

Каталитическая активность REV1 человека

Столяренко А.^{1,2*}, Новикова А.^{1,2}, Шилкин Е.^{1,2}, Кручинин А.^{1,2}, Макарова А.^{1,2*}

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

* nanostol@gmail.com, amakarova-img@yandex.ru

Key words: REV1; ДНК-полимераза; транслезионный синтез ДНК; внутрицепочечная цисплатиновая сшивка; Хугстиновские взаимодействия

Мотивация и цель: Повреждения ДНК могут вызвать арест репликации, что губительно для живой клетки. Транслезионный синтез ДНК представляет собой механизм репликации повреждений ДНК, предотвращающий арест репликации. Консервативный эукариотический белок REV1 служит плацдармом для координации ДНК-полимераз во время транслезионного синтеза ДНК [1, 2]. Помимо структурной роли REV1 представляет собой ДНК-полимеразу Y-семейства с собственной дистрибутивной дезоксицитидилтрансферазной активностью [3]. Каталитическая активность обеспечивается уникальным механизмом с участием матрицы белковой природы, когда входящий dCTP и основание ДНК не взаимодействуют друг с другом напрямую [4]. Изменения экспрессии и/или каталитической активности REV1 способствуют мутагенезу и канцерогенезу и могут модулировать эффект химиотерапевтического лечения [5]. Известно, что REV1 *in vivo* участвует в репликации АП-сайтов [6-8], 1,N⁶-ethenoA [7, 9], G-квадруплексов [10] и играет роль при соматической гипермутации генов иммуноглобулинов [11], однако, данные о точности и эффективности синтеза ДНК REV1 в литературе противоречивы. Целью работы является расширение знаний об активности REV1 на ДНК с разными повреждениями *in vitro*.

Методы и алгоритмы: Мы экспрессировали и выделили полноразмерный белок REV1 человека из эукариотической экспрессионной системы на основе *Saccharomyces cerevisiae*. Мы охарактеризовали его ДНК-полимеразную активность на неповрежденной ДНК и широком спектре поврежденных ДНК-субстратов. Отсутствие примесей, влияющих на активность REV1, проверяли с использованием каталитически неактивного варианта REV1. ДНК-полимеразы Pol *iota* и Pol *eta* человека были использованы в качестве контроля для анализа Хугстиновских и Уотсон-Криковских взаимодействий соответственно.

Результаты: G является предпочтительной матрицей REV1 [3, 12–15]. Мы проанализировали влияние ряда биологических и искусственных повреждений матричного G. Мы показали, что REV1 блокируется внутрицепочечной цисплатиновой сшивкой 1,2-GG, преобладающим повреждением, вызываемым химиотерапевтическим препаратом цисплатином. Искусственное повреждение, 7-deazaG, используемое для изучения Хугстиновских взаимодействий, также ингибировало REV1, что объясняется образованием контактов Хугстиновской стороны матричного нуклеотида с белком. Также мы протестировали репликацию наиболее распространенного повреждения G – 8-oxoG (с противоречивыми данными в литературе [3, 13, 16, 17]) и показали, что REV1 ингибируется более чем в ~360 раз. Одновременно с этим эффект O⁶-meG (~36-кратное ингибирование) соответствовал литературным данным [3, 18].

А является второй предпочтительной матрицей REV1 после G. Используя повреждение Уотсон-Криковской плоскости 1,N⁶-ethenoA и модификацию Хугстиновской плоскости 7-deazaA, мы показали, что REV1 в гораздо большей степени ингибируется повреждением Хугстиновской плоскости. Данные литературы для 1,N⁶-ethenoA противоречивы [13, 19]. Мы показали, что REV1 активируется на матрице с 1,N⁶-ethenoA более чем в 50 раз, в соответствии с [19]. Кроме того, мы впервые проанализировали активность напротив 8-охоА и показали, что это повреждение легко реплицируется REV1 в ошибочной манере. Среди модифицированных пиримидинов, при том что неповрежденные пиримидины являются наименее предпочтительными матрицами REV1, метилцитозин (mC) и гидроксиметилцитозин C (hmC) несколько ингибировали REV1. Тимингликоль (Tg) неожиданно реплицировался очень эффективно: более чем в 1700 раз эффективнее, чем неповрежденный Т, и в ошибочной манере. Следует отметить, что для большинства исследованных повреждений (8-охоG, O⁶-meG, 1,N⁶-ethenoA, Tg) дискриминация нуклеотидных субстратов происходила на этапе связывания, что сопровождалось значительным изменением K_M , но не k_{cat} . **Выводы:** В данной работе впервые была изучена активность REV1 человека на ДНК с внутрицепочечной цисплатиновой сшивкой 1,2-GG, с аналогами нуклеотидов 7-deazaG и 7-deazaA, с вызванными окислительным стрессом повреждениями 8-охоА и Tg, а также эпигенетическими модификациями mC и hmC.

Структуры REV1 с матрицами А, Т и С в литературе не описаны. Мы приводим биохимические доказательства важности Хугстиновой плоскости матричного А для работы REV1. Известно, что матричный G контактирует атомами N7 и O6 своей Хугстиновской плоскости с амидами основной цепи His774 и Gly775 активного центра REV1 [4]. Наши данные указывают на то, что связывание матриц G и А в активном сайте REV1 происходит по сходному механизму (А находится в связывающем кармане фермента в той же конформации, что и G).

REV1 «активируется» на ДНК с 1,N⁶-ethenoA и Tg. Интактные матричные А, Т и С являются гораздо менее предпочтительными субстратами для REV1, поскольку они не способны образовывать взаимодействия, специфичные для матричного G, где атом O6 является акцептором водородной связи. Повышение активности REV1 напротив 1,N⁶-ethenoA может объясняться потерей атомом в положении 6 свойств донора водорода [19]. Более того, согласно нашим результатам и литературным данным, присоединение СН₃-группы к С с образованием mC или к U с образованием Т [13, 20, 21] снижает активность REV1. Однако добавление ОН-группы непосредственно к этой группе (к mC с образованием hmC) или вблизи нее (к Т с образованием Tg) восстанавливает или даже усиливает активность REV1. Вместе эти данные проливают свет на функционирование активного центра REV1 на различных ДНК-субстратах.

Результаты частично опубликованы в работе <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/7/4107> (Stolyarenko A., Novikova A., Shilkin E., Poltorachenko V., Makarova A. The Catalytic Activity of Human REV1 on Undamaged and Damaged DNA. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25:4107–4120. doi 10.3390/ijms25074107).

Финансирование: Исследование поддержано госзаданием НИЦ «Курчатовский институт».

Human REV1 catalytic activity

Stolyarenko A.^{1, 2*}, Novikova A.^{1, 2}, Shilkin E.^{1, 2}, Kruchinin A.^{1, 2}, Makarova A.^{1, 2*}

¹ National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

² Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

* nanostol@gmail.com, amakarova-img@yandex.ru

Key words: REV1; DNA polymerase; translesion DNA synthesis; cisplatin intrastrand crosslink; Hoogsteen interactions

Motivation and Aim: DNA damage can cause replication arrest which is detrimental to the living cell. DNA translesion synthesis is a mechanism to bypass DNA lesions preventing replication arrest. Conserved eukaryotic REV1 protein serves as a scaffold for the coordination of DNA polymerases during DNA translesion synthesis [1, 2]. Besides its structural role, REV1 is a Y-family DNA polymerase with its own distributive deoxycytidyl transferase activity [3]. It is driven by a unique protein-template mechanism, when the incoming dCTP and the template base do not directly pair with each other [4]. Alterations in REV1 expression and/or catalytic activity promote mutagenesis and carcinogenesis and can modulate the effect of chemotherapy treatment [5]. Although REV1 activity is known to function *in vivo* in the bypass of AP sites [6-8], 1,N⁶-ethenoA [7, 9], G quadruplexes [10] and in somatic hypermutation of immunoglobulin genes [11], data about the accuracy and efficiency of DNA synthesis by REV1 in the literature are contrasting. The aim of this project is to expand the knowledge on REV1 activity with a variety of lesions *in vitro*.

Methods and Algorithms: We expressed and purified the full-length human REV1 protein from a eukaryotic expression strain of *Saccharomyces cerevisiae* and characterized its DNA polymerase activity on undamaged DNA and a wide range of damaged DNA templates. The absence of impurities affecting the activity of REV1 was verified using the catalytically inactive REV1 variant. Human Y-family DNA polymerases Pol ι and Pol η were used in control experiments to analyze Hoogsteen and Watson-Crick base interactions, respectively.

Results: G is known to be the preferable template of REV1 [3, 12–15]. We analyzed the effect of several biological and artificial modifications of template G. We showed that REV1 is blocked by the 1,2-GG cisplatin intrastrand crosslink, the predominant lesion caused by cisplatin chemotherapy. The artificial lesion constructed for Hoogsteen face impairment studies, 7-deazaG, also inhibited REV1, which is explained by the necessity of this face of the template nucleotide for contacts with the protein. Also, we analyzed REV1 activity on DNA with the most frequent lesion of G, 8-oxoG, with contradictory data in the literature [3, 13, 16, 17] and showed that REV1 is inhibited by over ~360 fold. At the same time, the result on the effect of O⁶-meG inhibition (~36-fold inhibition) was in line with the literature data [3, 18].

A is the second preferred template of REV1 after G. By using Watson-Crick face impairing 1,N⁶-ethenoA lesion and Hoogsteen face impairing 7-deazaA modification, we showed that REV1 is much more inhibited by Hoogsteen face impairment. We tested REV1 replication for 1,N⁶-ethenoA with contradictory data in the literature [13, 19] and showed that REV1 is activated by over 50-fold, in accordance with [19]. Also, we studied 8-oxoA for the first time and showed that this oxidative lesion was readily replicated by REV1 in an error-prone manner.

Among the lesions of pyrimidines, while undamaged pyrimidines are the least favorite templates of REV1, methylcytosine (mC) and hydroxymethylcytosine (hmC) somewhat inhibited REV1. Surprisingly, thymine glycol (Tg) was replicated in an error-prone manner over 1700-fold more efficiently than undamaged T. It is important to note that most of the measured catalytic efficiencies (8-oxoG, O⁶-meG, 1,N⁶-ethenoA, Tg) showed that REV1 depends on discrimination at the binding step accompanied by a marked change in K_M and not k_{cat}.

Conclusion: In this work, we for the first time studied the activity of human REV1 on DNA containing the 1,2-GG cisplatin intrastrand crosslink, 7-deazaG and 7-deazaA nucleotide analogs, 8-oxoA and Tg lesions caused by oxidative stress as well as epigenetically modified nucleobases mC and hmC.

The structure of REV1 with templates A, T and C are still lacking in the literature. We provided biochemical evidence of the importance of the Hoogsteen face of template A for REV1 functioning. Template G is known to contact via its N7 and O⁶ atoms of its Hoogsteen face with REV1 main chain amides His774 and Gly775 [4]. Our data suggest that the binding of templates G and A in the active site of REV1 is similar (i.e. A and G have similar conformations in the binding pocket).

REV1 was “activated” by 1,N⁶-ethenoA and Tg lesions. Intact templates A, T and C are much poorer substrates for REV1 since they are unable to form interactions specific for the G base, where O⁶ is a hydrogen bond acceptor. Increase in REV1 activity opposite 1,N⁶-ethenoA can be explained by the loss of hydrogen bond donor properties of the atom in position 6 [19]. Moreover, based on our results and the literature data, addition of a CH₃ group to C yielding mC as well as to U yielding T [13, 20, 21] decreases REV1 activity. However, the addition of OH directly to this group (to methylC yielding hydroxymethylC) or in its vicinity (to T yielding Tg) restores or even increases REV1 activity. Altogether, the obtained data shed light on the functioning of the active center of REV1 on different DNA substrates.

The results are partially available at <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/7/4107> (Stolyarenko, A., Novikova, A., Shilkin, E., Poltorachenko, V., Makarova, A., 2024. The Catalytic Activity of Human REV1 on Undamaged and Damaged DNA. *International Journal of Molecular Sciences* 25, 4107–4120. doi 10.3390/ijms25074107).

Funding: The study is supported by the state task of the National Research Center “Kurchatov Institute”.

Список литературы/References

1. Bezalel-Buch R., Cheun Y.K., Roy U., Schärer O.D., Burgers P.M. Bypass of DNA interstrand crosslinks by a Rev1–DNA polymerase ζ complex. *Nucleic Acids Res.* 2020;48:8461-8473. doi 10.1093/nar/gkaa580
2. Ross A.-L., Simpson L.J., Sale J.E. Vertebrate DNA damage tolerance requires the C-terminus but not BRCT or transferase domains of REV1. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:1280-1289. doi 10.1093/nar/gki279
3. Haracska L., Prakash S., Prakash L. Yeast Rev1 Protein Is a G Template-specific DNA Polymerase. *J Biol Chem.* 2002;277:15546-15551. doi 10.1074/jbc.M112146200
4. Swan M.K., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S., Aggarwal A.K. Structure of the Human Rev1–DNA–dNTP Ternary Complex. *J Mol Biol.* 2009;390:699-709. doi 10.1016/j.jmb.2009.05.026
5. Shilkin E.S., Boldinova E.O., Stolyarenko A.D., Goncharova R.I., Chuprov-Netochin R.N., Khairullin R.F., Smal M.P., Makarova A.V. Translesion DNA Synthesis and Carcinogenesis. *Biochem Mosc.* 2020;85:425-435. doi 10.1134/S0006297920040033
6. Chan K., Resnick M.A., Gordenin D.A. The choice of nucleotide inserted opposite abasic sites formed within chromosomal DNA reveals the polymerase activities participating in translesion DNA synthesis. *DNA Repair.* 2013;12:878-889. doi 10.1016/j.dnarep.2013.07.008

7. Kim N., Mudrak S.V., Jinks-Robertson S. The dCMP transferase activity of yeast Rev1 is biologically relevant during the bypass of endogenously generated AP sites. *DNA Repair*. 2011;10:1262-1271. doi 10.1016/j.dnarep.2011.09.017
8. Otsuka C., Kunitomi N., Iwai S., Loakes D., Negishi K. Roles of the polymerase and BRCT domains of Rev1 protein in translesion DNA synthesis in yeast in vivo. *Mutat Res*. 2005;578:79-87. doi 10.1016/j.mrfmmm.2005.03.005
9. Zhou Y., Wang J., Zhang Y., Wang Z. The catalytic function of the Rev1 dCMP transferase is required in a lesion-specific manner for translesion synthesis and base damage-induced mutagenesis. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:5036-5046. doi 10.1093/nar/gkq225
10. Sarkies P., Reams C., Simpson L.J., Sale J.E. Epigenetic Instability due to Defective Replication of Structured DNA. *Mol Cell*. 2010;40:703-713. doi 10.1016/j.molcel.2010.11.009
11. Jansen J.G., Langerak P., Tsaalbi-Shtylik A., Van Den Berk P., Jacobs H., De Wind N. Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J Exp Med*. 2006;203:319-323. doi 10.1084/jem.20052227
12. Lin W., Xin H., Zhang Y., Wu X., Yuan F., Wang Z. The human REV1 gene codes for a DNA template-dependent dCMP transferase. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:4468-4475. doi 10.1093/nar/27.22.4468
13. Zhang Y., Wu X., Rechtkoblit O., Geacintov N.E., Taylor J.-S., Wang Z. Response of human REV1 to different DNA damage: preferential dCMP insertion opposite the lesion. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:1630-1638. doi 10.1093/nar/30.7.1630
14. Masuda Y., Kamiya K. Biochemical properties of the human REV1 protein. *FEBS Lett*. 2002;520:88-92. doi 10.1016/S0014-5793(02)02773-4
15. Piao J., Masuda Y., Kamiya K. Specific amino acid residues are involved in substrate discrimination and template binding of human REV1 protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;392:140-144. doi 10.1016/j.bbrc.2009.12.167
16. Yeom M., Kim I.-H., Kim J.-K., Kang K., Eoff R.L., Guengerich F.P., Choi J.-Y. Effects of Twelve Germline Missense Variations on DNA Lesion and G-Quadruplex Bypass Activities of Human DNA Polymerase REV1. *Chem Res Toxicol*. 2016;29:367-379. doi 10.1021/acs.chemrestox.5b00513
17. Howel C.A., Prakash S., Washington M.T. Pre-Steady-State Kinetic Studies of Protein-Template-Directed Nucleotide Incorporation by the Yeast Rev1 Protein. *Biochemistry*. 2007;46:13451-13459. doi 10.1021/bi701429v
18. Choi J.-Y., Guengerich F.P. Kinetic Analysis of Translesion Synthesis Opposite Bulky N2- and O6-Alkylguanine DNA Adducts by Human DNA Polymerase REV1. *J Biol Chem*. 2008;283:23645-23655. doi 10.1074/jbc.M801686200
19. Yoon J.-H., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S. DNA polymerase θ accomplishes translesion synthesis opposite 1,N 6 -ethenodeoxyadenosine with a remarkably high fidelity in human cells. *Genes Dev*. 2019;33:282-287. doi 10.1101/gad.320531.118
20. Masuda Y., Takahashi M., Fukuda S., Sumii M., Kamiya K. Mechanisms of dCMP Transferase Reactions Catalyzed by Mouse Rev1 Protein. *J Biol Chem*. 2002;277:3040-3046. doi 10.1074/jbc.M110149200
21. Acharya N., Haracska L., Prakash S., Prakash L. Complex Formation of Yeast Rev1 with DNA Polymerase η . *Mol Cell Biol*. 2007;27:8401-8408. doi 10.1128/MCB.01478-07