

Diss. ETH Nr. 8149

**ERFASSUNG VON PROMOTOREN MIT HILFE VON  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE.  
ABKLÄRUNG IHRER WIRKUNGSWEISE IM  
ZUSAMMENHANG MIT DER INDUKTION VON NONDISJUNCTIONS**

ABHANDLUNG

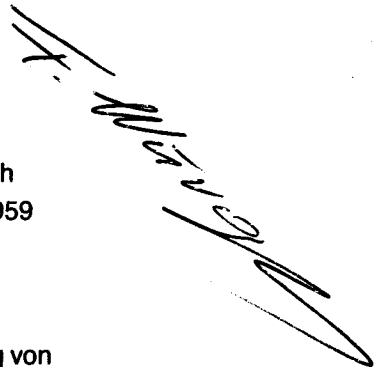
zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
SILVIO ALBERTINI  
Dipl. Natw. ETH Zürich  
geboren am 28. April 1959  
von Poschiavo (GR)

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. F.E. Würigler, Referent  
PD Dr. W.K. Lutz, Korreferent

Zürich 1986

ADAG Administration & Druck AG



## ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Kanzerogenese spielt neben der Veränderung des Erbmaterials (Initiation) auch dessen Verteilung (Mitose und Translokationen; v.a. im Zusammenhang mit der Expression veränderter Gene (Onkogene)) eine Rolle. Solche Mechanismen dürften bei der zweiten Phase der Tumorentstehung, der Tumorpromotion, von Bedeutung sein. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen zur Chromosomenverteilung von zunehmender Bedeutung. Für die Erfassung von Chromosomenfehlverteilungen, insbesondere für den Nachweis von Aneuploidie, stehen nur ungenügend validierte Testsysteme zur Verfügung. Zudem sind auch die Wirkungsmechanismen, die zu diesen spezifischen genotoxischen Effekten führen noch unklar.

Der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Induktion aneuploider Zellen (Nachweis von Chromosomenverlust) in *S. cerevisiae* D61.M wurde untersucht. Mit diesem Testsystem können auch andere genetische Endpunkte untersucht werden (insbesondere Rekombinationen). Von den acht untersuchten Tumor-Promotoren waren vier im Hefesystem positiv (Cholsäure, Lithocholsäure, Phenobarbital (PB) und Saccharin). Diethylstilböstrol (DES) zeigte in mehreren voneinander unabhängigen Versuchen sowohl positive wie auch negative Ergebnisse (im positiven Fall wirkte DES zudem auch rekombinogen). Drei Promotoren waren negativ [Anthralin, 4,4'-Dichlor-diphenyl-trichlor-äthan (DDT) und  $\gamma$ -Hexachlorcyclohexan ( $\gamma$ -HCH; Lindan)]. Die drei kompletten Kanzerogene Aflatoxin B<sub>1</sub>, Benz(a)pyren und 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen waren mit und ohne Zugabe eines exogenen Aktivierungssystems (Rattenleberhomogenat; S9) negativ, induzierten aber mit S9 Rekombinationen. Eine Auswahl verschiedener anderer Substanzen zeigte (z.T. in Übereinstimmung mit der Literatur) im Hefe-Testsystem folgendes Bild: positiv waren Aceton, Aethylacetat, Bavistan, Cyclophosphamid und Chlorpropham, wobei Chlorpropham auch rekombinogen war. Negative Ergebnisse wurden mit 5-Azacytidin, Colchizin, Dimethylsulfoxid (DMSO),  $\alpha$ -Hexachlorcyclohexan ( $\alpha$ -HCH) und vier verschiedenen neurotoxischen Pyridinthionen erhalten. 5-Azacytidin induzierte Rekombinationen. Mit Mitomycin C (MMC), einem Agens, das nach reduktiver Aktivierung zwei einzelne DNS Stränge miteinander zu verknüpfen vermag (crosslinking), wurden sowohl positive (2), schwach positive (1), als auch negative (2) Befunde gefunden. In den beiden positiven Fällen induzierte MMC auch Rekombinationen. Die Effekte liessen sich mit dem YEP-Gehalt und der Zugabe von S9 korrelieren.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Es gibt Substanzen, die spezifisch Chromosomenfehlverteilungen auslösen können (keine anderen genotoxischen Effekte). Andere Substanzen können neben der Induktion von Aneuploidie auch zusätzliche genetische Endpunkte beeinflussen (z.B. mitotische Rekombination). Obwohl unter den Promotoren Substanzen gefunden wurden, die spezifisch Chromosomenverluste induzieren, kann dieser Effekt allein nicht zur Identifikation von Promotoren benutzt werden.

Da die Spindel als Verteilungsapparat der Chromosomen während Mitose und Meiose einen möglichen Angriffspunkt für die Induktion von Aneuploidie darstellt, wurde der Einfluss der Substanzen auf das in vitro Assembly von Säuger-Tubulin untersucht. Sämtliche acht Tumor-Promotoren zeigten Effekte. Fünf (Anthralin, Cholsäure,  $\gamma$ -HCH, Lithocholsäure und PB) stimulierten das Assembly, eine davon reversibel (PB), zwei partiell reversibel ( $\gamma$ -HCH und Cholsäure) und eine irreversibel (Lithocholsäure). Die anderen drei (DES, DDT, Saccharin) hemmten das Assembly reversibel. Die

Konzentrationen bei welchen das Assembly um 50% gehemmt wurden waren sehr unterschiedlich: sie betragen für DES 30  $\mu\text{M}$ , für DDT 0.6 mM und für Saccharin 7.5 mM. Von den zusätzlich untersuchten Substanzen wurde mit Asbest, Bavistan, Colchizin, Chlorpropham und MMC eine Hemmung gefunden, während  $\text{Fe}^{2+}$  (kommt in Asbest vor) keinen und DMSO (übereinstimmend mit Literaturdaten) einen stimulierenden Effekt zeigten. Dabei betragen die 50%-Hemmkonzentrationen für Colchizin 12  $\mu\text{M}$  und für MMC 0.15 mM. Im Falle von Bavistan und Chlorpropham konnte experimentell innerhalb der Löslichkeitsgrenze lediglich eine etwa 30%-ige Hemmung erreicht werden (geschätzte 50%-Hemmkonzentrationen für Bavistan  $> 1$  mM, für Iso-PC  $\geq 2.5$  mM). Ueberraschend war vorallem der Befund mit MMC, da sich die Hemmung als reversibel erwies.

Im weiteren wurde von einigen ausgewählten Substanzen der Einfluss auf präformierte Mikrotubuli untersucht (Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation (Steady State)). Keinen Effekt zeigten Anthralin, Cholsäure, PB und DMSO, eine leichte Erniedrigung des Steady State Wertes wurde nach Zugabe von DDT und Bavistan beobachtet und zu einer massiven Erniedrigung führte die Zugabe von DES, Colchizin und Chlorpropham.

Vorläufig lassen sich die Ergebnisse mit *S. cerevisiae* D61.M (Auslösen von Chromosomenverlust) nicht mit den Resultaten der in vitro Tubulin assembly Tests korrelieren (mögliche Unterschiede zwischen Säuger- und Hefe-Tubulin?). Auch Substanzen, die keine Chromosomenverluste induzierten, zeigten einen induzierenden resp. hemmenden Effekt im in vitro Tubulin-Test [Anthralin und  $\gamma$ -HCH (Induktion); DDT (Hemmung)]. Interessant ist die Tatsache, dass fünf der acht untersuchten Promotoren zu einer Stimulation der Tubulin-Polymerisation führten. Zur genaueren Charakterisierung einer derart heterogenen Substanzgruppe, wie sie die Promotoren darstellt, ist jedoch eine möglichst umfassende Erhebung weiterer genotoxischer Daten unumgänglich.

## SUMMARY

The primary target for most mutagens is DNA metabolism. In the theoretical models of chemical carcinogenesis these compounds are believed to be the initiators of tumor formation. Subsequent changes in the regulation of normal cell growth are induced by a rather heterogeneous class of substances called tumor promoters. Generally these compounds do not interact with DNA. Because this heterogeneous class of compounds may interact with different cellular targets, it is difficult to develop specific short-term test systems for their detection. In this context the examination of chromosome distribution has received increasing attention. For the detection of chromosome malsegregation, particularly for aneuploidy, available test systems have not yet been sufficiently validated. The mechanisms leading to the specific genotoxic effects are unknown.

In the present investigation we validated a yeast test system, especially in regard to the possible suitability for screening purposes of tumor promoters. In addition we tried to gain information about the mechanisms leading to induced chromosome malsegregation.

The influence of different substances on the induction of aneuploid colonies in *S. cerevisiae* D61.M was investigated. Specifically the loss of chromosome VII was measured. Recombination could also be detected in this system. Of the eight tumor promoters tested four were positive in the yeast test system: cholic acid, lithocholic acid, phenobarbital (PB) and saccharin. Diethylstilbestrol (DES) showed positive as well as negative results in several independent experiments. In the positive experiments DES induced also recombination. Three tumor promoters were negative: anthralin, 4,4'-dichlor-diphenyl-ethan (DDT) and  $\gamma$ -hexachlorcyclohexane (lindane;  $\gamma$ -HCH).

The three complete carcinogens aflatoxin B<sub>1</sub>, benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene were negative, independent of the addition of an exogenous metabolic activation system (rat liver homogenat; S9); but in the presence of S9 they induced recombinations.

Other substances, partially in agreement with the literature, showed the following results with *S. cerevisiae* D61.M: acetone, ethylacetate, bavistan, cyclophosphamide and chlorpropham were positive. In addition chlorpropham induced recombination. Negative results were obtained with 5-azacytidine, colchicine, dimethylsulfoxide (DMSO),  $\alpha$ -hexachlorcyclohexane ( $\alpha$ -HCH) and four different neurotoxic pyridinthiones. 5-Azacytidine induced recombination in addition to chromosome loss. With mitomycin C (MMC) positive (2), weak positive (1) and negative (2) results were obtained. In the positive cases MMC induced recombination as well as chromosome loss. The loss could be correlated with the YEP-content and the addition of an exogenous metabolic activation system.

The results with yeast can be summarized as follows: some substances specifically induce chromosome malsegregation (no other genotoxic effects); other compounds induced recombination alongside aneuploidy, and a third category of compounds showed equivocal genetic responses.

The most important point however is the fact that only half of the tested tumor promoters were able to induce chromosome loss in yeast. This clearly shows that in *S. cerevisiae* D61.M the genetic endpoint chosen is only partially compatible with the tumor promoting activity of certain substances in vivo.

The spindle apparatus is involved in chromosome distribution during mitosis and meiosis. Therefore the spindle could be a possible target for

compounds inducing aneuploidy. We investigated the influence of different substances on the in vitro assembly of porcine brain tubulin.

All eight tumor promoters showed effects. Five of them: anthralin, cholic acid,  $\gamma$ -HCH, lithocholic acid and PB enhanced the in vitro assembly. The effect was reversible in the case of PB and only partially reversible in the case of cholic acid and  $\gamma$ -HCH, whereas the stimulating effects of lithocholic acid led to an irreversible modification of the tubulin structure as was shown by the insolubility of the microtubules formed at 0° C. The other three tested tumor promoters - DES, DDT and saccharin - inhibited the assembly. The necessary concentrations for a 50% inhibition covered a wide range. The concentrations were 0.03 mM, 0.6 mM and 7.5 mM for DES, DDT and saccharin.

In addition asbestos (crocidolith), bavistan, colchicine, chlorpropham and MMC showed also inhibitory effects, whereas  $Fe^{2+}$  (a constituent of asbestos) had no influence on tubulin assembly. In agreement with data from the literature, DMSO enhanced the in vitro assembly of porcine brain tubulin. The 50%-inhibition concentrations for colchicine and for MMC were 12  $\mu$ M and 0.15 mM. In the case of bavistan and chlorpropham only a 30% reduction of the assembly was detected because of the limited solubility of the compounds. The estimated 50% inhibition values for bavistan and chlorpropham are  $\geq 1$  mM and  $\geq 2.5$  mM respectively. The inhibitory effects of chlorpropham, asbestos and the cross linking agent MMC were reversible.

Some selected substances were tested for their influence on preformed microtubules [interaction with the equilibrium between assembly and disassembly (steady state)]. Anthralin, cholic acid, PB and DMSO showed no effect, a slight reduction of the steady state plateau was induced by DDT and bavistan, whereas DES, colchicine and chlorpropham lead to a pronounced reduction.

At present it is difficult to correlate the results with *S. cerevisiae* D61.M (induction of chromosome loss) and the results of the in vitro tubulin assembly test, probably because of the possible differences between mammalian and yeast tubulin. There are compounds, which did not induce chromosome loss but which showed an effect on in vitro assembly like anthralin and  $\gamma$ -HCH (stimulation) and DDT (inhibition). Of great interest is the fact, that five of the eight tested tumor promoters lead to a stimulation of the tubulin polymerisation.

For a detailed characterisation of such a heterogenous class of compounds as presented by tumor promoters, it is certainly necessary to investigate an extensive range of genotoxic endpoints for more extensively and detailed genotoxic data.