

Diss. ETH Nr. 9313

**Heterologous Expression of Human Xenobiotic Metabolizing
Liver Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae***

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

presented by
HANS-PIETRO EUGSTER
graduate in Natural Sciences
born August 5, 1952
citizen of Altstätten SG

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

ADAG Administration & Druck AG

1990

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die cDNA's der humanen mikrosomalen Epoxid Hydrolase, des humanen Cytochroms P450IA1 und P450IA2 in eine induzierbare und in eine konstitutive Hefe-Expressionskassette integriert und die entsprechenden Expressionskassetten auf Hefe-Expressionsvektoren subkloniert.

Um die Selektion von Expressionsplasmiden, die einen selektiven URA3 Marker tragen, in einem Hefestamm, der mit dem *S.cerevisiae* D7 Stamm identisch ist, zu ermöglichen, wurde der Stamm *S.cerevisiae* YHE2 konstruiert der denselben Genotyp wie der D7 Stamm aufweist, zusätzlich aber noch eine nicht revertierbare Mutation im URA3 Gen enthält.

S.cerevisiae YHE2 wurde mit sämtlichen Expressionsplasmiden transformiert. Alle heterologen Gene wurden in YHE2 exprimiert und die spezifischen Enzymaktivitäten waren hauptsächlich mit der Mikrosomenfraktion der Hefezellen assoziiert. Hefemikrosomen, welche die mikrosomale Epoxid Hydrolase, Cytochrome P450IA1 oder P450IA2 enthielten, wurden für Substrat-Spezifitäts-Studien und Arzneimittel-Interaktions-Studien verwendet.

Mit Mikrosomen, welche die mikrosomale Epoxid Hydrolase enthielten, wurde die Inhibition der durch die Epoxid Hydrolase katalysierten Hydrolyse von Styroloxid und Carbamazepin-Epoxid durch Valpromid nachgewiesen. Im weiteren hat sich gezeigt, dass die humane mikrosomale Epoxid Hydrolase nur an der Bildung von trans-Carbamazepin-diol beteiligt ist.

Die Substratspezifität der heterolog exprimierten Cytochrome P450IA1 und P450IA2 wurden mittels verschiedenen Phenoxazon Aethern untersucht, wobei sich Unterschiede in Bezug auf Aktivität und Spezifität ergaben. Beide P450 Isoenzyme zeigten Acetanilid 4-Hydroxylase Aktivität und katalysierten sämtliche N-Demetylierungen und die 8-Hydroxylierung von Koffein. Im weiteren konnte die Inhibition der P450IA1 und P450IA2 katalysierten 7-Ethoxyresurofin O-deethylierung durch α -Naphthoflavon und das Antimykotikum Ketokonazol gezeigt werden. Ketokonazol und α -Naphthoflavon zeigten gegenüber P450IA1 eine grössere Affinität als gegenüber P450IA2.

Abschliessend wurde ein Hefestamm konstruiert der gleichzeitig die mikrosomale Epoxid Hydrolase, P450IA1 und P450IA2 funktionell exprimiert. Die erzielten Resultate dokumentieren die funktionelle Expression von verschiedenen humanen Fremdstoff metabolisierenden Leberenzymen in *S.cerevisiae*. Die transformierten Hefestämme können einerseits als Quelle für humane Enzyme für in vitro Metabolismus-Studien oder in Zukunft auch als Genotoxizitäts Test System verwendet werden.

1. INTRODUCTION

1.1 General introduction

All living beings are daily exposed to a great number of xenobiotic compounds present in the environment and taken up into the body via the lung, skin or gastro-intestinal tract. A variety of these xenobiotics are known or potential chemical carcinogens and exposure to these compounds is of major concern for public health. Therefore detection and control of compounds with these properties is a genuine task for toxicologists. To detect possible carcinogens animals are widely used as test systems. However for ethical as well as practical reasons a need for alternative short term test systems exists. In the past, several short term test systems were developed to detect potential carcinogens (Kilbey et al., 1984). After J. and E. Miller (1970, 1974) suggested the use of cell free mammalian activation systems for metabolic activation of xenobiotics, it was B. Ames (1973a) who applied this idea to a short term microbial mutagenicity test system. After Ames and colleagues (1973b) stated: "Carcinogens are mutagens", an enormous amount of work was performed in the field of genetic toxicology leading to a more differentiated view of the problem. In the beginning about 90 % of the tested known carcinogens were also mutagens in the Salmonella/mammalian-microsome assay (Maron and Ames, 1983). Later on, this number decreased to 65 % (carcinogenic in rat and mice) and 44 % (carcinogenic only in one species). In addition 33 % of non-carcinogens were mutagenic (Gold et al., 1989). In parallel the concept of non-genotoxic carcinogens has become a well documented fact (for an overview see Banbury Report 25, 1987).

Today carcinogens are divided into genotoxic and non-genotoxic carcinogens. The non-genotoxic carcinogens might still contain a large number of mutagens which were not detectable by the test systems used so far. Some were detected as genotoxins with a sophisticated system established by Schiestl (1989) which allows the detection of compounds which induce intrachromosomal recombination in yeast, a genetic endpoint not available in any test system used before.

The polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic amines and aflatoxins which were used by Ames (1973) were all carcinogens but only mutagenic after metabolic activation with a preparation of phenobarbital induced rat liver (S-9). From these results it became evident that metabolism of carcinogens was crucial for their genotoxic activity.

That a genotoxic event is considered to represent the first initiating step in multistage carcinogenesis was postulated by Weinstein (1988). Further Fearon and Vogelstein (1990) delineated the genetic alterations occurring in the development of human colon cancer. These genetic alterations lead to the activation of one or several oncogenes and the inactivation of several tumor suppressor genes. In the case of the oncogenesis of