

## DNA-Reparatur

# DNA-Protein-Crosslinks: Schaden und Schutz zugleich

SOPHIE DÜRAUER, MAXIMILIAN DONSBACH, JULIAN STINGELE  
GENZENTRUM UND DEPARTMENT BIOCHEMIE, LMU MÜNCHEN

**Covalent DNA-protein crosslinks (DPCs) are generally toxic DNA lesions that must be repaired to prevent premature aging and cancer formation. However, DPCs formed by the protein HMCES are important to stabilize abasic sites during replication, thereby preventing the formation of dangerous DNA breaks. Here, we discuss the principles of HMCES-DPC formation and resolution, which encompasses both proteolytic and non-proteolytic mechanisms.**

DOI: 10.1007/s12268-023-2018-4  
© Die Autorinnen und Autoren 2023

■ Die DNA aller Zellen wird kontinuierlich und auf unterschiedlichste Art und Weise beschädigt. DNA-Schäden haben diverse exogene und körpereigene Ursprünge und müssen permanent repariert werden, um die erfolgreiche Transkription und Replikation der DNA nicht zu gefährden. Dementsprechend haben Zellen effiziente DNA-Reparaturmechanismen entwickelt, welche die Stabilität des Genoms und damit der Erbinformation sicherstellen.

DNA-Protein-Crosslinks (DPCs) sind eine Form von DNA-Schaden, die entsteht, wenn ein kovalenter Komplex zwischen einem Protein und der DNA gebildet wird. DPCs können sowohl durch enzymatische als auch nicht enzymatische Prozesse entstehen und sind äußerst vielfältig, da verschiedenste Proteine über eine große Anzahl unterschiedlicher chemischer Bindungen mit der DNA verknüpft werden können. Eine rele-

vante exogene Quelle von DPCs sind weit verbreitete Chemotherapeutika. Wirkstoffe wie Camptothecin oder Etoposid stabilisieren kovalente enzymatische Intermediate, die durch Topoisomerasen mit der DNA gebildet werden. Im Gegensatz dazu führen platinbasierte Crosslinker oder metabolische Aldehyde zum unspezifischen Verknüpfen von Chromatinproteinen [1].

### HMCES-DNA-Protein-Crosslinks

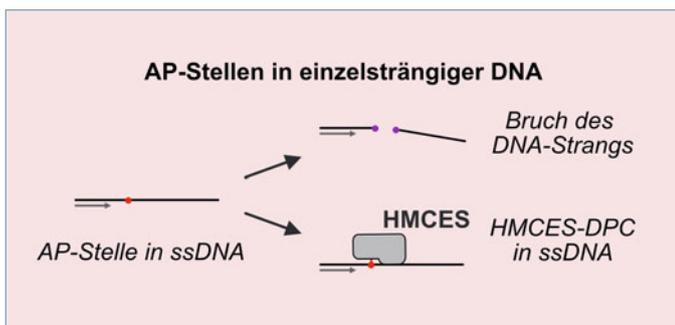
DPCs sind gefährlich, da sie durch ihre schiere Größe wichtige zelluläre Prozesse, wie die Replikation oder die Transkription, blockieren. Allerdings sind nicht alle DPCs schädlich. Bestimmte enzymatische DPCs werden gezielt von Zellen gebildet und haben wichtige Funktionen. Die kovalente Verknüpfung von Proteinen mit abasischen (AP) Stellen in der DNA verhindert DNA-Doppelstrangbrüche. AP-Stellen entstehen, wenn

beschädigte Nucleobasen von spezialisierten DNA-Glykosylasen erkannt und entfernt werden [2]. Alternativ können AP-Stellen auch durch spontane Hydrolyse der glykosidischen Bindung zwischen Nucleobase und Desoxyribose entstehen. AP-Stellen sind instabil und können über eine spontane  $\beta$ -Eliminierungsreaktion zu DNA-Strangbrüchen führen. In doppelsträngiger DNA wird die Inzision der AP-Stellen sogar gefördert und durch AP-Endonukleasen katalysiert. Danach wird die DNA repariert, indem der gegenüberliegende DNA-Strang als Vorlage verwendet wird. Die enzymatische oder spontane Inzision einer AP-Stelle in einzelsträngiger DNA, z. B. während der Replikation, ist allerdings sehr gefährlich, da dies zu einem kompletten Bruch des DNA-Doppelstrangs führen würde (**Abb. 1**).

Das konservierte humane Protein HMCES verhindert dies, indem es einen DPC mit AP-Stellen spezifisch in einzelsträngiger DNA bildet (**Abb. 1**, [3]). Die Aminogruppe des N-terminalen Cysteinrests von HMCES reagiert mit der AP-Stelle und führt zur Entstehung einer intermediären Schiff'schen Base, welche in einem zweiten Schritt mit der Sulfhydrylgruppe des Cysteins einen stabilen Thiazolidinring bildet [4, 5]. Obwohl HMCES-DPCs eine wichtige Rolle beim Schutz von AP-Stellen in einzelsträngiger DNA spielen, müssen sie auch wieder entfernt werden. Proteolytische und nicht proteolytische Mechanismen können HMCES-DPCs auflösen, um die Reparatur der AP-Stelle und den Fortgang der Replikation zu ermöglichen.

### Autokatalytische Freisetzung von HMCES-DPCs

Neben dem aktiven Cystein befindet sich im aktiven Zentrum von HMCES ein von Bakterien bis zum Menschen konserviertes Glutamat, Glu127, welches aber nur eine vernachlässigbare Rolle bei der Bildung des DPCs spielt [4, 5]. Allerdings ist Glu127 essenziell, um die Rückreaktion zu katalysieren, die Auflösung des DPCs [4, 5]. Ob die AP-Stelle nach Auflösung des Thiazolidinring freige-

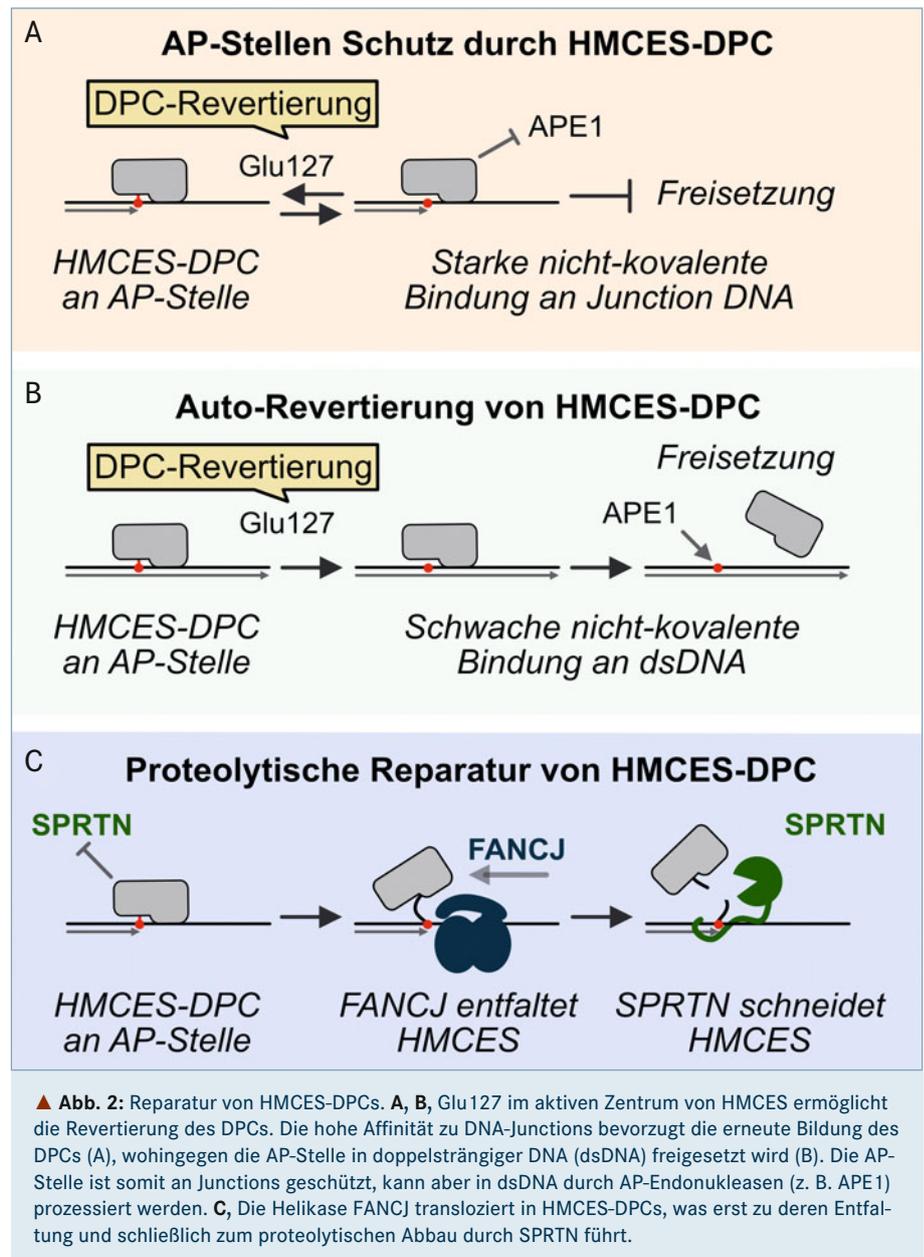


◀ **Abb. 1:** Funktion von HMCES-DPCs. HMCES verhindert enzymatische oder spontane Inzisionen von abasischen (AP) Stellen in einzelsträngiger DNA (ssDNA) durch Bildung eines kovalenten DPCs mit der AP-Stelle.

setzt wird, oder ob HMCES sich erneut mit der AP-Stelle kovalent verbindet, wird durch die Struktur der umgebenden DNA bestimmt [5]. HMCES hat eine hohe Affinität zu AP-Stellen in einzelsträngiger DNA oder an DNA-Junctions – Übergängen von einzelsträngiger zu doppelsträngiger DNA –, deshalb überwiegt in dieser Situation die erneute Ausbildung des DPCs gegenüber der Freisetzung der AP-Stelle (**Abb. 2A**). Das ist biologisch sinnvoll, da HMCES so die Inzision von AP-Stellen in einem einzelsträngigen Kontext verhindern kann. Spezialisierte Transläsions-Polymerasen oder *template switching*-Mechanismen können intakte HMCES-DPCs überwinden, die sich daraufhin in doppelsträngiger DNA befinden, wo keine Notwendigkeit mehr besteht, die AP-Stelle zu schützen [6]. Da HMCES nur geringe Affinität zu doppelsträngiger DNA zeigt, wird die AP-Stelle freigesetzt, sobald Glu127 den Thiazolidinring gelöst hat, was die Reparatur durch AP-Endonukleasen und den Basenexzision-Reparaturweg ermöglicht (**Abb. 2B**, [2]).

### Proteolytische DNA-Protein-Crosslink-Reparatur

Alternativ zur autokatalytischen Freisetzung können HMCES-DPCs auch durch generelle proteolytische DPC-Reparaturmechanismen repariert werden. Die proteolytische DPC-Reparatur ist an die DNA-Replikation gekoppelt und wird eingeleitet, wenn die DNA-Polymerase daran scheitert, über den DPC hinweg zu synthetisieren [7]. Die Proteolyse des mit der DNA verknüpften Proteinaddukts kann sowohl über proteasomalen Abbau stattfinden als auch über die spezifische DPC-Protease SPRTN [8]. Für Zellen ist es essenziell, die Aktivität solcher Proteasen präzise zu regulieren, um den unkontrollierten Verdau anderer Proteine zu verhindern. Humanes SPRTN besitzt eine N-terminale Metalloproteasedomäne, gefolgt von zwei DNA-Bindedomänen, der *zinc-binding domain* (ZBD) und der *basic region* (BR). ZBD und BR spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung der proteolytischen Aktivität von SPRTN. ZBD und BR besitzen eine unterschiedliche DNA-Spezifität. Die ZBD bindet einzelsträngige DNA, während die BR doppelsträngige DNA präferiert. SPRTN wird aktiviert, wenn beide DNA-Bindedomänen mit dem Substrat interagieren können [9]. Dies ist der Fall, wenn sich der DPC in einem DNA-Kontext befindet, in dem sowohl einzelsträngige als auch doppelsträn-



gige Elemente vorhanden sind. Eine solche DNA-Junction entsteht, wenn die DNA-Polymerase während der Replikation am DPC anhält [7]. Die aktivierende DNA-Struktur ist aber unterhalb des DPCs verborgen und für SPRTN nicht zugänglich. Deshalb wird nun die Aktivität eines weiteren Enzyms benötigt, der Helikase FANCI [6]. FANCI bindet am einzelsträngigen Teil der DNA-Junction und transloziert mittels seiner ATPase-Aktivität in das Proteinaddukt, was zu dessen Entfaltung führt. Dadurch wird die aktivierende DNA-Struktur unterhalb des DPC für SPRTN zugänglich, welches nun das entfaltete Proteinaddukt spaltet (**Abb. 2C**). Transläsions-Polymerasen synthetisieren

anschließend über das übrigbleibende Peptidaddukt, dessen endgültiges Schicksal nicht geklärt ist [6].

Der jeweilige Beitrag des proteolytischen Abbaus und der autokatalytischen Freisetzung zur Reparatur von HMCES-DPCs ist Thema aktueller Forschungsprojekte. In *Xenopus laevis*-Eiextrakten werden HMCES-DPCs hauptsächlich durch SPRTN abgebaut [10], wohingegen die autokatalytische Freisetzung in humanen Zellen eine wichtigere Rolle zu spielen scheint [11].

Die Forschung zu DPCs und ihrer Reparatur hat in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse über deren Rolle für die Genomstabilität und den Wirkmechanismus

verschiedener DPC-induzierender Chemotherapeutika hervorgebracht. Ob weitere Proteine, wie HMCES, gezielt DPCs mit wichtigen physiologischen Funktionen bilden, ist eine spannende Frage für die Zukunft. ■

## Literatur

- [1] Weickert P, Stingle J (2022) DNA-Protein Crosslinks and Their Resolution. *Annu Rev Biochem* 91: 157–181
- [2] Amidon KM, Eichman BF (2020) Structural biology of DNA abasic site protection by SRAP proteins. *DNA Repair* 94: 102903
- [3] Mohni KN, Wessel SR, Zhao R et al. (2019) HMCES Maintains Genome Integrity by Shielding Abasic Sites in Single-Strand DNA. *Cell* 176: 144–153.e13
- [4] Paulin KA, Cortez D, Eichman BF (2022) The SOS response-associated peptidase (SRAP) domain of YedK catalyzes ring opening of abasic sites and reversal of its DNA-protein cross-link. *J Biol Chem* 298: 102307
- [5] Donsbach M, Dürauer S, Grünert F et al. (2023) A non-proteolytic release mechanism for HMCES-DNA-protein crosslinks. *EMBO J*, DOI: 10.15252/embj.2022113360
- [6] Yaneva D, Sparks JL, Donsbach M et al. (2023) The FANCD1 helicase unfolds DNA-protein crosslinks to promote their repair. *Mol Cell* 83: 43–56.e10
- [7] Larsen NB, Gao AO, Sparks JL et al. (2019) Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair by SPRTN and the Proteasome in *Xenopus* Egg Extracts. *Mol Cell* 73: 574–588.e7
- [8] Stingle J, Bellelli B, Alte F et al. (2016) Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN. *Mol Cell* 64: 688–703
- [9] Reinking HK, Kang HS, Götz MJ et al. (2020) DNA Structure-Specific Cleavage of DNA-Protein Crosslinks by the SPRTN Protease. *Mol Cell* 80: 102–113.e6
- [10] Semlow DR, MacKrell VA, Walter JC (2022) The HMCES DNA-protein cross-link functions as an intermediate in DNA interstrand cross-link repair. *Nat Struct Mol Biol* 29: 451–462
- [11] Rúa-Fernandez J, Lovejoy CA, Mehta KPM et al. (2023) Self-reversal facilitates the resolution of HMCES-DNA protein crosslinks in cells. *bioRxiv*, DOI: 10.1101/2023.06.14.544844

**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:

Prof. Dr. Julian Stingle  
 Genzentrum und Department Biochemie  
 Ludwig-Maximilians-Universität München  
 Feodor-Lynen-Straße 25  
 D-81377 München  
 stingle@genzentrum.lmu.de

## AUTORINNEN UND AUTOREN



### Sophie Dürauer

2015–2018 Bachelorstudium Biomedizinische Analytik, FH Campus Wien, Österreich. 2018–2020 Masterstudium Tissue Engineering and Regenerative Medicine, FH Technikum Wien, Österreich. Seit 2021 Doktorandin bei Prof. Dr. J. Stingle, LMU München.



### Maximilian Donsbach

2015–2019 Bachelorstudium Chemie, LMU München. 2019–2022 Masterstudium Biochemie, LMU München. Seit 2022 Doktorand bei Prof. Dr. J. Stingle, LMU München.



### Julian Stingle

2004–2010 Studium der Biologie, Universität Konstanz. 2010–2014 Doktorand bei Prof. Dr. S. Jentsch, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 2014–2017 Post-Doc bei Prof. Dr. S. Boulton, Francis Crick Institute, London, UK. Seit 2017 Professor für Zelluläre Biochemie, LMU München.