

POL θ -mediated end-joining

Reparaturwege in Krebszellen gezielt ausschalten

MICHAEL ENSMINGER, MARTA LLORENS-AGOST, MARKUS LÖBRICH
STRAHLENBIOLOGIE UND DNA-REPARATUR, TU DARMSTADT

Mutations in *BRCA1* or *BRCA2* are associated with breast, ovarian and other cancers. Cells with these mutations are defective in homologous recombination (HR), one of two main processes to repair DNA double-strand breaks (DSBs). Survival of these cells strongly relies on the usage of alternative repair pathways, such as POL θ -mediated end-joining (TMEJ). Thus, targeting TMEJ could be a promising new strategy for the therapy of *BRCA1*- and *BRCA2*-mutant tumours.

DOI: 10.1007/s12268-022-1715-8
© Die Autorinnen und Autoren 2022

■ In den letzten Jahren wird vermehrt von Frauen berichtet, die sich aufgrund einer erhöhten Prädisposition für erblich bedingten Brustkrebs für eine vorbeugende Amputation der Brüste entscheiden. Diese Frauen tragen meist Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* oder *BRCA2*, welche in den Medien häufig als „die Brustkrebs-Gene“ bezeichnet werden. In der Tat haben Frauen mit einer monoallelischen *BRCA1*- oder

BRCA2-Mutation – ein Verlust beider Allele eines dieser Gene ist embryonal letal – ein Risiko von 50 bis 80 Prozent, an Brustkrebs zu erkranken [1].

DNA-Schäden und Reparaturmechanismen

BRCA1 und *BRCA2* haben wichtige Funktionen in der DNA-Schadensantwort, also den zellulären Prozessen zur Erkennung und

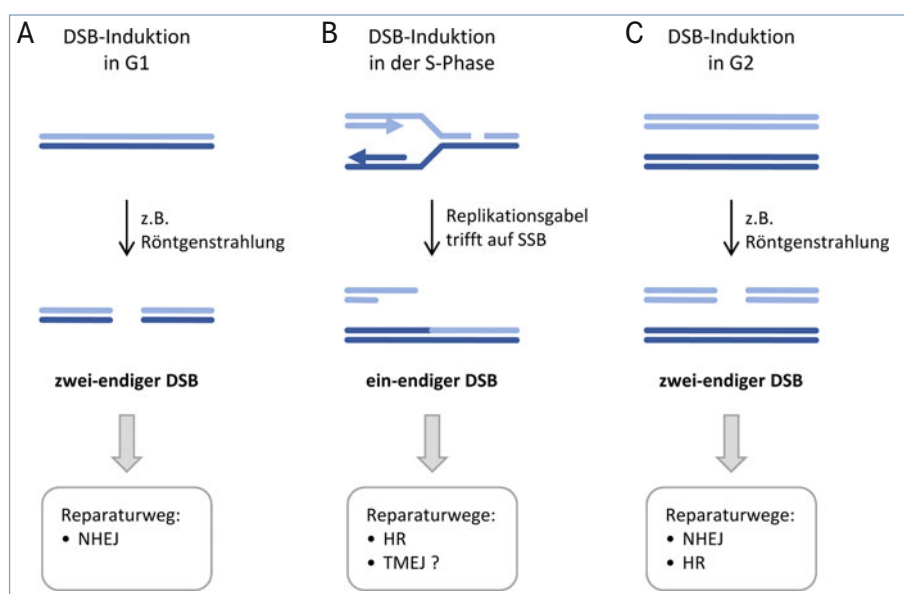
Behebung von DNA-Schäden. In jeder Zelle unseres Körpers treten pro Tag mehrere zehntausend DNA-Schäden auf. Am schwerwiegendsten ist dabei der DNA-Doppelstrangbruch (*double-strand break*, DSB), bei dem beide Stränge der DNA-Doppelhelix durchtrennt sind.

Für die Reparatur von DSBs stehen der Zelle zwei Hauptwege zur Verfügung: die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ) und die homologe Rekombination (*homologous recombination*, HR). Die NHEJ beschreibt den Prozess einer direkten Ligation der Bruchenden, der im gesamten Zellzyklus eine schnelle Reparatur ermöglicht, jedoch zur Ausbildung von Deletionen an den Bruchenden führen kann. Die HR ist dagegen ein fehlerfreier Prozess, der aber auf postreplikative Zellzyklusphasen beschränkt ist. Hierbei dient die unbeschädigte DNA-Sequenz im homologen Bereich der Schwesterchromatide als Vorlage für die korrekte Wiederherstellung der zerstörten DNA-Bereiche. *BRCA1* und *BRCA2* sind für diesen Prozess essenziell [2].

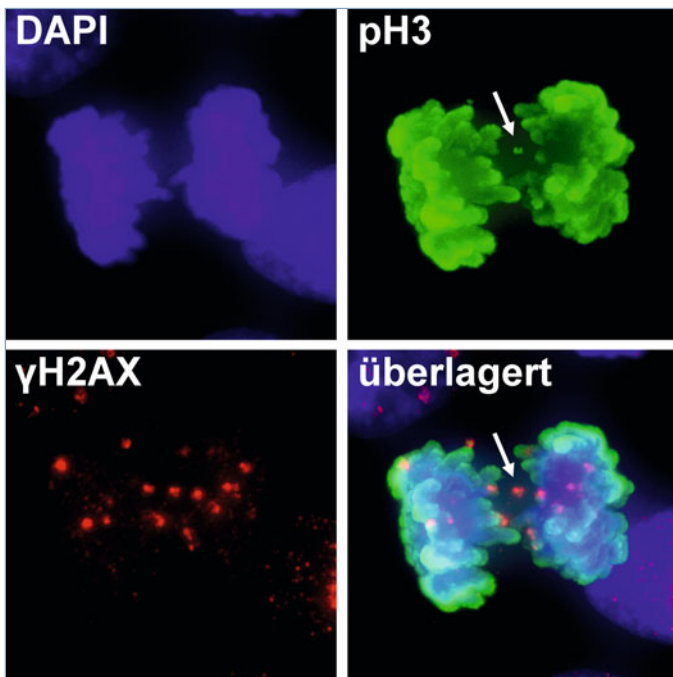
Eine besondere Form von DSBs entsteht während der Replikation. Trifft eine Replikationsgabel auf einen DNA-Einzelstrangbruch (*single-strand break*, SSB), wird ein DSB erzeugt, der nur ein einzelnes Bruchende besitzt. Diese ein-endigen DSBs können nicht via NHEJ repariert werden, jedoch kann der HR-Weg solch einen Schaden beheben und so eine vollständige Replikation gewährleisten (Abb. 1, [2]).

Therapie von HR-defizienten Tumoren

In *BRCA1*- oder *BRCA2*-defizienten Tumoren liegen beide Allele des betroffenen Gens durch Mutationen inaktiviert vor. Die gesunden Zellen der Patienten verfügen aber noch über ein intaktes Allel und exprimieren somit funktionales Protein. Dadurch können sie im Gegensatz zu den Tumorzellen DSBs über den HR-Weg beheben. Für eine möglichst selektive Schädigung der Tumorzellen werden bei einer Krebstherapie daher oft



▲ **Abb. 1:** Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs). **A** und **C**, Entstehen DSBs in der G1- oder G2-Phase, besitzen sie zwei Bruchenden. **B**, Tritt ein DSB in der S-Phase auf, wenn eine Replikationsgabel auf einen SSB trifft, ist dieser dagegen ein-endig. Die verfügbaren Reparaturwege sind angegeben.



◀ **Abb. 2:** Unreparierte DSBs in der Mitose. Dargestellt sind zwei Anaphase-Zellen nach gemeinsamer Depletion von BRCA2 und POLθ, die unreparierte DSBs (erkennbar durch den DSB-Marker γH2AX) und ein *lagging chromosome* (weißer Pfeil) zeigen. Ebenfalls gefärbt ist die DNA (mittels DAPI) und der Mitosemarker pH3.

gleichen. Dies stellt aber auch eine Achillesferse des Tumors dar, denn nur das Überleben der Tumorzellen, nicht aber das der HR-profizienten Normalgewebszellen, hängt von diesen alternativen Reparaturwegen ab. Eine gezielte Hemmung dieser Wege sollte daher eine starke und selektive Wirkung auf die Tumorzellen haben.

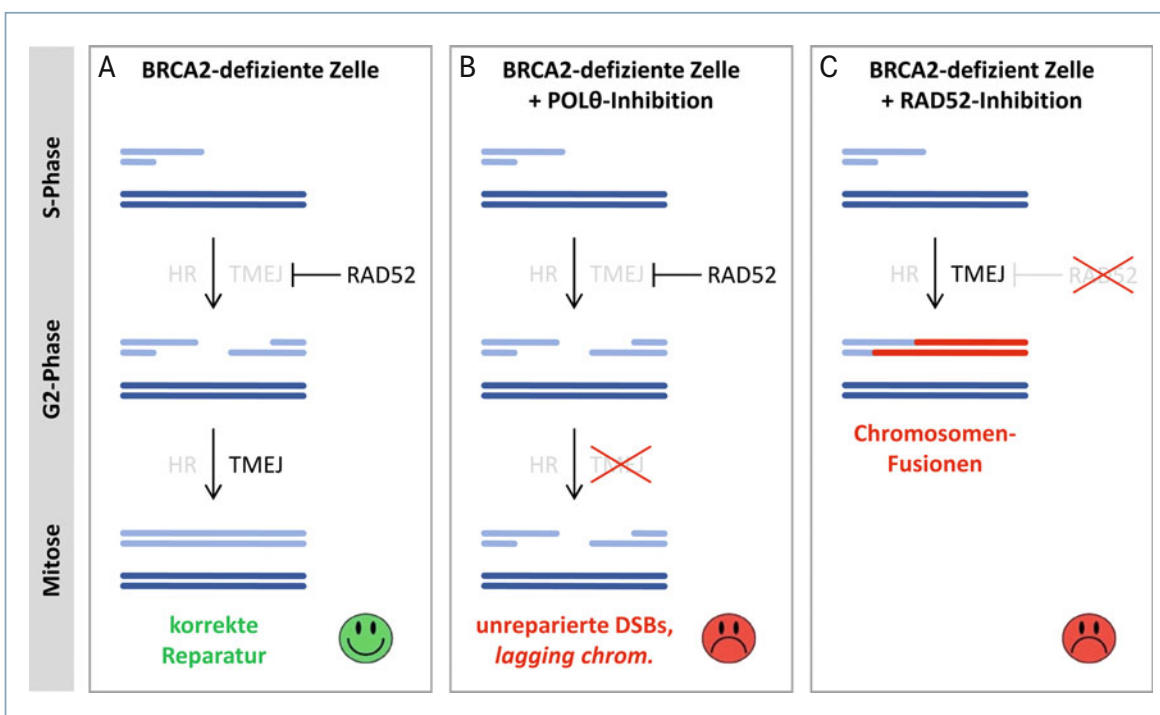
POLθ – ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Therapie HR-defizienter Tumore

Ein spannender Faktor in diesem Zusammenhang ist die Polymerase Theta (POLθ), die den Reparaturweg des *POLθ-mediated end-joinings* (TMEJ) vermittelt. Dies ist ein Unterweg der NHEJ zur Reparatur von DSBs mit einzelsträngigen Überhängen, wie sie auch an ein-endigen DSBs auftreten. Dabei lagern sich die einzelsträngigen Bereiche durch Nutzung von Mikrohomologien zusammen und die fehlenden DNA-Bereiche werden durch POLθ wieder aufgefüllt [4].

Dieser Prozess ist in gesunden Zellen nur von geringer Bedeutung und ein Verlust von POLθ hat hier keinen negativen Effekt. Wird POLθ dagegen in HR-defizienten Zellen ausgeschaltet, sterben diese ab [5]. Diese selektive Wirkung macht POLθ zu einem vielversprechenden Ansatzpunkt für eine Therapie von BRCA1- und BRCA2-defizienten Tumoren, gerade auch für solche, die eine Resistenz gegen PARP-Inhibitoren entwickelt

DSBs erzeugt, die HR-abhängig repariert werden. Dazu werden häufig Inhibitoren gegen das Enzym PARP1 eingesetzt. Wird PARP1 gehemmt, akkumulieren spontan auftretende SSBs und verursachen während der Replikation vermehrt ein-endige DSBs. Während Normalgewebszellen diese mittels HR effizient reparieren können, verbleiben sie in BRCA1- oder BRCA2-defizienten Tumorzellen teilweise unrepariert und können zum Zelltod führen [3].

PARP-Inhibitoren werden seit einigen Jahren klinisch eingesetzt, jedoch können die Tumore Resistenzen gegen diese Therapie entwickeln. Dies kann auf eine verstärkte Nutzung alternativer Reparaturwege zurückzuführen sein. Neben dem HR- und NHEJ-Weg sind einige weitere Prozesse beschrieben, die den Ausfall dieser Hauptwege teilweise kompensieren können. Durch eine verstärkte Nutzung dieser Prozesse können die Tumorzellen also den Verlust der HR aus-



◀ **Abb. 3:** Reparatur ein-endiger DSBs via TMEJ. **A**, BRCA2-defiziente Zellen sind HR-defekt. Nach Erzeugung eines zweiten Bruchendes durch eine benachbarte Replikationsgabel können diese DSBs während der Mitose mittels TMEJ repariert werden. **B** und **C**, Sowohl eine Hemmung des TMEJ in der Mitose (**B**) als auch eine vorzeitige Nutzung des TMEJ in S/G2 (**C**) erzeugt Chromosomenaberrationen, die zum Zelltod führen.

haben. Daher wird aktuell versucht, therapeutisch einsetzbare POL θ -Inhibitoren zu entwickeln [3].

POL θ vermittelt die Reparatur von DSBs in BRCA2-defizienten Tumorzellen

Die Funktion von POL θ war bisher noch nicht genau verstanden und wurde nun von unserer Arbeitsgruppe zusammen mit Forschern der Universitäten von Kalifornien und Texas genauer untersucht. Interessanterweise ist für die letale Wirkung einer POL θ -Depletion in HR-defizienten Zellen keine zusätzliche DNA-Schädigung nötig. Dies lässt vermuten, dass das TMEJ hier für die Reparatur spontan auftretender DSBs essenziell ist.

Während jeder S-Phase treten spontan etwa zehn bis zwanzig ein-endige DSBs auf. Wir konnten feststellen, dass diese in BRCA2-defizienten Zellen in der S/G2-Phase unrepariert verbleiben, dann aber während der Mitose mittels TMEJ nahezu vollständig repariert werden. Zellen, in denen die HR und POL θ zusammen ausgeschaltet wurden, zeigten dagegen hohe Zahlen an unreparierten DSBs und *lagging chromosomes* in der Mitose (**Abb. 2**). Letzteres sind Chromosomenfragmente, die bei der Aufteilung der DNA in die beiden Tochterzellen verloren gehen. Diese meist letalen Ereignisse könnten das starke Zellsterben von HR-defizienten Zellen erklären, wenn POL θ ausgeschaltet wird [6].

Aber warum erfolgt das TMEJ nur während der Mitose, einer Zellzyklusphase, in der DSB-Reparaturprozesse sonst sogar häufig unterdrückt werden? Spontane DSBs sind meist ein-endig, durch eine benachbarte Replikationsgabel kann aber ein zweites Bruchende erzeugt werden, was die Möglichkeit einer NHEJ-vermittelten Reparatur eröffnet. Erfolgen solche NHEJ-Prozesse jedoch ohne zweites Bruchende, kann es zur Verknüpfung von Enden unterschiedlicher DSBs und zur Fusion zweier Chromosomen kommen, was in der Regel ein letales Ereignis darstellt. Daher scheint es plausibel, die Reparatur ein-endiger DSBs auf postreplikative Zellzyklusphasen zu beschränken, wenn sichergestellt ist, dass ein zweites Bruchende vorliegt. Zudem könnte der Kondensationsgrad des Chromatins die Reparatur beeinflussen. In der Interphase liegt das Chromatin entspannt vor, sodass die beiden Bruchenden weit voneinander entfernt sein können, was die Gefahr einer Verknüpfung von Enden unterschiedlicher DSBs erhöht. Durch die

starke Kondensation des Chromatins in der Mitose werden die Bruchenden dagegen in räumlicher Nähe zu einander ausgerichtet, was eine Verknüpfung korrekter Enden via TMEJ ermöglicht.

In unserer Studie konnten wir mit RAD52 zudem einen Faktor identifizieren, der eine Nutzung des TMEJ in der S/G2-Phase unterdrückt. Nach Depletion von RAD52 konnten wir in BRCA2-defizienten Zellen eine TMEJ-vermittelte Reparatur bereits in der G2-Phase beobachten, die allerdings mit einer signifikanten Zunahme der Zahl an Chromosomenfusionen einherging [6]. Dies unterstützt unser Modell, dass eine vorzeitige Nutzung des TMEJ zur Ausbildung eben dieser toxischen Läsionen führt. Das ist umso spannender, da RAD52 ein weiterer Faktor ist, dessen Verlust zum Absterben von BRCA1- und BRCA2-defizienten Tumorzellen führt und gegen den therapeutisch einsetzbare Inhibitoren entwickelt werden [7].

Zusammenfassend kann unsere Studie erklären, warum POL θ und RAD52 für das Überleben von BRCA2-defizienten Zellen essenziell sind. POL θ ermöglicht eine Reparatur spontan auftretender DSBs mittels TMEJ und RAD52 reguliert diesen Prozess. Wird das TMEJ verhindert (z. B. nach POL θ -Inhibition) oder erfolgt es vorzeitig (z. B. nach RAD52-Inhibition), entstehen unterschiedliche Chromosomenaberrationen, die zum Absterben der Zelle führen (**Abb. 3**). ■

Literatur

- [1] Roy R, Chun J, Powell SN (2012) BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 12: 68–78
- [2] Ensminger M, Löbrich M (2020) One end to rule them all: non-homologous end-joining and homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Br J Radiol* 93: 20191054
- [3] Higgins GS, Boulton SJ (2018) Beyond PARP-POL θ as an anticancer target. *Science* 359: 1217–1218
- [4] Mateos-Gomez PA, Gong F, Nair N et al. (2015) Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* 518: 254–257
- [5] Ceccaldi R, Liu JC, Amunugama R et al. (2015) Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol θ -mediated repair. *Nature* 518: 258–262
- [6] Llorens-Agost M, Ensminger M, Le HP et al. (2021) POL θ -mediated end joining is restricted by RAD52 and BRCA2 until the onset of mitosis. *Nat Cell Biol* 23: 1095–1104
- [7] Huang F, Goyal N, Sullivan K et al. (2016) Targeting BRCA1-and BRCA2-deficient cells with RAD52 small molecule inhibitors. *Nucleic Acids Res* 44: 4189–4199

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Michael Ensminger
 AG Löbrich – Radiation biology and DNA repair
 TU Darmstadt
 Schnittpahnstraße 13
 D-64287 Darmstadt
 ensminger@bio.tu-darmstadt.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Michael Ensminger

2001–2006 Biologiestudium an der Universität des Saarlandes. Ab 2007 Doktorand und ab 2012 Postdoktorand an der TU Darmstadt im Bereich Strahlenbiologie und DNA-Reparatur unter Prof. Dr. M. Löbrich.



Marta Llorens-Agost

2006–2011 Biotechnologiestudium an der Universität von Valencia, Spanien. 2011–2016 Promotion in Biochemie an der University of Ireland in Galway, Irland. Seit 2016 Postdoktorandin an der TU Darmstadt im Bereich Strahlenbiologie und DNA-Reparatur unter Prof. Dr. M. Löbrich.



Markus Löbrich

1985–1990 Physikstudium an der TU Darmstadt und der Universität Gießen. 1990–1993 Promotion an der der Universität Gießen mit Aufenthalt an der University of California, Berkeley, USA. 1993–1999 Postdoktorand an der Universität Gießen und University of California mit Habilitation im Fachgebiet Biophysik. 1999–2007 Professor an der Universität des Saarlandes und seit 2007 Professor an der TU Darmstadt.