



## DNA 聚合酶 $\theta$ : 易错的多功能 DNA 末端修复分子\*

王 瑶<sup>1)</sup> 陈国江<sup>2)</sup> 冯健男<sup>2)</sup> 石艳春<sup>1)\*\*</sup> 王 晶<sup>2)\*\*</sup> 郑源强<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> 内蒙古医科大学, 内蒙古自治区分子生物学重点实验室, 呼和浩特 010058;

<sup>2)</sup> 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100850

**摘要** DNA 聚合酶  $\theta$  (DNA polymerase theta, Pol $\theta$ ) 是一种广泛存在于动植物中的 DNA 修复酶。它在选择性末端连接 (alternative end-joining, Alt-EJ) 途径中发挥着关键作用, 常参与 DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DSB) 损伤修复。在正常生理状态下, Pol $\theta$  主要调控基因组稳定性。然而, 在恶性肿瘤发生时, Pol $\theta$  表现出异常高表达水平, 并参与调控肿瘤细胞的恶性转变过程。研究表明, 抑制 Pol $\theta$  活性可导致同源重组 (homologous recombination, HR) 缺陷的肿瘤细胞发生合成致死 (synthetic lethality, SL)。因此, 已经开发出多种针对 Pol $\theta$  的小分子抑制剂, 可与其他化疗药物联合使用以抑制恶性肿瘤的发展。此外, 敲除或抑制 Pol $\theta$  活性还能增加 HR 修复效率, 从而提高外源基因靶向整合效果。本文综述了 Pol $\theta$  及其介导的 Alt-EJ 修复机制在生物学功能方面的最新研究进展, 为靶向 Pol $\theta$  在肿瘤治疗和基因编辑方面的应用提供理论基础。

**关键词** DNA 聚合酶  $\theta$ , DNA 双链断裂修复, 基因组稳定性, 肿瘤抑制, 靶向整合

**中图分类号** R3, R392

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0201

Pol $\theta$  (DNA polymerase theta), 又被称为 DNA 聚合酶  $\theta$ , 是 DNA 聚合酶 A 家族成员之一, 参与 DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DSB) 修复过程<sup>[1-4]</sup>。Pol $\theta$  具有独特的结构, 是目前已知真核生物中发现的唯一含有解旋酶活性的聚合酶, 同时也是一种易出错的聚合酶。机体内 DSB 发生后常见有 4 种修复途径 (图 1), 即经典非同源末端连接 (classical-non homologous end joining, C-NHEJ)、同源重组 (homologous recombination, HR)、单链退火 (single-strand annealing, SSA) 和选择性末端连接 (alternative-end joining, Alt-EJ)。当主要的 DNA 修复通路缺陷时 (如 HR 通路), 细胞会依赖 Pol $\theta$  介导的 Alt-EJ 通路来修复损伤的 DNA, 以维持基因组稳定性<sup>[5]</sup>。然而, 由于 Pol $\theta$  具有低保真性的特点, Alt-EJ 修复常常会出错。此外, 癌症中常可见过度表达的 Pol $\theta$ , 抑制 Pol $\theta$  与各种 DNA 修复基因的联合缺失会导致合成

致死 (synthetic lethality, SL), 包括已知的癌症驱动因子 (如 *BRCA1/2*)<sup>[6]</sup>。近年来, 小分子靶向化疗药成为抑制肿瘤生长的热点, 但是脱靶效应和耐药性成为困扰其临床应用的主要问题, 尤其是对聚 ADP 核糖聚合酶抑制剂 (poly-ADP-ribose polymerase inhibitor, PARPi) 的耐药性。研究发现, 在 HR 缺陷肿瘤细胞中阻断 Pol $\theta$  活性可逆转 PARPi 耐药, 这使 Pol $\theta$  在癌症治疗中成为一个非常有前途的治疗靶点<sup>[7]</sup>。目前, 已经报道了多种 Pol $\theta$  抑制剂, 如新生霉素 (Novobiocin, NVB)<sup>[7]</sup>、ART558<sup>[8]</sup> 和 RP-6685<sup>[9]</sup> 等。这些抑制剂的研制为

\* 北京市自然科学基金 (7222262) 和国家自然科学基金 (31900676) 资助项目。

\*\* 通讯联系人。

石艳春 Tel: 13948101150, E-mail: yeshi5388@163.com

王晶 Tel: 13161648702, E-mail: jingw\_biomed@163.com

郑源强 Tel: 13948101570, E-mail: zhengyq688@163.com

收稿日期: 2023-05-22, 接受日期: 2023-07-20

治愈 *BRCAl/2* 突变的肿瘤提供了新的方向。此外，通过减少 Polθ 介导的 Alt-EJ 修复途径还有助于提高 HR 修复效率，增加外源基因靶向整合 (target integration, TI) 几率，使 Polθ 抑制剂又具有新的

潜在应用价值。本文综述近几年关于 Polθ 分子功能及其参与 Alt-EJ 通路修饰机制的研究进展，为深入了解该领域提供思路。

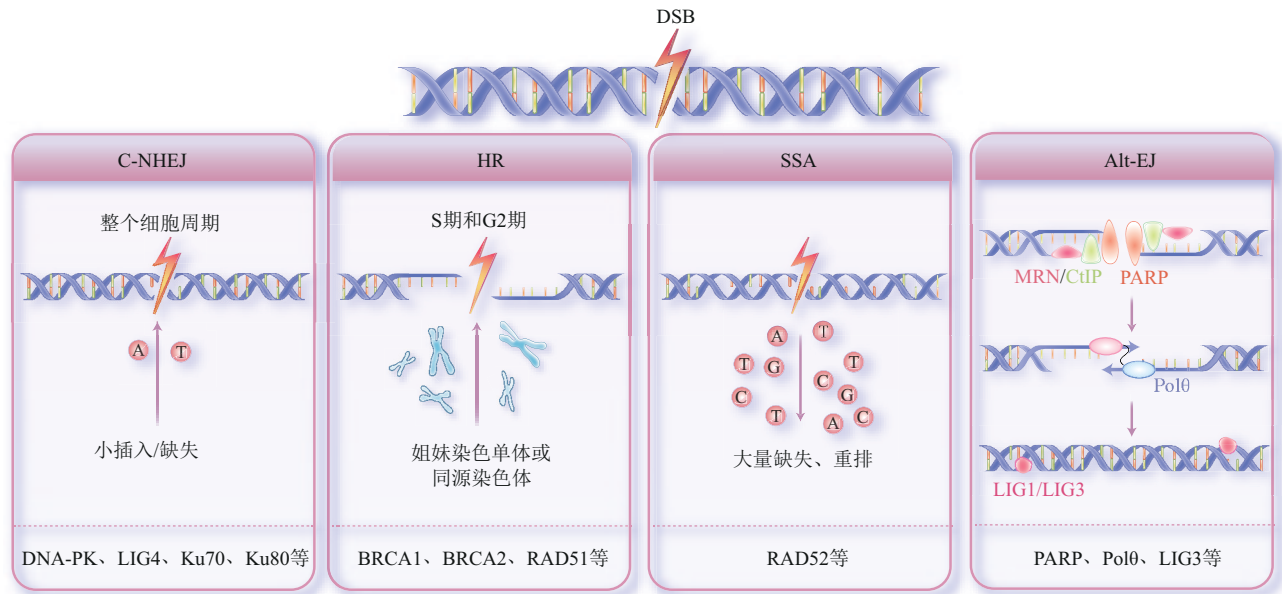


Fig. 1 DSB repair pathways

图1 常见的4种DSB修复途径：C-NHEJ、HR、SSA和Alt-EJ

## 1 Polθ的结构特征及功能

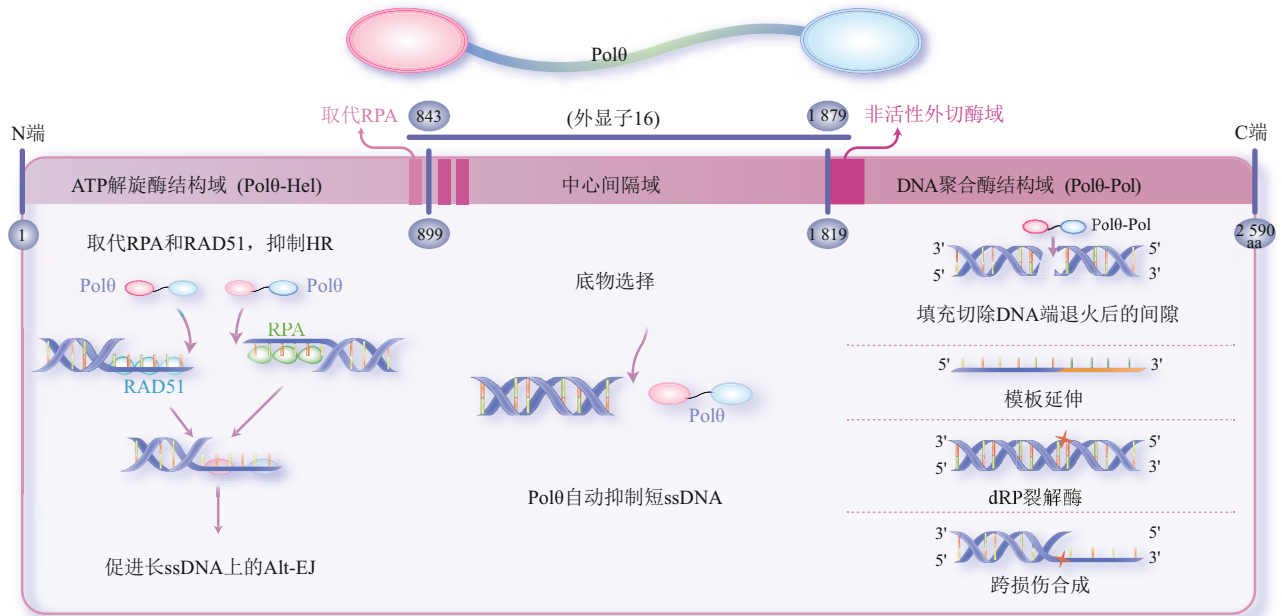
Polθ由 *POLQ* 基因编码，由 2 590 个氨基酸组成，分子质量为 290 ku，主要参与 Alt-EJ 途径对 DSB 进行修复。*POLQ* 基因在包括植物和原生生物在内的多细胞真核生物中广泛存在。然而，在包括酵母在内的真菌中，并没有发现 *POLQ* 类似基因<sup>[10]</sup>。Polθ 结构独特，是哺乳动物细胞中唯一包含解旋酶功能的 DNA 聚合酶。该分子主要包含 3 个结构域 (图 2)：氮 (N) 端含保守序列的解旋酶样结构域 (helicase-like domain)、碳 (C) 端的 DNA 聚合酶结构域 (polymerase domain) 以及连接这两个区域的一段无序序列的中心区域 (central domain)<sup>[10]</sup>。

N 端是超家族 2 解旋酶样结构域 (superfamily 2 helicase domain, Polθ-Hel)，具有 DNA 依赖的 ATP 酶活性，其在复制进化过程中基本保持不变。Polθ-Hel 通过取代复制蛋白 A (reputation protein A, RPA) 来阻止 HR 修复。Polθ-Hel 可以在长单链

DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 上促进 Alt-EJ<sup>[11]</sup>。

C 端是 DNA 聚合酶 A 家族结构域 (family-A polymerase domain, Polθ-Pol)，包括 3 个插入氨基酸环，促使短单链 DNA 引物的相互作用、退火和延伸<sup>[12-13]</sup>。在 Alt-EJ 中，Polθ-Pol 可以作为末端转移酶或催化经过热处理的序列的模板延伸。除了双链断裂修复外，该聚合酶还可以作为 5'-dRP 裂解酶在碱基切除修复 (base excision repair, BER) 中发挥作用，并对紫外线损伤进行跨损伤合成 (translesion synthesis, TLS)。Alt-EJ 在连接退火的 DSB 末端之前，利用 Polθ-Pol 填充 DNA 间隙。

中心区域由一个外显子跨越了整个非结构化的中心氨基酸序列<sup>[14]</sup> 组成，虽然在大小和跨物种序列方面保守性较差，但可将 Polθ-Hel 和 Polθ-Pol 连接在一起，其中包含与 RAD51 结合模块。另外，该中心区域对底物选择至关重要，它能自动抑制短 ssDNA 上的 Polθ 的活性。

Fig. 2 The structure of Pol $\theta$ 图2 Pol $\theta$ 结构示意图

## 2 Pol $\theta$ 与DSB修复通路

DSB是由拓扑异构酶抑制剂、电离辐射、紫外线照射、停滞的DNA复制分叉以及CRISPR/Cas9等诱导,可造成DNA复制或转录停滞,进而引发基因重排、细胞坏死甚至细胞减数分裂过程中断和促进癌症发生发展等。现阶段发现,DSB断裂之后有4种主要修复途径(图1),即C-NHEJ、HR、SSA和Alt-EJ。大多数DSB是由C-NHEJ介导修复的,可以发生在整个细胞周期中,通过在断裂位点引入小DNA片段的插入和删除以及染色体易位来直接连接DNA末端<sup>[15]</sup>。在S和G2期,HR使用姐妹染色单体或同源染色体作为模板进行DNA合成,是目前已知唯一精确的DSB修复途径<sup>[16]</sup>。SSA是DSB修复的第三种途径,消除了重复序列之间的DNA片段<sup>[17]</sup>,通常导致大量的缺失和DNA重排,对基因组完整性有害。当主要的DNA修复通路缺失时,细胞会依赖替代通路,即Alt-EJ,也称微同源性介导的末端连接(microhomology-mediated end-joining, MMEJ)和聚合酶介导的末端连接(theta-mediated end joining, TMEJ)<sup>[5]</sup>。这种修复途径具有内在的诱变性,断裂位点通常因插入和删除而受损。DSB修复通路中,4种通路都至关重要,除HR介导靶向

整合外,其他通路都介导随机修复。

### 2.1 Pol $\theta$ 介导选择性末端连接(Alt-EJ)修复通路

Alt-EJ包括许多由5'-3'的切除因子,如PARP1<sup>[18]</sup>、Pol $\theta$ <sup>[19]</sup>、CtBP相互作用蛋白(carboxy-terminal binding protein, CtIP)<sup>[20]</sup>,MRN复合物(MRE11-RAD50-NBS1, MRN)<sup>[21]</sup>,DNA连接酶1(DNA ligase I, LIG1)和DNA连接酶3(DNA ligase III, LIG3)<sup>[22]</sup>等。Pol $\theta$ 在Alt-EJ通路中起着核心作用<sup>[23]</sup>,可以延长3'单链和双链DNA的-OH末端,跨越脱嘌呤嘧啶位点或以不依赖模板的方式错配。Alt-EJ通路中(图1),首先由PARP1募集到DSB处并激活MRN/CtIP复合物<sup>[24]</sup>,以暴露断裂位点的微同源序列<sup>[25-28]</sup>。MRN/CtIP处理DNA末端产生3' DNA悬垂,Pol $\theta$ 结合由DSB的5'-3'重剪切生成的长单链DNA(ssDNA)悬臂,并通过与具有2~6个碱基对的微同源序列退火,将它们用作DNA合成的引物<sup>[29-30]</sup>,促使修复过程初始阶段形成的中间DNA结构稳定。经过内切酶等其他酶对过渡结构的处理后,最后由LIG3或LIG1来促进最终DNA间隙的融合<sup>[31]</sup>。其中,PARP1依赖的Pol $\theta$ 向DSB位点的募集是这一途径的关键步骤<sup>[6, 19]</sup>。

## 2.2 Polθ参与DSB修复以外的修复途径

Polθ除了在DSB修复途径中发挥作用,还参与BER、DNA链间交联(DNA interstrand crosslinks, ICLs)修复、TLS等过程,并且可能是特定类型DNA损伤的唯一可用途径<sup>[28]</sup>。由于Polθ-Pol有较弱的5'-脱氧核糖磷酸裂解酶活性,因此,通常认为Polθ在BER中起作用<sup>[32]</sup>。DNA单链断裂在遇到复制分叉时转化为DSB也可能依赖于Polθ的修复<sup>[33]</sup>。在果蝇和线虫中,Polθ参与的ICLs和Polθ-Hel活性对果蝇对氮芥抗性至关重要<sup>[34-35]</sup>。另外,Polθ对G4四重体结构的修复不可或缺,防止以小缺失为代价的基因组重排<sup>[5]</sup>。Bela等<sup>[36]</sup>证明,Polθ-Pol可以催化一种独特的诱变间隙填充反应,称为微同源介导的DNA间隙跳跃(microhomology-mediated gap skipping, MMGS),该反应通过微同源性退火导致间隙填充反应中缺失的形成,可能是产生Polθ依赖性基因组瘢痕的潜在机制。MMGS可以绕过多种病变,不需要与病变相对的核苷酸掺入,在HR缺陷细胞中引起Polθ活性的突变特征。Yi等<sup>[37]</sup>证明,Polθ的TLS活性在高线能传递辐射诱导的复杂DSB中起着关键作用。

## 3 Polθ与基因组稳定性

DNA损伤反应(DNA-damage response, DDR)通过内源性和外源性DNA损伤并激活特定的DNA修复途径来保持基因组的完整性。正常组织细胞中,ICL和DSB修复缺陷可导致染色体不稳定,并抑制DNA复制和转录,进一步导致相关疾病的发生。Ceccaldi等<sup>[6]</sup>利用小干扰RNA敲低Polθ,发现Polθ减少与DSB形成增加、复制叉的不稳定以及对某些基因毒性因子的敏感性增强有关,因此,推测Polθ在基因组稳定性中起着至关重要的作用。另有研究发现,*POLQ*基因缺失的正常组织细胞甚至肿瘤细胞对外界因素,包括过氧化氢、γ射线等变得敏感<sup>[38-39]</sup>,进而引发基因不稳定等突变事件发生。Polθ除了在哺乳动物基因组稳定中起作用,在植物中同样起着重要作用<sup>[40]</sup>。Plecenikova等<sup>[41]</sup>发现,Polθ缺失增加苔藓和单细胞衣藻对博莱霉素(用于治疗癌症的药物,会引起DNA双链断裂)的敏感性。此外,拟南芥中Polθ缺失会干扰外源DNA片段插入基因<sup>[42]</sup>。虽然Polθ介导的Alt-EJ修复易出错,但与其他在缺失情况下进行修复并可能导致总基因组畸变的过程相比,Polθ介导的Alt-EJ修复通常是更安全的选择,具有

维持基因组稳定性的作用。然而学术界也有不同的结论,Mateos-Gomez等<sup>[19]</sup>报道Polθ本身会导致基因组不稳定,这可能源于其在Alt-EJ中的诱变作用。多个研究发现,Polθ损耗可减少染色体易位和紫外线相关突变,其过表达增加DNA损伤标记物并损害细胞周期进展<sup>[4, 19, 43]</sup>。目前,Polθ对于基因组稳定的影响还存在一定争议,这可能与特定的DSB诱导因素和细胞类型有关。

## 4 Polθ与肿瘤发生

### 4.1 Polθ在多种肿瘤组织中高表达

由于Polθ在DNA合成时具有低保真度的特点,当它在不同的时间和位点发挥作用时,其升高可能导致染色体重排,甚至肿瘤的发生。一般情况下,在正常细胞中Polθ低表达或不表达,仅在骨髓和淋巴系统中高表达。而在恶性肿瘤如结直肠癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌和头颈部癌等中,发现Polθ的高表达<sup>[1-4]</sup>,而且大量临床数据分析发现,Polθ过表达可能与患者预后不良、基因突变、肿瘤分级及无复发生存期缩短有关<sup>[1, 44]</sup>。

### 4.2 抑制Polθ介导肿瘤细胞合成致死性

在恶性肿瘤细胞中,由于HR修复机制发生缺陷,抑制Polθ具有显著的合成致死效应<sup>[6, 19]</sup>。Ceccaldi等<sup>[45]</sup>发现,在*BRCA*缺乏的癌细胞中,Polθ表达升高会增加Alt-EJ修复活性,以补偿HR缺陷。因此,抑制Polθ可以作为抗击肿瘤的潜在治疗靶点。目前PARPi临床多用于治疗HR缺陷类型肿瘤,但PARPi耐药性问题成为其广泛应用的主要障碍<sup>[46]</sup>。Li等<sup>[47]</sup>发现,Polθ抑制与PARPi联合,在HR缺陷肿瘤中可发挥“双合成致死”作用,即两个或多个基因和两条途径共同导致肿瘤细胞死亡,且敲除*POLQ*基因,可能会提高HR缺陷肿瘤细胞对PARPi的敏感性<sup>[7]</sup>。

### 4.3 抑制Polθ促进肿瘤细胞死亡的其他机制

研究表明,Polθ也与先天免疫反应激活存在联系。肿瘤细胞中HR修复不足,抑制Polθ会导致Alt-EJ修复减少,造成基因组不稳定,进而促进免疫细胞对癌细胞的免疫识别和免疫破坏<sup>[48]</sup>。其潜在机制为:a.新抗原生成<sup>[49]</sup>;b.cGAS/STING通路激活<sup>[50]</sup>;c.免疫细胞死亡诱导<sup>[51]</sup>等,来触发癌细胞的免疫原性。近期,Patterson-Fortin等<sup>[52]</sup>也发现,在*BRCA*缺陷癌症中,抑制Polθ会激活cGAS/STING通路,导致T细胞浸润和活性增加,并对免疫检查点阻断剂产生敏感性。

## 5 Pol $\theta$ 小分子抑制剂

靶向癌细胞的 Alt-EJ 修复通路既可以选择性地杀死肿瘤细胞, 同时又不影响正常细胞存活, 因此 Pol $\theta$  是治疗 HR 缺陷癌症的一个很有前景的靶点<sup>[53]</sup>, 此外, 它还可以作为人类癌症免疫肿瘤治疗高应答的潜在生物标志物。现阶段已经报道多个高特异性且有效的 Pol $\theta$  小分子抑制剂用于阻断 HR 缺乏的各种癌症 (表1)。

### 5.1 ART558、ART812和ART899

Zatreanu 等<sup>[54]</sup>发现一种有效的、选择性的小分子 Pol $\theta$ -Pol 抑制剂 ART558, 通过破坏 Pol $\theta$ -Pol DNA 复合物的稳定性降低了生产能力, 进而抑制引物的延伸。该研究发现, 在 *BRCA2*<sup>-/-</sup> 的结直肠腺癌上皮细胞 DLD1、胰导管腺癌肿瘤细胞 CAPAN1 和视网膜色素上皮细胞 RPE 中给与 1~10  $\mu\text{mol/L}$  ART558 治疗后, 可诱导肿瘤细胞 SL<sup>[6, 54]</sup>。在 *BRCA2*<sup>-/-</sup> DLD1 细胞中, 产生了 DNA 损伤相关的生物标志物, 包括核  $\gamma\text{H2AX}$  病灶、磷酸化 H2AX、染色体异常和微核的增加, 这可能是导致合成致死的原因。在该细胞中, 同时给与 ART558 和 PARPi 奥拉帕尼处理对细胞存活、克隆培养率和凋亡的影响远大于 DLD1.*BRCA2* 野生型细胞<sup>[54]</sup>。在 *BRCA*<sup>-/-</sup> RPE 细胞中, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  ART558 及 0.1  $\mu\text{mol/L}$  奥拉帕尼同时处理后, 细胞存活显著降低<sup>[54]</sup>。ART558 不仅能使 *BRCA*<sup>-/-</sup> 肿瘤细胞合成致死, 还能减弱由 p53 结合蛋白 1 抗体 (p53-binding protein 1, 53BP1) 缺陷引起的 PARPi 耐药性<sup>[54]</sup>。53BP1<sup>-/-</sup> 和 *BRCA1*<sup>-/-</sup> 的患者源性肿瘤体外培养类器官对 PARPi 奥拉帕尼或卡铂耐药, 但是对 ART558 处理敏感, 肿瘤在 1~100  $\mu\text{mol/L}$  ART558 处理时存活显著减少<sup>[54]</sup>。Rodriguez-Berriguete 等<sup>[55]</sup>在结肠癌细胞 HCT116、大细胞肺癌细胞 H460 和膀胱癌细胞 T24 中发现, 1  $\mu\text{mol/L}$  ART558 即可增加 3 种肿瘤细胞的放射敏感性。由于 ART558 稳定性较差, Zatreanu 等<sup>[8]</sup>进一步优化衍生出新 Pol $\theta$ -Pol 抑制剂, ART812, 发现对 *BRCA1/SHLD2*<sup>-/-</sup> (SHLD2 为在 DNA 修复中起关键性作用的一种蛋白质) 乳腺癌细胞 MDA-MB-436 荷瘤大鼠模型给与 100 mg/kg ART812 时即有明显的肿瘤抑制作用<sup>[54]</sup>。随后 Rodriguez-Berriguete 等<sup>[55]</sup>又研制出另一种 Pol $\theta$ -Pol 抑制剂——ART899。1 mmol/L 和 3 mmol/L

ART899 处理 HCT116 和 H460 细胞, 可明显增加肿瘤细胞放疗敏感性<sup>[55]</sup>。

### 5.2 新生霉素 (novobiocin, NVB)

NVB 是一种新发现的特异性的 Pol $\theta$ -Hel 抑制剂<sup>[7]</sup>, 它与 Pol $\theta$  的配体蛋白结合阻止 Pol $\theta$  募集到 DNA 损伤部位从而抑制 Alt-EJ 修复。NVB 可以剂量依赖性诱导 HR 缺陷的肿瘤死亡<sup>[7]</sup>。Zhou 等<sup>[7]</sup>发现, 在骨肉瘤细胞 U2OS 中, 分别使用 50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  NVB 时, MMEJ 活性下降约 50%, 而对 HR 活性没有明显影响。NVB 可以与 PARPi 协同杀死 HR 缺陷型肿瘤, 在 *BRCA*<sup>-/-</sup> RPE 细胞中, 100  $\mu\text{mol/L}$  NVB 与 10 nmol/L PARPi 鲁卡帕尼同时作用导致细胞提前死亡<sup>[7]</sup>。*HR*<sup>-/-</sup> 人源肿瘤异种移植 (patient-derived tumor xenografts, PDXs) 肿瘤模型 (DF83 和 DF59) 中, NVB 与 PARPi 奥拉帕利同时作用, 使 PARPi 耐药性减弱, 肿瘤完全/提前消退<sup>[7]</sup>。因此, NVB 和 PARPi 联合使用比单独使用 PARPi 能更有效地杀死 HR 缺乏的肿瘤, 且联合治疗可预防 PARPi 的耐药性。Pol $\theta$  表达水平是 NVB 敏感性的预测性生物标志物, NVB 还可诱导 DSB 末端切除和 RAD51 病灶增加<sup>[7]</sup>。Patterson-Fortin 等<sup>[56]</sup>发现, 随着 C-NHEJ 关键蛋白 DNA-PK 抑制剂培塞替布浓度增加 (1~5  $\mu\text{mol/L}$ ), 给与 100  $\mu\text{mol/L}$  NVB, 使 TP53 缺陷肿瘤细胞, 如非小细胞肺癌细胞 A549 和 H460 细胞毒性逐渐增强, 且 NVB 可以减弱 TP53 突变肿瘤细胞对培塞替布的耐药性。因此, 靶向 DNA-PK 抑制剂和 Pol $\theta$  抑制剂组合可能为 TP53 突变实体瘤提供一种合理的治疗策略。

### 5.3 RP-6685

RP-6685 是一种强效针对 Pol $\theta$ -Pol 的口服抑制剂, 它对 Pol $\theta$  表现出极好的选择性, 对其他几种 DNA 聚合酶 (Pols  $\alpha$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\lambda$  和  $\mu$ ) 均没有活性<sup>[57]</sup>。Bubenik 等<sup>[57]</sup>发现, 在人结肠癌细胞 *BRCA2*<sup>-/-</sup> HCT116 的小鼠异种肿瘤移植模型中, 给与 80 mg/kg RP-6685 治疗 8 d, 肿瘤细胞即被明显抑制, 并且出现微核和  $\gamma\text{H2AX}$  增加的 DNA 损伤标志物。但遗憾的是, 肿瘤细胞对 RP-6685 会产生耐药。也许该抑制剂与其他化疗药联合使用会产生更好的疗效, 相关工作还需进一步探索和研究。因此, 靶向 Pol $\theta$ -Pol 活性的抑制剂可能成为进一步开发的候选药物。

Table 1 Small molecule inhibitors targeting Polθ and tumor lethality

表1 Polθ小分子抑制剂与肿瘤致死

抑制剂名称	靶向Polθ结构域	模型系统	联用化合物	生物学表型	参考文献
ART558	C端聚合酶结构域	<i>BRCA2</i> <sup>-/-</sup> DLD1、CA-PAN1、RPE细胞	/	1~10 μmol/L ART558使肿瘤存活明显降低	[54]
		<i>BRCA2</i> <sup>-/-</sup> DLD1细胞	PARPi奥拉帕尼	对细胞存活、克隆培养率和凋亡的影响远大于DLD1. <i>BRCA2</i> 野生型细胞	[54]
		<i>BRCA</i> <sup>-/-</sup> RPE细胞	PARPi奥拉帕尼	0.5 μmol/L ART558+0.1 μmol/L奥拉帕尼处理后, 细胞存活显著降低	[54]
		<i>BRCA1</i> <sup>-/-</sup> 53BP1 <sup>-/-</sup> 肿瘤体外培养类器官	/	1~100 μmol/L ART558处理时肿瘤存活明显减少	[54]
		HCT116、H460和T24细胞	/	1 μmol/L ART558即可使3种肿瘤细胞放射敏感性增加	[55]
ART812	C端聚合酶结构域	<i>BRCA1</i> <sup>-/-</sup> / <i>SHLD2</i> <sup>-/-</sup> 的MDA-MB-436细胞	/	100 mg/kg ART812使肿瘤生长受到明显抑制	[54]
ART899	C端聚合酶结构域	HCT116和H460细胞	/	在1 mmol/L和3 mmol/L ART899处理时, 细胞对放射敏感性增高	[55]
新生霉素 (NVB)	ATP酶结构域	U2OS细胞	/	50 μmol/L、100 μmol/L NVB, MMEJ活性下降约50%, 而HR活性下降不明显	[7]
		<i>BRCA</i> <sup>-/-</sup> RPE1细胞	PARPi鲁卡帕尼	NVB 100 μmol/L肿瘤细胞在10 nmol/L PARPi时就提前死亡	[7]
		<i>HR</i> <sup>-/-</sup> PDX肿瘤模型 (DF83和DF59)	PARPi 奥拉帕利	PARPi耐药性减弱; 肿瘤完全/提前消退	[7]
		<i>TP53</i> <sup>-/-</sup> 的肿瘤细胞 (A549, H460)	DNA-PK抑制剂替布 (M3814)	随替布浓度增加同时给与100 μmol/L NVB, 导致A549和H460细胞毒性增强	[56]
RP-6685	C端聚合酶结构域	<i>BRCA2</i> <sup>-/-</sup> HCT116细胞的小鼠肿瘤模型	/	80 mg/kg RP-6685治疗8 d, 肿瘤细胞被明显抑制	[57]

## 6 抑制Polθ有助于提高外源基因靶向整合效率

生理情况下, 由于Polθ与DNA修复蛋白相互作用, 会抑制HR通路, 进而导致依赖HR通路的外源基因靶向整合效率低下。近期大量研究发现, 抑制Polθ有可能增加HR, 可大幅度提高外源基因的靶向效率<sup>[6, 19]</sup> (表2)。另一方面, 在正常细胞中, 由于内在的HR修复机制的存在, 抑制Polθ一般不会产生严重合成致死效应。Zelensky等<sup>[58]</sup>使用CRISPR/Cas9技术在小鼠胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) 中同时敲除*POLQ*基因和C-NHEJ关键分子Ku80时, 发现HR基因靶向效率在*Rad54*基因座和*Pim1*基因座分别提高了23%和3倍, 进而敲除*POLQ*基因和联用DNA-PK抑制剂NU-7441时, 外源基因在*Rad54*基因座的9号和18号外显子位置的外源基因靶向整合效率分别提高9%、11%, 同时发现随机整合 (random

integration, RI) 的降低主要是通过抑制Polθ介导的Alt-EJ通路, 而抑制C-NHEJ通路对外源基因敲入效率影响不明显。进一步研究发现, 同时抑制Polθ和C-NHEJ关键蛋白Ku70/Ku80/*LIG4*, 抑制RI会更为明显<sup>[58-60]</sup>。Saito等<sup>[60]</sup>也发现, 在B淋巴细胞白血病细胞中同时敲除*POLQ*和*LIG4*基因, 基因靶向效率提高约99.4%。同样, 在衣藻中使用CRISPR/Cas9体系敲除*POLQ*基因, 发现HR修复效率提高了28%~97%<sup>[59]</sup>。Arai等<sup>[61]</sup>在小鼠ES中利用shRNA敲低*POLQ*基因并联合DNA-PK抑制剂M3814, 提高双等位基因敲入效率15倍。另外, NVB与M3814联用可协调提高双等位基因敲入效率<sup>[61]</sup>。另一项研究表明, 在*LIG4*<sup>-/-</sup> HEK293细胞中, 用RP-6685敲低*POLQ*基因, 靶向整合效率提高了2倍<sup>[9]</sup>。综上所述, 通过敲除或用小分子抑制剂阻断Polθ介导的Alt-EJ通路有助于提高HR通路活性, 增加外源基因靶向整合效率。

Table 2 Inhibition of Pol $\theta$  improves target integration efficiency表2 抑制Pol $\theta$ 提高HR效率

Pol $\theta$ 抑制方法	联合方法/试剂	模型系统	靶向整合提高情况	基因编辑系统	参考文献
Pol $\theta$ KO	Ku80 <sup>-/-</sup>	小鼠ES细胞	RAD54基因座: 23% Pim1基因座: 3倍	CRISPR/Cas9	[58]
	NU-7441		RAD54基因座: 外显子9提升9%; 外显子18: 提升11%		
Pol $\theta$ KO	LIG4 <sup>-/-</sup>	B淋巴细胞白血病细胞	基因靶向效率提高99.4%	CRISPR/Cas9	[60]
Pol $\theta$ KO	/	衣藻	提高28%~97%	CRISPR/Cas9	[59]
Pol $\theta$ KD	M3814	小鼠ES细胞	提高敲入效率15倍	CRISPR/Cas9	[61]
新生霉素(NVB)	M3814	小鼠ES细胞	提高双等位基因敲入效率	CRISPR/Cas9	[61]
Pol $\theta$ KD	RP-6685	LIG4 <sup>-/-</sup> HEK293细胞	提高2倍	CRISPR/Cas9	[9]

KO: 敲除 (knockout); KD: 敲低 (knockdown)。

## 7 总结与展望

Pol $\theta$ 是Alt-EJ修复通路的关键分子,生理条件下主要参与维持基因组稳定性,而其异常高表达则会促进多种癌症的发生发展。现阶段,科学家已经研发多种靶向Pol $\theta$ 的小分子抑制剂,发现阻断Alt-EJ修复通路可增加肿瘤细胞对放疗或化疗敏感性,逆转部分肿瘤的PARPi耐药。因此,Pol $\theta$ 有望成为癌症治疗的新靶点,同时也可作为肿瘤免疫治疗高反应的潜在生物标志物。除此之外,抑制Pol $\theta$ 活性还可以提高外源基因发生同源重组的效率,在基因靶向整合方面具有潜在应用前景。相信随着人们对Pol $\theta$ 介导Alt-EJ通路机制研究的不断深入,越来越多的相关应用会在生物制药领域发挥重要的有益作用。

## 参 考 文 献

- Allera-Moreau C, Rouquette I, Lepage B, *et al.* DNA replication stress response involving PLK1, CDC6, POLQ, RAD51 and CLASPIN upregulation prognoses the outcome of early/mid-stage non-small cell lung cancer patients. *Oncogenesis*, 2012, **1**(10): e30
- Pillaire M J, Selves J, Gordien K, *et al.* A 'DNA replication' signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. *Oncogene*, 2010, **29**(6): 876-887
- Leoncini E, Ricciardi W, Cadoni G, *et al.* Adult height and head and neck cancer: a pooled analysis within the INHANCE consortium. *Eur J Epidemiol*, 2014, **29**(1): 35-48
- Lemée F, Bergoglio V, Fernandez-Vidal A, *et al.* DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(30): 13390-13395
- Koole W, Van Schendel R, Karambelas A E, *et al.* A polymerase theta-dependent repair pathway suppresses extensive genomic instability at endogenous G4 DNA sites. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3216
- Ceccaldi R, Liu J C, Amunugama R, *et al.* Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol $\theta$ -mediated repair. *Nature*, 2015, **518**(7538): 258-262
- Zhou J, Gelot C, Pantelidou C, *et al.* A first-in-class polymerase theta inhibitor selectively targets homologous-recombination-deficient tumors. *Nat Cancer*, 2021, **2**(6): 598-610
- Zatreanu D, Robinson H M R, Alkhatib O, *et al.* Pol $\theta$  inhibitors elicit BRCA-gene synthetic lethality and target PARP inhibitor resistance. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 3636
- Bubenik M, Mader P, Mochirian P, *et al.* Identification of RP-6685, an orally bioavailable compound that inhibits the DNA polymerase activity of pol $\theta$ . *J Med Chem*, 2022, **65**(19): 13198-13215
- Kruchinin A A, Makarova A V. Multifaceted nature of DNA polymerase  $\theta$ . *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(4): 3619
- Schrempf A, Slysokova J, Loizou J I. Targeting the DNA repair enzyme polymerase  $\theta$  in cancer therapy. *Trends Cancer*, 2021, **7**(2): 98-111
- Kent T, Chandramouly G, Mcdevitt S M, *et al.* Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase  $\theta$ . *Nat Struct Mol Biol*, 2015, **22**(3): 230-237
- Wyatt D W, Feng W, Conlin M P, *et al.* Essential roles for polymerase  $\theta$ -mediated end joining in the repair of chromosome breaks. *Mol Cell*, 2016, **63**(4): 662-673
- Zahn K E, Jensen R B. Polymerase  $\theta$  coordinates multiple intrinsic enzymatic activities during DNA repair. *Genes (Basel)*, 2021, **12**(9): 1310
- Chang H H Y, Pannunzio N R, Adachi N, *et al.* Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol cell Biol*, 2017, **18**(8): 495-506
- Ranjha L, Howard S M, Cejka P. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma*, 2018, **127**(2): 187-214
- Blasiak J. Single-strand annealing in cancer. *Int J Mol Sci*, 2021,

- 22(4): 2167
- [18] Mansour WY, Rhein T, Dahm-Daphi J. The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(18): 6065-6077
- [19] Mateos-Gomez PA, Gong F, Nair N, *et al.* Mammalian polymerase  $\theta$  promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature*, 2015, **518**(7538): 254-257
- [20] Ahrabi S, Sarkar S, Pfister S X, *et al.* A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(12): 5743-5757
- [21] Deriano L, Stracker T H, Baker A, *et al.* Roles for NBS1 in alternative nonhomologous end-joining of V(D)J recombination intermediates. *Mol Cell*, 2009, **34**(1): 13-25
- [22] Lu G, Duan J, Shu S, *et al.* Ligase I and ligase III mediate the DNA double-strand break ligation in alternative end-joining. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(5): 1256-1260
- [23] Schimmel J, Van Schendel R, Den Dunnen J T, *et al.* Templated insertions: a smoking gun for polymerase theta-mediated end joining. *Trends Genet*, 2019, **35**(9): 632-644
- [24] Haince J F, McDonald D, Rodrigue A, *et al.* PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem*, 2008, **283**(2): 1197-1208
- [25] Anand R, Ranjha L, Cannavo E, *et al.* Phosphorylated CtIP functions as a co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 endonuclease in DNA end resection. *Mol Cell*, 2016, **64**(5): 940-950
- [26] Audebert M, Salles B, Calsou P. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem*, 2004, **279**(53): 55117-55126
- [27] Wang M, Wu W, Wu W, *et al.* PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(21): 6170-6182
- [28] Truong L N, Li Y, Shi L Z, *et al.* Microhomology-mediated end joining and homologous recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(19): 7720-7725
- [29] Faridounnia M, Folkers G E, Boelens R. Function and interactions of ERCC1-XPF in DNA damage response. *Molecules*, 2018, **23**(12): 3205
- [30] Li J, Ko J M, Dai W, *et al.* Depletion of DNA polymerase theta inhibits tumor growth and promotes genome instability through the cGAS-STING-ISR pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel)*, 2021, **13**(13): 3204
- [31] Liang L, Deng L, Nguyen S C, *et al.* Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(10): 3297-3310
- [32] Prasad R, Longley M J, Sharief F S, *et al.* Human DNA polymerase theta possesses 5'-dRP lyase activity and functions in single-nucleotide base excision repair *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(6): 1868-1877
- [33] Wang Z, Song Y, Li S, *et al.* DNA polymerase  $\theta$  (POLQ) is important for repair of DNA double-strand breaks caused by fork collapse. *J Biol Chem*, 2019, **294**(11): 3909-3919
- [34] Beagan K, Armstrong R L, Witsell A, *et al.* *Drosophila* DNA polymerase theta utilizes both helicase-like and polymerase domains during microhomology-mediated end joining and interstrand crosslink repair. *PLoS Genet*, 2017, **13**(5): e1006813
- [35] Muzzini D M, Plevani P, Boulton S J, *et al.* *Caenorhabditis elegans* POLQ-1 and HEL-308 function in two distinct DNA interstrand cross-link repair pathways. *DNA Repair (Amst)*, 2008, **7**(6): 941-950
- [36] Belan O, Sebald M, Adamowicz M, *et al.* POLQ seals post-replicative ssDNA gaps to maintain genome stability in BRCA-deficient cancer cells. *Mol Cell*, 2022, **82**(24): 4664-4680
- [37] Yi G, Sung Y, Kim C, *et al.* DNA polymerase  $\theta$ -mediated repair of high LET radiation-induced complex DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, 2023, **51**(5): 2257-2269
- [38] Yoshimura M, Kohzaki M, Nakamura J, *et al.* Vertebrate POLQ and POLbeta cooperate in base excision repair of oxidative DNA damage. *Mol Cell*, 2006, **24**(1): 115-125
- [39] Goff J P, Shields D S, Seki M, *et al.* Lack of DNA polymerase theta (POLQ) radiosensitizes bone marrow stromal cells *in vitro* and increases reticulocyte micronuclei after total-body irradiation. *Radiat Res*, 2009, **172**(2): 165-174
- [40] Van Kregten M, De Pater S, Romeijn R, *et al.* T-DNA integration in plants results from polymerase- $\theta$ -mediated DNA repair. *Nat Plants*, 2016, **2**(11): 16164
- [41] Plecenikova A, Slaninova M, Riha K. Characterization of DNA repair deficient strains of *Chlamydomonas reinhardtii* generated by insertional mutagenesis. *PLoS One*, 2014, **9**(8): e105482
- [42] Lv Q, Han S, Wang L, *et al.* TEB/POLQ plays dual roles in protecting *Arabidopsis* from NO-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 2022, **50**(12): 6820-6836
- [43] Yoon J H, McArthur M J, Park J, *et al.* Error-prone replication through UV lesions by DNA polymerase  $\theta$  protects against skin cancers. *Cell*, 2019, **176**(6): 1295-1309. e1215
- [44] Higgins G S, Harris A L, Prevost R, *et al.* Overexpression of POLQ confers a poor prognosis in early breast cancer patients. *Oncotarget*, 2010, **1**(3): 175-184
- [45] Ceccaldi R, Rondinelli B, D'andrea A D. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol*, 2016, **26**(1): 52-64
- [46] Lord C J, Ashworth A. Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers. *Nat Med*, 2013, **19**(11): 1381-1388
- [47] Li S, Topatana W, Juengpanich S, *et al.* Development of synthetic lethality in cancer: molecular and cellular classification. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, **5**(1): 241
- [48] Caracciolo D, Riillo C, Di Martino M T, *et al.* Alternative non-homologous end-joining: error-prone DNA repair as cancer's achilles' heel. *Cancers (Basel)*, 2021, **13**(6): 1392



- [49] Mardis E R. Neoantigens and genome instability: impact on immunogenomic phenotypes and immunotherapy response. *Genome Med*, 2019, **11**(1): 71
- [50] Härtlova A, Erttmann S F, Raffi F A, *et al.* DNA damage primes the type I interferon system *via* the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. *Immunity*, 2015, **42**(2): 332-343
- [51] Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, *et al.* Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*, 2017, **17**(2): 97-111
- [52] Patterson-Fortin J, Jadhav H, Pantelidou C, *et al.* Polymerase  $\theta$  inhibition activates the cGAS-STING pathway and cooperates with immune checkpoint blockade in models of BRCA-deficient cancer. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 1390
- [53] Burdak-Rothkamm S, Rothkamm K. DNA Damage repair deficiency and synthetic lethality for cancer treatment. *Trends Mol Med*, 2021, **27**(1): 91-92
- [54] Zatreanu D, Robinson H M R, Alkhatib O, *et al.* Pol $\theta$  inhibitors elicit BRCA-gene synthetic lethality and target PARP inhibitor resistance. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 3636
- [55] Rodriguez-Berriguete G, Ranzani M, Prevo R, *et al.* Small-molecule Pol $\theta$  inhibitors provide safe and effective tumor radiosensitization in preclinical models. *Clin Cancer Res*, 2023, **29**(8): 1631-1642
- [56] Patterson-Fortin J, Bose A, Tsai W C, *et al.* Targeting DNA repair with combined inhibition of NHEJ and MMEJ induces synthetic lethality in TP53-mutant cancers. *Cancer Res*, 2022, **82**(20): 3815-3829
- [57] Bubenik M, Mader P, Mochirian P, *et al.* Identification of RP-6685, an orally bioavailable compound that inhibits the DNA polymerase activity of Pol $\theta$ . *J Med Chem*, 2022, **65**(19): 13198-13215
- [58] Zelensky A N, Schimmel J, Kool H, *et al.* Inactivation of Pol  $\theta$  and C-NHEJ eliminates off-target integration of exogenous DNA. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 66
- [59] Sizova I, Kelterborn S, Verbenko V, *et al.* Chlamydomonas POLQ is necessary for CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *G3 (Bethesda)*, 2021, **11**(7): jkab114
- [60] Saito S, Maeda R, Adachi N. Dual loss of human POLQ and LIG4 abolishes random integration. *Nat Commun*, 2017, **8**: 16112
- [61] Arai D, Nakao Y. Efficient biallelic knock-in in mouse embryonic stem cells by *in vivo*-linearization of donor and transient inhibition of DNA polymerase  $\theta$ /DNA-PK. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 18132

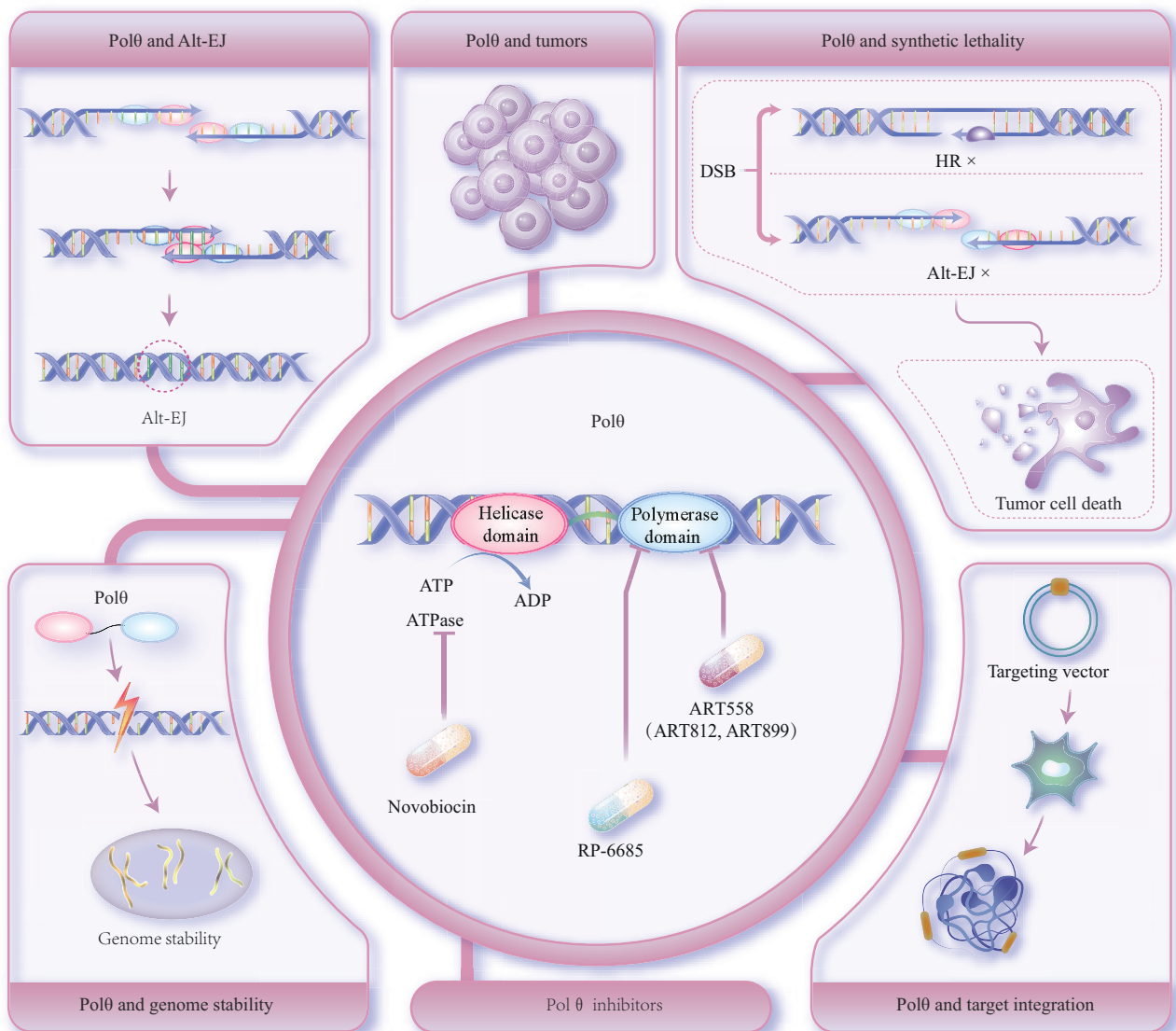
## DNA Polymerase $\theta$ : a Multifunctional and Error-prone DNA End Repair Enzyme\*

WANG Yao<sup>1)</sup>, CHEN Guo-Jiang<sup>2)</sup>, FENG Jian-Nan<sup>2)</sup>, SHI Yan-Chun<sup>1)\*\*</sup>,  
WANG Jing<sup>2)\*\*</sup>, ZHENG Yuan-Qiang<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Key Laboratory of Molecular Biology of Inner Mongolia Autonomous Region, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010058, China;

<sup>2)</sup>State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

### Graphical abstract



\* This work was supported by grants from Natural Science Foundation of Beijing (7222262) and The National Natural Science Foundation of China (31900676).

\*\* Corresponding author.

SHI Yan-Chun. Tel: 86-13948101150, E-mail: yeshi5388@163.com

WANG Jing. Tel: 86-13161648702, E-mail: jingw\_biomed@163.com

ZHENG Yuan-Qiang. Tel: 86-13948101570, E-mail: zhengyq688@163.com

Received: May 22, 2023 Accepted: July 20, 2023

**Abstract** DNA polymerase theta (Pol $\theta$ ), also known as DNA polymerase  $\theta$ , is the member of the DNA polymerase A family and plays a crucial role in the repair of DNA double-strand breaks (DSB). Pol $\theta$  has 3 distinct structural domains: the N-terminal helicase-like domain with a conserved sequence, the C-terminal polymerase domain, and the central domain, which is a disordered sequence connecting these two regions. Notably, Pol $\theta$  is the only known polymerase in eukaryotes that possesses helicase activity. However, it is also an error-prone polymerase. When DNA DSBs occur, a specialized network consisting of at least 4 pathways, including classical-non homologous end joining (C-NHEJ), homologous recombination (HR), single-strand annealing (SSA), and alternative-end joining (Alt-EJ), is responsible for repairing DNA damage caused by DSBs. In the absence of major DNA repair pathways like HR, cells rely on Alt-EJ pathway mediated by Pol $\theta$  to repair damaged DNA and maintain genomic stability. Nevertheless, due to the low fidelity of Pol $\theta$ , Alt-EJ repair often leads to errors. Depletion of Pol $\theta$  has shown to increase DSB formation and compromise genomic stability. Conversely, overexpression of Pol $\theta$  has been associated with increased DNA damage markers and impaired cell cycle progression. As a result, the impact of Pol $\theta$  on genome stability remains controversial. Furthermore, overexpression of Pol $\theta$  is frequently observed in cancer and is associated with a characteristic mutational signature and poor prognosis. Depleting Pol $\theta$  in an HR-deficient background has been shown to impair cell viability, suggesting a synthetic lethal (SL) relationship between Pol $\theta$  and HR factors. In recent years, targeted chemotherapy drugs that inhibit tumor growth have gained significant attention. However, off-target effects and drug resistance pose challenges for clinical application, particularly with poly-ADP-ribose polymerase inhibitor (PARPi). Blocking Pol $\theta$  activity in HR-deficient tumor cells has been found to reverse PARPi resistance, making Pol $\theta$  a very promising therapeutic target in cancer treatment. The availability of crystal structures for both helicase and polymerase domain has facilitated the design of potent inhibitors of Pol $\theta$ . Currently, several highly specific and effective small molecule inhibitors targeting Pol $\theta$ , such as Novobiocin, RP-6685, and ART558, have been reported to effectively block various cancers with HR deficiency. The initial success of these inhibitors points to new directions for treating *BRCA1/2*-mutated tumors. Additionally, reducing the Alt-EJ repair pathway mediated by Pol $\theta$  can improve HR repair efficiency and increase the chance of exogenous gene target integration (TI), suggesting potential new applications for Pol $\theta$  inhibitors. This article reviews the recent research progress on the molecular function of Pol $\theta$  and its involvement in the Alt-EJ pathway modification mechanism, providing insights for a deeper understanding of this field.

**Key words** Pol $\theta$ , DNA double-strand break repair, genome stability, tumor suppression, target integration

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0201