

DISS. ETH NO. 28620

**Targeting protein-protein interactions of human DNA
polymerase ζ to circumvent chemotherapy
resistance**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH Zurich
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

JEANNE ZOÉ CRESSON

M.Sc. in Pharmacy, Université de Genève

Born on 07.10.1994

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Shana J. Sturla

Prof. Dr. Robert L. Eoff

Dr. Hailey L. Gahlon

2022

Abstract

Platinum-based drugs are widely used in the clinic to treat a wide range of cancers. Their mechanism of action relies on the formation of DNA adducts that block the replication and transcription of DNA and thus lead to the death of cancerous cells. An adverse outcome of this therapy is the development of drug resistance, particularly through DNA translesion synthesis. This process allows cells to replicate past platinum adducts using specialized DNA polymerases, such as human polymerase ζ (hPol ζ). It has been found in clinical studies that human Pol ζ expression increases following platinum drug therapy and, therefore, contributes to drug resistance. Human Pol ζ is a pentameric protein composed of a catalytic subunit Rev3, a dimer of the regulatory subunit Rev7, and two accessory subunits, PolD2 and PolD3. The binding of Rev3 to the “seatbelt” region of Rev7 is essential for the activity of the enzyme and induces a conformational change in Rev7, from an “open” to “close” state. Due to the lack of enzymatic activity of Rev7 and the difficulty in producing Rev3 because of its large size, our current understanding of the Rev7/Rev3 protein-protein interaction is limited and restricts our ability to target hPol ζ . This work aims to structurally evaluate the Rev7/Rev3 interface to develop inhibition strategies against hPol ζ . The inhibition of translesion DNA synthesis polymerases by small molecules has been shown to chemosensitize cells to platinum drugs, offering an outlook for better patient outcomes from therapy with platinum analogs.

Chapter 1 introduces the use of platinum-based chemotherapy in the clinic and its limitation due to resistance. DNA translesion synthesis is discussed in detail, with a focus on the human polymerase ζ . Small molecules developed to inhibit protein-protein interactions in translesion DNA synthesis polymerases are presented.

Chapter 2 presents the design and development of a panel of eleven potential inhibitors of the Rev7/Rev3 protein-protein interaction (PPI) by combining organic synthesis and ligand-based virtual screening. This panel is derived from the first developed moderate Rev7/Rev3 PPI inhibitor, which sensitizes cells to the platinum-based anti-cancer drug cisplatin.

Chapter 3 reviews the main cellular roles of Rev7, i.e., DNA translesion synthesis, DNA repair, and cell cycle control. The expression and purification of several protein complexes of human Rev7 with fragments of Rev3 are described. These protein complexes will be used to assess the activity of the potential inhibitors on the Rev7/Rev3 interaction and gain mechanistic insights into the small molecules' mode of action.

Chapter 4 presents biochemical and biophysical assays developed to assess the effect of the potential Rev7/Rev3 PPI inhibitors qualitatively and quantitatively. A peptide pull-down assay

allows the detection of Rev3 displacement upon the addition of the small molecules to an immobilized Rev7/Rev3 complex. Binding affinities of the small molecules for Rev7 were measured by microscale thermophoresis. These experiments identified potentially more potent inhibitors than the reference compound and gave mechanistic insight into their mode of action.

Chapter 5 summarizes the findings of this thesis and presents their limitations and potential further studies.

Résumé

Les médicaments à base de platine sont communément utilisés pour traiter un large éventail de cancers. Leur mécanisme d'action repose sur la formation d'adduits à l'ADN qui bloquent la réplication et la transcription de l'ADN ce qui a pour effet d'entraîner la mort des cellules cancéreuses. Un effet indésirable de cette thérapie est l'apparition de phénomènes de résistance aux médicaments, notamment à cause de l'activité de la synthèse translésionnelle de l'ADN. Ce processus permet aux cellules de se répliquer malgré la présence d'adduits de platine en employant des ADN polymérases spécialisées, comme la polymérase ζ humaine (hPol ζ). Des études cliniques ont révélé que l'expression de la Pol ζ humaine augmente à la suite d'un traitement à base de sels de platine et contribue donc à la résistance à ces médicaments. La Pol ζ humaine est une protéine pentamérique composée d'une sous-unité catalytique Rev3, d'un dimère de la sous-unité régulatrice Rev7 et de deux sous-unités accessoires, PolD2 et PolD3. La liaison de Rev3 à la région "seatbelt" de Rev7 est essentielle pour l'activité de la polymérase et induit un changement de conformation de Rev7, d'un état "ouvert" à un état "fermé". En raison du manque d'activité enzymatique de Rev7 et de la difficulté de produire Rev3 en raison de sa grande taille, notre compréhension actuelle de l'interaction protéine-protéine Rev7/Rev3 est limitée et restreint notre capacité à cibler hPol ζ . Ce travail vise à évaluer structurellement l'interface Rev7/Rev3 pour développer des stratégies d'inhibition contre hPol ζ . Il a été démontré que l'inhibition des polymérases translésionnelles par de petites molécules chimiosensibilise les cellules aux médicaments à base de platine, offrant ainsi une perspective de meilleurs résultats aux patients traités par des médicaments à base de platine.

Le chapitre 1 introduit l'usage de la chimiothérapie avec des médicaments contenant du platine en clinique et ses limites dues à l'apparition de résistances. La synthèse translésionnelle de l'ADN est abordée en détail, en mettant l'accent sur la polymérase humaine ζ . Les petites molécules développées pour inhiber les interactions protéine-protéine dans les polymérases translésionnelles sont présentées.

Le chapitre 2 présente la conception et le développement d'un panel de onze inhibiteurs potentiels de l'interaction protéine-protéine (IPP) Rev7/Rev3 en combinant la synthèse organique et le criblage virtuel de ligands. Ce panel est dérivé d'un inhibiteur modéré de l'IPP Rev7/Rev3 récemment découvert qui sensibilise les cellules au cisplatine, un médicament anticancéreux à base de platine.

Le chapitre 3 passe en revue les principaux rôles cellulaires de Rev7, à savoir la synthèse translésionnelle de l'ADN, la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. L'expression

et la purification de plusieurs complexes protéiques de la protéine humaine de Rev7 avec des fragments de Rev3 sont décrites. Ces complexes protéiques seront utilisés pour évaluer dans le chapitre 4 l'activité des inhibiteurs potentiels de l'interaction Rev7/Rev3 et obtenir des informations mécanistiques sur le mode d'action des petites molécules présentées dans le chapitre 2.

Le chapitre 4 présente les tests biochimiques et biophysiques développés pour évaluer qualitativement et quantitativement l'effet de potentiels inhibiteurs de l'IPP Rev7/Rev3. Un test de pull-down peptidique permet de détecter la libération de Rev3 lors de l'ajout des petites molécules à un complexe immobilisé de Rev7/Rev3. Les affinités de liaison des petites molécules à Rev7 ont été mesurées par thermophorèse à micro-échelle. Ces expériences ont permis d'identifier deux inhibiteurs potentiellement plus puissants que le composé de référence et ont donné permis une meilleure compréhension mécanistique de l'inhibition de Rev7/Rev3.

Le chapitre 5 résume les résultats de cette thèse et présente leurs limites et propose de potentielles futures études.