



Doctoral Thesis

**Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450  
6A2  
gene structure, expression pattern and metabolic capacity  
towards procarcinogens**

**Author(s):**

Saner, Chatherine

**Publication Date:**

1995

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001511877> →

**Rights / License:**

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

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

Diss. ETH No. 11205

**Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 6A2:  
gene structure, expression pattern and metabolic capacity  
towards procarcinogens**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH  
for the degree of  
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by  
CATHERINE SANER  
Dipl. Biol. II, Biocenter, University of Basel  
born April 17, 1965  
citizen of Büsserach SO

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. F. E. Würigler, examiner  
PD Dr. Ch. Sengstag, co-examiner  
Prof. Dr. U. A. Meyer, co-examiner

Zürich 1995

## Summary

Although tests with several hundreds of compounds proved the validity of the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*, it remained unknown, which set of cytochrome P450 enzymes is available in *Drosophila melanogaster* for the activation of promutagens and procarcinogens and how these genes relate to the mammalian ones. To address this issue, a cloning project was initiated to isolate novel CYP450 genes from *Drosophila* with the aim of studying their role in the metabolism of promutagens and procarcinogens upon heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. For this purpose, a cDNA library from late larvae and a genomic DNA library were constructed from an insecticide (DDT) resistant *Drosophila* strain (*OR(R)*). Both libraries were screened at distinct stringencies using cDNAs of various human CYP450 genes (*CYP1A1*, *CYP1A2* and *CYP2B1*) as probes as well as several oligonucleotides coding for part of the characteristic hemebinding domain of CYP450s. In spite of extensive library screens, only *CYP6A2* was isolated. Analysis of the genomic *CYP6A2* sequence revealed an intron which was invariantly present in all members of family 6A genes analyzed in insects, so far. The *CYP6A2* gene is transcribed during the whole development, predominantly in the larval and pupal stages, which coincides with that period when the induction of cell clones occurs in the SMART. Since *CYP6A2*, as a member of a novel CYP450 gene family, has not been characterized biochemically and toxicologically before, it was heterologously overexpressed together with human NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (hOR) in *Saccharomyces cerevisiae*. Successful expression was confirmed by (i) Western blot analysis using a rabbit antiserum raised against a bacterially overexpressed polypeptide of *CYP6A2*, (ii) CO-difference spectrum for detecting hemoprotein content, and (iii) cytochrome *c* reductase assay for hOR activity. The metabolizing capacity of *CYP6A2* was detected by the activation of the mycotoxin aflatoxin B<sub>1</sub> in the transformed yeast strains to a recombinagen, as detected by gene conversion in the *trp5* locus of the yeast tester strain YHE2. In addition, 7,12-dimethylbenz[a]anthrazene (DMBA) and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) were metabolized to cytotoxic products that killed the host in a dose dependent manner. This study not only demonstrated functional interaction of *CYP6A2* with hOR in *S. cerevisiae* but also the contribution of *CYP6A2* in the metabolism of some promutagens and procarcinogens that are also positive in the SMART. The

heterologous expression system will be applicable to other CYP450 genes from *Drosophila melanogaster* and thereby help to elucidate their function in the metabolism of proenotoxins to recombinagens and mutagens.

## Zusammenfassung

Obwohl mehrere hundert chemische Verbindungen die Validität des somatischen Mutations- und Rekombinationstests (SMART) in *Drosophila melanogaster* bestätigt haben, war bis anhin unbekannt, über welche Cytochrom P450 Enzyme (CYP450) *Drosophila melanogaster* verfügt, um Promutagene und Prokarzinogene zu aktivieren und in wieweit diese Gene denen der Säuger ähneln. Es wurde daher in dieser Arbeit ein Klonierprojekt in Angriff genommen, um neue CYP450 Gene aus *Drosophila* zu isolieren und sie dann mittels heterologer Expression in *Saccharomyces cerevisiae* bezüglich Metabolismus von Promutagenen und Prokarzinogenen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden eine cDNA Bibliothek von späten Larven und eine genomische DNA Bibliothek von einem Insektizid (DDT) resistenten *Drosophila* Stamm (*OR(R)*) konstruiert. Beide Bibliotheken wurden bei unterschiedlicher Stringenz mit cDNA Proben von drei menschlichen CYP450 Genen (*CYP1A1*, *CYP1A2* und *CYP2B1*) abgesucht, wie auch mit verschiedenen Oligonukleotiden, die für einen Teil der charakteristischen Häm bindenden Domäne kodieren. Trotz umfangreichster Anstrengungen, in den Bibliotheken neue CYP450 Gene zu identifizieren, konnte nur *CYP6A2* isoliert werden. Die Analyse der genomischen *CYP6A2* Sequenz zeigte ein Intron, das in allen bis anhin untersuchten Mitgliedern der Familie CYP6A in Insekten unverändert vorhanden ist. Das *CYP6A2* Gen ist während der ganzen Entwicklung transkribiert, vorherrschend in den larvalen und Puppenstadien, was mit jener Periode übereinstimmt, wenn die Induktion der Zellklone im SMART eintritt. Da bisher noch kein einziger Vertreter der Familie CYP6A bezüglich seiner toxikologischen und biochemischen Eigenschaften untersucht worden war, wurde *CYP6A2* zusammen mit menschlicher NADPH-Cytochrom P450 Oxidoreduktase (hOR) in *Saccharomyces cerevisiae* heterolog überexprimiert. Erfolgreiche Ueberexpression wurde bestätigt mittels, (1.), Western Blot Analyse unter Verwendung eines Kaninchen Antiserums, das gegen ein bakteriell überexprimiertes *CYP6A2*-Peptid gerichtet war, (2.), CO-Differenzspektrum, um den Hämoproteingehalt zu bestimmen, und (3.), ein Cytochrom *c* Reduktase Test, um die hOR-Aktivität zu messen. Es wurde anschliessend gezeigt, dass *CYP6A2* im transformierten Hefestamm das Pilzgift Aflatoxin B<sub>1</sub> zu metabolisieren vermag, was zu einer gesteigerten Genkonversionsrate im *trp5* Locus des Hefe-Testerstamms YHE2 führte.

Zusätzlich wurden 7,12-Dimethylbenz[a]anthrazen (DMBA) und 3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol (Trp-P-2) zu zytotoxischen Produkten metabolisiert, die dosisabhängig zum Tod des Wirtsstammes führten. Diese Studie wies nicht nur nach, dass CYP6A2 eine funktionelle Interaktion mit hOR in *S. cerevisiae* eingeht, sondern auch, dass CYP6A2 einen Beitrag im SMART leistet durch die Metabolisierung einiger Promutagene und Prokarzinogene. In Zukunft kann das heterologe Expressionssystem in Hefe zeigen, welche der aus *Drosophila* verfügbaren CYP450 Gene ebenfalls Genotoxine zu Rekombinogene und Mutagene metabolisieren können.