

CRL4 泛素化酶在卵巢癌中的功能和突变研究*

唐子执^{1,2}, 王海斌^{1,2}, 曾 鸣^{1,2}, 刘 聪^{1,2}, 李德华^{1,2,△}

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041)

【摘要】 目的 研究泛素化酶 CRL4 蛋白复合体家族成员 CRL4-WD40 重复序列结构域蛋白 70(WDR70)在卵巢癌细胞中的 DNA 修复功能,以及卵巢癌组织中该泛素化酶基因的突变规律。**方法** 利用免疫荧光方法,检测 CRL4 骨架蛋白 DDB1 及 WDR70 基因特异性沉默的卵巢癌细胞与其对应的对照组细胞在化疗药物或放射线照射诱导产生 DNA 双链断裂后,组蛋白 H2AX(γ H2AX)及单链 DNA 结合蛋白 32(RPA32)磷酸化灶点显示的差异;BrdU 标记和染色实验检测 WDR70 基因对 DNA 复制是否存在影响,同时利用免疫组化染色检测卵巢癌组织临床病理标本及正常卵巢组织标本中的 WDR70 和组蛋白 H2B 单泛素化(uH2B)染色差异,以阐明 CRL4 的 DNA 损伤应答特征,RT-PCR 测定卵巢癌组织中 WDR70 的基因表达水平,并采用 DNA 测序确定 WDR70 突变位点。**结果** 免疫荧光染色结果显示,CRL4-WDR70 的不同蛋白亚基(DDB1、WDR70)在细胞周期检验点激活和 uH2B 介导的 DNA 末端回切过程中起着不同的作用:DDB1 参与以上两个机制的调控,而 WDR70 只促进末端回切、RPA32 在 DNA 断裂点的招募和同源重组修复。BrdU 标记和染色结果显示 WDR70 基因对 DNA 复制并不存在影响。免疫组化结果显示,卵巢癌组织临床病理标本及正常卵巢组织标本中的 WDR70 和 uH2B 表达存在差异。RT-PCR 结果显示 WDR70 基因的全长、5' 和 3' 转录本水平在 50% 的卵巢癌组织中水平减低,出现多处外显子突变位点。**结论** CRL4 在 DNA 修复过程中具有促进 H2B 单泛素化、促进 DNA 末端回切和激活细胞周期检验点等多种重要功能,是维持基因组稳定性、遏阻卵巢癌发生的重要抗癌机制。

【关键词】 H2B 单泛素化 CRL4 DNA 损伤应答 卵巢癌

DNA Repair Function and Mutation of an H2B Monoubiquitination Factor WDR70 in Ovarian Cancer TANG Zi-zhi^{1,2}, WANG Hai-bin^{1,2}, ZENG Ming^{1,2}, LIU Cong^{1,2}, LI De-hua^{1,2,△}. 1. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: 562372162@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the roles of enzyme DCAF protein-DNA damage-binding protein 1 (DDB1)/cullin4 (CRL4) complex family members CRL4-WD40 repeat domain protein 70 (WDR70) in DNA repair process and its mutation in ovarian cancer. **Methods** Immunofluorescent assay was employed to measure H2AX (γ H2AX) and phosphorylated replication protein A2 (RPA32) formed in siDDB1 or siWDR70 ovarian cancer cells after the treatments of chemical medicine and radioactive therapy. 5-BrdU immunohistochemical staining was used to explore the function of WDR70 in DNA replication. The expressions of WDR70 and histone protein H2B monoubiquitination (uH2B) was measured by immunohistochemistry, the function of DNA repair, expression and mutations of CRL4 in ovarian cancer were detected by semi-quantitative PCR and DNA sequencing. **Results** Immunofluorescent assay indicated that distinct subunits of CRL4 played different roles in checkpoint activation and H2B-monoubiquitination-dependent homologous recombination, while the scaffold subunit DDB1 participated in both processes, WDR70 was only required for DNA end resection, chromatin loading of RPA32 and HR. The dose of WDR70 was not effect on DNA replication. Ovarian cancer had different expression of WDR70 and uH2B compared with normal tissue, transcripts of WDR70 was diminished or truncated in 50% of ovarian cancer, which corresponded to multiple mutations. **Conclusion** CRL4 ubiquitin ligase plays multiple roles in DNA repair and is critical for genome stability. It may be an potential anti-cancer barrier against ovarian malignancies.

* 四川省科技厅应用基础计划项目(No. 2017FZ0034)和四川省科技厅软科学计划项目(No. 2017ZR0169)资助

△ 通信作者, E-mail: 562372162@qq.com

【Key words】 H2B monoubiquitination CRL4 DNA damage responses Ovarian cancer

人体细胞的基因组 DNA 会因为各种物理化学因素导致突变积累,造成细胞死亡、肿瘤发生和器官异常发育^[1-3]。真核细胞进化出一系列的分子机制以快速消除异常的 DNA 结构并维持基因组的稳定性^[4]。其中,依赖 ATM 和 ATR 激酶的细胞周期检查点机制可以在极短时间内识别 DNA 损伤,激活 CHK1 和 CHK2 检验点,使细胞周期停滞,防止损伤的 DNA 进入复制或丝分裂期^[5-7]。对 DNA 双链断裂而言,同源重组修复是维持基因组稳定性最重要的修复方式,它与非同源末端链接修复方式(NHEJ)相竞争,该过程中核酸酶对 DNA 末端进行回切加工,形成由单链 DNA 结合蛋白(RPA)包裹的单链 DNA 纤维,再由重组酶 RAD51 介导有效的同源重组修复^[8]。DNA 末端回切是同源重组的重要调控步骤,一旦回切启动,NHEJ 就不能发挥功能^[9-10]。

CRL4 是一类泛素化酶,由 CUL4-DDB1 骨架蛋白和一组底物适配蛋白构成^[11]。近期研究发现 CRL4 是调控 DNA 复制和修复的重要因子,CRL4-WD40 重复序列结构域蛋白 70(WDR70)调控组蛋白 H2B 单泛素化(uH2B)修饰、DNA 末端回切和同源重组修复^[12]。目前公认的乳腺癌、卵巢癌和子宫内膜癌存在频繁的同源重组修复缺陷(HRD),均表现出基因组大规模重组和高突变倾向^[13-14]。目前还有接近一半的 HRD 患者未发现致病基因,可能有未知的同源重组修复通路的突变参与这些肿瘤的发生^[15]。

本研究分析了 CRL4 泛素化酶的不同亚基在卵巢癌细胞中的 DNA 修复功能,针对具有组蛋白修饰和同源重组修复功能的 WDR70 进行了 mRNA 水平的突变分析,以期揭示新发现的 CRL4 泛素化酶介导的损伤修复机制与卵巢癌发生间的重要联系。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 培养液 (Sigma),胎牛血清 (FBS, Gibco),0.25% 胰蛋白酶 (Sigma),TritonX-100 (Keygen),反转录酶 (Promega),Taq 酶 (Roche),小干扰 RNA (siRNA) 转染试剂 (TurboFect™ Transfection Reagent, Thermo),喜树碱 (CPT, Sigma),40 g/L 多聚甲醛 (PFA, Sigma),5-溴脱氧

尿嘧啶核苷 (BrdU, Sigma),磷酸化组蛋白 H2AX (rH2AX) 鼠抗人抗体 (Cell Signaling),WDR70 兔抗人抗体 (Bethyl),噻唑蓝 (MTT, Sigma),RPA32 丝氨酸 33 的磷酸化位点 (RPA32-pS33) 兔抗人抗体 (NOVUS),鼠抗人 uH2B 抗体 (Abnova),荧光素 Cy3 标记抗兔二抗 (Sigma),荧光素 FITC 标记抗鼠二抗 (Santa),4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, Vector),荧光显微镜 (Olympus, BX51) 等。293T 人肾上皮细胞株,SKOV3、OVCAR-8TR 卵巢癌细胞株和宫颈癌细胞 HeLa 为本实验室保存。引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。

1.2 细胞培养

OVCAR-8TR、293T 单层细胞采用含 10% FBS 和 1% 抗生素的 DMEM 完全培养基传代。细胞长满后,弃去细胞培养瓶中培养基,PBS 清洗后用 0.25% 胰蛋白酶消化 3~5 min,完全培养基(体积为胰酶的 10 倍)终止消化,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清用完全培养基稀释细胞(计算细胞数量)后铺盘。

1.3 基因沉默

待转染 OVCAR-8TR 卵巢癌细胞接种于预置好爬片的 24 孔细胞板中(爬片上细胞密度控制为 30%~50%)。18~24 h 后进行 siRNA 转染。转染步骤如下:30 μ L 孵育缓冲液 Opti-MEM I (Gibco) 中加入 2 μ L siRNA(工作浓度为 50 nmol/L),混匀后加入转染试剂,孵育 15 min,每孔细胞换入 470 μ L DMEM 完全培养基后加入转染混合物。所有转染用 siRNA 购于 Ribobio 公司,siWDR70 (siG1117130927,5'-CUGCCAGAAUGGAAGCAU A-3'); siDDB1 (siB09531141904,5'-CCUGUUG AUUGCCAAAAC-3');阴性对照随机转染序列 (Scramble, siN05815122147)。

1.4 免疫荧光和免疫组化

将转染 siWDR70 或 siDDB1 后 48 h 的 OVCAR-8TR 卵巢癌细胞用离子射线(5 Gy,4 h)或 CPT(2 μ mol/L,2 h)处理后收样,以转染随机转染序列的 OVCAR-8TR 细胞为对照。用 40 g/L PFA 固定 10 min,0.3% Tritonx-100 通透 10 min 和 3% FBS 封闭 30 min。加入一抗[鼠抗人 γ H2AX,兔抗人磷酸化 RPA32(即兔抗人 RPA32-pS33)]37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 清洗后加入荧光标记 Cy3 的抗兔或荧光标记 FITC 的抗鼠的二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

加含有 DAPI 的抗荧光淬灭剂,于荧光显微镜下观察结果并拍照。1000 倍视野下每张爬片取 10 个视野采图,计数可形成磷酸化 RPA32 及 γ H2AX 灶点的细胞在总数中所占百分比。

免疫组化采用来源于我院妇产科的卵巢癌临床病理标本的石蜡组织切片,切片脱水后加 1% Triton-100 处理 15 min, PBS 清洗再加 3% H_2O_2 (28% 甲醇配制)避光处理 15 min。抗原修复(柠檬酸缓冲液, 95 °C, 40 min, 自然冷却至室温)后用 10% 羊血清封闭 30 min。加一抗(兔抗人 WDR70, 鼠抗人 uH2B)4 °C 过夜。PBS 清洗 3 次后加生物素标记的山羊抗兔抗体、过氧化物酶链亲和素 37 °C 各孵育 30 min, DAB 显色,并用苏木素复染 30 s。显微镜下观察结果并拍照。

1.5 BrdU 标记和染色

沉默 WDR70 基因的 293T 细胞及对照组用 1 μ mol/L BrdU 处理 30 min 后,样品用 -20 °C 预冷的甲醇于 -20 °C 固定 20 min。PBS 洗 3 次, 0.4 mol/L HCl 变性处理 25 min,其后按免疫荧光标准实验步骤进行通透及孵育。以 PI 染色标记所有细胞核, BrdU 掺入效率为 100 个 PI 阳性细胞中 BrdU 免疫荧光阳性细胞所占百分比。

1.6 RT-PCR 检测 WDR70 基因的表达及基因突变分析

收取提前 1 d 在 3.5 cm 培养皿中培养好的卵巢癌细胞 (SKOV3、OVCAR-8TR) 及宫颈癌细胞 Hela 或卵巢癌相关组织标本(包括 2 例正常卵巢组织和 8 例卵巢癌肿瘤标本,来源于四川大学华西第二医院妇产科)速冻于液氮中,然后在研钵中研磨至粉末,并转运至干净无 RNA 酶的 1.5 mL Eppendoff 管内。加入 1 mL Trizol,充分混匀后室温放置 5 min。加入 200 μ L 氯仿,剧烈震荡混匀 30 s 后 14 000 r/min 离心 10 min。将上层液体转移至新的 Eppendoff 管中,加入等体积的异丙醇,混匀后室温放置 10 min, 14 000 r/min 离心 10 min。弃掉上清,用 70% 酒精洗涤沉淀 1 次,室温干燥 5 min 后加入 50 μ L DEPC 处理后的水溶解 RNA。利用逆转录试剂盒(Promega)将提取的 RNA 用 polydT 逆转录成 cDNA,设计 WDR70 全长基因的上、下游引物(Forward: 5'-ACAGCTGGAGAAGGACAG-3'; Reverse: 5'-TTTCACTGCTGCTCGTATC-3'), PCR 扩增 WDR70 条带(反应程序为 95 °C 3 min, 其后进行 35 个循环反应: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 循环结束后 72 °C 延伸 5 min), 测序

(上海生工)并鉴定 WDR70 突变或缺失情况。设计 WDR70 基因 5' 区域的上、下游引物(Forward: 5'-CTGGGCCAGCGAAGTGACA-3'; Reverse: 5'-GATACGAGCAGCAGTGAAA-3')以及 3' 区域的上、下游引物(Forward: 5'-TGGAACCCACGGGGGCACTC-3'; Reverse: 5'-GGCTCATTCTTTGCTTCC TC-3'),采用以上与全长基因同样的方法扩增其 5' 及 3' 片段(循环反应中延伸时间为 30 s, 其余反应条件同全长基因扩增条件)。所有半定量 PCR 内参基因选用 β -actin(引物序列为 Forward: 5'-CTCT TCCAGCCTTCCTTCCT-3'; Reverse: 5'-AGCACT GTGTTGGCGTACAG-3')。

1.7 统计学方法

组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRL4 复合体不同亚基对细胞周期检查点和单链 DNA 形成的差异影响

化疗药物 CPT 处理 DDB1 基因特异性沉默的卵巢癌细胞 OVCAR-8TR 中 H2AX 及 RPA32 磷酸化程度相比对照组下降(对照组药物处理后 γ H2AX 及 RPA32 磷酸化灶点阳性细胞比例分别为 85% 和 90%, DDB1 基因特异性沉默的卵巢癌细胞中比例为 20% 及 10%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 DDB1 功能缺失细胞系中 DNA 双链断裂后周期检查点激活及单链 DNA 形成存在缺陷(图 1A)。CRL4 底物适配蛋白 WDR70 基因沉默的卵巢癌细胞 OVCAR-8TR 中不能有效地形成 RPA32 磷酸化蛋白的灶点, 但 H2AX 磷酸化未受抑制(对照组射线处理后 γ H2AX 及 RPA32 磷酸化灶点阳性细胞比例分别为 87% 和 91%, WDR70 基因特异性沉默的卵巢癌细胞中比例为 83% 及 10%), 两组间 RPA32 磷酸化灶点阳性细胞比例差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 γ H2AX 磷酸化灶点阳性细胞比例差异无统计学意义, 提示 WDR70 与检查点活化无关(图 1B)。

2.2 WDR70 对 DNA 复制的影响

瞬时 BrdU 掺入法检测 WDR70 基因沉默的 293T 细胞中 BrdU 的掺入效率为 25%, 对照组为 24%, 二者相比差异无统计学意义, 说明细胞 DNA 复制效率未降低(图 2)。

2.3 WDR70 在正常卵巢上皮和卵巢癌中的组织分布及表达

免疫组化实验显示, uH2B 及 WDR70 蛋白在正常卵巢上皮组织及多数卵巢癌组织样本中染色呈强阳性, 提示二者在卵巢上皮组织中发挥功能; 但部分肿瘤样本完全失去免疫组化的信号, 提示这部分肿瘤可能存在 uH2B 单泛素化依赖的同源重组修复的缺陷(图 3)。

RT-PCR 结果显示, 正常卵巢组织、SKOV3 及

HeLa 细胞中 WDR70 转录水平正常, 而 OVCAR-8TR 细胞系中 WDR70 基因表达缺失(图 4), 提示 OVCAR-8TR 细胞系中可能存在 WDR70 和 H2B 单泛素化的功能缺陷。进一步测试 2 例正常卵巢组织及 8 例卵巢癌肿瘤标本中 WDR70 基因 5' 和 3' 转录本的水平, 结果显示 50% 肿瘤样本(样本编号: 47, 48, 49, 17)中 WDR70 基因存在转录缺失(图 5), 同时在

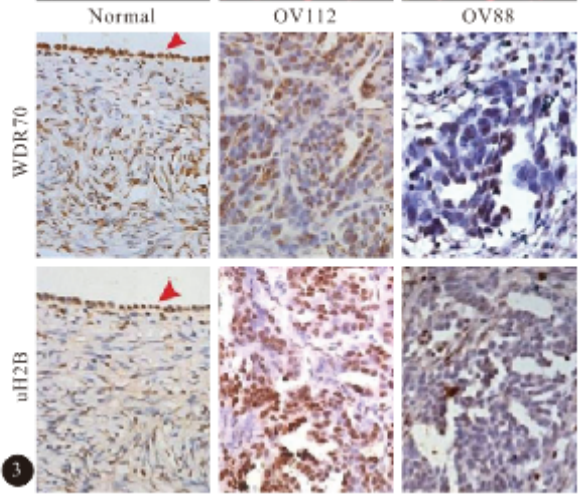
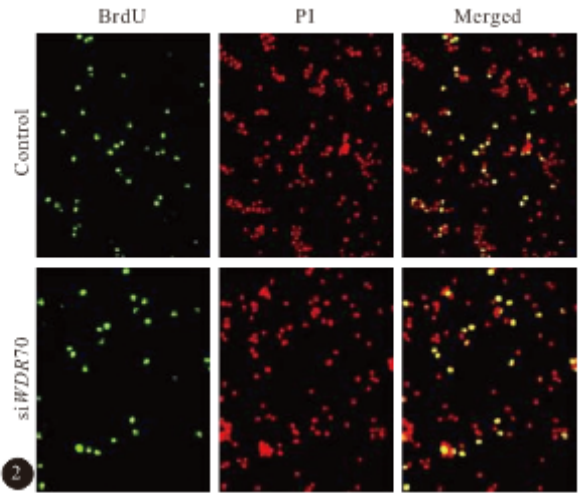
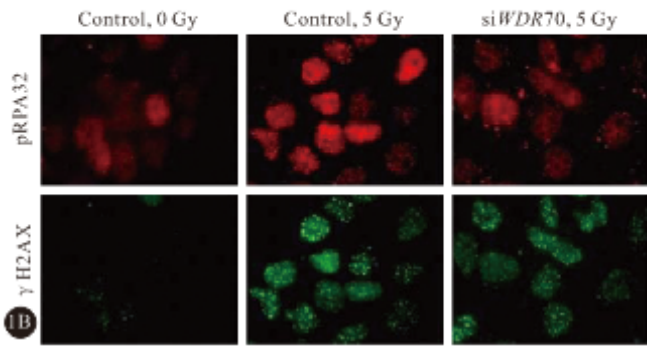
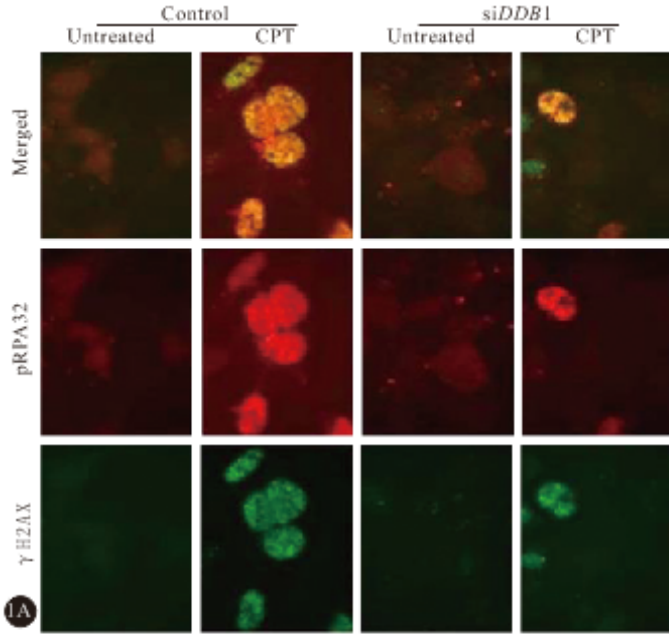


图 1 CRL4-WDR70 泛素化酶不同亚基在 OVCAR-8TR 细胞 DNA 损伤应答机制中的功能差异。间接免疫荧光染色 ×1 000 图 2 WDR70 对 293T 细胞 DNA 复制的影响。间接免疫荧光染色 ×200 图 3 WDR70 及 uH2B 在正常卵巢上皮和卵巢癌组织中的定位和表达。SP ×200

Fig 1 Differential function of CRL4-WDR70 ubiquitin ligase in DNA damage responses in OVCAR-8TR cells. IF staining ×1 000 Fig 2 Influence on DNA replication of WDR70 in 293T cells. IF staining ×200 Fig 3 Distribution and gene expression of WDR70 in normal ovarian epithelium and cancer biopsies. SP ×200

Fig 1: A: *DDB1* gene was silenced by siRNA in OVCAR-8TR cells. Cells were then challenged with CPT for 2 h after 48 h of transfection. Phosphorylated RPA32 (pRPA32, red) and H2AX (γ H2AX, green) showed localization to DNA breaks; B: OVCAR-8TR cells were transfected with siWDR70 and insulted by ionizing radiation (5 Gy). Fig 2: 293T cells were transfected with siWDR70 and pulse chased with BrdU for 30 min. Replicating cells were marked by denatured staining for BrdU (green), while all nuclei were visualized by propidium (PI, red). Fig 3: Co-localization of WDR70 and uH2B in normal ovarian epithelium (arrow heads). These two proteins were also positively stained in ovarian cancer sample (OV112), but diminished in a subgroup of cancer samples (OV88). IF: Indirect immunofluorescent; Control: Random small RNA as control for indicated specific siRNA

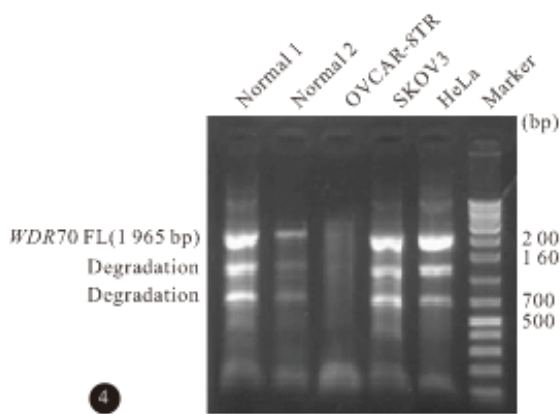


图 4 WDR70 在正常卵巢组织及不同细胞系中的表达

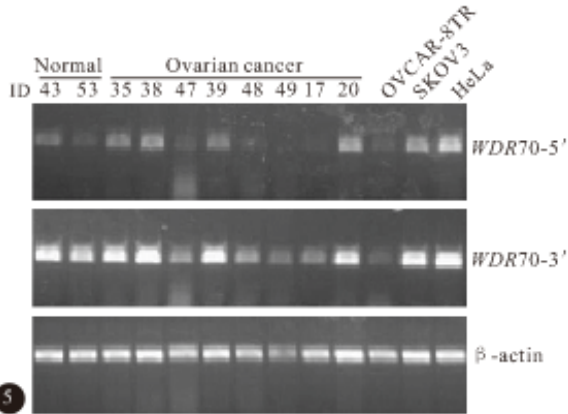


图 5 WDR70 基因 5'区域和 3'区域在不同卵巢组织和细胞系中的表达

Fig 4 Gene expression of WDR70 in normal ovarian tissue and different cell lines (lower bands indicates decayed WDR70 transcripts; FL: Full length) Fig 5 3' and 5' transcripts of WDR70 in ovarian cancer samples and 3 cell lines

SKOV3 及 HeLa 细胞中 WDR70 5' 和 3' 转录水平正常, 而 OVCAR-8TR 细胞系缺失, 提示部分卵巢癌组织中存在 WDR70 基因表达缺陷。

2.4 卵巢癌组织中 WDR70 基因的突变分析

与正常卵巢组织中序列比对分析, 结果显示 30% 复染肿瘤样本中 WDR70 转录本序列存在点突变、缺失或者 mRNA 异常剪切等情况 (图 6)。

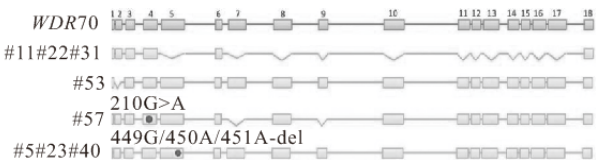


图 6 WDR70 基因在卵巢癌中的突变鉴定

Fig 6 Mutational study in ovarian cancer

The genomic locus of WDR70 gene contains 18 exons. There were three types of cDNA variants of WDR70 cDNA: splicing mutant (#11, #22 and #31), point mutation (#57) and small deletion (#5, #23 and #40)

3 讨论

DNA 损伤应答是维护基因组稳定性、抑制肿瘤发生的重要分子机制, 该信号网络不仅包括细胞周期检验点和 DNA 修复的核心应答分子, 还需要辅助机制帮助其达到最佳应答或修复的效果。CRL4 家族是由 CUL4-DDB1 骨架蛋白与底物适配蛋白构成的多功能泛素化酶, 参与多种 DNA 损伤应答的调控, 包括 DNA 复制、dNTP 合成、组蛋白修饰和同源重组修复等^[16]。在此基础上, 本研究重点阐明 CRL4-WDR70 泛素化酶在 DNA 损伤应答机制中的功能特征及其与卵巢癌发生之间的关联。

CRL4 是一类蛋白复合体, 其骨架蛋白 (CUL4-DDB1) 参与所有的生化功能, 而底物适配蛋白 (CDT1、WDR70 等) 则介导特异性的生化功能。本研究结果证明 DDB1 参与 DNA 末端回切和细胞周期检验点的激活, 适配蛋白 WDR70 则参与末端回切和同源重组修复的功能; 同时 BrdU 掺入法证明 WDR70 不参与 DNA 复制。前期研究结果显示 WDR70 具有较窄的功能范围, 特异性地调控 DNA 修复网络中的一个信号机制, 其功能缺陷导致抑癌机制的特异性丢失, 但不影响更多的细胞功能, 是一个很好的肿瘤相关候选基因 (如 TP53 和 BRCA1); 另一方面, DDB1 基因由于功能较多, 其基因突变会抑制多方面细胞功能, 甚至直接抑制肿瘤细胞 DNA 复制、增殖和恶性转化, 因此成为肿瘤发生驱动基因可能性较小^[13-14]。本研究还检测了 WDR70 基因在卵巢癌中的定位和突变情况, 结果表明 WDR70 和组蛋白 UH2B 在卵巢上皮中表达, 在部分卵巢癌中水平减低, 提示 WDR70 可能具有抑癌基因的功能。

前期研究已经证明 CRL4-WDR70 促进组蛋白 H2B 依赖的 DNA 回切和同源重组修复, 阻断 H2B 单泛素化和 WDR70 功能均能够降低 DNA 修复功能, 造成基因组不稳定性^[12]。卵巢癌与乳腺癌和前列腺癌相似, 约 30%~40% 的患者表现为 HRD^[14]。既往研究阐明 BRCA1、BRCA2 和 CHK1 是造成这些肿瘤修复缺陷的主要遗传因素, 但是仍有一部分具有修复缺陷指征的患者并不携带上述突变基因。结合 WDR70 和 UH2B 在同源重组修复过程中的功能特征 (未发表), 可以推测 WDR70 的功能与 BRCA1 基因不同但非常类似, 其功能丧失带来的

疾病后果和类型也可能相似。本研究结果部分证实:WDR70 蛋白和 UH2B 在正常卵巢上皮中大量存在,部分卵巢癌则丢失这些蛋白;WDR70 基因表达在部分肿瘤中减低,并出现多种突变,这些突变可能导致 WDR70 转录本稳定性降低,翻译移位或提前终止,最终导致 WDR70 蛋白功能丧失,UH2B 水平降低和同源重组缺陷。上述结果均提示 WDR70-UH2B 在卵巢上皮细胞中发挥功能,参与维持其基因组的稳定性;而部分卵巢癌在发生过程中丢失此功能,表明 WDR70 和 UH2B 机制是一个类似于 BRCA1 的潜在抗癌信号通路。

综上所述,本研究证实 CRL4-WDR70 和 UH2B 信号通路在一部分卵巢癌中功能减低,是一个潜在的同源重组修复相关的抗癌机制。

参 考 文 献

[1] HOEIJMAKERS JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, 2009, 361(15):1475-1485.

[2] CICCIA A, ELLEDGE SJ. The DNA damage response; making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 179-204.

[3] JACKSON SP, BARTEK J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009, 461(7267):1071-1078.

[4] BASU A, BROYDE S, IWAI S, *et al.* DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *J Nucleic Acids*, 2010, 2010: 182894. doi: 10.4061/2010/182894.

[5] SHILOH Y, ZIV Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(4):197-210.

[6] PAULL TT. Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 711-738[2017-05-10]. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034335>.

[7] BUISSON R, BOISVERT JL, BENES CH, *et al.* Distinct

but concerted roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in countering replication stress during S phase. *Mol Cell*, 2015, 59(6):1011-1024.

- [8] NIMONKAR AV, GENSCHEL J, KINOSHITA E, *et al.* BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev*, 2011, 25(4):350-362.
- [9] TAKEDA S, NAKAMURA K, TANIGUCHI Y, *et al.* Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination. *Molecular Cell*, 2007, 28(3):351-352.
- [10] CEJKA P. DNA end resection; nucleases team up with the right partners to initiate homologous recombination. *J Biol Chem*, 2015, 290(38): 22931-22938.
- [11] HE YJ, MCCALL CM, HU J, *et al.* DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev*, 2006, 20(21):2949-2954.
- [12] ZENG M, REN L, MIZUNO K, *et al.* CRL4Wdr70 regulates H2B monoubiquitination and facilitates Exo1-dependent resection. *Nat Commun*, 2016, 7:11364. doi: 10.1038/ncomms11364.
- [13] NIK-ZAINAL S, DAVIES H, STAAF J, *et al.* Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole genome sequences. *Nature*, 2016, 534(7605):47-54.
- [14] WANG YK, BASHASHATI A, ANGLÉSIO MS, *et al.* Genomic consequences of aberrant DNA repair mechanisms stratify ovarian cancer histotypes. *Nat Genet*, 2017, 49(6): 856-865.
- [15] DAVIES H, GLODZIK D, MORGANELLA S, *et al.* HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. *Nat Med*, 2017, 23(4):517-525.
- [16] JACKSON S, XIONG Y. CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34(11): 562-570.

(2017-02-18 收稿, 2017-05-20 修回)

编辑 余琳