

Diss. ETH No. 14321

**The Role of Recombination in Aflatoxin B₁-induced
DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae***

AND

**The Sge1 Protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a
Membrane-associated Multidrug Transporter**

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

presented by

Monika U. Keller Seitz

Dipl. natw. ETH

born March 22, 1969

citizen of Berneck (SG), Rüti (AR) and Affoltern a/A (ZH)

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. F. E. Würigler, examiner
PD. Dr. C. Sengstag, co-examiner
Prof. Dr. U. Certa, co-examiner
Prof. Dr. F. Thoma, co-examiner

Zürich, 2001

Zusammenfassung

Aflatoxin B₁ (AFB₁) ist eines der stärksten bekannten Kanzerogene. Es wird von den Schimmelpilzen *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* gebildet, die in feuchtwarmem Klima auf unsachgemäss gelagertem Getreide und Nüssen wachsen. Mit Aflatoxin kontaminierte Nahrungsmittel stellen in einigen afrikanischen und asiatischen Gebieten ein grosses gesundheitliches Problem dar, indem sie zu einem erhöhten Auftreten von hepatozellulären Karzinomen (HCC) führen.

Tierversuche haben das grosse krebserregende Potential von AFB₁ in verschiedenen Spezies bestätigt. Weiter war AFB₁ im bakteriellen Ames Mutagenitätstest positiv. Epidemiologische Untersuchungen von humanen HCC führten zur Entdeckung einer AFB₁-spezifischen G→T Transversion im Tumorsuppressor-Gen *p53*, welche das betroffene Allel inaktiviert. Eine solche Induktion von G→T Transversionen konnte auch mit reinem AFB₁ in diversen Testsystemen im Labor reproduziert werden. Trotz dieser Mutagenität übersteigt allerdings die Kanzerogenität von AFB₁ diejenige von Substanzen mit gleichem mutagenem Potential bei weitem, was darauf hindeutet, dass noch andere krebsauslösende Mechanismen beteiligt sein müssen. In eukaryontischen Testsystemen mit der Hefe *S. cerevisiae* wurde AFB₁ eine nur geringe Mutagenität, dafür aber eine starke Induktion von verschiedenen Rekombinationen nachgewiesen. Eine solche Erhöhung der mitotischen Rekombination könnte in der mehrstufigen Tumorentstehung zum Verlust von heterozygoten Allelen führen – im schlimmsten Fall zur Inaktivierung von denjenigen funktionellen Tumorsuppressor-Genen, die ein mutiertes Allel besitzen – bzw. zur Deregulation von Proto-Onkogenen durch deren Translokation in stark exprimierte Regionen.

In der vorliegenden Dissertation wird ein Hefestamm vorgestellt, der die simultane Bestimmung von Mutagenität und Rekombinogenität im selben Experiment ermöglicht. Die Hefezellen tragen ein Plasmid, das durch die Expression der humanen Enzyme Cytochrom P450 und Oxidoreduktase die intrazelluläre Aktivierung von AFB₁ in den eigentlichen toxischen Metaboliten AFB₁-8,9-Epoxid erlaubt. AFB₁ zeigte auch in diesem Testsystem eine starke Induktion der Rekombinationsfrequenz bei praktisch gleichbleibender Mutationsfrequenz.

Die Adduktdichte stellt einen guten Parameter dar, um die Toxizität diverser Kanzerogene in verschiedenen Organismen zu vergleichen. Daher kann der Befund, dass AFB₁ in der Hefe auch bei DNS-Adduktdichten, die derjenigen der geschätzten humanen Exposition entspricht, primär Rekombination induziert, für das Model der

AFB₁-assoziierten Krebsentstehung beim Menschen von Bedeutung sein. Um den verantwortlichen Reparaturmechanismus genauer zu untersuchen, wurde mittels Oligonukleotid-Arrays, die Proben aller Gene des gesamten Hefegenoms enthalten, das Genexpressionsmuster AFB₁-behandelter versus unbehandelter Zellen verglichen. Praktisch alle induzierten DNS-Reparaturgene sind in der Rekombination involviert, hingegen wurden kaum Gene des Nukleotid-Exision Reparaturweges (NER) induziert. Vergleiche der Induktion von Rekombination und der Substanzempfindlichkeit von AFB₁ in den Reparaturmutanten *rad1* und *rad51* zeigten, dass das Rekombinationsprotein Rad51 wie auch das NER Protein Rad1 in die Reparatur von AFB₁-induzierten Läsionen involviert sind. Weiter kann gesagt werden, dass Rad1 wahrscheinlich eher in einer Rad1-abhängigen Rekombinationsreparatur involviert ist, als in seiner Funktion als NER-Protein. Zusammengekommen erhärten diese Befunde die These, dass AFB₁ in Eukaryonten primär einen rekombinationsabhängigen Reparaturweg auslöst.

Die Elimination toxischer Substanzen aus empfindlichen zellulären Kompartimenten erfolgt meist mit Hilfe energieabhängiger Transportproteine, die in den entsprechenden Membranen eingelagert sind. Eine Überexpression solcher Transporter kann zur Resistenz gegen bestimmte Toxine führen, was vor allem in der Medizin und in der Landwirtschaft ein wichtiges Problem darstellt. Sie führt dazu, dass Zytostatika in der Krebsbehandlung, Antibiotika bei Infektionen und Pestizide im Ackerbau unwirksam werden. Erst vor kurzem wurde die Major-Facilitator Superfamily (MFS) entdeckt, die unter anderem auch solche Mehrfachresistenz-Transporter beinhaltet. Ein Mitglied dieser Familie ist der Hefe-Transporter Sge1, der Resistenz gegen das Fungizid Kristallviolett vermitteln kann. In dieser Arbeit wurde Sge1 weiter charakterisiert: Sge1 konnte den 14-Transmembrandomänen-MFS zugeordnet werden, die ihre Energie aus Protonengradienten von Membranen beziehen. Weiter konnte Sge1 mittels Zellmembranfraktionierungen und indirekter Immunfluoreszenz mit der Plasmamembran assoziiert werden, wo Sge1 als protonengetriebene Exportpermease verschiedene planare, kationische Substanzen aus der Zelle befördern kann, bevor diese ihre toxische Wirkung entfalten können.

Summary

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is one of the most potent carcinogens known. It is produced by the common fungal moulds *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, which grow on improperly stored grains and nuts in humid and warm conditions. AFB₁ contaminated consumables represent a major health problem in some areas in Africa and Asia where they lead to an increased incidence of hepatocellular carcinomas (HCC).

The carcinogenic potential of AFB₁ has been confirmed in various assays in many different species. Furthermore, AFB₁ was positive in the bacterial Ames mutagenicity test. Epidemiological studies of human HCC led to the detection of an AFB₁-specific G→T transversion in the tumour suppressor gene *p53* which inactivates the affected allele. Such an induction of G→T transversions with pure AFB₁ could also be reproduced in different test systems in the laboratory. However, despite the ability to induce mutations, the carcinogenicity of AFB₁ exceeds that of other agents with comparable mutagenic potential by far, indicating that yet other mechanisms must be involved. In eukaryotic test systems with the yeast *S. cerevisiae* only a moderate mutagenicity could be assigned to AFB₁ whereas several types of recombination were strongly increased. In the multistep process of tumourgenesis an induction of recombination could lead to the loss of heterozygous alleles – in the worst case to the inactivation of functional tumour suppressor genes having a mutated allele – or to the deregulation of proto-oncogenes by translocation into strongly transcribed regions.

In this thesis, a yeast tester strain that allows simultaneous determination of mutagenicity and recombination frequency in a single experiment is presented. The cells carry a plasmid harbouring expression cassettes for the human enzymes cytochrome P450 and oxidoreductase, which allows intracellular activation of AFB₁ to its ultimate carcinogenic metabolite AFB₁-8,9-epoxide. Consistently with previous reports, AFB₁ showed a strong induction of recombination at virtually unaltered mutation frequency in this test system.

Adduct density represents a good parameter to compare the toxicity of different carcinogens in various organisms. Therefore, our finding that in yeast, AFB₁ also primarily induces recombination at DNA adduct densities that correspond to those at expected human exposure, could have implications for the model of AFB₁-

associated tumour development in humans. To gain more insight into the responsible repair mechanisms gene expression patterns of AFB₁-treated versus untreated cells were monitored using high density oligonucleotide arrays comprising specific gene probes for the entire yeast genome. Virtually all of the induced DNA repair genes are reported to have functions in recombination. However, hardly any nucleotide excision repair (NER) genes were upregulated. Comparison of drug killing and induction of recombination of AFB₁ in the repair mutants *rad1* and *rad51* revealed an involvement of the recombination protein Rad51 as well as the NER protein Rad1 in the repair of AFB₁ lesions. Furthermore, it seems that Rad1 is rather involved as part of a Rad1-dependent recombinational repair than as a NER protein. Taken together, these results corroborate the notion that AFB₁ primarily triggers a recombination dependent repair mechanism in eukaryotes.

Elimination of toxic compounds from a sensitive cellular compartment is mostly achieved by energy-dependent transporters located in the respective membranes. An overexpression of such transporters can lead to the resistance against certain toxins, which poses a important problem in medicine and agriculture. It can lead to the ineffectiveness of cytostatic drugs in cancer therapy, antibiotics in treatment of infections, and pesticides in farming. Only recently, the major facilitator superfamily (MFS), comprising such multidrug resistance transporters, was discovered. A member of this family is the yeast transport protein Sge1 that was found to confer resistance to the fungicide crystal violet. In this work, Sge1 was further characterised: Sge1 could be assigned to the 14 transmembrane domain MFS which use the proton gradient of membranes as energy source. Moreover, by means of subcellular fractionation as well as immunolocalisation, Sge1 was shown to be associated with the plasma membrane where it is thought to act as a drug export permease expelling planar cationic agents from the cell before they can exert their toxic effects.