

DNA 损伤修复因子 WDR70 的生物学功能及其 在人卵巢癌中的突变研究*

郭莲娣¹, 王丹¹, 杨帆¹, 梁语珈¹, 杨雪琴¹, 覃意扬¹, 任来峰²,
曾鸣³, 唐子执³, 王小军³, 王思³, 刘聪³, 楼江燕³, 陈杰^{3△}

1. 西南民族大学(成都 610041); 2. 山西医科大学汾阳学院(汾阳 032200); 3. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041)

【摘要】目的 在细胞水平上分析新发现的 DNA 损伤修复因子 WDR70 的生物学功能, 确定 WDR70 基因在人卵巢癌中的突变发生情况, 以验证该基因的功能丢失是否与卵巢癌关联。**方法** 在人细胞中用 siRNA 干扰 WDR70 基因表达, 或用慢病毒和质粒过表达 WDR70 的野生型和突变体, 通过免疫印迹和免疫荧光等方法研究该基因在 DNA 损伤后的亚细胞定位和 DNA 损伤信号通路中的作用; 此外, 抽提 1 例正常卵巢组织和 16 例卵巢癌标本的 mRNA 进行半定量 RT-PCR 扩增, 对这些标本中的 WDR70 基因进行测序分析。**结果** WDR70 基因沉默和过表达其突变体导致同源重组功能蛋白——DNA 复制蛋白 A (RPA32) 磷酸化修饰水平降低和重组酶——重组蛋白 A (RAD51) 向 DNA 损伤位点招募的能力减低; WDR70 的功能障碍还导致染色体的断裂增多; 同时, 卵巢癌样本中发现多例 WDR70 突变型别。**结论** 在体外系统中, WDR70 参与 DNA 损伤修复过程, 沉默或过表达其突变体将导致同源重组修复缺陷和染色体结构的不稳定; 在卵巢癌基因组中, WDR70 基因频繁出现突变, 可能导致相应的 DNA 修复缺陷和基因组不稳定性发生。因此, WDR70 是一个潜在的卵巢癌抗癌基因。

【关键词】 DNA 损伤应答 卵巢癌 WDR70

Functional Analysis of DNA Damage Repair Factor WDR70 and Its Mutation in Ovarian Cancer GUO Lian-di¹, WANG Dan¹, YANG Fan¹, LIANG Yu-jia¹, YANG Xue-qin¹, QIN Yi-yang¹, REN Lai-feng², ZENG Ming³, TANG Zi-zhi³, WANG Xiao-jun³, WANG Si³, LIU Cong³, LOU Jiang-yan³, CHEN Jie^{3△}. 1. Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China; 3. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: cjzb@sina.com

【Abstract】Objective To analyze the cellular function of the newly discovered DNA damage repair factor WDR70, and investigate the mutation in ovarian cancer to verify if function loss of the WDR70 gene was associated with ovarian cancer. **Methods** The WDR70 gene was silenced by using siRNA technique or overexpressed its wild and mutation type by with lentivirus and plasmid in human cells. The subcellular localization and biochemical function of WDR70 was analyzed by indirect immunofluorescence and immunoblotting. The expression level of WDR70 and the mutations of its cDNA was checked with RT-PCR sequencing for 1 normal ovarian tissue and 16 ovarian cancer specimen. **Results** We found gene silencing of WDR70 or overexpression of WDR70 mutation type disrupts the phosphorylation level of homologous recombination functional protein RPA32 and the ability of recruitment at DNA damage site of recombinase RAD51, the loss of function of WDR70 also causes the elevation of the chromosome breakage in metaphase. Meanwhile, we also noticed that the existence of multiple mutations in genomic WDR70 in ovarian cancer specimen. **Conclusion** Our results defined that *in vitro* system, WDR70 is a DNA damage repair gene, silencing of WDR70 or overexpression of WDR70 mutation type disrupts homologous recombination and chromosomal instability; the frequent mutations of WDR70 gene in genome of ovarian cancer specimens could also lead to DNA repair defeat and gene instability. Consequently WDR70 gene could represent an anti-cancer mechanism for ovarian cancer.

【Key words】 DNA damage responses Ovarian cancer WDR70

从酵母到人类细胞, 存在一种高度保守的 DNA

损伤应答机制保证基因组的稳定性, 避免细胞灾变和突变发生^[1-2]; 在个体水平上, 这种分子机制更能保证器官发育的正常和防止恶性肿瘤的发生^[3-4]。DNA 损伤应答(DDR)主要包括 DNA 复制应激、细胞周期检验点和 DNA 损伤修复机制^[5-6]。这些机

* 中央高校基本科研业务费专项基金项目(No. 2015NZYQN63)、成都市科技局项目(No. 2015-HM01-00058-SF)和四川省杰出青年学术技术带头人资助计划(No. 2012JQ0005)资助

△ 通信作者, E-mail: cjzb@sina.com

制协同进行,在 DNA 损伤发生后迅速启动,从而保证染色体的稳定和细胞生理功能的正常进行^[7]。

最近的发现表明,裂殖酵母(*S. pombe*)编码一个 WD40 螺旋桨结构的基因(*WDR70*),该蛋白质参与 DNA 损伤修复的单链 DNA(ssDNA)加工过程^[8]。由于同源重组修复通路需要长链的 ssDNA 以便于搜索未受损伤的同源模板链^[9],因此 *WDR70* 也参与同源重组的启动步骤。

近年研究证明,基因组丧失稳定性是肿瘤细胞的一个基本特征,而维护基因组稳定的 DNA 损伤应答通路是机体最重要的抑癌屏障之一^[10]。不能修复和异常修复的 DNA 损伤常常导致子代细胞的基因突变和染色体畸变,促使细胞获得较高的增殖和进化能力,最终促进癌变发生^[11-12]。长期的研究还表明,同源重组缺陷基因(如 *BRCA1/BRCA2* 等)在乳腺癌和卵巢癌中频繁检出,在这类癌症的发展过程中起着重要的推动作用。因此,同源重组机制的完整性对遏制卵巢癌和乳腺癌的发生发展起着关键的作用^[13-15]。

本研究对新发现的同源重组基因(*WDR70*)在人类正常和卵巢癌细胞中进行了功能研究,并分析卵巢癌标本中 *WDR70* 基因突变的发生情况,结果表明,*WDR70* 在基因组稳定性的维护中发挥功能,有可能是一个新的卵巢癌抗癌基因。这为卵巢癌发病机理和治疗策略的研究提供新的可能和方向。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 培养液(Sigma),磷酸盐缓冲液(PBS, 国产),胎牛血清(FBS, Gibco),青霉素(100 U/L)/链霉素(100 mg/L)(Invitrogen),0.25%胰蛋白酶(Sigma),TritonX-100(Keygen),喜树碱(CPT, Sigma),体积分数为 4%的多聚甲醛(PFA, Sigma),*WDR70* 兔抗人抗体(Bethyl),噻唑蓝(MTT, Sigma),DNA 复制蛋白 A(RPA32)丝氨酸 33 的磷酸化位点(RPA32-pS33)兔抗人抗体(NOVUS),微管蛋白 Tubulin 鼠抗人抗体(Sigma),毛细血管扩张共济失调突变蛋白(ATM)-pS1981 鼠抗人抗体(Cell Signaling),重组蛋白 A(RAD51)兔抗人抗体(Cell Application),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-苯基吲哚(DAPI, Vector),荧光显微镜(Olympus, BX51)等。U2OS 人骨肉瘤细胞株、293T 人肾上皮细胞株、NIH 3T3 小鼠胚胎成纤维

细胞株为本实验室保存。引物合成由成都擎科梓熙生物技术有限公司完成。

1.2 细胞毒实验

0.25%胰蛋白酶消化用 Lipofectin 2000 转染 *WDR70* 特异性的小干扰 RNA——si*WDR70* (siG1117130927; CTGCCAGAATGGAAGCATA, Ribobio, 广州)的 293T 细胞,将 1×10^4 mL⁻¹ 293T 细胞接种 100 μ L 于 96 孔培养板,在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养 24 h。在转染随机 siRNA (Ribobio, 阴性对照)或特异性 siRNA (si*SDR70*)的细胞中分别加入 5、10、15、20 nmol/L CPT;在转染随机 siRNA 或 si*WDR70* 的细胞中分别给予 X 射线 2、4、6 Gy 或不照射,每组设 3 个复孔。培养 72 h 后,每孔加入 MTT 液 20 μ L,继续培养 4 h;弃上清,每孔加入 200 μ L 二甲亚砜(DMSO),振荡 10 min。用酶标仪在 570 nm 波长处测定各孔吸光度值(A 值),重复 5 次取平均值。细胞存活率(%)为实验组 A 值与对照组 A 值的比值。

1.3 制备中期染色体

si*WDR70* 或随机小干扰 RNA 处理的 293T 细胞经 X 射线照射 10 h 后,样品中加入 200 ng/mL 秋水仙素处理 1.5 h,并加入 BrdU 以区别姊妹染色体,收集细胞。加入 6 mL 75 mmol/L KCl 溶液,37 $^{\circ}$ C 温育 16~25 min。温育后用甲醇-冰醋酸混合固定液固定 3 次,1 000 r/min 离心并重悬细胞,留取 500 μ L 固定液,混匀细胞。将固定好的细胞液从高处滴落至预先冰冻处理的载玻片上,晾干后用 Giemsa 染色液染色 10 min,树脂封片;处理完成后的染色片用光学显微镜观察、拍照并根据 BrdU 染色区分的姊妹染色体的交换频率计数。观察染色体断裂情况,并根据 BrdU 染色区分的姊妹染色体的交换频率计算染色体交换指数。

1.4 免疫荧光

将生长在爬片上对数生长期的转染 si*WDR70* 和随机小干扰 RNA 的 U2OS 细胞用 X 射线(2 Gy)处理 4 h, PFA 固定后以 0.3% Tritonx-100 通透 10 min, PBS 洗涤后用驴血清缓冲液封闭 30 min, 加入一抗(鼠抗人 ATM-pS1981, 1 : 1 000; 兔抗人 RAD51, 1 : 200) 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗涤 3 次后加入 Cy3 标记的抗兔或 FITC 标记的抗鼠荧光标记抗体(1 : 300), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 并洗涤后,用 DAPI 抗荧光淬灭液封片,于荧光显微镜下观察结果并拍照。10 \times 100 倍视野下每个爬片取 10 个视野采图。

1.5 基因克隆

1.5.1 pcDNA3-TAP-WDR70 质粒的构建 通过 NCBI 数据库查找鼠源 *WDR70* 的 CDS 序列(基因号 NM_001081402.1),设计 *WDR70* 全长的上、下游引物(5'-CCAAGGTACCATGGAGCACTCGGGAACC-3'; 5'-CCAAGAATTCTCAAATTTTTCGTTTTTCCATTCT-3')。以 Hela 细胞 cDNA 文库为模板,PCR 扩增(95 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 2 min; 34 个循环)得到 *WDR70* 全长的 DNA 片段。将扩增产物和载体 pcDNA3-TAP(由本实验室构建)双酶切(*KpnI*/*EcoRI*)后。利用 *T4* 连接酶连接载体及片段,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 于含有氨苄青霉素(50 mg/L)的培养皿中筛选阳性克隆并测序鉴定,得到 pcDNA3-TAP-*WDR70* 质粒。

1.5.2 pLVX-IRES-ZsGreen-WDR70-Flag 质粒的构建 设计上、下游引物:5'-CCAAGAATTCATGAGCGCTCTGGGCCAG-3'; 5'-CCAAGAATCTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCAATTTTACGTTTTTCC-3'。以 1.5.1 部分构建的 pcDNA3-TAP-*WDR70* 质粒为模板,PCR 扩增 95 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 2 min; 34 个循环,得到羧基端带有 Flag 序列的 *WDR70* 全长的 DNA 片段。将扩增产物和载体 pLVX-IRES-ZsGreen(Clontech)进行 *EcoRI* 单酶切,利用 *T4* 连接酶连接载体及片段,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 于含有氨苄青霉素(50 mg/L)的培养皿中筛选阳性克隆并测序鉴定,得到 pLVX-IRES-ZsGreen-*WDR70*-Flag 质粒。

1.5.3 pcDNA3-NTAP-WDR70-DWD 质粒的构建 设计 *WDR70* 突变位点的上、下游引物(5'-GATACATTAATAATTAGCGGCTGTCCGCAATTTAATAAG-3'; 5'-CTTATTAAATTGCCGGACAGCCGCTAATTTTAATGTATC-3')。以 pcDNA3-TAP-*WDR70* 质粒为模板,PCR 扩增(95 °C, 30 s; 58 °C, 30s; 72 °C, 2 min; 18 个循环),*DpnI* 消化 PCR 产物以去除模板质粒,转化大肠杆菌 DH5 α , 于含有氨苄青霉素(50 mg/L)的培养皿中筛选阳性克隆并测序鉴定,获得定点突变 DWD 基序的 pcDNA3-NTAP-*WDR70*-DWD 质粒。

1.6 免疫印迹

293T 细胞感染 *WDR70*-Flag 慢病毒及 pLV 对照病毒,48 h 后用 X 射线 10 Gray 处理 0、1、4 h 并收样;NIH3T3 细胞转染带有 TAP 标签的 *WDR70* 野生型(Wt)和突变体(Mu)基因及空载体,48 h 后用 X 射线(10 Gray, 0、1、4 h)或 CPT(5 nmol/L,

2 h)处理并收样。免疫印迹具体步骤:将 100 万个处理后的细胞溶于 SDS 细胞裂解液,取 10 μ L 总蛋白样品进行 SDS-PAGE 分离,电转移蛋白质至 PVDF 膜上,用 5% BSA 室温封闭 1 h。用含 5% BSA 的 TBS-0.1% Tween-20 稀释一抗[兔抗人 *WDR70*, 1:1 000;RPA32 抗血清(兔),1:20 000;兔抗人 RPA32-pS33, 1:1 000;鼠抗人 Tubulin, 1:5 000]孵育过夜(4 °C),用稀释的羊抗鼠二抗(1:3 000)室温温育 1 h 后进行 ECL 发光显影。

1.7 卵巢癌中基因突变的检测

收取卵巢癌相关组织标本(来源于四川大学华西第二医院)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* 基因上、下游引物(5'-ACAGCTGGAGAAGGACAG-3'; 5'-TTCACTGCTGCTCGTATC-3'),PCR 扩增 *WDR70* 条带(退火温度:55 °C;循环数:35 个,延伸时间:2 min。聚合酶:Faststart *TaqDNA* polymerase, Roche),测序(上海生工)并鉴定 *WDR70* 突变或缺失情况。

1.8 统计学方法

组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 WDR70 基因沉默对 DNA 损伤应答的影响

WDR70 在 293T 细胞中被沉默后,CPT 或 X 射线处理后测定细胞存活率,*WDR70* 沉默细胞对 CPT 处理诱发的细胞死亡更为敏感,而 X 射线诱发 *WDR70* 沉默细胞死亡的能力则较弱(图 1A、1B)。进一步检测 *WDR70* 基因沉默的 293T 细胞在 X 光诱导后染色体的断裂情况和姊妹染色体交换的指数,结果显示,*WDR70* 基因沉默后 X 射线诱导的染色体断裂明显增多,姊妹染色体交换频率也相应减低(图 1C、1D)。

2.2 WDR70 基因沉默对 DNA 重组酶 RAD51 向损

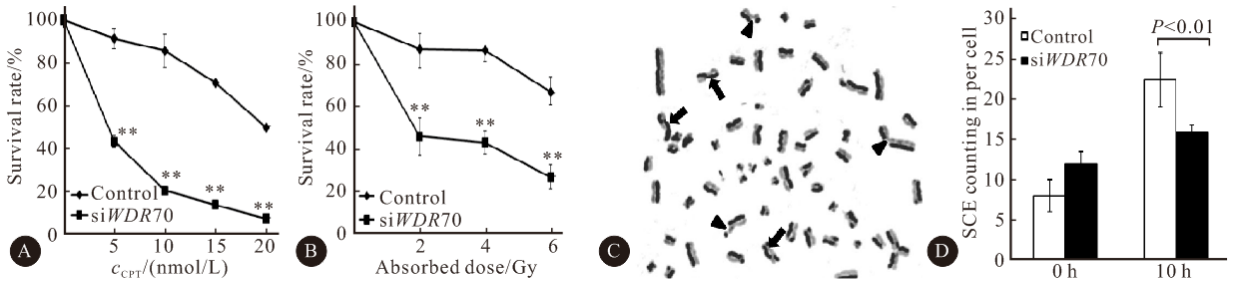


图 1 沉默 WDR70 后的细胞对 CPT 或 X 射线照射的敏感性的变化

Fig 1 Silencing of WDR70 causes hypersensitivity to CPT or X-ray irradiation

A: Cell survival of 293T cells after treatment with indicated siRNA and CPT; B: Survival upon X-ray irradiation as in A; C: Metaphase spread of siWDR70-treated 293T cells [arrows show sister chromatid exchange (SCE); arrow heads show chromosomal breakage]; D: Quantification of assays for SCE in cells treated with random siRNA or siWDR70. * * $P < 0.01$, vs. control group

伤位点招募的影响

作为对照,与同源重组无关的 ATM-pS1981 的断点招募在 WDR70 沉默和 X 射线处理后没有缺陷,并快速地在损伤位点形成灶点;但是与对照细胞

相比较,WDR70 沉默细胞中 RAD51 重组酶不能有效地聚集在灶点(图 2)。

2.3 过表达 WDR70 及其突变体对 DNA 损伤应答的影响

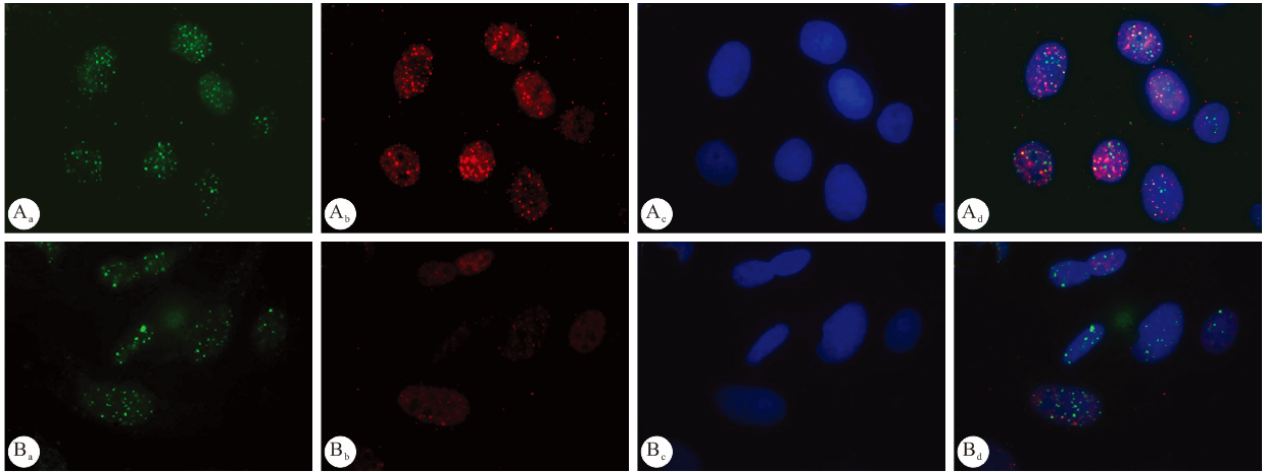


图 2 WDR70 基因沉默对 X 射线照射后 U2OS 细胞中重组酶 RAD51 向 DNA 断点招募的影响

Fig 2 WDR70 influences the recruitment of RAD51 recombinase to DNA breaks after X-ray irradiation on U2OS cells

A: Control; B: siWDR70; a: Anti-phospho-ATM Serine 1981; b: Anti-RAD51 recombinase; c: DAPI; d: Merge

将过表达 WDR70 全长读码框的慢病毒感染 293T 细胞,细胞表达绿色荧光和 WDR70-Flag 蛋白质(图 3A)。为检测过表达 WDR70 的功能,我们测定了慢病毒感染的细胞在 X 射线处理后 ssDNA 结合蛋白 RPA32 磷酸化水平的变化,结果显示,过表达 WDR70 可以在射线处理 1 h 时增强 RPA32 磷酸化的水平,提示 ssDNA 加工效率和同源重组增强,并在 4 h 时基本完成同源重组修复(图 3B)。

NIH3T3 细胞转染带有 TAP 标签的 WDR70 野生型(Wt)和突变体(Mu)基因及空载体,发现在 X 射线或 CPT 处理后,过表达野生型 WDR70 细胞

的 RPA32 的磷酸化水平增加;而过表达 DWD 突变的细胞则无法有效促进 RPA32 的磷酸化(图 4)。该突变研究表明,DWD 基序对 WDR70 介导的同源重组修复非常关键。

2.4 卵巢癌中 WDR70 基因的突变形式

抽提 1 例正常卵巢组织和 16 例卵巢癌标本的 mRNA 进行半定量 RT-PCR 扩增,结果显示(图 5),WDR70 的 mRNA 在一部分肿瘤组织中(样本 38、47、40、48、49、17)相对于正常卵巢组织(样本 43)明显缺失。进一步分析 cDNA 序列表明,WDR70 存在多种突变形式,如样本 20、51 和 53 出

现外显子缺失,样本 22 存在错义突变。

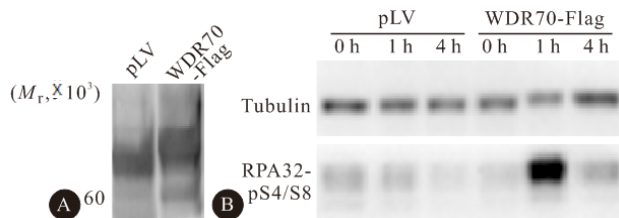


图 3 过表达 WDR70 基因对 RPA32 磷酸化的影响(293T 细胞)

Fig 3 Effects of overexpression of WDR70 gene on RPA32 phosphorylation (293T cells)

A: Detection of WDR70-Flag by immunoblotting 48 h after infection. WDR70 was probed by anti-WDR70 (rabbit) (pLV: Empty virus; WDR70-Flag: Lentivirus integrated with WDR70 fragment with Flag-tag at the carboxyl terminus); B: Monitor for phosphorylated RPA32 (anti-phospho-RPA32-Serine 4/8) after indicated lentiviral infection (Tubulin: Internal control)

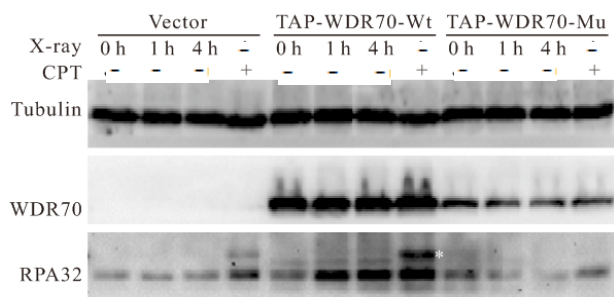


图 4 过表达 WDR70 野生型或突变体对 RPA32 磷酸化的影响(NIH3T3 细胞)

Fig 4 Effects of overexpression wild type or mutant of WDR70 gene on RPA32 phosphorylation (NIH3T3 cells)

Wt: Wild type; Mu: DWD mutant; *: Slow migration fraction relative to major bands. Cells were transfected by TAP-tagged WDR70 and challenged by X-ray or CPT for indicated time. WDR70 and RPA32 were probed by anti-TAP and RPA32 anti-serum, respectively. Unlike CPT treatment, X-ray didn't induce RPA32 band shift

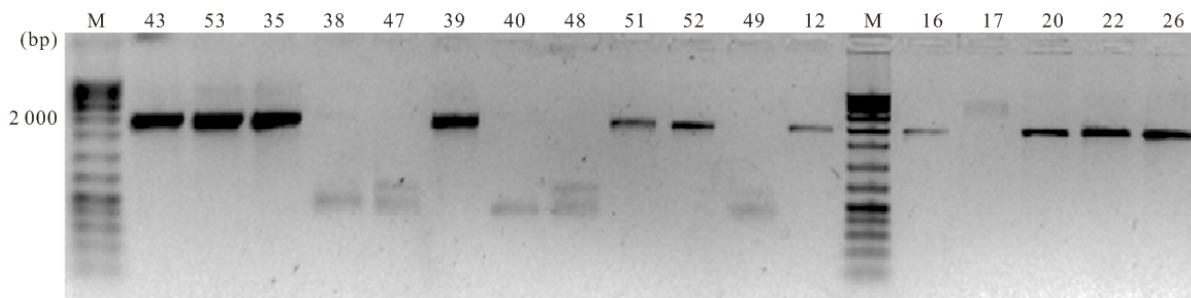


图 5 卵巢癌标本中 WDR70 基因的突变分析

Fig 5 Analysis of WDR70 gene mutational in ovarian cancer

Amplification of WDR70 open reading frame (ORF) by RT-PCR from 16 ovarian cancer samples. Sample 43: Normal ovarian tissue

3 讨论

DNA 损伤应答是细胞维持基因组稳定性和遗传信息高保真传递的重要分子机制。当基因组 DNA 受到损伤后,细胞周期检验点、DNA 复制和修复机器的调控因子均被活化,以高度协调的方式快速除去受损的核苷酸(或片段),并代之以修复的 DNA。其中,同源重组修复机制因其以未受损同源姊妹链为模板进行修复,具有高保真的特性,因此是哺乳动物细胞最为依赖的修复方式。其关键基因的缺失,如 BRCA1、BRCA2 的突变,均伴随癌症的高发^[13]。

我们最近新发现的酵母 WDR70 基因在同源重组修复机制中发挥重要功能,其缺失导致酵母细胞染色体断裂,对基因毒物敏感,以及损伤修复能力减低^[8]。在本研究中,我们在人细胞中验证了该基因

的进化保守性,证明 WDR70 在高等哺乳动物细胞中也发挥类似酵母同源基因的功能^[8],可以促进同源重组(RAD51 灶点形成),并为 SSDNA 产生过程所必需(RPA32 磷酸化),其基因功能丧失会导致细胞对基因毒物的敏感性增高。虽然我们发现 WDR70 功能丧失导致 RAD51 的染色质招募和功能障碍,并降低姊妹染色体交换的频率,这些现象提示 WDR70 在人类细胞中参与同源重组和基因组稳定性的维护,并维持染色体的稳定性,但是,我们同时也发现 WDR70 与 RAD51 等关键的同源重组调控因子不同,该蛋白只参与调控同源重组某一亚通路的调节,因此其基因沉默仅导致细胞对某些化疗药物(如 CPT)的高度敏感性,而对放射线等因素并不十分敏感,这提示 WDR70 参与某种 DNA 损伤类型(如 CPT)的修复,还有其他的平行机制可以补充 WDR70 的修复功能。

同源重组修复需要较长的 ssDNA 作为引导, 侵入完好的姊妹链, 以之为模板进行修复。最新研究表明, ssDNA 的产生是同源重组修复的关键和限速步骤, 并有众多调控因子参与这个调控过程^[16]。本研究结果表明, WDR70 可以促进 ssDNA 的形成, 对于同源重组修复所需的同源 DNA 搜寻和链侵入步骤至关重要。我们还进一步证明 WDR70 的 WD40 结构域中的 DWD 基序对该蛋白质在同源重组中的作用非常重要, 可能介导 WDR70 与其他修复因子的相互作用。由于同源重组修复基因 (*BRCA1/BRCA2*) 突变在乳腺癌和卵巢癌中反复出现, 我们假设 *WDR70* 的正常功能可能是一个新的乳腺癌/卵巢癌抗癌机制, 并通过临床卵巢癌标本的筛选和测序, 发现 *WDR70* 在卵巢癌中发生高频率的基因表达缺失或点突变, 这说明 *WDR70* 基因在卵巢癌中有高频突变的倾向, 这部分卵巢癌细胞与 *BRCA1* 突变类似, 可能造成同源重组缺陷从而促进肿瘤的发生。虽然基于我们的细胞生物学研究, *WDR70* 蛋白质与 *BRCA1/BRCA2* 不完全在一条信号通路上, 但是, 由于 *BRCA1* 蛋白质也调控 ssDNA 加工过程, *WDR70* 可能与 *BRCA1* 有一定的遗传关系。

综上所述, 本研究证明 *WDR70* 是一个进化高度保守的基因, 通过调控同源重组机制维护基因组和染色体的稳定性, 并对遏制卵巢癌的发生起着重要的抑癌作用。然而, *WDR70* 作用的下游蛋白及其参与的具体信号网络尚不明确, 需要我们进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] SANCAR A, LINDSEYBOLTZ LA, ÜNSALKAÇMAZ K, *et al.* Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 2004 (73):39-85.
- [2] WOOD RD. DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, 1996(65):135-167.
- [3] LOMBARD DB, CHUA KF, RAUL M, *et al.* DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, 2005, 120(4):497-512.
- [4] HELLEDAY T, PETERMANN E, LUNDIN C, *et al.* DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(3):193-204.
- [5] WEINERT T. DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. *Cell*, 1998, 94(5):555-558.
- [6] GROTH A, ROCHA W, VERREAULT A, *et al.* Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell*, 2007, 128(4):721-733.
- [7] JEGGO PA, PEARL LH, CARR AM. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(1):35-42.
- [8] ZENG M, REN LF, KEN'LCHI M, *et al.* CRL4 (Wdr70) regulates H2B monoubiquitination and facilitates Exo1-dependent resection. *Nat Commun*, 2016(7):11364. doi:10.1038/ncomms11364.
- [9] NIMONKAR AV, JOCHEN G, ERI K, *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.
- [10] HALAZONETIS TD, GORGOULIS VG, BARTEK J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 2008, 319(5868):1352-1355.
- [11] JIRINA B, ZUZANA H, KAREN K, *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 2005, 434(7035):864-870.
- [12] GORGOULIS VG, VASSILIOU LV, KARAKAIDOS P, *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, 2005, 434(7035):907-913.
- [13] FACKENTHAL JD, OLOPADE OI. Breast cancer risk associated with *BRCA1* and *BRCA2* in diverse populations. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(12):937-948.
- [14] 马志萍, 王 雯, 张 巍. 三阴性乳腺癌 33 例患者 *BRCA1/2* 基因突变状态及临床. *中国病理学杂志*, 2016, 45(6):397-400.
- [15] BUNTING SF, CALLÉN E, WONG N, *et al.* 53BP1 inhibits homologous recombination in *brca1*-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, 2010, 141(2):243-254.
- [16] GRABARZ A, GUIROUILH-BARBAT J, BARASCU A, *et al.* A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell Reports*, 2013, 5(1):21-28.

(2016-01-03 收稿, 2016-03-27 修回)

编辑 余琳