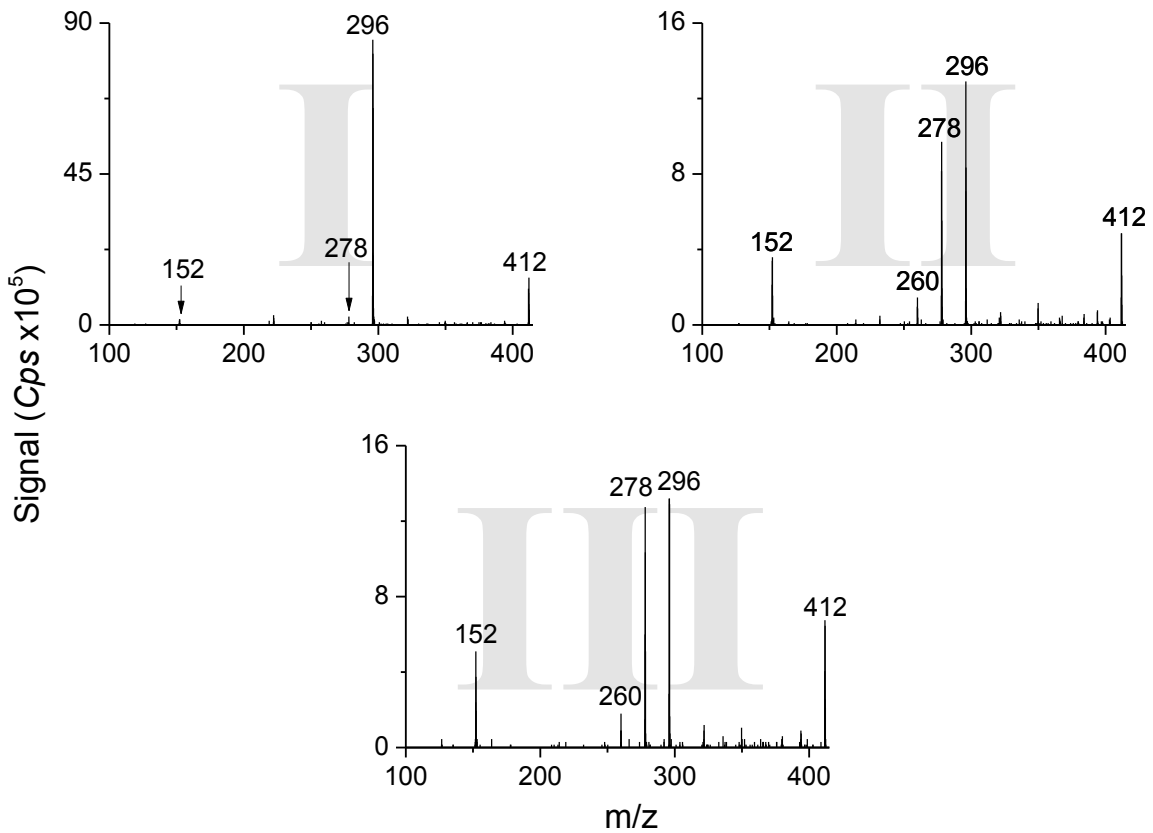


A4.8 Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung der Molekülionen der cGSH-PAT-dNuS-Mischaddukte von PAT mit dG ( $m/z$  683; A), sowie der PAT-dNuS Monoaddukte mit dG ( $m/z$  412; B) (*enhanced* Produktionsenscan, CE 15 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1).

(A) cGSH-PAT-dG:  $m/z$  683  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  567  $[M+H\text{-Deoxyribose}]^+$ ,  $m/z$  549  $[M+H\text{-Deoxyribose-H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  416  $[M+H\text{-dG}]^+$ ,  $m/z$  341  $[M+H\text{-Glycin-dG}]^+$ ,  $m/z$  152  $[\text{Guanin}+H]^+$ .

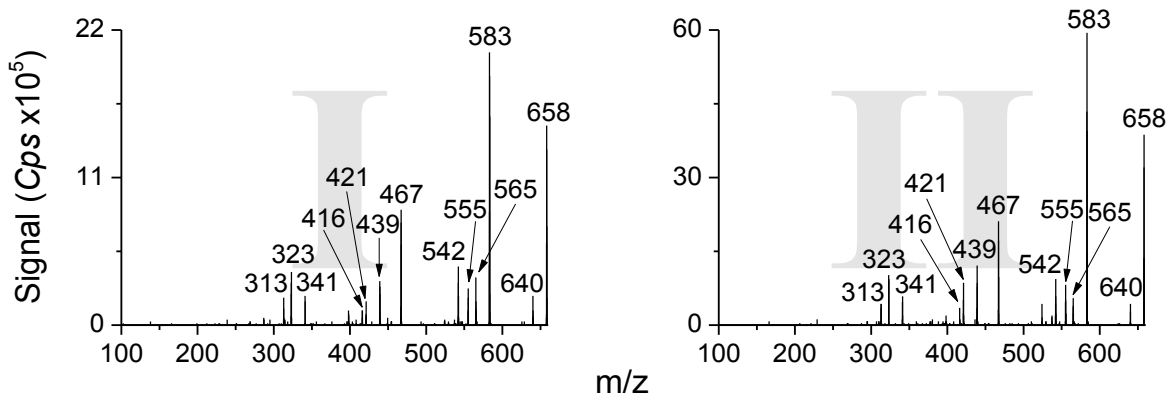


(B) PAT-dG:  $m/z$  412  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  296  $[M+H\text{-Deoxyribose}]^+$ ,  $m/z$  278  $[M+H\text{-Deoxyribose-H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  260  $[M+H\text{-Deoxyribose-2H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  152  $[\text{Guanin}+H]^+$ .

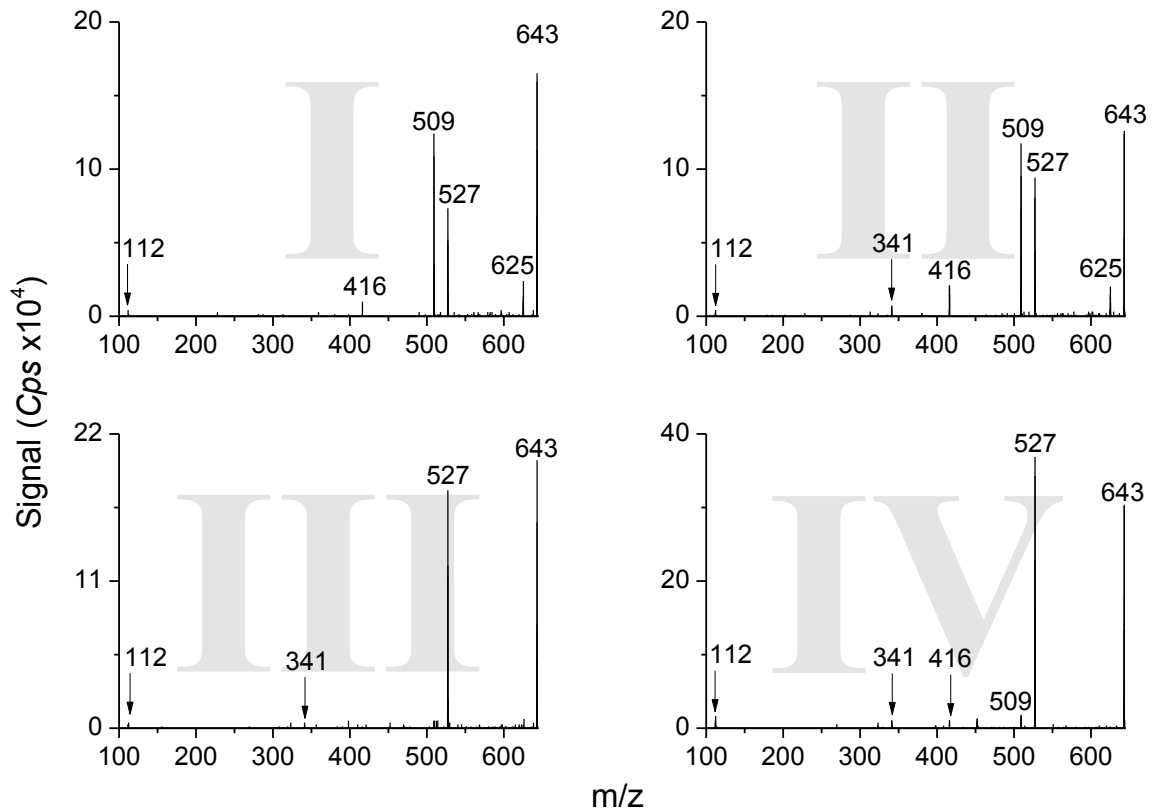


A4.9 Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung der Molekülonen der cGSH-PAT-dNuS-Mischaddukte von PAT mit dT ( $m/z$  658; A) und dC ( $m/z$  643; B) (*enhanced* Produktionenscan, CE 15 V, Kapitel 6.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Die Nummerierung der Massenspektren entspricht der Nummerierung aus **Abb. 58**.

(A) cGSH-PAT-dT:  $m/z$  658 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  583 [M+H-Glycin]<sup>+</sup>,  $m/z$  565 [M+H-Glycin-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>,  $m/z$  555 [M+H-Glycin-CO]<sup>+</sup>,  $m/z$  542 [M+H-Deoxyribose]<sup>+</sup>,  $m/z$  467 [M+H-Deoxyribose-Glycin]<sup>+</sup>,  $m/z$  439 [M+H-Deoxyribose-Glycin-CO]<sup>+</sup>,  $m/z$  421 [M+H-Deoxyribose-Glycin-CO-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>,  $m/z$  416 [M+H-dT]<sup>+</sup>,  $m/z$  341 [M+H-Glycin-dT]<sup>+</sup>,  $m/z$  323 [M+H-Glycin-dT-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>,  $m/z$  313 [M+H-Glycin-dT-CO]<sup>+</sup>.



(B) cGSH-PAT-dC:  $m/z$  643 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  625 [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>,  $m/z$  527 [M+H-Deoxyribose]<sup>+</sup>,  $m/z$  509 [M+H-Deoxyribose-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>,  $m/z$  416 [M+H-dC]<sup>+</sup>,  $m/z$  341 [M+H-Glycin-dC]<sup>+</sup>,  $m/z$  112 [Cytosin+H]<sup>+</sup>.



ANHANG

**A5 DNA-Hydrolyse**

A5.1 Chromatographische Daten und Auswertungen zu den Stabilitätsuntersuchungen der cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 unter den aufgeführten Hydrolysebedingungen. Diaster., Diastereomer; Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; IS, Interner Standard; Wdf., Wiederfindung; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

|  |           | Addukt 5.1  |             | Addukt 5.2  |             | IS (Coffein) |             | Flächen-<br>verhältnis<br>Summe<br>Addukte/IS | Wdf. (%)<br>bezogen auf<br>die Kontrolle | MW<br>(%) | Stabw<br>(%) |
|--|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---|--|-----------|--------------|
|  |           | Rt<br>(min) | Fläche (FE) | Rt<br>(min) | Fläche (FE) | Rt<br>(min)  | Fläche (FE) |   |  |           |              |
| Alkalische enzymatische<br>Hydrolyse mit TRIS-<br>HCl-Puffer<br>pH 8, 16 h, 37°C | a         | 6,8         | 2,43895     | 11,2        | 3,55098     | 19,7         | 735,97705   | 0,00814                                       | 21,42880                                 |           |              |
|  | b         | 6,7         | 1,71555     | 10,9        | 2,43401     | 19,7         | 734,75366   | 0,00565                                       | 14,86965                                 |           |              |
|  | c         | 6,7         | 2,12171     | 10,9        | 3,26571     | 19,7         | 731,99072   | 0,00736                                       | 19,37830                                 |           |              |
|  | Kontrolle | 6,7         | 16,02231    | 11,0        | 11,90299    | 19,7         | 735,25540   | 0,03798                                       |  | 18,56     | 3,36         |
| Saure enzymatische<br>Hydrolyse mit NaOAc-<br>Puffer<br>pH 5, 115 min, 37°C      | a         | 6,4         | 128,40555   | 12,4        | 126,99815   | 19,6         | 424,49030   | 0,60167                                       | 56,57616                                 |           |              |
|  | b         | 6,4         | 123,78858   | 12,4        | 120,35725   | 19,6         | 421,26236   | 0,57956                                       | 54,49676                                 |           |              |
|  | c         | 6,3         | 131,12589   | 12,4        | 140,90054   | 19,6         | 442,43292   | 0,61484                                       | 57,81462                                 |           |              |
|  | Kontrolle | 7,3         | 447,15128   | 12,4        | 51,69861    | 19,6         | 469,07675   | 1,06347                                       |  | 56,30     | 1,68         |
| Saure chemische<br>Hydrolyse mit TFA 98%<br>45 min, 70°C                         | a         | 4,9         | 424,52692   | 6,9         | 705,70508   | 19,1         | 852,19110   | 1,32627                                       | 65,24393                                 |           |              |
|  | b         | 4,9         | 513,82629   | 6,9         | 734,34137   | 19,1         | 851,04437   | 1,46663                                       | 72,14899                                 |           |              |
|  | c         | 4,9         | 430,13388   | 6,9         | 724,49164   | 19,1         | 850,13702   | 1,35816                                       | 66,81312                                 |           |              |
|  | Kontrolle | 4,8         | 1153,50366  | 6,8         | 540,20953   | 19,1         | 833,20026   | 2,03278                                       |  | 68,07     | 3,62         |
| Saure chemische<br>Hydrolyse mit HCl 1 M<br>30 min, 70°C                         | a         | 6,3         | 556,42255   | 10,0        | 343,48349   | 19,6         | 767,70282   | 1,17221                                       | 80,30824                                 |           |              |
|  | b         | 6,4         | 537,49377   | 10,2        | 415,78244   | 19,6         | 770,31177   | 1,23752                                       | 84,78291                                 |           |              |
|  | c         | 6,3         | 554,67572   | 10,1        | 369,73630   | 19,5         | 782,82568   | 1,18087                                       | 80,90151                                 |           |              |
|  | Kontrolle | 6,4         | 846,70551   | 10,4        | 276,25714   | 19,6         | 769,34546   | 1,45963                                       |  | 82,00     | 2,43         |

ANHANG

---

Fortsetzung A5.1

|   |           |     |            |      |           |      |           |         |           |       |      |
|---|-----------|-----|------------|------|-----------|------|-----------|---------|-----------|-------|------|
| Saure chemische<br>Hydrolyse mit FA 88%<br>15 min, 70°C                           | a         | 6,4 | 1146,19556 | 10,4 | 453,04779 | 19,6 | 783,15826 | 2,04204 | 96,29526  |       |      |
|   | b         | 6,6 | 1194,70898 | 10,8 | 514,20166 | 19,6 | 783,38165 | 2,18145 | 102,86932 |       |      |
|   | c         | 6,4 | 1187,82214 | 10,4 | 364,37231 | 19,6 | 771,19122 | 2,01272 | 94,91262  |       |      |
|   | Kontrolle | 6,4 | 1507,12195 | 10,3 | 127,17262 | 19,6 | 770,67316 | 2,12061 |           | 98,03 | 4,25 |
| Saure chemische<br>Hydrolyse mit FA 88%<br>45 min, 140°C                          | a         | -   | n.d.       | -    | n.d.      | 19,5 | 861,34106 | -       | -         |       |      |
|   | b         | -   | n.d.       | -    | n.d.      | 19,5 | 888,17834 | -       | -         |       |      |
|   | c         | -   | n.d.       | -    | n.d.      | 19,5 | 862,88232 | -       | -         |       |      |
|   | Kontrolle | 6,0 | 651,73645  | 9,2  | 545,27667 | 19,6 | 862,64270 | 1,38761 |           | n.d.  | n.d. |
| Neutrale Hydrolyse in<br>Kaliumphosphatpuffer<br>(0,1 M, pH 7,4)<br>10 min, 100°C | a         | 6,2 | 1,39242    | 9,3  | 1,02641   | 19,4 | 716,87494 | 0,00337 | 0,99241   |       |      |
|   | b         | 6,0 | 2,44098    | 9,2  | 2,07427   | 19,4 | 714,48547 | 0,00632 | 1,85873   |       |      |
|   | c         | 6,0 | 3,49130    | 9,2  | 5,82540   | 19,4 | 718,24890 | 0,00811 | 2,38549   |       |      |
|   | Kontrolle | 6,0 | 198,4503   | 9,3  | 242,32485 | 19,4 | 712,72992 | 0,34000 |           | 1,75  | 0,70 |

ANHANG

A5.2 Chromatographische Daten und Auswertungen zu den Stabilitätsuntersuchungen der PAT-Adenin-Addukte unter den aufgeführten Hydrolysebedingungen. PA, PAT-Adenin-Monoaddukte; PAA; PAT-Adenin-Diaddukte Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; IS, Interner Standard; FV, Flächenverhältnis Addukt/IS; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung; Wdf, Wiederfindung.

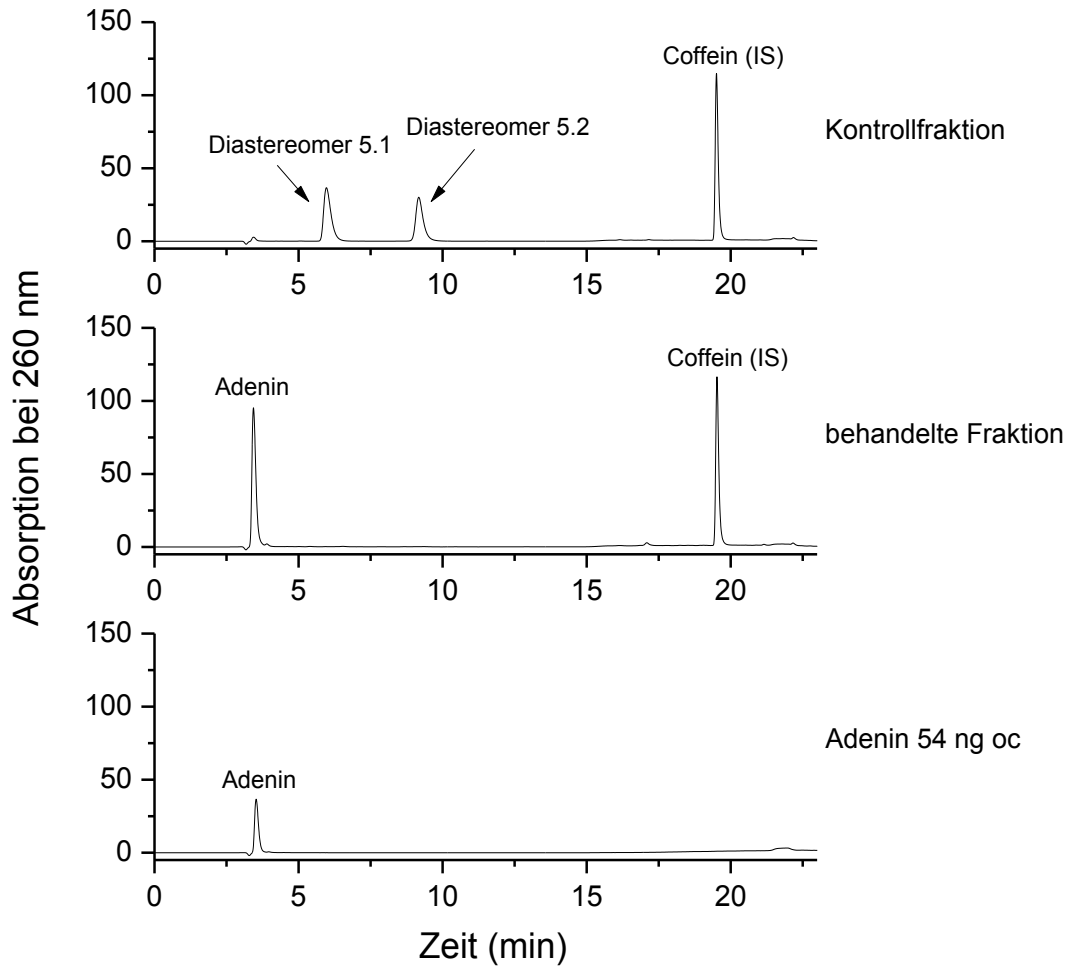
|  |               | Kontrolle |             |      | Hydrolyse a |             |      |         | Hydrolyse b |             |      |         | Hydrolyse c |             |      |         | MW (%) | Stabw (%) |
|--|---------------|-----------|-------------|------|-------------|-------------|------|---------|-------------|-------------|------|---------|-------------|-------------|------|---------|--------|-----------|
|  |               | Rt (min)  | Fläche (FE) | FV   | Rt (min)    | Fläche (FE) | FV   | Wdf (%) | Rt (min)    | Fläche (FE) | FV   | Wdf (%) | Rt (min)    | Fläche (FE) | FV   | Wdf (%) |        |           |
| alkalische enzymat. Hydrolyse mit TRIS-HCl-Puffer pH 8, 16 h, 37°C                               | Adenosin (IS) | 19,8      | 151,80569   |      | 19,3        | 151,32256   |      |         | 19,5        | 151,65596   |      |         | 19,8        | 151,89363   |      |         |        |           |
|  | PA1.1         | 10,3      | 98,87693    | 0,65 | 10,1        | 44,92941    | 0,30 | 45,58   | 10,1        | 47,71019    | 0,31 | 48,30   | 10,3        | 35,30523    | 0,23 | 35,69   | 43,19  | 6,64      |
|  | PA 1.2        | 17,1      | 37,37253    | 0,25 | 16,7        | 11,18949    | 0,07 | 30,04   | 16,9        | 9,90169     | 0,07 | 26,52   | 17,2        | 9,87331     | 0,07 | 26,40   | 27,65  | 2,06      |
|  | PA 1.3        | 7,7       | 107,05652   | 0,71 | 7,7         | 56,43474    | 0,37 | 52,88   | 7,7         | 63,26273    | 0,42 | 59,15   | 7,7         | 64,32723    | 0,42 | 60,05   | 57,36  | 3,91      |
|  | PAA 2.1       | 17,7      | 13,73663    | 0,09 | 17,2        | 12,24233    | 0,08 | 89,41   | 17,4        | 13,02172    | 0,09 | 94,89   | 17,7        | 11,84932    | 0,08 | 86,21   | 90,17  | 4,39      |
| saure enzymat. Hydrolyse mit Puffermix (Na-acetat, MgSO <sub>4</sub> , NaCl) pH 5, 115 min, 37°C | Adenosin (IS) | 19,8      | 152,64264   |      | 19,8        | 142,4435    |      |         | 20,0        | 152,05847   |      |         | 19,9        | 139,92525   |      |         |        |           |
|  | PA1.1         | 10,3      | 116,79008   | 0,77 | 10,4        | 93,77551    | 0,66 | 86,04   | 10,4        | 112,36668   | 0,74 | 96,58   | 10,4        | 89,68684    | 0,64 | 83,77   | 88,80  | 6,84      |
|  | PA 1.2        | 17,1      | 40,13453    | 0,26 | 17,2        | 28,67145    | 0,20 | 76,55   | 17,3        | 33,88542    | 0,22 | 84,75   | 17,3        | 24,87394    | 0,18 | 67,61   | 76,31  | 8,58      |
|  | PA 1.3        | 7,7       | 121,54102   | 0,80 | 7,7         | 82,51089    | 0,58 | 72,75   | 7,7         | 139,02968   | 0,91 | 114,83  | 7,7         | 109,90074   | 0,79 | 98,64   | 95,41  | 21,23     |
|  | PAA 2.1       | 17,7      | 19,95944    | 0,13 | 17,7        | 15,51616    | 0,11 | 83,30   | 17,8        | 19,4439     | 0,13 | 97,79   | 17,8        | 17,62276    | 0,13 | 96,32   | 92,47  | 7,97      |
| saure chemische Hydrolyse mit TFA 98% 45 min, 70°C   | Adenosin (IS) | 19,4      | 152,13863   |      | 19,7        | 150,77065   |      |         | 19,7        | 150,97899   |      |         | 19,8        | 151,18527   |      |         |        |           |
|  | PA1.1         | 10,2      | 160,13187   | 1,05 | 10,3        | 115,04379   | 0,76 | 72,50   | 10,3        | 111,0498    | 0,74 | 69,88   | 10,3        | 111,71056   | 0,74 | 70,20   | 70,86  | 1,43      |
|  | PA 1.2        | 16,8      | 48,65915    | 0,32 | 17,0        | 30,36916    | 0,20 | 62,98   | 17,0        | 31,1382     | 0,21 | 64,48   | 17,1        | 31,57328    | 0,21 | 65,30   | 64,25  | 1,18      |
|  | PA 1.3        | 7,7       | 196,00198   | 1,29 | 7,7         | 145,1225    | 0,96 | 74,71   | 7,7         | 141,06044   | 0,93 | 72,52   | 7,8         | 142,56183   | 0,94 | 73,19   | 73,48  | 1,12      |
|  | PAA 2.1       | 17,3      | 25,90639    | 0,17 | 17,6        | 27,9704     | 0,19 | 108,95  | 17,5        | 29,69236    | 0,20 | 115,49  | 17,7        | 28,25068    | 0,19 | 109,74  | 111,39 | 3,57      |

ANHANG

Fortsetzung A5.2:

|   |               |      |           |      |      |           |      |        |           |           |      |           |      |           |      |        |        |       |
|---|---------------|------|-----------|------|------|-----------|------|--------|-----------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|--------|--------|-------|
|   | Adenosin (IS) | 16,5 | 155,96817 |      | 16,5 | 156,30882 |      | 16,5   | 157,17937 |           | 16,4 | 156,79251 |      |           |      |        |        |       |
| saure chemische<br>Hydrolyse mit HCl<br>1 M 30 min, 70°C                                  | PA1.1         | 9,0  | 109,61918 | 0,70 | 9,0  | 126,67861 | 0,81 | 115,31 | 9,0       | 113,1277  | 0,72 | 102,41    | 8,9  | 126,52489 | 0,81 | 114,82 | 110,84 | 7,31  |
|   | PA 1.2        | 14,9 | 34,82817  | 0,22 | 14,9 | 35,41990  | 0,23 | 101,48 | 14,9      | 34,53157  | 0,22 | 98,38     | 14,8 | 34,23470  | 0,22 | 97,78  | 99,21  | 1,98  |
|   | PA 1.3        | 6,9  | 89,47293  | 0,57 | 6,9  | 92,90710  | 0,59 | 103,61 | 6,9       | 83,4680   | 0,53 | 92,57     | 6,9  | 95,07608  | 0,61 | 105,70 | 100,63 | 7,06  |
|   | PAA 2.1       | 13,6 | 9,66428   | 0,06 | 13,5 | 9,45559   | 0,06 | 97,63  | 13,6      | 7,60755   | 0,05 | 78,11     | 13,4 | 9,10266   | 0,06 | 93,69  | 89,81  | 10,32 |
|   | Adenosin (IS) | 19,9 | 151,75986 |      | 20,0 | 151,71194 |      | 20,0   | 150,43481 |           | 20   | 149,6665  |      |           |      |        |        |       |
| saure chemische<br>Hydrolyse mit FA<br>88% 15 min, 70°C                                   | PA1.1         | 10,3 | 135,99832 | 0,90 | 10,4 | 127,01379 | 0,84 | 93,42  | 10,4      | 121,93924 | 0,81 | 90,45     | 10,4 | 126,6499  | 0,85 | 94,43  | 92,77  | 2,07  |
|   | PA 1.2        | 17,2 | 44,59245  | 0,29 | 17,3 | 41,01755  | 0,27 | 92,01  | 17,3      | 36,33934  | 0,24 | 82,21     | 17,2 | 35,69716  | 0,24 | 81,17  | 85,13  | 5,98  |
|   | PA 1.3        | 7,7  | 172,0062  | 1,13 | 7,8  | 170,51683 | 1,12 | 99,17  | 7,8       | 165,12186 | 1,10 | 96,84     | 7,8  | 170,34134 | 1,14 | 100,42 | 98,81  | 1,81  |
|   | PAA 2.1       | 17,7 | 24,50136  | 0,16 | 17,9 | 21,42218  | 0,14 | 87,46  | 17,9      | 21,35999  | 0,14 | 87,95     | 17,8 | 21,39799  | 0,14 | 88,56  | 87,99  | 0,55  |
|   | Adenosin (IS) | 21,0 | 150,69214 |      | 21,0 | 151,25043 |      | 21,0   | 147,76617 |           | 21,1 | 155,15456 |      |           |      |        |        |       |
| saure chemische<br>Hydrolyse mit FA<br>88% 45 min,<br>140°C                               | PA1.1         | 10,8 | 139,33427 | 0,92 | 10,8 | 95,33516  | 0,63 | 68,17  | 10,8      | 91,02852  | 0,62 | 66,62     | 10,8 | 89,87739  | 0,58 | 62,65  | 65,81  | 2,85  |
|   | PA 1.2        | 18,1 | 44,19586  | 0,29 | 18,2 | 35,60357  | 0,24 | 80,26  | 18,1      | 39,36139  | 0,27 | 90,82     | 18,2 | 33,15566  | 0,21 | 72,86  | 81,32  | 9,03  |
|   | PA 1.3        | 8,0  | 151,82361 | 1,01 | 8,0  | 107,94387 | 0,71 | 70,84  | 8,0       | 96,99545  | 0,66 | 65,15     | 8    | 98,1042   | 0,63 | 62,76  | 66,25  | 4,15  |
|   | PAA 2.1       | 18,7 | 22,66068  | 0,15 | 18,7 | 13,88719  | 0,09 | 61,06  | 18,7      | 17,42885  | 0,12 | 78,44     | 18,8 | 13,02038  | 0,08 | 55,81  | 65,10  | 11,84 |
|   | Adenosin (IS) | 21,1 | 151,77634 |      | 21,1 | 151,62448 |      | 21,0   | 150,81683 |           | 21,1 | 151,6722  |      |           |      |        |        |       |
| Neutrale<br>Hydrolyse in<br>Kaliumphosphat-<br>puffer (0,1 M, pH<br>7,4) 10 min,<br>100°C | PA1.1         | 10,9 | 136,14938 | 0,90 | 10,9 | 17,4394   | 0,12 | 12,82  | 10,8      | 17,32597  | 0,11 | 12,81     | 10,9 | 14,15686  | 0,09 | 10,41  | 12,01  | 1,39  |
|   | PA 1.2        | 18,2 | 45,36544  | 0,30 | 18,2 | 2,35267   | 0,02 | 5,19   | 18,2      | 2,58623   | 0,02 | 5,74      | 18,2 | 2,52683   | 0,02 | 5,57   | 5,50   | 0,28  |
|   | PA 1.3        | 8,1  | 159,16357 | 1,05 | 8,0  | 9,94833   | 0,07 | 6,26   | 8,0       | 12,4227   | 0,08 | 7,85      | 8,1  | 10,12866  | 0,07 | 6,37   | 6,83   | 0,89  |
|   | PAA 2.1       | 18,8 | 22,72133  | 0,15 | 18,8 | 28,73041  | 0,19 | 126,57 | 18,7      | 25,77787  | 0,17 | 114,17    | 18,8 | 22,76409  | 0,15 | 100,26 | 113,67 | 13,17 |

A5.3 HPLC-UV-Chromatogramme der unbehandelten Kontrollfraktion der diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2, einer Fraktion die mit den Bedingungen der starken sauren Hydrolyse mit 88%iger FA (140°C, 45 min) inkubiert wurde und einer Mischung von Adenin und Coffein als internem Standard (IS) Die Auftrennung erfolgte mittels HPLC-UV Methode 4 (Kapitel 6.2.1.1).





ANHANG

A5.4 a) Retentionszeiten (Rt) und Peakflächen von Guanin (Gua) und dem internen Standard Theobromin (TB) der externen Kalibrierung von Guanin und Berechnung der Flächenverhältnisse (FV) Gua/TB. FE, Flächeneinheit.

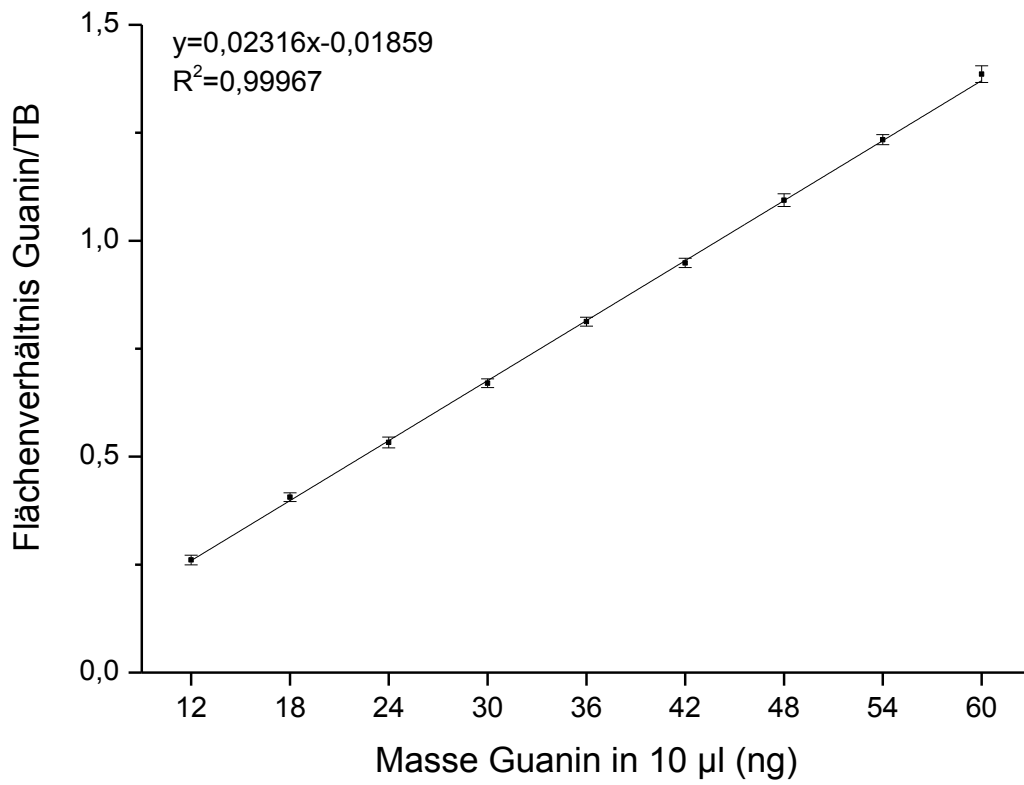
| Konz. Gua<br>in 10 µl<br>(ng) | Kalibriergerade 1 |                   |                   |                   |              | Kalibriergerade 2 |                   |                   |                   |              | Kalibriergerade 3 |                   |                   |                   |              |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|
|                               | Rt Gua<br>(min)   | Fläche<br>Gua FE) | Rt<br>TB<br>(min) | Fläche<br>TB (FE) | FV<br>Gua/TB | Rt Gua<br>(min)   | Fläche<br>Gua FE) | Rt<br>TB<br>(min) | Fläche<br>TB (FE) | FV<br>Gua/TB | Rt Gua<br>(min)   | Fläche<br>Gua FE) | Rt<br>TB<br>(min) | Fläche<br>TB (FE) | FV<br>Gua/TB |
| 12,0                          | 5,4               | 32,717            | 15,0              | 130,882           | 0,250        | 5,4               | 36,029            | 15,0              | 132,293           | 0,272        | 5,2               | 33,363            | 14,7              | 128,246           | 0,260        |
| 18,0                          | 5,4               | 51,602            | 15,1              | 124,217           | 0,415        | 5,3               | 53,613            | 14,9              | 131,600           | 0,407        | 5,2               | 52,117            | 14,7              | 131,772           | 0,396        |
| 24,0                          | 5,4               | 69,405            | 15,0              | 132,857           | 0,522        | 5,3               | 69,734            | 14,9              | 127,553           | 0,547        | 5,2               | 69,642            | 14,6              | 131,466           | 0,530        |
| 30,0                          | 5,4               | 85,067            | 15,0              | 127,423           | 0,668        | 5,3               | 87,841            | 14,9              | 128,917           | 0,681        | 5,2               | 86,222            | 14,6              | 130,341           | 0,662        |
| 36,0                          | 5,4               | 103,606           | 15,1              | 127,322           | 0,814        | 5,3               | 104,799           | 14,9              | 127,445           | 0,822        | 5,5               | 104,121           | 15,2              | 129,831           | 0,802        |
| 42,0                          | 5,4               | 121,513           | 15,1              | 128,874           | 0,943        | 5,3               | 122,125           | 14,9              | 127,076           | 0,961        | 5,5               | 121,942           | 15,1              | 129,463           | 0,942        |
| 48,0                          | 5,4               | 137,950           | 15,0              | 125,216           | 1,102        | 5,3               | 142,600           | 14,8              | 129,253           | 1,103        | 5,5               | 139,469           | 15,1              | 129,499           | 1,077        |
| 54,0                          | 5,4               | 155,334           | 15,0              | 125,792           | 1,235        | 5,3               | 160,588           | 14,8              | 128,955           | 1,245        | 5,4               | 157,724           | 15,1              | 129,083           | 1,222        |
| 60,0                          | 5,4               | 172,989           | 15,0              | 124,833           | 1,386        | 5,3               | 178,877           | 14,8              | 127,289           | 1,405        | 5,4               | 172,548           | 15,1              | 126,260           | 1,367        |

ANHANG

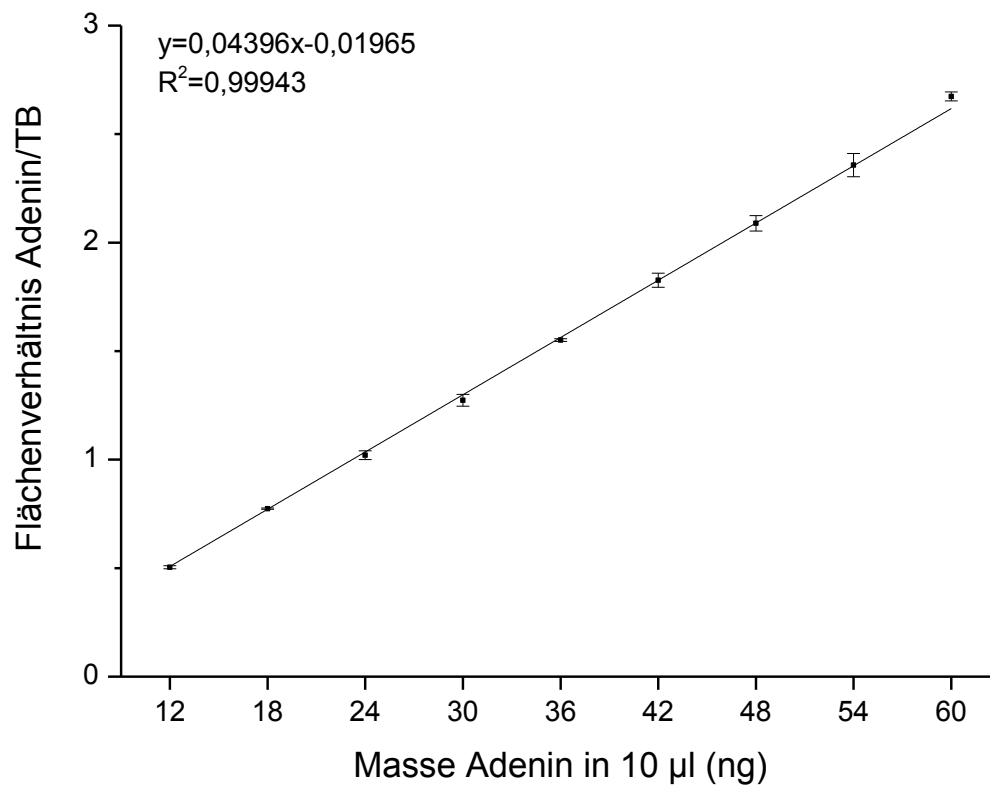
b) Retentionszeiten (Rt) und Peakflächen von Adenin (Ade) und dem internen Standard Theobromin (TB) der externen Kalibrierung von Adenin und Berechnung der Flächenverhältnisse (FV) Ade/TB. FE, Flächeneinheit

| Konz.<br>Ade<br>in 10 µl<br>(ng) | Kalibriergerade 1  |                       |                   |                   |              | Kalibriergerade 2  |                       |                   |                   |              | Kalibriergerade 3  |                       |                   |                   |              |
|----------------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|--------------|--------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|--------------|--------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|--------------|
|                                  | Rt<br>Ade<br>(min) | Fläche<br>Ade<br>(FE) | Rt<br>TB<br>(min) | Fläche<br>TB (FE) | FV<br>Ade/TB | Rt<br>Ade<br>(min) | Fläche<br>Ade<br>(FE) | Rt<br>TB<br>(min) | Fläche<br>TB (FE) | FV<br>Ade/TB | Rt<br>Ade<br>(min) | Fläche<br>Ade<br>(FE) | Rt<br>TB<br>(min) | Fläche<br>TB (FE) | FV<br>Ade/TB |
| 12,0                             | 10,0               | 61,996                | 14,8              | 124,998           | 0,496        | 11,0               | 65,417                | 15,4              | 129,233           | 0,506        | 10,5               | 64,842                | 15,1              | 127,336           | 0,509        |
| 18,0                             | 10,1               | 95,200                | 14,8              | 123,407           | 0,771        | 11,0               | 100,322               | 15,3              | 129,635           | 0,774        | 10,5               | 99,755                | 15,1              | 128,365           | 0,777        |
| 24,0                             | 10,1               | 126,071               | 14,9              | 126,037           | 1,000        | 11,0               | 135,003               | 15,3              | 129,729           | 1,041        | 10,5               | 130,547               | 15,1              | 127,789           | 1,022        |
| 30,0                             | 10,0               | 156,892               | 14,8              | 123,198           | 1,273        | 11,0               | 161,966               | 15,3              | 130,002           | 1,246        | 10,4               | 166,547               | 15,1              | 128,062           | 1,301        |
| 36,0                             | 10,0               | 190,606               | 14,8              | 123,239           | 1,547        | 11,0               | 200,864               | 15,3              | 129,704           | 1,549        | 10,4               | 199,198               | 15,1              | 127,823           | 1,558        |
| 42,0                             | 10,0               | 224,651               | 14,8              | 121,859           | 1,844        | 11,0               | 232,273               | 15,3              | 129,811           | 1,789        | 10,4               | 235,103               | 15,1              | 127,278           | 1,847        |
| 48,0                             | 10,0               | 256,190               | 14,8              | 122,811           | 2,086        | 10,9               | 267,742               | 15,3              | 130,293           | 2,055        | 10,4               | 269,445               | 15,1              | 126,750           | 2,126        |
| 54,0                             | 10,0               | 289,188               | 14,8              | 122,500           | 2,361        | 10,9               | 302,717               | 15,3              | 131,486           | 2,302        | 10,3               | 303,491               | 15,0              | 126,014           | 2,408        |
| 60,0                             | 10,0               | 319,475               | 14,8              | 120,269           | 2,656        | 10,8               | 339,862               | 15,3              | 127,394           | 2,668        | 10,2               | 336,381               | 15,0              | 124,728           | 2,697        |

c) Kalibriergerade von Guanin



d) Kalibriergerade von Adenin.



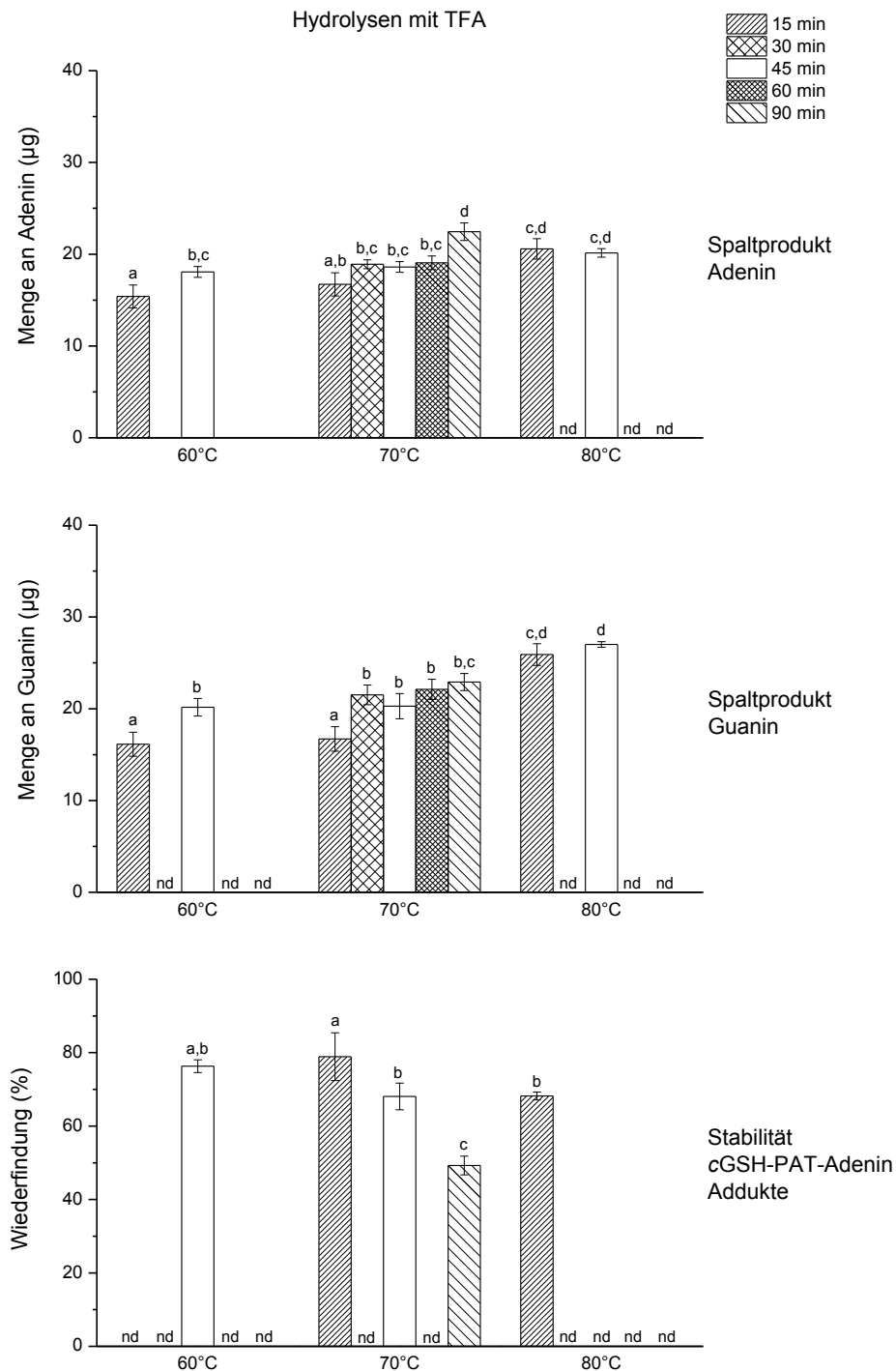
ANHANG

A5.5 Chromatographische Daten und Auswertungen zu den sauren Hydrolysen mit 0,1, 0,2 und 1 molarer HCl bei 70°C für 60 Minuten. Retentionszeiten (Rt) und Peakflächen des internen Standards Theobromin (TB) und den Spaltprodukten Adenin (Ade) und Guanin (Gua) sowie der Flächenverhältnisse (FV). Die Menge an Spaltprodukten wurde mit Hilfe der Kalibriergeraden von Adenin und Guanin (A5.4) bezogen auf jeweils 270 µg zur Hydrolyse eingesetzter DNA berechnet. FE, Flächeneinheiten; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

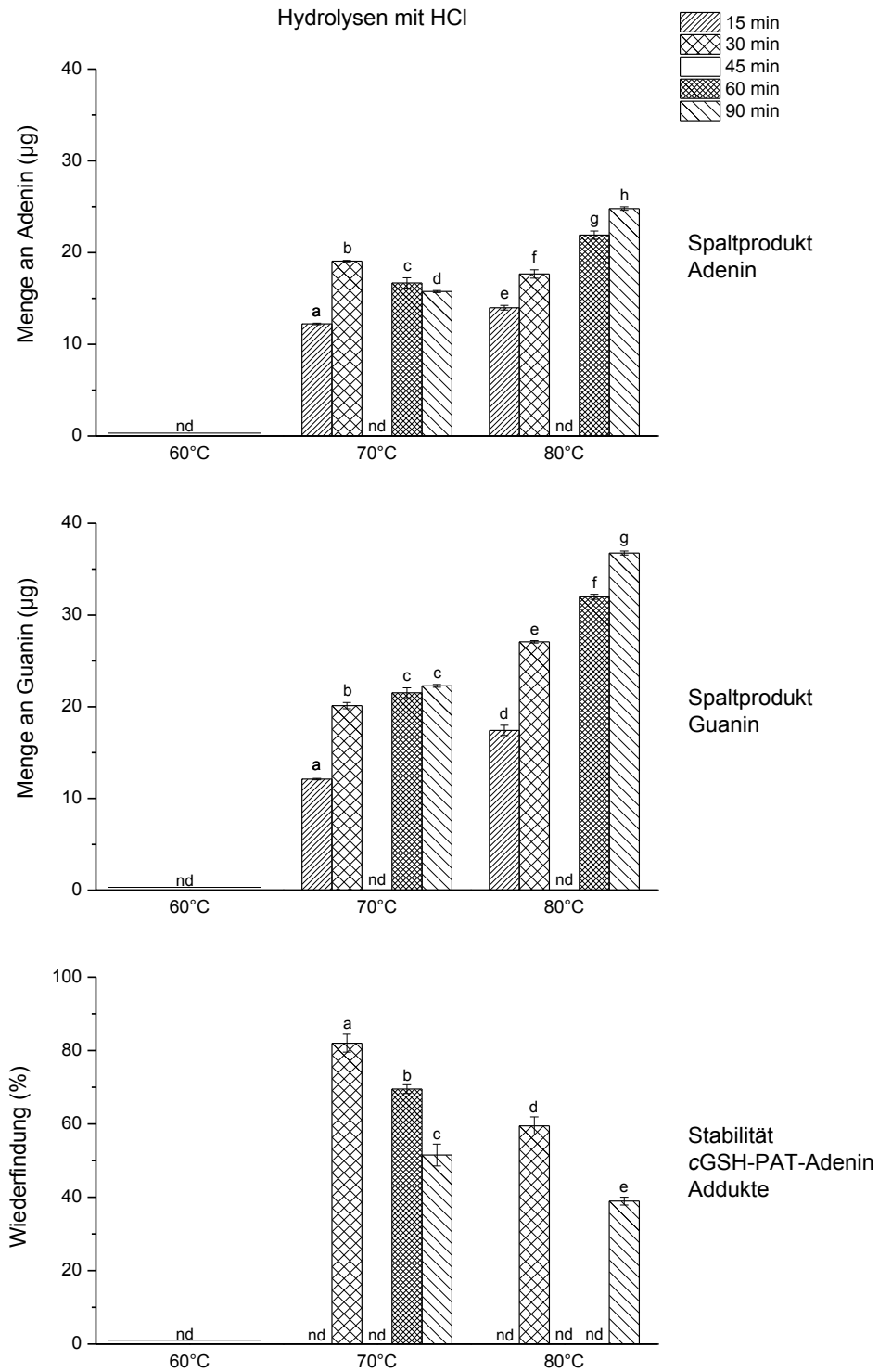
|           |   | Rt<br>TB<br>(min) | Fläche<br>TB (FE) | Rt<br>Gua<br>(min) | Fläche<br>Gua<br>(FE) | FV<br>Gua/TB | Menge<br>Gua<br>(µg) | MW<br>Menge<br>Gua<br>(µg) | Stabw<br>Menge<br>Gua<br>(µg) | Rt<br>Ade<br>(min) | Fläche<br>Ade (FE) | FV<br>Ade/TB | Menge<br>Ade (µg) | MW<br>Menge<br>Ade (µg) | Stabw<br>Menge<br>Ade (µg) |
|-----------|---|-------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------|-------------------|-------------------------|----------------------------|
| HCl 0,1 M | 1 | 16,8              | 120,751           | 7,4                | 59,785                | 0,495        | 11,090               | 11,349                     | 0,384                         | 14,2               | 140,780            | 1,166        | 13,484            | 13,865                  | 0,382                      |
|           | 2 | 16,8              | 124,528           | 7,4                | 62,099                | 0,499        | 11,167               |                            |                               | 14,2               | 153,555            | 1,233        | 14,249            |                         |                            |
|           | 3 | 16,8              | 120,201           | 7,4                | 63,413                | 0,528        | 11,791               |                            |                               | 14,2               | 144,146            | 1,199        | 13,863            |                         |                            |
| HCl 0,2 M | 1 | 16,8              | 125,204           | 7,4                | 65,759                | 0,525        | 11,740               | 12,268                     | 0,457                         | 14,2               | 142,471            | 1,138        | 13,166            | 13,848                  | 0,611                      |
|           | 2 | 16,9              | 131,637           | 7,4                | 73,894                | 0,561        | 12,520               |                            |                               | 14,2               | 159,829            | 1,214        | 14,033            |                         |                            |
|           | 3 | 16,9              | 133,667           | 7,4                | 75,172                | 0,562        | 12,543               |                            |                               | 14,2               | 165,959            | 1,242        | 14,345            |                         |                            |
| HCl 1 M   | 1 | 16,7              | 125,487           | 6,9                | 119,239               | 0,950        | 20,915               | 21,523                     | 0,536                         | 13,8               | 188,746            | 1,504        | 17,331            | 16,682                  | 0,564                      |
|           | 2 | 16,9              | 130,145           | 7,4                | 129,794               | 0,997        | 21,932               |                            |                               | 14,2               | 185,157            | 1,423        | 16,405            |                         |                            |
|           | 3 | 16,8              | 133,731           | 7,3                | 132,058               | 0,987        | 21,720               |                            |                               | 14,1               | 189,142            | 1,414        | 16,310            |                         |                            |

A5.6 Hydrolyseoptimierungen mit 98%-iger TFA (A, Kapitel 6.2.8.2), 1 M HCl (B, Kapitel 6.2.8.3) und 88%-iger FA (C, Kapitel 6.2.8.4). Menge an Spaltprodukten Adenin (oben) und Guanin (Mitte) nach Hydrolyse von 270 µg DNA mit Säure unter Variation der Hydrolysetemperatur (60°C, 70°C und 80°C) und der Hydrolysezeit (15, 30, 45, 60, und 90 min). Sowie Wiederfindung des diastereomeren cGSH-PAT-Adenin Addukts 5.1 und 5.2 (unten) unter den jeweiligen Hydrolysebedingungen (Kapitel 6.2.9.3). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Tukey Test,  $p < 0,05$ ). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Rohdaten: Anhang A5.7 und A5.8.

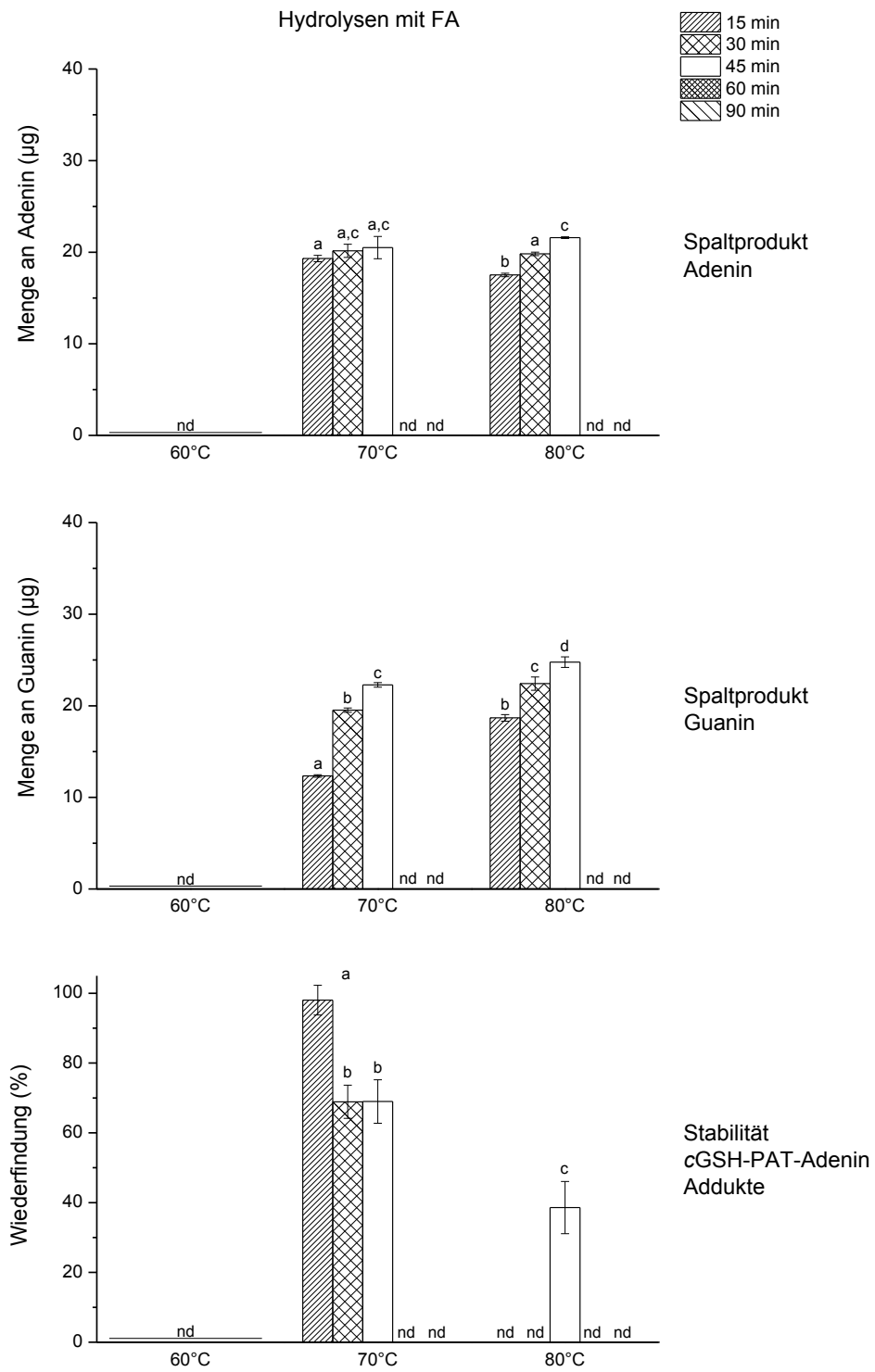
(A)



(B)



(C)



ANHANG

A5.7 Chromatographische Daten und Auswertungen zu den Optimierungen der sauren Hydrolysen TFA (98%-ig), HCl (1 M) und FA (88%-ig) bei verschiedenen Inkubationszeiten und Temperaturen. Retentionszeiten (Rt) und Peakflächen des internen Standards Theobromin (TB) und den Spaltprodukten Adenin (Ade) und Guanin (Gua) sowie der Flächenverhältnisse (FV). Die Menge an Spaltprodukten wurde mit Hilfe der Kalibriergeraden von Adenin und Guanin (A5.4) bezogen auf jeweils 270 µg zur Hydrolyse eingesetzter DNA berechnet. FE, Flächeneinheiten; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

| TFA            |   | TB       |             |  | Gua      |             |           |            | Ade           |                  |          |             |           |            |               |                  |
|----------------|---|----------|-------------|--|----------|-------------|-----------|------------|---------------|------------------|----------|-------------|-----------|------------|---------------|------------------|
|                |   | Rt (min) | Fläche (FE) |  | Rt (min) | Fläche (FE) | FV Gua/TB | Menge (µg) | MW Menge (µg) | Stabw Menge (µg) | Rt (min) | Fläche (FE) | FV Ade/TB | Menge (µg) | MW Menge (µg) | Stabw Menge (µg) |
| 60°C<br>15 min | 1 | 14,8     | 126,125     |  | 5,2      | 94,546      | 0,750     | 16,585     |               |                  |          |             |           |            |               |                  |
|                | 2 | 14,8     | 123,325     |  | 5,2      | 95,735      | 0,776     | 17,160     | 16,133        | 1,313            | 9,6      | 176,709     | 1,433     | 16,521     | 15,394        | 1,251            |
|                | 3 | 14,8     | 125,980     |  | 5,2      | 83,170      | 0,660     | 14,654     |               |                  | 9,6      | 153,129     | 1,216     | 14,049     |               |                  |
| 60°C<br>45 min | 1 | 14,8     | 126,337     |  | 5,2      | 118,464     | 0,938     | 20,645     |               |                  | 9,6      | 201,663     | 1,596     | 18,379     |               |                  |
|                | 2 | 14,7     | 129,669     |  | 5,1      | 122,398     | 0,944     | 20,780     | 20,162        | 0,956            | 9,4      | 207,565     | 1,601     | 18,430     | 18,066        | 0,588            |
|                | 3 | 14,6     | 127,806     |  | 5,1      | 110,464     | 0,864     | 19,061     |               |                  | 9,3      | 192,870     | 1,509     | 17,388     |               |                  |
| 70°C<br>15 min | 1 | 16,0     | 121,101     |  | 6,1      | 98,016      | 0,809     | 17,875     |               |                  | 12,2     | 186,728     | 1,542     | 17,761     |               |                  |
|                | 2 | 16,0     | 123,223     |  | 6,1      | 94,770      | 0,769     | 17,005     | 16,710        | 1,337            | 12,2     | 182,547     | 1,481     | 17,073     | 16,717        | 1,261            |
|                | 3 | 16,0     | 127,930     |  | 6,1      | 87,991      | 0,688     | 15,250     |               |                  | 12,1     | 169,751     | 1,327     | 15,316     |               |                  |
| 70°C<br>30 min | 1 | 15,8     | 126,382     |  | 6,0      | 116,315     | 0,920     | 20,271     |               |                  | 11,9     | 201,593     | 1,595     | 18,366     |               |                  |
|                | 2 | 15,8     | 132,251     |  | 5,9      | 133,595     | 1,010     | 22,210     | 21,507        | 1,074            | 11,7     | 221,896     | 1,678     | 19,307     | 18,902        | 0,484            |
|                | 3 | 15,8     | 134,158     |  | 5,9      | 134,477     | 1,002     | 22,042     |               |                  | 11,6     | 221,874     | 1,654     | 19,034     |               |                  |
| 70°C<br>45 min | 1 | 16,0     | 126,668     |  | 6,2      | 114,644     | 0,905     | 19,941     |               |                  | 12,3     | 200,139     | 1,580     | 18,195     |               |                  |
|                | 2 | 16,0     | 130,123     |  | 6,1      | 112,803     | 0,867     | 19,117     | 20,282        | 1,368            | 12,3     | 207,479     | 1,594     | 18,359     | 18,609        | 0,581            |
|                | 3 | 16,0     | 129,074     |  | 6,1      | 127,864     | 0,991     | 21,788     |               |                  | 12,2     | 216,183     | 1,675     | 19,273     |               |                  |



ANHANG

Fortsetzung A5.7:

|                |   |      |         |     |         |       |        |        |       |      |         |       |        |        |       |
|----------------|---|------|---------|-----|---------|-------|--------|--------|-------|------|---------|-------|--------|--------|-------|
| 70°C<br>60 min | 1 | 15,9 | 128,176 | 6,1 | 133,250 | 1,040 | 22,845 |        |       | 12,1 | 218,110 | 1,702 | 19,578 |        |       |
|                | 2 | 15,9 | 130,321 | 6,1 | 134,325 | 1,031 | 22,654 | 22,115 | 1,103 | 12,0 | 219,720 | 1,686 | 19,400 | 19,066 | 0737  |
|                | 3 | 15,9 | 130,137 | 6,0 | 123,240 | 0,947 | 20,846 |        |       | 11,9 | 205,920 | 1,582 | 18,221 |        |       |
| 70°C<br>90 min | 1 | 15,7 | 155,148 | 5,9 | 154,699 | 0,997 | 21,928 |        |       | 11,4 | 291,951 | 1,882 | 21,627 |        |       |
|                | 2 | 15,7 | 150,110 | 5,8 | 162,607 | 1,083 | 23,788 | 22,911 | 0,934 | 11,4 | 307,237 | 2,047 | 23,503 | 22,456 | 0,957 |
|                | 3 | 15,7 | 175,198 | 5,8 | 183,533 | 1,048 | 23,017 |        |       | 11,3 | 339,087 | 1,935 | 22,237 |        |       |
| 80°C<br>15 min | 1 | 14,5 | 122,565 | 5,1 | 139,106 | 1,135 | 24,904 |        |       | 9,2  | 209,939 | 1,713 | 19,706 |        |       |
|                | 2 | 14,4 | 124,627 | 5,0 | 154,754 | 1,242 | 27,209 | 25,904 | 1,182 | 9,0  | 236,732 | 1,900 | 21,829 | 20,577 | 1,111 |
|                | 3 | 14,3 | 122,546 | 4,9 | 143,039 | 1,167 | 25,600 |        |       | 8,9  | 215,209 | 1,756 | 20,198 |        |       |
| 80°C<br>45 min | 1 | 14,2 | 123,858 | 4,9 | 152,663 | 1,233 | 27,011 |        |       | 8,8  | 217,174 | 1,753 | 20,167 |        |       |
|                | 2 | 14,1 | 124,584 | 4,8 | 155,217 | 1,246 | 27,299 | 27,003 | 0,300 | 8,6  | 223,089 | 1,791 | 20,591 | 20,142 | 0,461 |
|                | 3 | 13,9 | 121,508 | 4,8 | 148,014 | 1,218 | 26,700 |        |       | 8,5  | 207,733 | 1,710 | 19,669 |        |       |

| HCl            |   | Rt          | Fläche  | Rt           | Fläche      | FV     | Menge       | MW                   | Stabw                | Rt                   | Fläche       | FV       | Menge  | MW       | Stabw             |
|----------------|---|-------------|---------|--------------|-------------|--------|-------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|----------|--------|----------|-------------------|
|                |   | TB<br>(min) | TB (FE) | Gua<br>(min) | Gua<br>(FE) | Gua/TB | Gua<br>(µg) | Menge<br>Gua<br>(µg) | Menge<br>Gua<br>(µg) | Menge<br>Gua<br>(µg) | Ade<br>(min) | Ade (FE) | Ade/TB | Ade (µg) | Menge<br>Ade (µg) |
| 70°C<br>15 min | 1 | 168         | 157,990 | 7,2          | 85,111      | 0,539  | 12,032      |                      |                      | 14,0                 | 165,474      | 1,047    | 12,136 |          |                   |
|                | 2 | 16,7        | 158,539 | 7,2          | 85,991      | 0,542  | 12,111      | 12,108               | 0,075                | 14,0                 | 167,149      | 1,054    | 12,215 | 12,220   | 0,086             |
|                | 3 | 16,7        | 158,902 | 7,2          | 86,701      | 0,546  | 12,181      |                      |                      | 14,0                 | 168,837      | 1,063    | 12,309 |          |                   |
| 70°C<br>30 min | 1 | 16,7        | 125,376 | 7,2          | 112,488     | 0,897  | 19,771      |                      |                      | 13,9                 | 207,686      | 1,657    | 19,065 |          |                   |
|                | 2 | 16,7        | 127,758 | 7,2          | 116,845     | 0,915  | 20,146      | 20,124               | 0,342                | 13,9                 | 210,800      | 1,650    | 18,991 | 19,068   | 0,079             |
|                | 3 | 16,7        | 125,046 | 7,1          | 116,145     | 0,929  | 20,453      |                      |                      | 13,9                 | 206,053      | 1,664    | 19,148 |          |                   |
| 70°C<br>60 min | 1 | 16,7        | 125,487 | 6,9          | 119,239     | 0,950  | 20,915      |                      |                      | 13,8                 | 188,746      | 1,504    | 17,331 |          |                   |
|                | 2 | 16,9        | 130,145 | 7,4          | 129,794     | 0,997  | 21,932      | 21,523               | 0,536                | 14,2                 | 185,157      | 1,423    | 16,405 | 16,682   | 0,564             |

ANHANG

Fortsetzung A5.7:

|        |   |      |         |     |         |       |        |        |       |      |         |       |        |        |       |
|--------|---|------|---------|-----|---------|-------|--------|--------|-------|------|---------|-------|--------|--------|-------|
|        | 3 | 16,8 | 133,731 | 7,3 | 132,058 | 0,987 | 21,720 |        |       | 14,1 | 189,142 | 1,414 | 16,310 |        |       |
| 70°C   | 1 | 16,8 | 122,975 | 7,3 | 123,650 | 1,005 | 22,109 |        |       | 14,1 | 166,423 | 1,353 | 15,616 |        |       |
| 90 min | 2 | 16,8 | 120,025 | 7,4 | 121,999 | 1,016 | 22,345 | 22,280 | 0,150 | 14,1 | 164,419 | 1,370 | 15,804 | 15,751 | 0,117 |
|        | 3 | 16,8 | 125,194 | 7,4 | 127,496 | 1,018 | 22,387 |        |       | 14,1 | 171,794 | 1,372 | 15,831 |        |       |
| 80°C   | 1 | 16,8 | 147,372 | 7,3 | 120,495 | 0,818 | 18,053 |        |       | 14,0 | 181,999 | 1,235 | 14,270 |        |       |
| 15 min | 2 | 16,8 | 151,414 | 7,2 | 116,443 | 0,769 | 17,004 | 17,421 | 0,556 | 14,0 | 180,341 | 1,191 | 13,770 | 13,985 | 0,257 |
|        | 3 | 16,8 | 154,610 | 7,2 | 120,353 | 0,778 | 17,207 |        |       | 14,0 | 186,092 | 1,204 | 13,913 |        |       |
| 80°C   | 1 | 16,7 | 121,620 | 7,2 | 150,527 | 1,238 | 27122  |        |       | 13,9 | 192,222 | 1,581 | 18,200 |        |       |
| 30 min | 2 | 16,7 | 125,436 | 7,2 | 154,178 | 1,229 | 26,937 | 27,084 | 0,132 | 14,0 | 189,472 | 1,511 | 17,404 | 17,667 | 0,461 |
|        | 3 | 16,7 | 129,068 | 7,2 | 160,171 | 1,241 | 27,193 |        |       | 13,9 | 194,892 | 1,510 | 17,398 |        |       |
| 80°C   | 1 | 16,8 | 123,658 | 7,3 | 182,674 | 1,477 | 32,294 |        |       | 14,0 | 235,755 | 1,906 | 21,908 |        |       |
| 60 min | 2 | 16,8 | 123,164 | 7,3 | 178,904 | 1,452 | 31,761 | 31,981 | 0,278 | 14,0 | 229,787 | 1,866 | 21,444 | 21,898 | 0,449 |
|        | 3 | 16,8 | 121,803 | 7,3 | 177,655 | 1,459 | 31,890 |        |       | 14,0 | 236,862 | 1,945 | 22,342 |        |       |
| 80°C   | 1 | 16,7 | 105,277 | 7,2 | 177,099 | 1,682 | 36,719 |        |       | 13,9 | 227,770 | 2,164 | 24,831 |        |       |
| 90 min | 2 | 16,7 | 111,436 | 7,1 | 188,885 | 1,695 | 36,995 | 36,762 | 0,214 | 13,9 | 242,437 | 2,176 | 24,968 | 24,797 | 0,191 |
|        | 3 | 16,7 | 109,495 | 7,2 | 183,460 | 1,676 | 36,574 |        |       | 13,9 | 234,574 | 2,142 | 24,590 |        |       |

| FA     |   | Rt    | Fläche  | Rt    | Fläche | FV     | Menge  | MW     | Stabw |       |          |        |          |          |          |
|--------|---|-------|---------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|----------|--------|----------|----------|----------|
|        |   | TB    | Fläche  | Gua   | Gua    | Gua/TB | Gua    | Menge  | Menge |       |          |        |          |          |          |
|        |   | (min) | TB (FE) | (min) | (FE)   |        | (µg)   | Gua    | Gua   | (min) | Ade (FE) | Ade/TB | Ade (µg) | Menge    | Menge    |
|        |   |       |         |       |        |        |        | (µg)   | (µg)  |       |          |        |          | Ade (µg) | Ade (µg) |
| 70°C   | 1 | 16,7  | 136,970 | 7,0   | 75,421 | 0,551  | 12,289 |        |       | 13,7  | 226,409  | 1,653  | 19,024   |          |          |
| 15 min | 2 | 16,7  | 135,116 | 7,0   | 74,041 | 0,548  | 12,232 | 12,339 | 0,139 | 13,7  | 225,562  | 1,669  | 19,211   | 19,311   | 0,347    |
|        | 3 | 16,7  | 134,126 | 7,0   | 75,366 | 0,560  | 12,497 |        |       | 13,7  | 230,313  | 1,712  | 19,697   |          |          |

ANHANG

Fortsetzung A5.7:

|                |   |      |         |     |         |        |        |        |       |      |         |       |        |        |       |
|----------------|---|------|---------|-----|---------|--------|--------|--------|-------|------|---------|-------|--------|--------|-------|
| 70°C<br>30 min | 1 | 16,7 | 126,148 | 7,0 | 112,819 | 0,894  | 19,709 |        |       | 13,7 | 212,301 | 1,683 | 19,365 |        |       |
|                | 2 | 16,7 | 125,279 | 7,0 | 109,410 | 0,873  | 19,256 | 19,524 | 0,238 | 13,7 | 221,150 | 1,765 | 20,302 | 20,149 | 0,719 |
|                | 3 | 16,7 | 125,500 | 7,0 | 111,640 | 0,890  | 19,606 |        |       | 13,6 | 226,810 | 1,807 | 20,779 |        |       |
| 70°C<br>45 min | 1 | 16,7 | 131,971 | 7,0 | 133,695 | 1,013  | 22,272 |        |       | 13,7 | 240,510 | 1,822 | 20,952 |        |       |
|                | 2 | 16,7 | 131,368 | 7,0 | 131,704 | 1,003  | 22,046 | 22,286 | 0,247 | 13,7 | 244,976 | 1,865 | 21,434 | 20,506 | 1,213 |
|                | 3 | 16,7 | 131,900 | 7,0 | 135,256 | 1,025  | 22,540 |        |       | 13,7 | 219,290 | 1,663 | 19,133 |        |       |
| 80°C<br>15 min | 1 | 16,6 | 135,866 | 6,9 | 113,444 | 0,835  | 18,427 |        |       | 13,5 | 207,362 | 1,526 | 17,583 |        |       |
|                | 2 | 16,6 | 136,948 | 6,9 | 114,996 | 0,840  | 18,530 | 18,682 | 0,356 | 13,5 | 205,644 | 1,502 | 17,303 | 17,516 | 0,189 |
|                | 3 | 16,6 | 137,991 | 6,8 | 119,440 | 0,866  | 19,088 |        |       | 13,5 | 211,578 | 1,533 | 17,663 |        |       |
| 80°C<br>30 min | 1 | 16,6 | 134,440 | 6,8 | 140,630 | 1,046  | 22,984 |        |       | 13,4 | 233,563 | 1,737 | 19,984 |        |       |
|                | 2 | 16,6 | 137,020 | 6,8 | 141,372 | 1,0320 | 22,676 | 22,421 | 0,726 | 13,4 | 233,504 | 1,704 | 19,607 | 19,817 | 0,192 |
|                | 3 | 16,6 | 135,762 | 6,8 | 133,317 | 0,982  | 21,602 |        |       | 13,4 | 234,407 | 1,727 | 19,862 |        |       |
| 80°C<br>45 min | 1 | 16,6 | 138,857 | 6,8 | 153,830 | 1,108  | 24,318 |        |       | 13,4 | 259,595 | 1,870 | 21,487 |        |       |
|                | 2 | 16,6 | 138,678 | 6,8 | 160,641 | 1,158  | 25,409 | 24,762 | 0,574 | 13,4 | 261,160 | 1,883 | 21,643 | 21,589 | 0,088 |
|                | 3 | 16,6 | 137,614 | 6,8 | 153,977 | 1,119  | 24,557 |        |       | 13,4 | 259,077 | 1,883 | 21,637 |        |       |

ANHANG

A5.8 Chromatographische Daten und Auswertungen zu den Stabilitätsuntersuchungen der diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 unter ausgewählten Hydrolysebedingungen. Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; IS, Interner Standard; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung; rel. Stabw, relative Stabw.

| TFA            |   | Addukt 5.1  |             | Addukt 5.2  |             | IS (Coffein) |             | Flächen-<br>verhältnis<br>Summe<br>Addukte/IS | Stabilität (%)<br>bezogen auf<br>die Kontrolle | MW    | Stabw |
|----------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---|--|-------|-------|
|                |   | Rt<br>(min) | Fläche (FE) | Rt<br>(min) | Fläche (FE) | Rt<br>(min)  | Fläche (FE) |   |  |       |       |
| 60°C<br>45 min | 1 | 5,2         | 316,498     | 7,4         | 362,287     | 19,3         | 851,877     | 0,797   | 77,38  | 76,32 | 1,73  |
|                | 2 | 5,1         | 278,655     | 7,2         | 373,304     | 19,2         | 851,870     | 0,765   | 74,32  |       |       |
|                | 3 | 5,0         | 314,289     | 7,2         | 370,539     | 19,2         | 860,922     | 0,795   | 77,25  |       |       |
|                | K | 5,0         | 530,388     | 7,1         | 347,947     | 19,2         | 852,991     | 1,030   |  |       |       |
| 70°C<br>15 min | 1 | 5,1         | 267,715     | 7,3         | 334,783     | 19,3         | 848,210     | 0,710   | 85,94  | 78,89 | 6,51  |
|                | 2 | 5,0         | 242,177     | 7,2         | 297,132     | 19,3         | 840,637     | 0,642   | 77,62  |       |       |
|                | 3 | 5,0         | 223,580     | 7,2         | 286,815     | 19,3         | 844,806     | 0,604   | 73,10  |       |       |
|                | K | 4,7         | 439,598     | 6,5         | 262,273     | 19,0         | 849,181     | 0,827   |  |       |       |
| 70°C<br>45 min | 1 | 4,9         | 424,527     | 6,9         | 705,705     | 19,1         | 852,191     | 1,326   | 65,24  | 68,07 | 3,62  |
|                | 2 | 4,9         | 513,826     | 6,8         | 734,341     | 19,1         | 851,044     | 1,467   | 72,15  |       |       |
|                | 3 | 4,9         | 430,134     | 6,8         | 724,492     | 19,1         | 850,137     | 1,358   | 66,81  |       |       |
|                | K | 4,8         | 1153,504    | 6,8         | 540,210     | 19,1         | 833,200     | 2,033   |  |       |       |
| 60°C<br>90 min | 1 | 5,1         | 207,419     | 7,4         | 547,844     | 19,2         | 852,176     | 0,886   | 51,21  | 49,25 | 2,55  |
|                | 2 | 5,1         | 190,467     | 7,4         | 487,651     | 19,2         | 844,901     | 0,803   | 46,37  |       |       |
|                | 3 | 5,1         | 201,508     | 7,3         | 530,823     | 19,2         | 843,393     | 0,868   | 50,17  |       |       |
|                | K | 5,0         | 818,621     | 7,3         | 642,470     | 19,2         | 844,192     | 1,731   |  |       |       |
| 80°C<br>15 min | 1 | 5,0         | 206,522     | 7,0         | 340,880     | 19,2         | 853,273     | 0,642   | 67,00  | 68,21 | 1,07  |
|                | 2 | 4,9         | 216,797     | 6,9         | 343,932     | 19,1         | 853,682     | 0,657   | 68,59  |       |       |
|                | 3 | 4,9         | 219,349     | 6,9         | 343,981     | 19,1         | 852,117     | 0,661   | 69,04  |       |       |
|                | K | 4,9         | 502,165     | 6,9         | 315,198     | 19,1         | 853,588     | 0,958   |  |       |       |

ANHANG

Fortsetzung A5.8:

| HCl            |   | Addukt 5.1  |             | Addukt 5.2  |             | IS (Coffein) |             | Flächen-<br>verhältnis<br>Summe<br>Addukte/IS | Stabilität (%)<br>bezogen auf<br>die Kontrolle | MW    | Stabw |
|----------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---|--|-------|-------|
|                |   | Rt<br>(min) | Fläche (FE) | Rt<br>(min) | Fläche (FE) | Rt<br>(min)  | Fläche (FE) |   |  |       |       |
| 70°C<br>30 min | 1 | 6,3         | 556,423     | 10,0        | 343,483     | 19,6         | 767,703     | 1,172   | 80,31  |       |       |
|                | 2 | 6,4         | 537,494     | 10,2        | 415,782     | 19,6         | 770,312     | 1,238   | 84,78  |       |       |
|                | 3 | 6,3         | 554,676     | 10,1        | 369,736     | 19,5         | 782,826     | 1,181   | 80,90  |       |       |
|                | K | 6,4         | 846,706     | 10,4        | 276,257     | 19,6         | 769,345     | 1,460   |  | 82,00 | 2,43  |
| 70°C<br>60 min | 1 | 4,7         | 379,804     | 6,5         | 527,264     | 19,0         | 857,559     | 1,058   | 68,11  |       |       |
|                | 2 | 4,7         | 394,538     | 6,5         | 536,746     | 19,0         | 853,615     | 1,091   | 70,25  |       |       |
|                | 3 | 4,8         | 389,124     | 6,5         | 539,960     | 19,0         | 853,498     | 1,089   | 70,10  |       |       |
|                | K | 4,7         | 756,155     | 6,5         | 576,335     | 19,0         | 858,022     | 1,553   |  | 69,49 | 1,19  |
| 70°C<br>90 min | 1 | 6,3         | 351,509     | 9,9         | 262,530     | 19,5         | 783,394     | 0,784   | 49,30  |       |       |
|                | 2 | 6,2         | 376,913     | 9,9         | 257,969     | 19,5         | 776,971     | 0,817   | 51,39  |       |       |
|                | 3 | 6,2         | 389,416     | 9,8         | 282,119     | 19,5         | 784,086     | 0,856   | 53,86  |       |       |
|                | K | 6,2         | 1137,802    | 9,9         | 66,458      | 19,5         | 757,381     | 1,590   |  | 51,52 | 2,29  |
| 80°C<br>30 min | 1 | 6,2         | 276,837     | 9,8         | 381,547     | 19,6         | 874,561     | 0,753   | 60,38  |       |       |
|                | 2 | 6,2         | 264,106     | 10,0        | 352,887     | 19,6         | 873,609     | 0,706   | 56,64  |       |       |
|                | 3 | 6,4         | 289,601     | 10,0        | 380,019     | 19,6         | 875,607     | 0,765   | 61,33  |       |       |
|                | K | 6,2         | 851,486     | 10,0        | 266,362     | 19,6         | 872,452     | 1,247   |  | 59,45 | 2,48  |
| 80°C<br>90 min | 1 | 6,2         | 63,930      | 9,8         | 203,136     | 19,6         | 872,849     | 0,306   | 39,56  |       |       |
|                | 2 | 6,2         | 64,756      | 9,9         | 203,639     | 19,6         | 876,406     | 0,306   | 39,59  |       |       |
|                | 3 | 6,5         | 70,40       | 10,5        | 198,349     | 19,6         | 920,68      | 0,292   | 37,74  |       |       |
|                | K | 6,2         | 677,668     | 9,9         | 186,105     | 19,6         | 876,139     | 0,773   |  | 38,96 | 1,06  |

ANHANG

Fortsetzung A5.8:

| FA             | Addukt 5.1  |             | Addukt 5.2  |             | IS (Coffein) |             | Flächen-<br>verhältnis<br>Summe<br>Addukte/IS | Stabilität (%)<br>bezogen auf<br>die Kontrolle | MW     | Stabw |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---|--|--------|-------|
|                | Rt<br>(min) | Fläche (FE) | Rt<br>(min) | Fläche (FE) | Rt<br>(min)  | Fläche (FE) |   |  |        |       |
| 70°C<br>15 min | 1           | 6,4         | 1146,196    | 10,4        | 453,048      | 19,6        | 783,158                                       | 2,042  | 96,30  |       |
|                | 2           | 6,6         | 1194,709    | 10,8        | 514,202      | 19,6        | 783,382                                       | 2,181  | 102,87 |       |
|                | 3           | 6,4         | 1187,822    | 10,4        | 364,372      | 19,6        | 771,191                                       | 2,013  | 94,91  |       |
|                | K           | 6,4         | 1507,122    | 10,3        | 127,173      | 19,6        | 770,673                                       | 2,121  |        | 98,03 |
| 70°C<br>30 min | 1           | 6,4         | 353,175     | 10,3        | 154,877      | 19,6        | 785,106                                       | 0,647  | 73,23  |       |
|                | 2           | 6,3         | 372,927     | 10,1        | 107,632      | 19,5        | 780,616                                       | 0,616  | 69,67  |       |
|                | 3           | 6,3         | 335,385     | 9,9         | 105,084      | 19,5        | 781,170                                       | 0,564  | 63,81  |       |
|                | K           | 6,4         | 623,529     | 10,2        | 54,961       | 19,6        | 767,813                                       | 0,884  | 73,42  | 68,90 |
| 70°C<br>45 min | 1           | 6,3         | 968,142     | 9,8         | 444,814      | 19,5        | 784,401                                       | 1,801  | 71,67  |       |
|                | 2           | 6,3         | 976,820     | 10,0        | 398,758      | 19,5        | 782,331                                       | 1,758  | 61,85  |       |
|                | 3           | 6,4         | 808,913     | 10,2        | 381,791      | 19,6        | 784,723                                       | 1,517  |        |       |
|                | K           | 6,4         | 1776,969    | 10,2        | 138,942      | 19,6        | 780,928                                       | 2,453  |        | 68,98 |
| 80°C<br>45 min | 1           | 6,5         | 247,825     | 10,4        | 223,843      | 19,6        | 769,017                                       | 0,613  | 38,52  |       |
|                | 2           | 6,3         | 296,646     | 9,9         | 268,795      | 19,5        | 770,171                                       | 0,734  | 46,11  |       |
|                | 3           | 6,4         | 204,196     | 10,2        | 176,422      | 19,5        | 767,519                                       | 0,496  | 31,15  |       |
|                | K           | 6,4         | 1146,817    | 10,3        | 68,181       | 19,6        | 763,116                                       | 1,592  |        | 38,59 |

ANHANG

**A6 Festphasenextraktion**

A6.1 Chromatographische Daten und Auswertungen zur Wiederfindung der diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukte 5.1 und 5.2 in den einzelnen Eluaten nach SPE an einer SAX-Phase. NH<sub>4</sub>Ac, Ammoniumacetat; Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; n.d., kein Peak detektierbar; Wdf, Wiederfindung; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

|               |             | Kontrolle |        |        | Probenaufgabe |     |     | Waschen NH <sub>4</sub> Ac |     |     | Waschen H <sub>2</sub> O |     |     | Elution |        |        |
|---------------|-------------|-----------|--------|--------|---------------|-----|-----|----------------------------|-----|-----|--------------------------|-----|-----|---------|--------|--------|
|               |             | a         | b      | c      | a             | b   | c   | a                          | b   | c   | a                        | b   | c   | a       | b      | c      |
| Addukt 5.1    | Rt (min)    | 12,7      | 12,4   | 12,4   |               |     |     |                            |     |     |                          |     |     | 12,4    | 12,4   | 12,4   |
|               | Fläche (FE) | 1069300   | 212010 | 158890 | n.d           | n.d | n.d | n.d                        | n.d | n.d | n.d                      | n.d | n.d | 568050  | 119680 | 111360 |
| Addukt 5.2    | Rt (min)    | 16,5      | 15,9   | 15,9   |               |     |     |                            |     |     |                          |     |     | 16,1    | 15,9   | 15,9   |
|               | Fläche (FE) | 166650    | 88528  | 95453  | n.d           | n.d | n.d | n.d                        | n.d | n.d | n.d                      | n.d | n.d | 669540  | 172650 | 155100 |
| Summe Addukte | Fläche (FE) | 1235950   | 300538 | 254343 |               |     |     |                            |     |     |                          |     |     | 1237590 | 292330 | 266460 |
| Wdf           | (%)         |           |        |        |               |     |     |                            |     |     |                          |     |     | 100,13  | 97,27  | 104,76 |
| MW            | (%)         |           |        |        |               |     |     |                            |     |     |                          |     |     | 100,72  |        |        |
| Stabw         | (%)         |           |        |        |               |     |     |                            |     |     |                          |     |     | 3,78    |        |        |

ANHANG

A6.2 Chromatographische Daten und Auswertungen zur Wiederfindung der PAT-Adenin-Addukte (PA, Monoaddukt; PAA, Diaddukt) in den einzelnen Eluaten nach SPE an einer SAX-Phase. NH<sub>4</sub>Ac, Ammoniumacetat; Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; n.d., kein Peak detektierbar; Wdf, Wiederfindung; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

|        |             | Kontrolle |         |         | Probenaufgabe |        |        | Waschen NH <sub>4</sub> Ac |        |        | Waschen H <sub>2</sub> O |       |        | Elution |        |        |
|--------|-------------|-----------|---------|---------|---------------|--------|--------|----------------------------|--------|--------|--------------------------|-------|--------|---------|--------|--------|
|        |             | a         | b       | c       | a             | b      | c      | a                          | b      | c      | a                        | b     | c      | a       | b      | c      |
| PA 1.3 | Rt (min)    | 3,7       | 3,8     | 3,7     | 3,7           | 3,2    | 3,8    | 3,7                        | 3,8    | 3,8    | 3,7                      | 3,8   | 3,8    | 3,7     | 3,8    | 3,8    |
|        | Fläche (FE) | 1379500   | 1022700 | 834790  | 473130        | 168950 | 341820 | 412830                     | 378050 | 370310 | 61714                    | 54906 | 49788  | 80185   | 51189  | 37162  |
|        | Wdf (%)     |           |         |         | 34,30         | 16,52  | 40,95  | 29,93                      | 36,97  | 44,36  | 4,47                     | 5,37  | 5,96   | 5,81    | 5,01   | 4,45   |
|        | MW (%)      |           |         |         |               | 30,59  |        |                            | 37,08  |        |                          | 5,27  |        |         | 5,09   |        |
|        | Stabw (%)   |           |         |         |               | 12,63  |        |                            | 7,22   |        |                          | 0,75  |        |         | 0,68   |        |
| PA 1.1 | Rt (min)    | 4,8       | 4,9     | 4,8     | 4,8           | 4,0    | 4,9    | 4,8                        | 4,9    | 4,8    | 4,8                      | 4,9   | 4,9    | 4,8     | 4,9    | 4,8    |
|        | Fläche (FE) | 1606600   | 1395100 | 1164300 | 417050        | 147020 | 259170 | 477690                     | 531310 | 502320 | 108380                   | 96610 | 106400 | 97506   | 89690  | 74656  |
|        | Wdf (%)     |           |         |         | 25,96         | 10,54  | 22,26  | 29,73                      | 38,08  | 43,14  | 6,75                     | 6,92  | 9,14   | 6,07    | 6,43   | 6,41   |
|        | MW (%)      |           |         |         |               | 19,59  |        |                            | 36,99  |        |                          | 7,60  |        |         | 6,30   |        |
|        | Stabw (%)   |           |         |         |               | 8,05   |        |                            | 6,77   |        |                          | 1,33  |        |         | 0,20   |        |
| PA 1.2 | Rt (min)    | 7,3       | 7,3     | 7,3     |               |        | 7,3    | 7,2                        | 7,4    | 7,3    | 7,3                      | 7,4   | 7,3    | 7,2     | 7,4    | 7,3    |
|        | Fläche (FE) | 397470    | 331900  | 271310  | n.d.          | n.d.   | 431    | 12295                      | 23709  | 12929  | 40068                    | 40909 | 30954  | 378190  | 236310 | 223340 |
|        | Wdf (%)     |           |         |         |               |        | 0,16   | 3,09                       | 7,14   | 4,77   | 10,08                    | 12,33 | 11,41  | 95,15   | 71,20  | 82,32  |
|        | MW (%)      |           |         |         |               |        |        |                            | 5,00   |        |                          | 11,27 |        |         | 82,89  |        |
|        | Stabw (%)   |           |         |         |               |        |        |                            | 2,04   |        |                          | 1,13  |        |         | 11,99  |        |



ANHANG

Fortsetzung A6.2:

|         |             |        |        |        |       |       |       |       |       |       |      |      |      |      |      |      |
|---------|-------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|
| PAA 2.1 | Rt (min)    | 7,3    | 7,3    | 7,3    | 7,2   | 7,2   | 7,3   | 7,2   | 7,4   | 7,3   | 7,3  | 7,4  | 7,3  | 7,2  | 7,3  | 7,3  |
|         | Fläche (FE) | 131430 | 152440 | 144410 | 60998 | 26022 | 49833 | 54223 | 53132 | 77526 | 3701 | 3581 | 4016 | 6221 | 2340 | 4045 |
| Wdf     | (%)         |        |        |        | 46,41 | 17,07 | 34,51 | 41,26 | 34,85 | 53,68 | 2,82 | 2,35 | 2,78 | 4,73 | 1,53 | 2,80 |
| MW      | (%)         |        |        |        |       | 32,66 |       |       | 43,27 |       |      | 2,65 |      |      | 3,02 |      |
| Stabw   | (%)         |        |        |        |       | 14,76 |       |       | 9,57  |       |      | 0,26 |      |      | 1,61 |      |

A6.3 Chromatographische Daten und Auswertungen zur Wiederfindung einer Mischung von DNA-Basen (Ade, Adenin; Thy, Thymin; Gua, Guanin; Cyt, Cytosin) in den einzelnen Eluaten nach SPE an einer SAX-Phase. IS, Interner Standard; NH<sub>4</sub>Ac, Ammoniumacetat; Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; FV, Flächenverhältnis Fläche Base/IS; Wdf, Wiederfindung; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

|       |             | Kontrolle |         |         | Probenaufgabe |         |         | Waschen NH <sub>4</sub> Ac |         |         | Waschen H <sub>2</sub> O |         |         | Elution |         |         |
|-------|-------------|-----------|---------|---------|---------------|---------|---------|----------------------------|---------|---------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|       |             | a         | b       | c       | a             | b       | c       | a                          | b       | c       | a                        | b       | c       | a       | b       | c       |
| Ade   | Rt (min)    | 10,6      | 10,7    | 10,3    | 10,5          | 10,9    | 10,4    | 10,4                       | 10,9    | 10,5    | 10,6                     | 10,9    | 10,4    | 11,0    | 10,9    | 10,9    |
|       | Fläche (FE) | 630,557   | 166,220 | 566,991 | 216,35        | 250,745 | 288,057 | 330,089                    | 212,335 | 207,539 | 59,015                   | 59,117  | 50,175  | 9,00    | 71,441  | 29,728  |
|       | FV          | 1,02861   | 0,81373 | 0,92504 | 0,35326       | 0,34630 | 0,47136 | 0,53888                    | 0,35061 | 0,34183 | 0,09343                  | 0,08891 | 0,08253 | 0,01444 | 0,10417 | 0,04888 |
| Wdf   | (%)         |           |         |         | 34,34         | 42,56   | 50,96   | 52,39                      | 43,09   | 36,95   | 9,08                     | 10,93   | 8,92    | 1,40    | 12,80   | 5,24    |
| MW    | (%)         |           |         |         |               | 42,62   |         |                            | 44,14   |         |                          | 9,64    |         |         | 6,48    |         |
| Stabw | (%)         |           |         |         |               | 8,31    |         |                            | 7,77    |         |                          | 1,11    |         |         | 5,80    |         |
| Thy   | Rt (min)    | 7,2       | 7,1     | 6,9     | 7,1           | 7,3     | 6,9     | 7                          | 7,3     | 6,9     | 7,1                      | 7,3     | 6,9     | 7,2     | 7,3     | 7,2     |
|       | Fläche (FE) | 404,188   | 119,292 | 395,694 | 136,339       | 186,962 | 182,231 | 230,809                    | 151,410 | 163,069 | 37,147                   | 35,899  | 34,624  | 4,600   | 18,823  | 17,284  |
|       | FV          | 0,65934   | 0,58399 | 0,64557 | 0,22262       | 0,25821 | 0,29819 | 0,37681                    | 0,25001 | 0,26859 | 0,05881                  | 0,05399 | 0,05695 | 0,00738 | 0,02745 | 0,02842 |
| Wdf   | (%)         |           |         |         | 33,76         | 44,22   | 46,19   | 57,15                      | 42,81   | 41,60   | 8,92                     | 9,24    | 8,82    | 1,12    | 4,70    | 4,37    |
| MW    | (%)         |           |         |         |               | 41,39   |         |                            | 47,19   |         |                          | 9,00    |         |         | 3,40    |         |
| Stabw | (%)         |           |         |         |               | 6,68    |         |                            | 8,65    |         |                          | 0,22    |         |         | 1,98    |         |



ANHANG

|         |             |          |      |      |      |         |         |        |       |      |      |      |
|---------|-------------|----------|------|------|------|---------|---------|--------|-------|------|------|------|
|         | Fläche (FE) | 4729200  | n.d. | n.d. | 6091 | 3579000 | 699480  | 50332  | 8317  | 4629 | 6112 | 1991 |
| Wdf     | (%)         |          |      |      | 0,13 | 75,68   | 14,79   | 1,06   | 0,18  | 0,10 | 0,13 | 0,04 |
| PA 1.1  | Rt (min)    | 4,6      |      | 4,6  |      | 4,6     | 4,6     | 4,6    | 4,6   | 4,6  | 4,6  | 4,6  |
|         | Fläche (FE) | 10377000 | n.d. | 1105 | n.d. | 7507400 | 1765300 | 120560 | 12434 | 7045 | 7536 | 4243 |
| Wdf     | (%)         |          | 0,01 |      |      | 72,35   | 17,01   | 1,16   | 0,12  | 0,07 | 0,07 | 0,04 |
| PA 1.2  | Rt (min)    | 7,0      |      |      |      | 7,0     | 7,0     | 7,0    |       |      |      |      |
|         | Fläche (FE) | 720880   | n.d. | n.d. | n.d. | 536500  | 120160  | 10161  | n.d.  | n.d. | n.d. | n.d. |
| Wdf     | (%)         |          |      |      |      | 74,42   | 16,67   | 1,41   |       |      |      |      |
| PAA 2.1 | Rt (min)    | 7,0      |      |      |      | 7,0     | 7,0     | 7,0    | 7,0   |      | 7,0  |      |
|         | Fläche (FE) | 346240   | n.d. | n.d. | n.d. | 232220  | 53889   | 3982   | 899   | n.d. | 1050 | n.d. |
| Wdf     | (%)         |          |      |      |      | 67,07   | 15,56   | 1,15   | 0,26  |      | 0,30 |      |

A6.5 Chromatographische Daten und Auswertungen zur Wiederfindung einer Mischung von DNA-Basen (Ade, Adenin; Thy, Thymin; Gua, Guanin; Cyt, Cytosin) in den einzelnen Eluaten nach SPE an einer X-A-Phase. IS, Interner Standard; NH<sub>4</sub>Ac, Ammoniumacetat; Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; FV, Flächenverhältnis Fläche Base/IS; Wdf, Wiederfindung; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

|     |          | Kontrolle |      |      | Probenaufgabe |   |   | Waschen NH <sub>4</sub> Ac |   |   | Waschen MeOH |    |    | Elution |   |   |
|-----|----------|-----------|------|------|---------------|---|---|----------------------------|---|---|--------------|----|----|---------|---|---|
|     |          | a         | b    | c    | a             | b | c | a                          | b | c | a            | b  | c  | a       | b | c |
| Ade | Rt (min) | 14,3      | 14,0 | 14,1 |               |   |   |                            |   |   | 14,2         | 14 | 14 |         |   |   |

ANHANG

|       |             |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |      |      |      |
|-------|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------|------|------|
|       | Fläche (FE) | 234,038 | 286,227 | 269,62  | n.d.    | n.d.    | n.d.    | n.d.    | n.d.    | n.d.    | 186,677 | 238,821 | 225,984 | n.d. | n.d. | n.d. |
|       | FV          | 1,96886 | 2,45071 | 2,32266 |         |         |         |         |         |         | 1,56998 | 2,03347 | 1,93751 |      |      |      |
| Wdf   | (%)         |         |         |         |         |         |         |         |         |         | 79,74   | 82,97   | 83,42   |      |      |      |
| MW    | (%)         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         | 82,04   |         |      |      |      |
| Stabw | (%)         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         | 2,01    |         |      |      |      |
|       | Rt (min)    | 9,9     | 9,6     | 9,7     |         |         |         |         |         |         | 9,9     | 9,6     | 9,6     |      |      |      |
| Thy   | Fläche (FE) | 142,10  | 172,72  | 165,377 | n.d.    | n.d.    | n.d.    | n.d.    | n.d.    | n.d.    | 151,635 | 161,174 | 161,21  | n.d. | n.d. | n.d. |
|       | FV          | 1,19543 | 1,47885 | 1,42465 |         |         |         |         |         |         | 1,27528 | 1,37234 | 1,38216 |      |      |      |
| Wdf   | (%)         |         |         |         |         |         |         |         |         |         | 106,68  | 92,80   | 97,02   |      |      |      |
| MW    | (%)         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         | 98,83   |         |      |      |      |
| Stabw | (%)         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         | 7,12    |         |      |      |      |
|       | Rt (min)    | 7,5     | 7,2     | 7,3     |         |         |         | 7,4     | 7,2     | 7,2     | 7,5     | 7,2     | 7,2     |      |      |      |
| Gua   | Fläche (FE) | 93,28   | 160,30  | 149,77  | n.d.    | n.d.    | n.d.    | 29,33   | 68,04   | 47,71   | 76,89   | 67,30   | 76,00   | n.d. | n.d. | n.d. |
|       | FV          | 0,78476 | 1,37255 | 1,29018 |         |         |         | 0,24852 | 0,58016 | 0,40998 | 0,64663 | 0,57300 | 0,65164 |      |      |      |
| Wdf   | (%)         |         |         |         |         |         |         | 31,67   | 42,27   | 31,78   | 82,40   | 41,75   | 50,51   |      |      |      |
| MW    | (%)         |         |         |         |         |         |         |         | 35,24   |         |         | 58,22   |         |      |      |      |
| Stabw | (%)         |         |         |         |         |         |         |         | 6,09    |         |         | 21,39   |         |      |      |      |
|       | Rt (min)    | 3,9     | 3,9     | 3,9     | 3,9     | 3,9     | 3,9     | 3,9     | 3,9     | 3,9     |         |         |         |      |      |      |
| Cyt   | Fläche (FE) | 119,487 | 129,651 | 124,459 | 34,47   | 40,77   | 41,36   | 71,73   | 75,82   | 72,53   | n.d.    | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
|       | FV          | 1,00519 | 1,11009 | 1,07216 | 0,29134 | 0,34899 | 0,35462 | 0,60780 | 0,64650 | 0,62319 |         |         |         |      |      |      |
| Wdf   | (%)         |         |         |         | 28,98   | 31,44   | 33,08   | 60,47   | 58,24   | 58,13   |         |         |         |      |      |      |
| MW    | (%)         |         |         |         |         | 31,17   |         |         | 58,94   |         |         |         |         |      |      |      |
| Stabw | (%)         |         |         |         |         | 2,06    |         |         | 1,32    |         |         |         |         |      |      |      |

ANHANG

|    |             |        |         |         |        |         |         |        |         |         |        |         |         |        |        |        |
|----|-------------|--------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|
| IS | Rt (min)    | 16,9   | 16,7    | 16,7    | 16,8   | 16,7    | 16,7    | 16,8   | 16,7    | 16,7    | 16,8   | 16,7    | 16,8    | 16,8   | 16,7   | 16,8   |
|    | Fläche (FE) | 118,87 | 116,793 | 116,083 | 118,30 | 116,818 | 116,618 | 118,02 | 117,282 | 116,377 | 118,90 | 117,445 | 116,636 | 119,40 | 117,01 | 117,20 |

A6.6 Chromatographische Daten und Auswertungen zur Wiederfindung der PAT-Adenin-Addukte (PA, Monoaddukt; PAA, Diaddukt) in den einzelnen Eluaten nach SPE an einer X-A-Phase. Elution mit 1 ml H<sub>2</sub>O mit 5% FA und 1 ml 3% MeOH mit 5% FA. Post-Elution mit 100% MeOH mit 5% FA. In den Fraktionen Probenaufgabe, Waschen Ammoniumacetat und Waschen MeOH waren keine Addukte detektierbar. Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; n.d., kein Peak detektierbar; Wdf, Wiederfindung.

|         |             | Kontrolle |          |          | Elution XA |          |          | Post-Elution XA |        |        |
|---------|-------------|-----------|----------|----------|------------|----------|----------|-----------------|--------|--------|
|         |             | a         | b        | c        | a          | b        | c        | a               | b      | c      |
| PA 1.3  | Rt (min)    | 4,0       | 4,0      | 4,0      | 4,0        | 4,0      | 4        | 4,0             | 4,0    | 4,0    |
|         | Fläche (FE) | 16921000  | 10667000 | 18975000 | 13956000   | 9936600  | 16841000 | 127930          | 99849  | 357580 |
| Wdf     | (%)         |           |          |          | 82,48      | 93,15    | 88,75    | 0,76            | 0,94   | 1,88   |
| MW      | (%)         |           |          |          |            | 88,13    |          |                 | 1,19   |        |
| Stabw   | (%)         |           |          |          |            | 5,37     |          |                 | 0,61   |        |
| PA 1.1  | Rt (min)    | 5,2       | 5,2      | 5,2      | 5,1        | 5,2      | 5,2      | 5,2             | 5,2    | 5,2    |
|         | Fläche (FE) | 31995000  | 21958000 | 34508000 | 30338000   | 20176000 | 30172000 | 262020          | 165120 | 608350 |
| Wdf     | (%)         |           |          |          | 94,82      | 91,88    | 87,43    | 0,82            | 0,75   | 1,76   |
| MW      | (%)         |           |          |          |            | 91,38    |          |                 | 1,11   |        |
| Stabw   | (%)         |           |          |          |            | 3,72     |          |                 | 0,57   |        |
| PA 1.2  | Rt (min)    | 7,9       | 8,1      | 8,1      | 7,9        | 8,0      | 8,1      | 7,9             | 8,0    | 8,1    |
|         | Fläche (FE) | 3435000   | 2125300  | 3389500  | 3360800    | 2168200  | 3337100  | 53975           | 33089  | 71724  |
| Wdf     | (%)         |           |          |          | 97,84      | 102,02   | 98,45    | 1,57            | 1,56   | 2,12   |
| MW      | (%)         |           |          |          |            | 99,44    |          |                 | 1,75   |        |
| Stabw   | (%)         |           |          |          |            | 2,26     |          |                 | 0,32   |        |
| PAA 2.1 | Rt (min)    | 8,4       | 8,6      | 8,6      | 8,4        | 8,6      | 8,6      | 8,4             | 8,6    | 8,6    |

ANHANG

|       |             |        |        |        |        |        |        |       |      |       |
|-------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|------|-------|
|       | Fläche (FE) | 555720 | 367850 | 627520 | 496710 | 279880 | 440870 | 12700 | 5938 | 11650 |
| Wdf   | (%)         |        |        |        | 89,38  | 76,09  | 70,26  | 2,29  | 1,61 | 1,86  |
| MW    | (%)         |        |        |        |        | 78,57  |        |       | 1,92 |       |
| Stabw | (%)         |        |        |        |        | 9,80   |        |       | 0,34 |       |

A6.7 Chromatographische Daten und Auswertungen zur Wiederfindung der diastereomeren cGSH-PAT-Adenin-Addukte (cGPA) und der PAT-Adenin-Addukte (PA, Monoaddukt; PAA, Diaddukt) in den einzelnen Eluaten nach 2-dimensionaler SPE mit einer SAX und X-A Säule. NH<sub>4</sub>Ac, Ammoniumacetat; Rt, Retentionszeit; FE, Flächeneinheiten; n.d., kein Peak detektierbar; Wdf, Wiederfindung; MW, Mittelwert.

|                |             | Kontrolle |          | Elution SAX |          | Probenaufgabe |         | Waschen NH <sub>4</sub> Ac |        | Waschen H <sub>2</sub> O |        | Elution XA |         |
|----------------|-------------|-----------|----------|-------------|----------|---------------|---------|----------------------------|--------|--------------------------|--------|------------|---------|
|                |             | a         | b        | a           | b        | a             | b       | a                          | b      | a                        | b      | a          | b       |
| cGPA 5.1       | Rt (min)    | 12,5      | 12,1     | 12,6        | 12,1     |               |         |                            |        |                          |        |            |         |
|                | Fläche (FE) | 2652400   | 8684100  | 1538300     | 5926900  | n.d.          | n.d.    | n.d.                       | n.d.   | n.d.                     | n.d.   | n.d.       | n.d.    |
| cGPA 5.2       | Rt (min)    | 16,1      | 15,6     | 16,2        | 15,6     |               |         |                            |        |                          |        |            |         |
|                | Fläche (FE) | 490740    | 5228700  | 2282400     | 7736800  | n.d.          | n.d.    | n.d.                       | n.d.   | n.d.                     | n.d.   | n.d.       | n.d.    |
| Summe Diaster. | Fläche (FE) | 3143140   | 13912800 | 3820700     | 13663700 |               |         |                            |        |                          |        |            |         |
| Wdf            | (%)         |           |          | 121,56      | 98,21    |               |         |                            |        |                          |        |            |         |
| MW             | (%)         |           |          | 109,88      |          |               |         |                            |        |                          |        |            |         |
| Range/2        | (%)         |           |          | 11,67       |          |               |         |                            |        |                          |        |            |         |
| PA 1.3         | Rt (min)    | 3,8       | 3,6      | 3,7         | 3,6      | 3,7           | 3,6     | 3,7                        | 3,6    | 3,7                      | 3,6    | 3,7        | 3,6     |
|                | Fläche (FE) | 1614800   | 4040500  | 127670      | 353550   | 825820        | 2050100 | 236080                     | 727210 | 48224                    | 48930  | 35116      | 139430  |
| Wdf            | (%)         |           |          | 7,91        | 8,75     | 51,14         | 50,74   | 14,62                      | 18,00  | 2,99                     | 1,21   | 2,17       | 3,45    |
| MW             | (%)         |           |          | 8,33        |          | 50,94         |         | 16,31                      |        | 2,10                     |        | 2,81       |         |
| Stabw          | (%)         |           |          | 0,42        |          | 0,20          |         | 1,69                       |        | 0,89                     |        | 0,64       |         |
| PA 1.1         | Rt (min)    | 4,9       | 4,6      | 4,8         | 4,6      | 4,8           | 4,6     | 4,8                        | 4,6    | 4,8                      | 4,6    | 4,8        | 4,6     |
|                | Fläche (FE) | 4500400   | 8456600  | 467710      | 798750   | 359220        | 453140  | 207220                     | 439300 | 108250                   | 157490 | 2571400    | 4965900 |



**A7 MRM-Methode**

A7.1 Vorläufer- und Fragmentionen, sowie substanzspezifische Parameter für die Erstellung einer MRM-Methode, welche mittels der automatischen *Compound Optimization* erzeugt wurden.

(A) Substanzspezifische MS/MS-Parameter optimiert anhand des cGSH-PAT-Adenin-Addukts 5.1. Die intensivsten Fragmentionen sind grau hinterlegt. -, kein Fragment zuordenbar und deswegen nicht als Fragment herangezogen.

| <i>m/z</i><br>Vorläuferion | DP<br>(V) | Intensität<br>(cps) | <i>m/z</i><br>Fragmentionen [Fragment]  | CE<br>(V) | CXP<br>(V) | Intensität<br>(cps) |
|----------------------------|-----------|---------------------|---|-----------|------------|---------------------|
| 551,1 [M+H] <sup>+</sup>   | 56        | 350100              | 341,1 [M+H-Gly-Ade] <sup>+</sup>  | 27        | 26         | 29300               |
|                            |           |                     | 313,0 [M+H-Gly-Ade] <sup>+</sup>  | 31        | 22         | 18910               |
|                            |           |                     | 295,1 [M+H-Gly-Ade-CO] <sup>+</sup>   | 39        | 20         | 22620               |
|                            |           |                     | 269,2 [M+H-Gly-Ade-H <sub>2</sub> O-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O] <sup>+</sup> | 39        | 22         | 17680               |
|                            |           |                     | 165,9 -   | 53        | 18         | 37520               |
|                            |           |                     | 138,1 -   | 81        | 18         | 9550                |
|                            |           |                     | 135,9 [Ade+H] <sup>+</sup>  | 31        | 12         | 178490              |
|                            |           |                     | 118,9 [Ade+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                                       | 119       | 14         | 12440               |

(B) Substanzspezifische MS/MS-Parameter für lineare Mischaddukte mit Adenin, optimiert anhand des /GSH-PAT-Adenin-Addukts 7.1. Die intensivsten Fragmentionen sind grau hinterlegt. -, kein Fragment zuordenbar.

| <i>m/z</i><br>Vorläuferion | DP<br>(V) | Intensität<br>(cps) | <i>m/z</i><br>Fragmentionen [Fragment]             | CE<br>(V) | CXP<br>(V) | Intensität<br>(cps) |
|----------------------------|-----------|---------------------|--|-----------|------------|---------------------|
| 569,0 [M+H] <sup>+</sup>   | 161       | 304840              | 434,1 [M+H-Ade] <sup>+</sup>                       | 27        | 22         | 13060               |
|                            |           |                     | 359,0 [M+H-Gly-Ade] <sup>+</sup>                   | 39        | 16         | 10000               |
|                            |           |                     | 287,0 [M+H-Glu-Ade-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>  | 29        | 26         | 41280               |
|                            |           |                     | 269,2 [M+H-Glu-Ade-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> | 39        | 18         | 17320               |
|                            |           |                     | 166,0 -  | 49        | 16         | 13210               |
|                            |           |                     | 137,8 -  | 71        | 26         | 2110                |
|                            |           |                     | 135,9 [Ade+H] <sup>+</sup>                         | 41        | 16         | 22280               |
|                            |           |                     | 119,0 [Ade+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>        | 121       | 14         | 2980                |

(C) Substanzspezifische MS/MS-Parameter für PAT-Adenin-Addukte. Die intensivsten Fragmentionen sind grau hinterlegt. -, kein Fragment zuordenbar.

| <i>m/z</i><br>Vorläuferion | DP<br>(V) | Intensität<br>(cps) | <i>m/z</i><br>Fragmentionen [Fragment]    | CE<br>(V) | CXP<br>(V) | Intensität<br>(cps) |
|----------------------------|-----------|---------------------|---|-----------|------------|---------------------|
| PAT-Adenin Addukt 1.1      |           |                     |   |           |            |                     |
| 280,0 [M+H] <sup>+</sup>   | 26        | 1543417             | 261,9 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> | 25        | 32         | 22450               |



ANHANG

|                          |     |         |  |    |    |        |
|--------------------------|-----|---------|--|----|----|--------|
|                          |     |         | 234,1 [M+H-COOH] <sup>+</sup>                                | 27 | 18 | 51030  |
|                          |     |         | 206,1 [M+H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -COOH] <sup>+</sup> | 27 | 16 | 259450 |
|                          |     |         | 148,9 -  | 25 | 14 | 7990   |
|                          |     |         | 136,1 [Ade+H] <sup>+</sup>                                   | 35 | 12 | 284680 |
|                          |     |         | 135,1 -  | 53 | 14 | 5240   |
|                          |     |         | 119,0 [Ade+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                  | 63 | 12 | 39390  |
|                          |     |         | 109,0 [M+H-Ade-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>               | 33 | 14 | 21510  |
| PAT-Adenin Addukt 1.2    |     |         |  |    |    |        |
| 280,0 [M+H] <sup>+</sup> | 101 | 456340  | 261,9 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                    | 9  | 12 | 15950  |
|                          |     |         | 234,0 [M+H-COOH] <sup>+</sup>                                | 9  | 16 | 11900  |
|                          |     |         | 206,1 [M+H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -COOH] <sup>+</sup> | 27 | 18 | 27730  |
|                          |     |         | 150,0 -  | 17 | 18 | 5180   |
|                          |     |         | 148,9 -  | 27 | 22 | 6650   |
|                          |     |         | 136,0 [Ade+H] <sup>+</sup>                                   | 33 | 10 | 28740  |
|                          |     |         | 119,0 [Ade+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                  | 59 | 12 | 4960   |
|                          |     |         | 109,0 [M+H-Ade-2-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>              | 31 | 14 | 2370   |
| PAT-Adenin Addukt 1.3    |     |         |  |    |    |        |
| 280,0 [M+H] <sup>+</sup> | 56  | 1182004 | 262,0 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                    | 19 | 20 | 86950  |
|                          |     |         | 244,1 [M+H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                   | 25 | 30 | 55770  |
|                          |     |         | 238,8 -  | 11 | 18 | 15280  |
|                          |     |         | 234,0 [M+H-COOH] <sup>+</sup>                                | 15 | 20 | 27410  |
|                          |     |         | 226,0 -  | 35 | 18 | 16550  |
|                          |     |         | 206,1 [M+H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -COOH] <sup>+</sup> | 27 | 16 | 21180  |
|                          |     |         | 188,1 -  | 21 | 10 | 12800  |
|                          |     |         | 136,0 [Ade+H] <sup>+</sup>                                   | 37 | 12 | 111190 |
| PAT-Adenin Diaddukt 2.1  |     |         |  |    |    |        |
| 396,9 [M+H] <sup>+</sup> | 76  | 168940  | 378,9 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                    | 9  | 20 | 8280   |
|                          |     |         | 351,0 [M+H-COOH] <sup>+</sup>                                | 11 | 24 | 9320   |
|                          |     |         | 262,0 [M+H-Ade] <sup>+</sup>                                 | 17 | 14 | 39360  |
|                          |     |         | 172,8 -  | 47 | 52 | 1020   |
|                          |     |         | 135,9 [Ade+H] <sup>+</sup>                                   | 39 | 12 | 18370  |
|                          |     |         | 128,9 -  | 61 | 20 | 1210   |
|                          |     |         | 119,2 [Ade+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                  | 89 | 18 | 1880   |
|                          |     |         | 109,0 [M+H-Ade-2-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>              | 45 | 12 | 3470   |

(D) Substanzspezifische MS/MS-Parameter optimiert anhand eines cGSH-PAT-Guanin-Addukts. Die intensivsten Fragmentationen sind grau hinterlegt. -, kein Fragment zuordenbar und deswegen nicht als Fragment herangezogen.

| <i>m/z</i><br>Vorläuferion | DP<br>(V) | Intensität<br>(cps) | <i>m/z</i><br>Fragmentationen [Fragment] | CE<br>(V) | CXP<br>(V) | Intensität<br>(cps) |
|----------------------------|-----------|---------------------|--|-----------|------------|---------------------|
|----------------------------|-----------|---------------------|--|-----------|------------|---------------------|

ANHANG

|                          |    |         |   |    |    |        |
|--------------------------|----|---------|---|----|----|--------|
| 567,0 [M+H] <sup>+</sup> | 91 | 1478548 | 416,1 [M+H-Gua] <sup>+</sup>                  | 27 | 20 | 121510 |
|                          |    |         | 398,0 [M+H-Gua-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> | 33 | 28 | 62630  |
|                          |    |         | 341,1 [M+H-Gly-Gua] <sup>+</sup>              | 29 | 26 | 57130  |
|                          |    |         | 177,0 -                                       | 37 | 22 | 63210  |
|                          |    |         | 152,1 [Gua+H] <sup>+</sup>                    | 29 | 12 | 53160  |
|                          |    |         | 111,0 -                                       | 71 | 10 | 13130  |
|                          |    |         | 83,9 -  | 91 | 12 | 19930  |
|                          |    |         | 83,0 -  | 91 | 14 | 22250  |

(E) Die /GSH-PAT-Guanin-Addukte waren nicht durch semipräparative HPLC-UV isolierbar und wurden somit keiner substanzspezifischen Optimierung unterzogen. Deshalb wurden die intensivsten Fragmentationen aus den Produktionen-Massenspektren (Kapitel A4.1) entnommen.

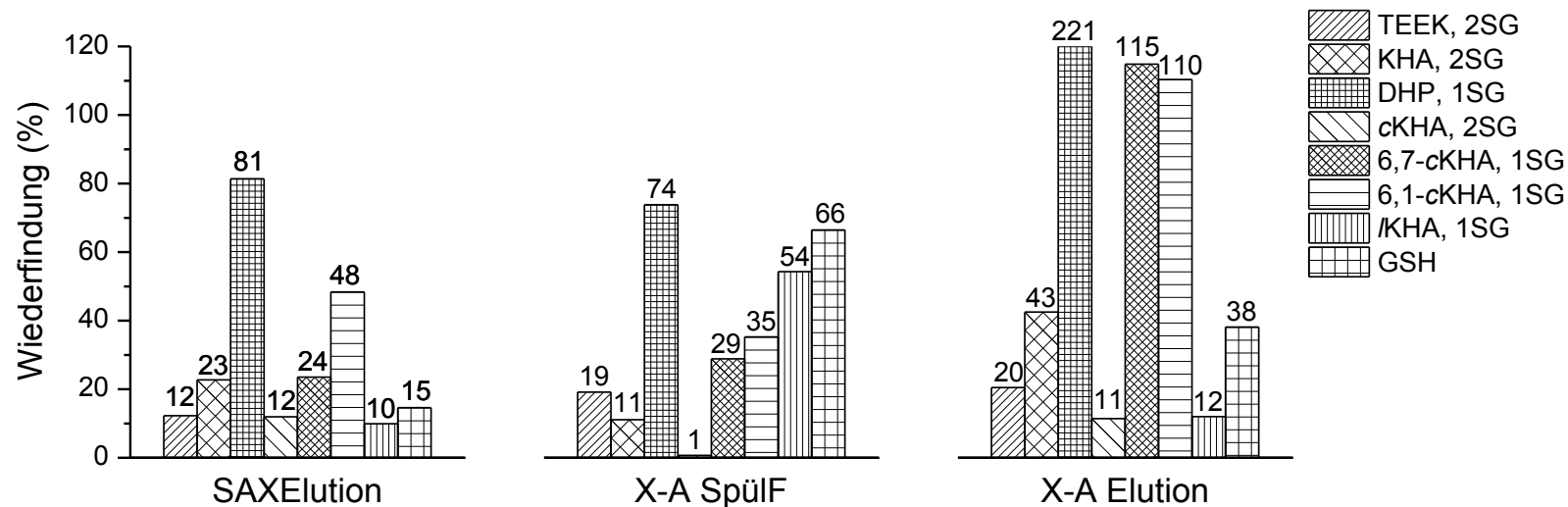
| <i>m/z</i><br>Vorläuferion | DP<br>(V) | <i>m/z</i><br>Fragmentationen [Fragment]          | CE<br>(V) | CXP<br>(V) |
|----------------------------|-----------|---|-----------|------------|
| 585,0 [M+H] <sup>+</sup>   | 80        | 416,1 [M+H-Gua] <sup>+</sup>                      | 20        | 13         |
|                            |           | 287,0 [M+H-Glu-Gua-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> | 20        | 13         |

(F) Substanzspezifische MS/MS-Parameter optimiert anhand eines PAT-Guanin-Monoaddukts. Da aufgrund der geringen Intensität des Adduktes nur ein interpretierbares Fragment erhalten wurde (grau markiert) wurde ein weiteres Fragment aus den Produktionen-Massenspektren (Kapitel 3.1.5.2) entnommen.

| <i>m/z</i><br>Vorläuferion | DP<br>(V) | Intensität<br>(cps) | <i>m/z</i><br>Fragmentationen [Fragment]                     | CE<br>(V) | CXP<br>(V) | Intensität<br>(cps) |
|----------------------------|-----------|---------------------|--|-----------|------------|---------------------|
| 295,9 [M+H] <sup>+</sup>   | 91        | 376866              | 152,2 [Gua+H] <sup>+</sup>                                   | 33        | 16         | 1600                |
|                            |           |                     | 222,0 [M+H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -COOH] <sup>+</sup> | 20        | 13         | ---                 |

**A8 DNA-Inkubation**

A8.1 Wiederfindungen der GSH-PAT-Addukte sowie GSH in den SPE-Fractionen: Elutionsfraktion der SAX-Phase (SAX Elution), Probenaufgabe- und Spülfractionen der X-A-Phase (X-A Spülf) und der Elutionsfraktion der X-A-Phase (X-A Elution). Ein Inkubationsansatz von PAT (0,25 mM), GSH (0,5 mM), Adenin (1 mM) und Guanin (0,5 mM) wurde für 24 h bei RT inkubiert und PAT zum Stoppen der Reaktion mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung analog zur Aufarbeitung der Inkubation von PAT mit DNA, sauer hydrolysiert (1 M HCl, 70°C, 30 min), zentrifugiert, neutralisiert und anschließend die SPE durchgeführt. Die erhaltenen SPE-Fractionen wurden abevaporiert, gefriergetrocknet und mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus analysiert (Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Die Berechnung der Wiederfindungen erfolgte anhand eines Inkubationsansatzes welcher direkt nach der 24-stündiger Inkubation gefriergetrocknet, anschließend resuspendiert und mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus analysiert wurde. 1/2SG, Anzahl der an den Addukten gebundenen GSH-Molekülen. TEEK, Thioenoletherketon; (c/l)KHA, (cyclisches/lineares) Ketoheptansäure-Derivat; DHP, Dihydropyranon. TEEK 2 SG,  $m/z$  385>179, CE 30 V; KHA, 2 SG  $m/z$  371>130, CE 35 V; DHP, 1 SG  $m/z$  462>315, CE 30 V; cKHA, 2 SG  $m/z$  723>648, CE 30 V; lKHA, 1 SG  $m/z$  452>287, CE 30 V; 6,1/6,7-cKHA, 1 SG  $m/z$  434>359, CE 25 V; GSH  $m/z$  308>179, CE 15 V.



ANHANG

A8.2 Chromatographische Daten und Auswertungen der PAT-Adenin-Addukte, PAT-Guanin-Addukte und GSH-PAT-Adenin-Addukte, welche nach Inkubation von PAT mit 1 mg DNA in Abwesenheit von GSH oder in Gegenwart von GSH mit GSH/PAT-Verhältnissen von 0,5, 1 oder 2 gebildet wurden. PF, Peakfläche; Qn, *Quantifier*-Spur; Ql, *Qualifier*-Spur; i. Vgl., im Vergleich; \* Anteil der PF i.Vgl. zu GSH/PAT=0,5 kalkuliert mit dem kleinstmöglichen detektierbaren Peak mit einer Fläche von 5000 counts; #, Anteil der PF i.Vgl. zu GSH/PAT=0,5 kalkuliert unter Verwendung der Peakflächen der Spülfractionen.

PAT-Adenin-Addukte

| GSH/PAT | Addukt | m/z-Spur | X-A-Elutionsfraktion |                  |                     | X-A-Spülfraction |                  |                     | Gesamt-PF (counts) | Anteil PF i.Vgl. zu GSH/PAT=0,5 |
|---------|--------|----------|----------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------|---------------------|--------------------|---------------------------------|
|         |        |          | PF (counts)          | Qn/Ql-Verhältnis | Anteil an Gesamt-PF | PF (counts)      | Qn/Ql-Verhältnis | Anteil an Gesamt-PF |                    |                                 |
| 0,5     | 1.1    | Qn       | 105610               | 3,3              |                     | 525080           | 1,1              |                     | 523443             |                                 |
|         |        | Ql       | 31683                |                  | 6,1                 | 491760           |                  | 93,9                |                    |                                 |
|         | 1.2    | Qn       | 8517                 | 1,1              | 17,8                | 39462            | 1,5              | 82,2                | 47979              |                                 |
|         |        | Ql       | 7860                 |                  |                     | 26074            |                  |                     |                    |                                 |
|         | 1.3    | Qn       | 65326                | 4,8              | 18,6                | 286600           | 5,5              | 81,4                | 351926             |                                 |
|         |        | Ql       | 13541                |                  |                     | 52508            |                  |                     |                    |                                 |
|         | 1.4    | Qn       | 15846                | ---              |                     | n.d.             | ---              |                     |                    |                                 |
|         |        | Ql       | n.d.                 |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         | 1.5    | Qn       | n.d.                 | ---              |                     | n.d.             | ---              |                     |                    |                                 |
|         |        | Ql       | n.d.                 |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
| 1       | 1.1    | Qn       | 60918                | 5,2              |                     | 59009            | 1,0              |                     | 11,2 <sup>#</sup>  |                                 |
|         |        | Ql       | 11704                |                  | 17,2                | 56218            |                  | 82,8                | 67922              |                                 |
|         | 1.2    | Qn       | n.d.                 | ---              |                     | n.d.             | ---              |                     | 10,4 <sup>*</sup>  |                                 |
|         |        | Ql       | n.d.                 |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         | 1.3    | Qn       | 25157                | 4,6              | 37,1                | 42604            | 5,6              | 62,9                | 67761              |                                 |
|         |        | Ql       | 5454                 |                  |                     | 7587             |                  |                     |                    |                                 |
|         | 1.4    | Qn       | 10210                | ---              |                     | n.d.             | ---              |                     |                    |                                 |
|         |        | Ql       | n.d.                 |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         | 1.5    | Qn       | n.d.                 | ---              |                     | n.d.             | ---              |                     |                    |                                 |
|         |        | Ql       | n.d.                 |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |

ANHANG

|     |     |     |       |        |      |       |         |      |       |                  |     |
|-----|-----|-----|-------|--------|------|-------|---------|------|-------|------------------|-----|
| 2   | 1.1 | Qn  | 56198 | 8,0    | 38,1 | 10543 | 0,9     | 61,9 | 18439 | 2,0 <sup>#</sup> |     |
|     |     | Ql  | 7023  |        |      | 11416 |         |      |       |                  |     |
|     | 1.2 | Qn  | n.d.  | ---    | ---  | n.d.  | ---     | ---  | ---   | 10,4*            |     |
|     |     | Ql  | n.d.  |        |      | n.d.  |         |      |       |                  |     |
|     | 1.3 | Qn  | n.d.  | ---    | ---  | n.d.  | ---     | ---  | ---   | 1,4*             |     |
|     |     | Ql  | n.d.  |        |      | n.d.  |         |      |       |                  |     |
|     | 1.4 | Qn  | 18619 | ---    | ---  | n.d.  | ---     | ---  | ---   | ---              |     |
|     |     | Ql  | n.d.  |        |      | n.d.  |         |      |       |                  |     |
|     | 1.5 | Qn  | n.d.  | ---    | ---  | n.d.  | ---     | ---  | ---   | ---              |     |
|     |     | Ql  | n.d.  |        |      | n.d.  |         |      |       |                  |     |
|     | --- | 1.1 | Qn    | 218220 | 1,3  | 14,6  | 1,3E+06 | 1,1  | 85,4  | 1490820          | --- |
|     |     |     | Ql    | 164750 |      |       | 1,2E+06 |      |       |                  |     |
|     |     | 1.2 | Qn    | 46548  | 1,1  | 41,6  | 65480   | 1,4  | 58,4  | 112028           | --- |
|     |     |     | Ql    | 43054  |      |       | 45287   |      |       |                  |     |
|     |     | 1.3 | Qn    | 188990 | 5,1  | 20,7  | 722450  | 4,8  | 79,3  | 911440           | --- |
| Ql  |     |     | 36959 | 152080 |      |       |         |      |       |                  |     |
| 1.4 |     | Qn  | 9418  | ---    | ---  | n.d.  | ---     | ---  | ---   | ---              |     |
|     |     | Ql  | n.d.  |        |      | n.d.  |         |      |       |                  |     |
| 1.5 |     | Qn  | 7995  | ---    | ---  | n.d.  | ---     | ---  | 7995  | ---              |     |
|     |     | Ql  | n.d.  |        |      | n.d.  |         |      |       |                  |     |

ANHANG

PAT-Guanin-Addukte

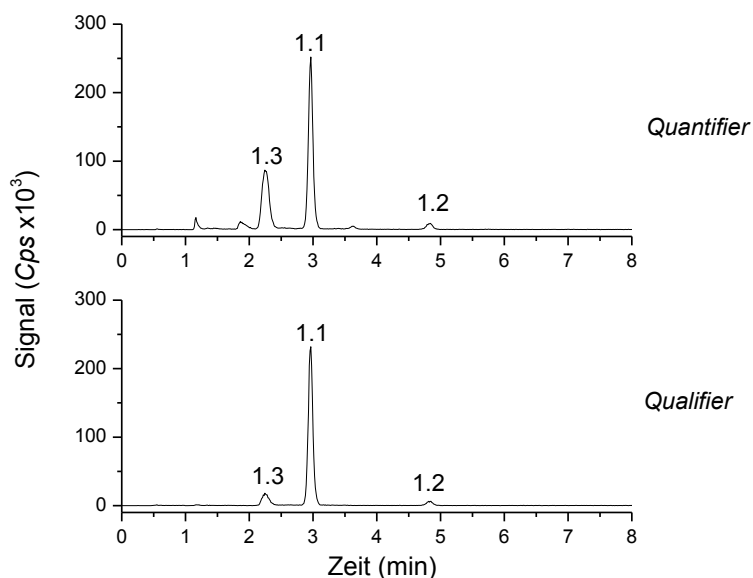
| GSH/PAT | Addukt | m/z-Spur | X-A-Elutionsfraktion |                  |                     | X-A-Spülfraction |                  |                     | Gesamt-PF (counts) | Anteil PF i.Vgl. zu GSH/PAT=0,5 |
|---------|--------|----------|----------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------|---------------------|--------------------|---------------------------------|
|         |        |          | PF (counts)          | Qn/QI-Verhältnis | Anteil an Gesamt-PF | PF (counts)      | Qn/QI-Verhältnis | Anteil an Gesamt-PF |                    |                                 |
| 0,5     | G11    | Qn       | 29784                | 3,5              |                     | n.d.             | ---              |                     | 29784              |                                 |
|         |        | QI       | 8455                 |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         | G12    | Qn       | n.d.                 | ---              |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         |        | QI       | n.d.                 |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         | G13    | Qn       | n.d.                 | ---              |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         |        | QI       | n.d.                 |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
| 1       | G11    | Qn       | 7941                 | ---              | n.d.                | ---              |                  | 7941                | 26,7               |                                 |
|         |        | QI       | n.d.                 |                  | n.d.                |                  |                  |                     |                    |                                 |
|         | G12    | Qn       | n.d.                 |                  | ---                 |                  |                  | n.d.                |                    |                                 |
|         |        | QI       | n.d.                 |                  |                     |                  |                  | n.d.                |                    |                                 |
|         | G13    | Qn       | n.d.                 |                  | ---                 |                  |                  | n.d.                |                    |                                 |
|         |        | QI       | n.d.                 |                  |                     |                  |                  | n.d.                |                    |                                 |
| 2       | G11    | Qn       | n.d.                 | ---              | n.d.                | ---              |                  | n.d.                | 16,8*              |                                 |
|         |        | QI       | n.d.                 |                  | n.d.                |                  |                  |                     |                    |                                 |
|         | G12    | Qn       | n.d.                 |                  | ---                 |                  |                  | n.d.                |                    |                                 |
|         |        | QI       | n.d.                 |                  |                     |                  |                  | n.d.                |                    |                                 |
|         | G13    | Qn       | n.d.                 |                  | ---                 |                  |                  | n.d.                |                    |                                 |
|         |        | QI       | n.d.                 |                  |                     |                  |                  | n.d.                |                    |                                 |
| ---     | G11    | Qn       | 110300               | 4,4              | 89,7                | 12731            | ---              | 10,3                | 123031             |                                 |
|         |        | QI       | 24867                |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         | G12    | Qn       | 11060                | ---              |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         |        | QI       | n.d.                 |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         | G13    | Qn       | 8895                 | ---              |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |
|         |        | QI       | n.d.                 |                  |                     | n.d.             |                  |                     |                    |                                 |

ANHANG

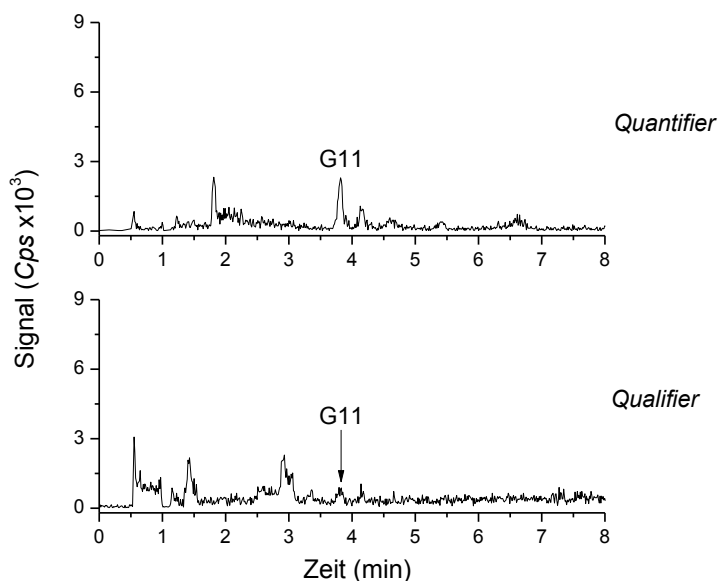
GSH-PAT-Adenin-Addukte

| GSH/PAT | Addukt | m/z-<br>Spur | X-A-Elutionsfraktion |                      |                        | X-A-Spülfraction |                      |                        | Gesamt-PF<br>(counts) | Anteil PF i.Vgl. zu<br>GSH/PAT=0,5 |
|---------|--------|--------------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|         |        |              | PF<br>(counts)       | Qn/QI-<br>Verhältnis | Anteil an<br>Gesamt-PF | PF<br>(counts)   | Qn/QI-<br>Verhältnis | Anteil an<br>Gesamt-PF |                       |                                    |
| 0,5     | 5.1    | Qn           | 11020                | ---                  |                        | 8433             | ---                  |                        | 35170                 |                                    |
|         |        | QI           | n.d.                 |                      | n.d.                   |                  |                      |                        |                       |                                    |
|         | 5.2    | Qn           | 8417                 | ---                  |                        | 7300             | ---                  |                        |                       |                                    |
|         |        | QI           | n.d.                 |                      | n.d.                   |                  |                      |                        |                       |                                    |
|         | Summe  | Qn           | 19437                | ---                  | 55,3                   | 15733            | ---                  | 44,7                   |                       |                                    |
|         |        | QI           | n.d.                 |                      |                        | n.d.             |                      |                        |                       |                                    |
| 1       | 5.1    | Qn           | 60440                | 5,3                  |                        | n.d.             | ---                  |                        | 89030                 | 253,1                              |
|         |        | QI           | 11490                |                      |                        | n.d.             |                      |                        |                       |                                    |
|         | 5.2    | Qn           | 28590                | 5,8                  |                        | n.d.             | ---                  |                        |                       |                                    |
|         |        | QI           | 4946                 |                      |                        | n.d.             |                      |                        |                       |                                    |
|         | Summe  | Qn           | 89030                | 5,4                  | 100,0                  | n.d.             | ---                  | ---                    |                       |                                    |
|         |        | QI           | 16436                |                      |                        | n.d.             |                      |                        |                       |                                    |
| 2       | 5.1    | Qn           | 29972                | 5,4                  |                        | 19460            | ---                  |                        | 85752                 | 243,8                              |
|         |        | QI           | 5599                 |                      |                        | n.d.             |                      |                        |                       |                                    |
|         | 5.2    | Qn           | 19560                | 5,2                  |                        | 16760            | ---                  |                        |                       |                                    |
|         |        | QI           | 3733                 |                      |                        | n.d.             |                      |                        |                       |                                    |
|         | Summe  | Qn           | 49532                | 5,3                  | 57,8                   | 36220            | ---                  | 42,2                   |                       |                                    |
|         |        | QI           | 9332                 |                      |                        | n.d.             |                      |                        |                       |                                    |

- A8.3 PAT-Adenin-Addukte, welche nach 48-stündiger Inkubation von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Abwesenheit von GSH, Aufarbeitung gemäß **Abb. 71** bereits beim Spülen der X-A-Phase und somit noch vor der Elution von der Säule gewaschen wurden. Dargestellt ist das Chromatogramm des *Quantifiers* mit  $m/z$  280>136, CE 35 V und des *Qualifiers* mit  $m/z$  280>206, CE 27 V. HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Identifizierung der Addukte über Retentionszeit und Quantifier/Qualifier-Verhältnis.  
PAT-Adenin-Addukte: 1.1: Rt 3,0 min, PFV 1,1; 1.2: Rt 4,8 min, PVF 1,4; 1.3: Rt 2,2 min, PVF 4,8.

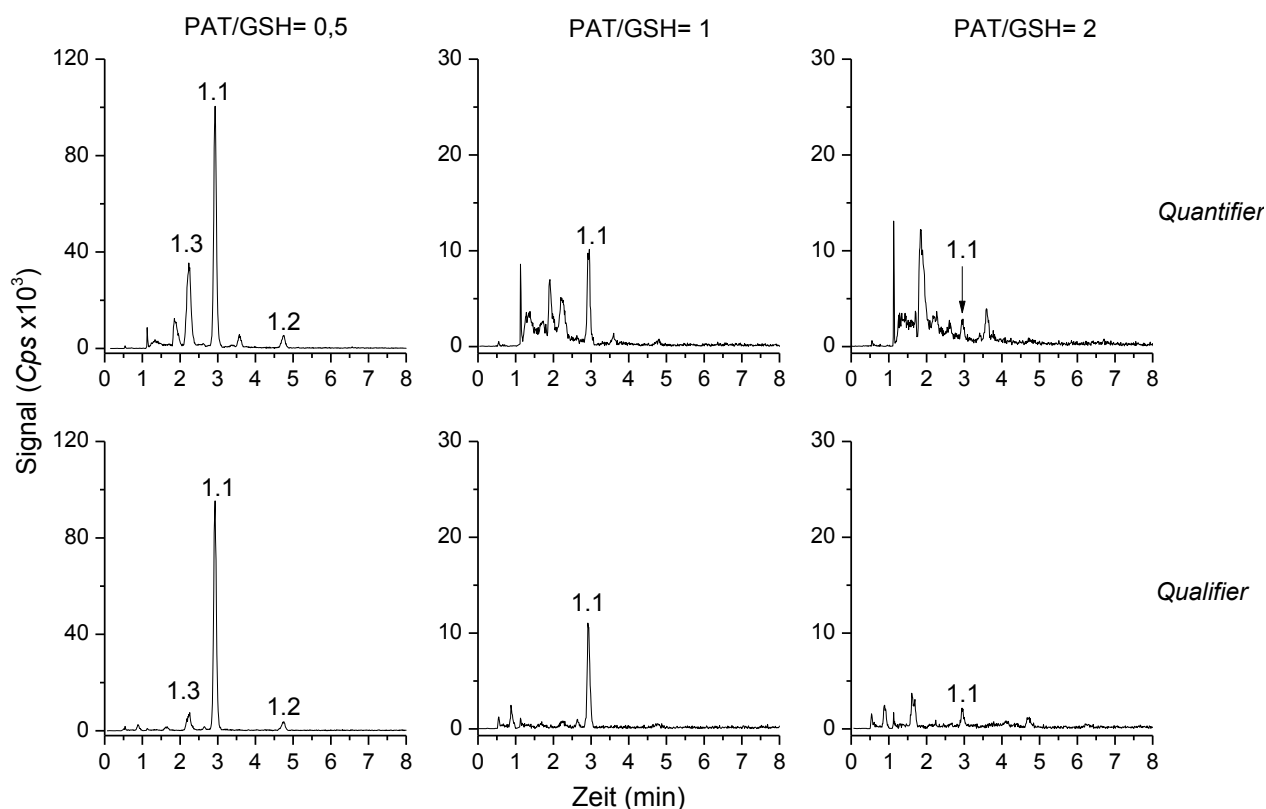


- A8.4 PAT-Guanin-Addukte, welche nach 48-stündiger Inkubation von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Abwesenheit von GSH, Aufarbeitung gemäß **Abb. 73** bereits beim Spülen der X-A-Phase und somit noch vor der Elution von der Säule gewaschen wurden. Dargestellt ist das Chromatogramm des *Quantifiers* mit  $m/z$  296>152, CE 33 V und des *Qualifiers* mit  $m/z$  296>222, CE 22 V. HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Identifizierung der Addukte über Retentionszeit und Quantifier/Qualifier-Verhältnis.  
PAT-Guanin-Addukt: G11: Rt 3,8 min, PFV 5,5.

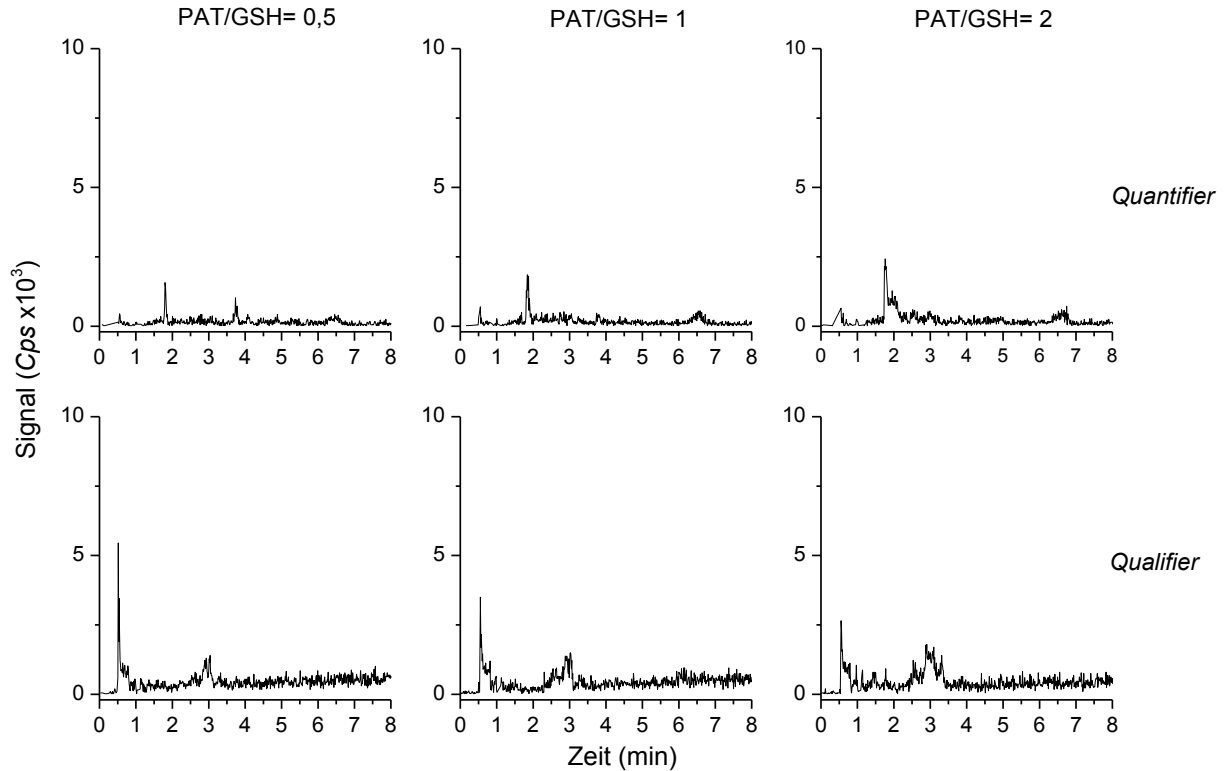




A8.5 PAT-Adenin-Addukte, welche nach 48-stündiger Inkubation von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Anwesenheit von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,4, 0,8 und 1,6 mM), Aufarbeitung gemäß Abb. 73 bereits beim Spülen der X-A-Phase und somit noch vor der Elution von der Säule gewaschen wurden. Dargestellt ist das Chromatogramm des *Quantifiers* mit  $m/z$  280>136, CE 35 V (oben) und des *Qualifiers*  $m/z$  280>206, CE 27 V (unten). HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Identifizierung der Addukte über Retentionszeit und *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis.  
 PAT-Adenin-Addukte: 1.1: Rt 2,9 min, PFV 1,1 (GSH/PAT=0,5 und 1), 0,9 (GSH/PAT=2); 1.2: Rt 4,8 min, PVF 1,5 (GSH/PAT=0,5); 1.3: Rt 2,2 min, PVF 5,5 (GSH/PAT=0,5).

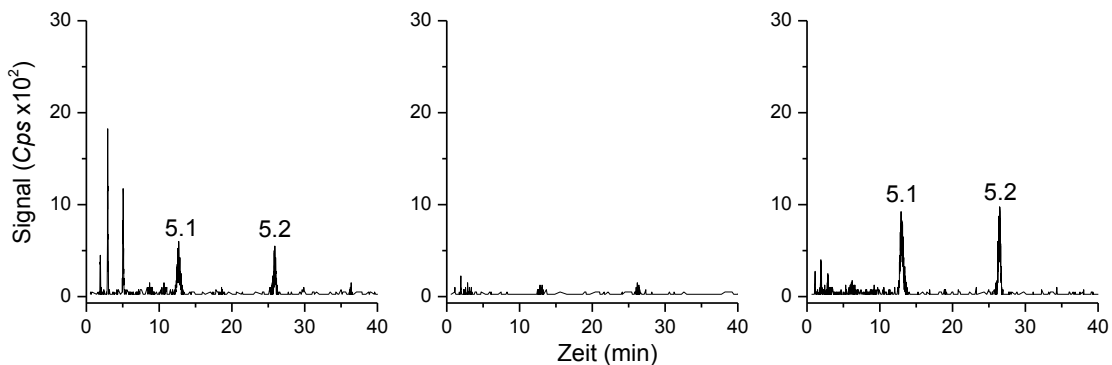


A8.6 PAT-Guanin-Addukte, welche nach 48-stündiger Inkubation von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Anwesenheit von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,4, 0,8 und 1,6 mM), Aufarbeitung gemäß Abb. 73 bereits beim Spülen der X-A-Phase und somit noch vor der Elution von der Säule gewaschen wurden. Dargestellt ist das Chromatogramm des *Quantifiers* mit  $m/z$  296>152, CE 33 V (oben) und des *Qualifiers*  $m/z$  296>222, CE 22 V (unten). HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Es wurden keine Addukte anhand der Retentionszeit und des *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis identifiziert.

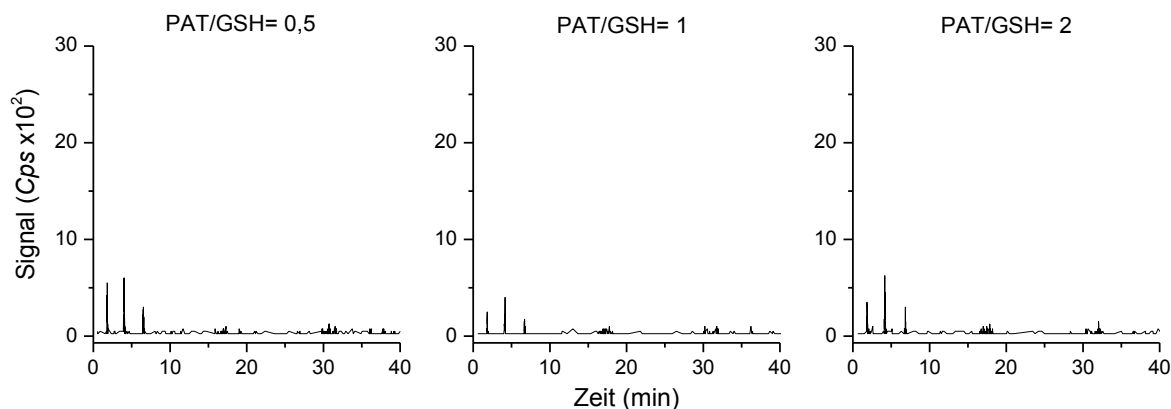


A8.7 cGSH-PAT-Adenin-Addukte, welche nach 48-stündiger Inkubation von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Anwesenheit von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,4, 0,8 und 1,6 mM), Aufarbeitung gemäß **Abb. 71** und in der Spülfraction der X-A-Phase detektiert wurden. Dargestellt ist das Chromatogramm des *Quantifiers* mit  $m/z$  551>136, CE 31 V. HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Die eingeklammerten Adduktpeaks wurden nur anhand der Retentionszeit (Rt) zugeordnet.

cGSH-PAT-Adenin-Addukte: 5.1: Rt 12,9 min; 5.2: Rt 26,5 min.



A8.8 Dargestellt ist das Chromatogramm des Quantifiers ( $m/z$  567>152, CE 29 V) zur Detektion von cGSH-PAT-Guanin-Addukten in der SAX-Elutionsfraktion eines gemäß Abb. 73 aufgearbeiteten 48-stündigen Inkubationsansatzes von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Anwesenheit von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,4, 0,8 und 1,6 mM). HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Es wurden keine Adduktpeaks identifiziert.



A8.9 Dargestellt ist das Chromatogramm des Quantifiers ( $m/z$  567>152, CE 29 V) zur Detektion von cGSH-PAT-Guanin-Addukten in der X-A-Spülfraction eines gemäß Abb. 73 aufgearbeiteten 48-stündigen Inkubationsansatzes von PAT (0,8 mM) mit 1 mg DNA in Anwesenheit von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,4, 0,8 und 1,6 mM). HPLC-MS/MS-Analyse im MRM-Modus (Kapitel 5.2.1.5 UHPLC-Methode 1). Es wurden keine Adduktpeaks identifiziert.

