

Diss. ETH No. 14064

**Mitotic recombination induced by the liver carcinogen
aflatoxin B₁ in a human cell line**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

PETER MARKUS STETTLER

Dipl. Natw. ETHZ
born February 10, 1972
citizen of Eggwil (BE)

accepted on the recommendation of
PD Dr. Ch. Sengstag, examiner
Prof. Dr. F.E. Würigler, co-examiner
Dr. Phaik Morgenthaler-Leong, co-examiner

Zürich, 2001

Zusammenfassung

Die Kontamination von Nahrungsmitteln mit Schimmelpilzen der Art *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* stellt ein grosses Problem dar, vor allem im Süden Afrikas und in der Provinz Qidong in China. Diese Schimmelpilze produzieren verschiedene Mykotoxine, wovon Aflatoxin B₁ (AFB₁) das gefährlichste ist. In diesen Regionen ist die Inzidenz von Hepatozellulären Karzinomen (HCC) höher als in anderen Gegenden. Verschiedenste Studien bringen diese Tumoren mit AFB₁ und chronischer Hepatitis B Virus (HBV) Infektion in Verbindung.

AFB₁ ist ein sehr potentes Mutagen. Verschiedene *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass AFB₁ vor allem zu G->T-Transversionen führt. In HCCs, die mit AFB₁ und HBV assoziiert wurden, enthielten etwa die Hälfte eine spezifische Mutation im Tumor Suppressor Gen *p53*, und zwar eine G->T-Transversion im Codon 249. In Tumoren, die nicht mit AFB₁ assoziiert waren, wurde diese Mutation dagegen nicht gefunden. Dies legt die Vermutung nahe, dass AFB₁ die Ursache für diese spezifische *p53* Mutation sein könnte. Ein weiterer Vergleich zwischen Tumoren aus der AFB₁ verseuchten Qidong Gegend und aus Peking, wo AFB₁ kein Problem darstellt, zeigte auch Unterschiede in der Häufigkeit von Heterozygotitätsverlust (Loss of heterozygosity, LOH). Die Tumoren aus der Qidong Gegend zeigten häufiger Abschnitte mit LOH. Die Mechanismen, die zu diesen LOH-Abschnitten führten, sind jedoch nicht bekannt. Mitotische Rekombination wäre ein möglicher Mechanismus. Unsere Gruppe hat kürzlich die Wirkung von AFB₁ auf die Mitotische Rekombination im niederen Eukaryot *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. In diesem Organismus wurden durch AFB₁ viel mehr Rekombinationen als Punktmutationen induziert.

Hätte AFB₁ eine vergleichbare Wirkung auf die Rekombinationsfrequenz in menschlichen Zellen, könnte diese Aktivität einen wichtigen Mechanismus darstellen, durch den heterozygote Gene während der Tumorentwicklung

inaktiviert würden. So könnte zum Beispiel ein durch Mutation verändertes *p53* Allel durch Mitotische Rekombination vom Wildtyp-Allel segregieren. Dadurch würde eine Zelle ohne *p53*-Aktivität entstehen, aus der sich dereinst eine Krebszelle entwickeln könnte.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, herauszufinden, ob der Effekt von AFB₁ auf die Rekombinationsfrequenz in einer menschlichen Zelllinie ähnlich stark ist wie in der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Ausserdem wollten wir die Mechanismen, die zum Verlust der Funktion eines heterozygoten Gens führen, unterscheiden und quantifizieren.

Die TK6 Zelllinie, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde, ist heterozygot am Thymidin-Kinase (*tk*) Locus auf Chromosom 17. Ein Allel produziert ein funktionelles *tk* Enzym, das andere Allel enthält eine inaktivierende Leseraster (frameshift) -Mutation in Exon 4.

Diese Mutation macht die TK6 Zelllinie zu einem idealen System, um Punktmutationen, Rekombinationen, grössere Deletionen und Chromosomenverlust am selben Locus zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden Mutationsexperimente durchgeführt. Darauf wurden unabhängige Mutanten isoliert, die die *tk*-Aktivität verloren hatten. Auf diese Weise wurden 87 AFB₁-induzierte und 57 spontane Mutanten isoliert.

Um herauszufinden, welche genetischen Ereignisse zum Verlust der *tk*-Funktion in diesen Mutanten geführt hatte, wurden Methoden verwendet, mit denen man allelische Unterschiede an spezifischen Chromosomen-Loci entdecken kann. Dies wurde erreicht durch Einzelstrangkonnformations-Analyse (SSCP-analysis) am *tk* Locus, sowie durch Mikrosatelliten-Analyse an verschiedenen Orten auf Chromosom 17. Mit diesen Methoden konnten LOH-Bereiche auf Chromosom 17 identifiziert werden. Zusätzlich wurde eine Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisations (FISH) Analyse am *tk* locus durchgeführt. Damit konnte die absolute Anzahl von *tk* Allelen bestimmt werden. Durch diese molekularen Analysen konnten Punktmutationen, Rekombinationen, grosse Deletionen und Chromosom 17-Verluste unterschieden werden, die zum Ausfall der *tk*-Funktion in den Mutanten

geführt hatten. Anschliessend konnte die Mutanten-Fraktion zu den jeweiligen genetischen Ereignissen berechnet werden.

Unsere Resultate haben gezeigt, dass mitotische Rekombination die Hauptursache für den Verlust der tk-Funktion war. Chromosomenverlust und Deletionen waren vergleichsweise selten.

Parallel zu diesen Experimenten wurden 32 tk-defiziente Mutanten nach Behandlung mit NMU isoliert. NMU ist ein klassisches methylierendes Mutagen. Eine molekulare Analyse dieser Mutanten hat gezeigt, dass hier vor allem Punktmutationen zum Verlust der tk-Aktivität geführt hatten. Daraus liess sich schliessen, dass die Induktion von Rekombinationen eine spezifische Aktivität von AFB₁ darstellte und nicht ein genereller Effekt der Mutagen-Behandlung.

Zusammengefasst zeigen unsere Resultate, dass AFB₁ nicht nur in der Hefe, sondern auch in menschlichen Zellen mitotische Rekombinationen induzieren konnte und dass dies ein fundamentaler Mechanismus sein könnte bei der Karzinogenese durch AFB₁.

Summary

Food contamination by the molds *aspergillus flavus* and *aspergillus parasiticus* is a major problem, mainly in southern Africa and in the Qidong area in China. These molds produce different mycotoxins of which aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most potent. In these regions the incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) is higher than elsewhere. Various investigations link these cancers to AFB₁ and chronic hepatitis B virus (HBV) exposure.

AFB₁ is known as a very potent mutagen. Various *in vitro* experiments suggested that exposure to AFB₁ leads mainly to G to T transversions. In AFB₁ and HBV related HCCs a specific mutation in the p53 tumor suppressor gene was present in half of the tumors, but was not found in AFB₁ unrelated cancers. This mutation is a G to T transversion in codon 249, and AFB₁ is the most likely candidate as cause

for this mutation. Differences in AFB₁ related and unrelated cancers were also found in the loss of heterozygosity (LOH) patterns. Higher incidence of LOH was found in the samples from the AFB₁ contaminated Qidong area compared to the samples from Beijing (low AFB₁). However, the mechanisms leading to LOH in these HCCs are not clear. Mitotic recombination is one possible explanation for such results.

Recent studies of our group found a relation between AFB₁ and mitotic recombination in the lower eukaryot *Saccharomyces cerevisiae*. AFB₁ induced much more recombinations compared to point mutations in this organism.

If AFB₁ had a comparable influence on the recombination frequency in human cells, this activity might provide an important mechanism for the loss of heterozygous genes in hepatic tumor development. Thus, a mutationally inactivated *p53* tumor suppressor allele might segregate from the corresponding wild type allele upon the induction of mitotic recombination and produce a cell devoid from *p53* function that has the ability to develop into a cancerous cell. The aim of the present work was to determine if the effect of AFB₁ on the recombination frequency in a human cell line is as pronounced as in yeast. We wanted to discriminate and quantify the mechanisms that lead to the loss of function of a heterozygous gene.

The TK6 cell line used in this study is heterozygous at the thymidine kinase (*tk*) locus on chromosome 17. One allele produces an active *tk* enzyme, the other allele carries an inactivating frameshift mutation in exon 4. This mutation renders the TK6 cell line a suitable tool to examine point mutations, recombinational events, large deletions, and chromosome loss at the same locus. In the present work we performed mutation assays and collected independent mutants which had lost *tk* activity. In this manner we collected a representative number of AFB₁ induced mutants (87) and spontaneously occurring mutants (57).

To determine which genetic event had led to the loss of *tk* function in these mutants we used methods by which allelic differences at specific chromosomal loci could be detected. The methods we applied for this purpose were single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis at the *tk* locus and microsatellite analysis at different loci on chromosome 17. This enabled us to detect loss of heterozygosity (LOH) tracts around the *tk* gene and on the other arm of chromosome 17. By fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis the physical presence of one or two alleles of the *tk* region could be observed. With this information we could distinguish between point mutations, mitotic recombinations, large deletions, and chromosome loss that led to the loss of *tk* function, and we calculated mutant fractions for these events.

Our results revealed that mitotic recombination was the dominant cause for AFB₁ induced loss of *tk* function. Chromosome loss and deletions occurred rather infrequently.

In parallel, we collected 32 *tk* deficient mutants upon exposure to NMU, a classical methylating agent. Molecular analysis of these mutants suggested that point mutations were the prominent cause for loss of *tk* function, in contrast to the AFB₁ induced mutants. Thus, recombination induction was a specific activity of AFB₁, rather than a general effect of mutagen exposure.