

特约综述



郑萍, 中国科学院昆明动物研究所研究组长(PI)、研究员、博士生导师, 入选中国科学院“百人计划”, 获得“云南省高端科技人才”称号。课题组主要从事干细胞遗传物质稳定性调控机制的研究以及生殖干细胞的基础生物学及应用研究。以第一或通讯作者在 *Cell Stem Cell*、*Genome Res*、*Cell Res*、*PNAS*、*J Cell Sci* 等期刊上发表多篇论文。

http://sourcedb.kiz.cas.cn/zw/zjrc/200908/t20090825_2446614.html

多能干细胞维持遗传物质稳定性的调控机制

张伟道 郑萍*

(中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

摘要 多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)能无限增殖且具有发育多潜能性, 在再生医学中有巨大的应用前景, 但长期扩增过程中产生的遗传物质不稳定性及潜在致癌性阻碍了临床应用。深入理解多能干细胞维持遗传物质稳定性的方式和机制具有重要的理论价值和应用前景。由于功能的特殊性, 相较于体细胞, 多能干细胞维持遗传物质稳定性的能力更强, 并有其独特的机制。该文简要综述了近年来在多能干细胞维持遗传物质稳定性方面的研究进展, 包括干细胞如何有效应对DNA复制压力、如何有效修复DNA损伤以及在DNA损伤情况下的细胞命运决定机制。

关键词 多能干细胞; 遗传物质稳定性; DNA损伤反应; DNA复制压力反应

Safeguarding Genomic Stability in Pluripotent Stem Cells

Zhang Weidao, Zheng Ping*

(Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract Pluripotent stem cells (PSCs) hold great promise for cell-based regenerative medicine. However, genomic instability and tumorigenicity hamper their full applications. Understanding the mechanisms that regulate their genome stability is critical to address this issue. Due to the specific functional purpose, PSCs possess high competence to safeguard genomic stability by employing specific strategies. In this review, we summarized the current progress in understanding the mechanisms that the PSCs utilize to cope with DNA replication stress, to repair DNA damage, and to determine the cell fates after unreparable damage.

Keywords pluripotent stem cells; genomic stability; DNA damage response; DNA replication stress response

国家重点研发计划干细胞及转化研究专项(批准号: 2016YFA0100300)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-68125422, E-mail: zhengp@mail.kiz.ac.cn

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China, Stem Cell and Translational Research (Grant No.2016YFA0100300)

*Corresponding author. Tel: +86-871-68125422, E-mail: zhengp@mail.kiz.ac.cn

网络出版时间: 2018-06-22 17:04:39

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180622.1704.002.html>

多能干细胞[包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)]能无限增殖, 并具发育多能性, 在人类疾病的细胞代替性治疗中有巨大的应用前景。多能干细胞的安全性, 即干细胞是否引发肿瘤的发生, 是决定干细胞最终能否成功应用的关键。遗传物质的稳定性是评价干细胞安全性的重要指标。理解多能干细胞如何维持遗传物质的稳定性将有助于其安全应用。

干细胞由于功能的特殊性, 具有很强的维持遗传物质稳定的能力。体外培养的小鼠胚胎干细胞和遗传背景相同的小鼠胚胎成纤维细胞比较, 其遗传突变率仅为后者的1/100^[1]。干细胞可通过多种途径高效维持遗传物质稳定。例如, 干细胞能高表达某些DNA损伤修复因子, 能对DNA损伤产生高效应答^[2-3], 从而有效修复DNA损伤。干细胞含有幼稚型线粒体并以无氧代谢方式利用葡萄糖, 降低ROS(reactive oxygen species)的产生及其对DNA的损伤^[4-5]。另外, 干细胞还有强大的DNA复制压力处理能力^[6-7], 从而高效预防内源性DNA损伤的产生。干细胞也使用特异机制维持端粒长度, 例如, 可通过Zscan4介导的端粒同源重组方式迅速延长端粒, 从而维持端粒长度^[8]。尽管对干细胞遗传物质稳定性维持的重要意义已有共识^[9-10], 但目前对相关的分子调控机理的认识还处于起步阶段。本文将重点阐述近年来在多能干细胞遗传物质稳定性调控上的研究进展。

1 多能干细胞的DNA损伤反应

1.1 DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)

细胞具有多种机制维持其遗传物质的稳定性, 其中DNA损伤反应(DDR)是细胞维持遗传物质稳定性的重要方式。DDR是指外源和内源因素引起DNA损伤断裂后, 细胞产生的复杂的应答反应。具体是指细胞能检测到断裂并产生信号传导, 激活和整合一系列复杂的细胞核和细胞质反应, 启动细胞周期的暂时性停滞, 进行DNA损伤修复, 并在DNA损伤无法修复的情况下启动凋亡程序以清除受损细胞, 从而最大程度保障细胞群体遗传物质的稳定性^[11-12]。DNA双链断裂对细胞的致死性最大, 也是最强的DDR激活因素, 因此, 对双链断裂诱导的DNA损伤反应的研究和认识也较为丰

富。DDR主要受PIKK(phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase)蛋白激酶调控, PIKK家族包括ATM(ataxia-telangiectasia mutated)、ATR(ATM-and RAD3-related)和DNA-PKcs激酶。其中, ATM和DNA-PKcs由DNA双链断裂诱导激活, 而ATR则由DNA单链断裂诱导激活^[13]。当发生DNA双链断裂时, 由Mre11/Rad50/Nbs1组成的MRN蛋白复合体能检测到双链损伤, 并招募ATM到损伤位点。正常情况下, ATM以二聚体形式存在, 当被招募到DNA损伤位点后, ATM二聚体解聚成为单体并迅速通过自磷酸化而被激活, 并磷酸化下游底物。其中, 组蛋白变体H2AX的第139位丝氨酸发生磷酸化(也称为 γ H2AX)是DDR激活的关键步骤。 γ H2AX通过正反馈效应使大量的ATM和DDR效应因子聚集到双链损伤位点, 行使信号传导和损伤修复功能^[12]。最近的研究发现, DDR涉及的细胞反应非常广泛, 除了ATM-Chk2介导的经典DNA损伤反应外, 还包含了细胞器的变化和调控^[14]。例如, DNA损伤会诱导高尔基体弥散分布于细胞质中, 高尔基体的重分布由DNA损伤反应激酶DNA-PK介导和调控。细胞器的变化也是细胞DDR的必要组成^[14], 但其作用及机制有待进一步研究。

DDR包含多种层次的分子调控, 如基因转录水平的调控、转录后mRNA的代谢调控以及蛋白质的翻译后修饰等^[15-21]。尽管对DDR的研究已经进行了数十年, 但对于不同种类的细胞(如体细胞和干细胞)如何识别不同类型的DNA损伤、如何产生和维持有效的损伤信号传导、如何调控细胞周期、如何进行DNA修复以及如何启动细胞凋亡信号等, 仍不是非常清楚。由于细胞DDR的异常与诸多疾病的发生密切相关(如肿瘤的发生、组织和器官的衰老及功能异常等)^[22-23], 澄清DDR每个环节的发生具体包含哪些重要步骤、需要哪些重要分子的参与仍将是生物医学研究的热点。

1.2 多能干细胞的DDR特征

迄今为止, 对DDR的研究主要集中在体细胞上, 而对干细胞DDR的调控却了解甚少。已有研究表明, ESC的DDR虽然也包含损伤信号的产生和传导、细胞周期调控、DNA损伤修复及损伤细胞的凋亡和清除, 但具其独特的方式和机制^[24]。例如, 小鼠和人ESC的DDR没有G₁细胞周期检查点, 而主要利用S期和G₂期进行细胞周期检查^[25-27]; 在DNA双链断裂损

伤修复方式上, ESC更倾向于采用高保真的同源重组方式(homologous recombination, HR)对DNA双链断裂进行修复, 而体细胞则可采用低保真的非同源末端连接方式(nonhomologous end joining, NHEJ)修复双链断裂^[28-29]; 另外, ESC对于凋亡非常敏感, 在同等程度的DNA损伤情况下, ESC更易迅速发生凋亡, 从而更有效地清除具有DNA损伤的细胞个体, 保障细胞群体遗传物质的稳定性。研究表明, ESC具有特殊的调控凋亡的分子机制^[30]。一方面, ESC的线粒体呈现high priming状态, priming的程度由线粒体上抗凋亡和促凋亡因子之间的相对含量和平衡态决定^[30]。干细胞中促凋亡因子的含量高于抗凋亡因子含量, 因此, 线粒体对凋亡发生的阈值(threshold)十分低下。另一方面, 干细胞还通过常态化激活Bax促凋亡蛋白来维持其对凋亡的快速反应。Bax蛋白直接调控细胞凋亡, 以非活化状态或活化状态形式存在。在非活化状态时, Bax蛋白的C-端和N-端隐藏在蛋白结构内部。在凋亡信号的诱导下, Bax蛋白构象发生改变, C-端和N-端暴露在外, 蛋白间相互结合形成多聚体, C-端随即插入线粒体外膜, 引起外膜通透和细胞色素C的释放, 从而激发凋亡的发生。在分化细胞中, Bax以非活化状态存在于细胞质中, 仅在凋亡信号的诱导下发生活化。但是, 在ESC中, Bax以活化状态存在于高尔基体上, 在凋亡信号诱导下转移至线粒体上激发凋亡的发生^[31]。通过这种方式, 干细胞中的Bax可以随时待命, 快速对细胞凋亡作出反应。另外, ESC发生严重DNA损伤后还可以发生分化, 分化后的细胞再通过p53启动凋亡程序^[32]。

1.3 调控多能干细胞DDR的特异分子机制

由于多能干细胞在DDR调控上有诸多特异性, 在体细胞中获得的DDR调控机制, 我们不能简单照搬到干细胞中, 而是需要对干细胞的DDR进行系统研究, 从而为全面理解多能干细胞独特的DDR调控方式奠定分子基础。

为了在全基因组水平上对ESC中参与调控DDR的潜在因子获得概括性认识, 我们根据最近在小鼠ESC上进行的两项组学层次扫描工作(包括蛋白质磷酸化质谱分析、基因表达芯片分析、部分基因功能的RNAi分析), 结合生物信息学分析获得了可能参与DDR调控的系列候选因子以及分子网络和模块, 并指出经典的Wnt信号通路与p53的相互对抗和平衡对于ESC经受DNA损伤后的命运决定(生存或

者死亡)起关键作用^[33-34]。这些组学层次的前驱工作为进一步细致研究ESC的DDR分子机制奠定了重要基础。

基于2011年Pines等^[33]在小鼠ESC中筛选出的潜在DDR调控因子, 并结合我们早期在小鼠卵和着床前胚胎中的研究结果^[35], 我们从系列候选基因中挑选了ESC特异表达基因Filia(官方名称Khdc3, 又名2410004A20Rik、Ecat1、AI467128、OEEP48)^[36]开展了深入研究。不同类型的DNA损伤可诱导小鼠ESC中Filia蛋白表达升高, 且Filia蛋白C-端包含了多个聚集分布的SQ/TQ结构域(motif)(该结构域是DDR激酶ATM/ATR的典型磷酸化作用位点, 也是经典的DDR蛋白结构特征)^[37], 表明Filia是多能干细胞特异的DNA损伤反应因子。功能研究发现, Filia在小鼠ESC的DDR中起重要的调控作用, 独立参与调控多个DDR途径, 包括ATM-Chk2激酶的活化和信号通路维持、细胞周期调控、DNA损伤修复及细胞命运决定。这些功能需要不同的蛋白结构域参与, 其中N-端参与调控ATM-Chk2信号通路的有效维持及DNA损伤修复, C-端在细胞周期及细胞命运调控中必不可少。Filia缺失后, ATM-Chk2虽然能在DNA损伤初期被有效激活, 但无法有效维持活化状态。S期和G₂/M期的细胞周期检查点失效, 使得DNA损伤情况下细胞周期无法停滞。另外, DNA损伤不能得到有效修复, 导致干细胞积累严重的DNA损伤。Filia缺失的细胞虽然有严重的DNA损伤, 但难以通过分化或者细胞凋亡途径进行有效清除。因此, 缺失Filia的胚胎干细胞在形态、生长能力和干性基因的表达上和野生型细胞没有区别, 但是遗传物质已经发生了惊人的变异。这些变异主要表现为: 高频率染色体数目变异、高频率染色体片段位移、高频率染色体断裂和微核形成等。体内畸胎瘤实验显示, 这些干细胞具有高致瘤性。因此, 干细胞特异表达的Filia在调控DDR和维持干细胞遗传物质稳定性中起着关键的多功能作用^[2]。

进一步的机制研究发现, Filia在干细胞中有多种定位, 并能结合不同的蛋白^[2]。Filia蛋白既分布于细胞质, 也分布于细胞核。在细胞质中, Filia常态化定位于中心体上, 并和中心体上的调节蛋白Numa结合, 维持中心体的正常功能。中心体不仅是调控有丝分裂的细胞器, 很多激酶和信号分子也定位于中心体上, 使得中心体成为重要的信息交流平台。例

如, ATM、Chk2以及调控细胞周期的激酶都可定位于中心体上^[39]。因此, Filia在中心体上的定位对于其执行多种功能具有重要意义。细胞质中的Filia还可定位于线粒体上, 但在线粒体上的分布受DNA损伤程度的动态调控。非损伤情况下, 仅有极少量的Filia分布于线粒体上。当DNA发生严重损伤、干细胞启动凋亡程序时, 线粒体上分布的Filia蛋白含量显著增高。因此, Filia在线粒体上的分布与其调控细胞凋亡的功能密切相关。Filia还可定位到DNA双链断裂处, 调控同源重组修复双链断裂。Filia入核受到蛋白翻译后调控, 第349位丝氨酸的磷酸化是Filia蛋白入核的前提, 该磷酸化位点突变后Filia不能进入细胞核执行功能。因此, 利用该位点的磷酸化特性, 我们分别鉴定了Filia在细胞质和细胞核中执行的功能, 发现表达不能入核的Filia突变体细胞具正常的ATM-Chk2信号激活通路、细胞周期检查点功能、细胞分化和细胞凋亡功能, 但却不能进行同源重组介导的DNA损伤修复。因此, Filia调控DDR中的信号通路维持、细胞周期调控及细胞命运决定是发生在细胞质的事件, Filia调控DNA损伤修复则需要进入细胞核并定位到DNA损伤位点。另外, Filia还可以在细胞质中和一个调控DDR的重要蛋白修饰酶——PARP1结合, 增强PARP1的酶活性, 通过PARP1途径介导其对DDR的高效调控功能。综上, 我们认为, Filia蛋白通过不同途径和层次, 整合调控了干细胞的DDR, 实现了其作为主控因子的功能^[2]。

除了Filia蛋白外, 研究人员还发现了干细胞特异表达的其他分子参与调控DNA损伤反应。例如, 调控干细胞干性的蛋白Sall4也参与调控DDR。Sall4在DNA双链断裂的情况下, 能被染色体结构重塑因子Baf60a(chromatin remodeling factor Baf60a)招募到双链断裂位点, 稳定MRN(Mre11-Rad50-Nbs1)蛋白复合物, 从而促进ATM激酶的活化和信号传导以及DNA修复^[40]。

2 多能干细胞处理DNA复制压力反应

2.1 DNA复制压力反应

DNA复制压力是指DNA复制过程中由多种因素(如DNA高级结构、DNA上结合的蛋白质、DNA合成底物dNTP的匮乏及DNA断裂等)导致复制叉移动减缓或停滞的现象, 是细胞产生内源性DNA损

伤和基因组不稳定的主要来源^[41]。有效处理复制压力是细胞维持遗传物质稳定性的重要途径之一。DNA复制压力反应(DNA replication stress response)是细胞应对复制压力的重要机制。当复制叉在前行过程中遇到障碍, DNA解旋酶(helicase)和DNA聚合酶(polymerase)的偶联可被破坏, DNA解旋酶继续解旋, 而DNA聚合酶则停止前行, 从而产生较长的单链DNA片段。单链DNA结合蛋白RPA(replication protein A)随即结合到单链DNA片段上, 并激发ATR-Chk1激酶活性及其下游的一系列信号传导通路, 保护受阻复制叉不发生坍塌并使其能在复制障碍解除后继续前行^[41]。

ATR是调控复制压力反应的核心激酶, ATR被激活是DNA复制压力反应的关键步骤。单链DNA与RPA结合形成的复合结构一方面能够招募ATRIP-ATR复合物, 另一方面也能招募Rad9-Rad1-Hus1蛋白复合物(简称9-1-1复合物)。9-1-1复合物继而招募ATR激酶的上游激活蛋白TopBP1, 使得TopBP1能与其底物ATR互作并激活ATR^[42]。除了TopBP1/9-1-1激活通路外, 最近的研究还鉴定了一个新的独立于TopBP1的ATR激活蛋白——ETAA1^[43-44]。ETAA1包含两个RPA结合结构域, 能够与RPA结合从而定位到受阻复制叉上。ETAA1还能直接和ATR-ATRIP结合, 并直接激活ATR, 其结合ATR-ATRIP的结构域序列与TopBP1上的ATR激活结构域相似^[43-44]。

研究DNA复制压力反应的常用方法包括DNA纤维分析(DNA fiber assay)^[45]和iPOND(isolate proteins on nascent DNA)^[46]。DNA纤维分析用于研究DNA复制叉行为, 而iPOND则用于鉴定和研究复制叉上的蛋白。如图1所示, DNA纤维分析是利用胸苷类似物IdU和CldU顺序对细胞DNA复制过程进行相同时间的标记, 然后将被标记的细胞进行裂解并将裂解后释放的DNA进行拉丝, 最后利用免疫荧光染色的方法将DNA复制过程直观地呈现出来。根据不同类型DNA标记所占的比例以及DNA标记的长度进行统计分析, 从而反映复制叉行为^[47]。iPOND实验是利用胸苷类似物EdU对细胞新合成的DNA进行短暂标记(也即对复制叉进行标记), 标记完成后利用甲醛将DNA和结合在DNA上的蛋白进行交联, 并在细胞透膜后添加生物素与EdU进行偶联反应, 再通过超声或微球菌核酸酶对交联后的DNA/蛋白复合物进行片段化处理, 最后利用亲和素与生物素的

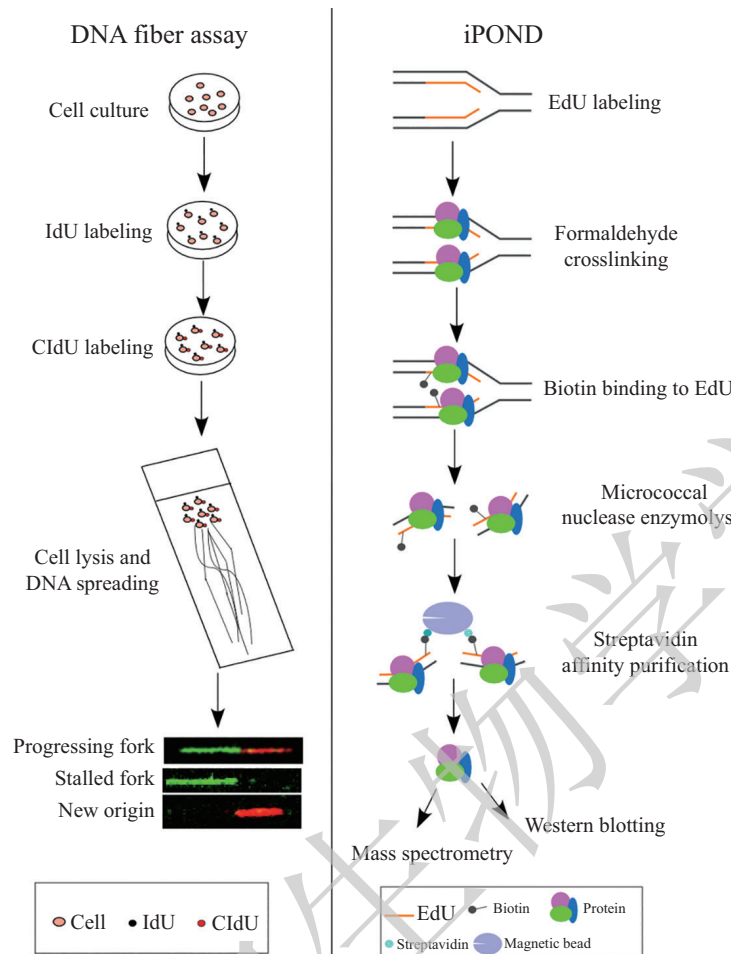


图1 DNA纤丝分析和iPOND实验流程图

Fig.1 Scheme of DNA fiber assay and iPOND

亲和反应将复制叉上的蛋白进行富集纯化。纯化得到的蛋白可进行质谱和免疫印迹分析^[46]。

2.2 多能干细胞具有高效的DNA复制压力反应以及特异的分子调控机制

与分化细胞相比,多能干细胞的细胞周期较短、DNA复制频繁(细胞周期为11~12小时,S期占据约60%的细胞周期)、细胞周期中G₁期十分短暂^[48]、缺乏G₁细胞周期检查点,这些特征使得干细胞在DNA复制中会产生巨大的复制压力^[49-50]。但是,干细胞能否高效以及如何高效处理复制压力从而维持遗传物质稳定性,并不清楚。最近,我们实验室以小鼠胚胎干细胞为模型,揭示了胚胎干细胞能利用干细胞特异机制高效处理复制压力,重启停滞的复制叉,从而维持遗传物质稳定性^[7]。我们通过DNA纤丝分析系统地比较了胚胎干细胞和不同类型的快速分裂的分化细胞(包括遗传背景相同的干细胞分化细胞)对于羟基脲(hydroxyurea, HU, 能导致细胞内DNA合

成底物dNTP缺乏^[51])诱导的DNA复制压力反应。我们发现,多能干细胞具有显著高效的复制压力处理能力,包括能高效维持新合成DNA片段的稳定、高效重启受阻复制叉以及高效启动休眠(dormant)复制叉,从而完成DNA复制^[7]。

为了寻找干细胞高效处理复制压力的分子调控机制,我们利用iPOND技术并结合蛋白质质谱分析,发现在胚胎干细胞的复制叉上存在干细胞特异表达的蛋白Filia和Flopel。通过系统的功能分析发现,Filia和Flopel形成蛋白复合体,常态性结合在复制叉上。当复制叉受阻停滞时,Filia-Flopel蛋白复合体会大量聚集到停滞的复制叉上,并在蛋白激酶ATR的调控下,Filia的第151位丝氨酸发生磷酸化,使Filia-Flopel复合体形成有功能的脚手架。该脚手架进而通过两条独立的途径高效调控复制叉重启。一方面,脚手架蛋白招募E3泛素化连接酶Trim25到受阻复制叉上,Trim25通过催化其底物Blm(促进复

制叉重启的关键解旋酶^[38,52])发生泛素化修饰,从而使大量Blm聚集到受阻复制叉上调控复制叉重启。另一方面,脚手架蛋白还能通过未知机制高效激活ATR激酶活性调控复制叉重启^[7]。分化细胞虽然也同样通过Trim25-Blm通路以及ATR激酶调控复制叉重启,但由于不表达Filia-Floped脚手架蛋白,Trim25-Blm不能被有效招募到受阻复制叉上,ATR激酶的活化效率也相对较低。因此,多能干细胞通过在复制叉上增设Filia-Floped脚手架,它以类似海绵的作用迅速富集到大量的复制叉维护和修复因子到受阻复制叉上,从而高效维持复制叉稳定和重启效率。我们的工作还表明,除了Filia-Floped脚手架外,多能干细胞还存在其他未知的特异性分子机制高效调控DNA复制压力,维持遗传物质稳定性^[7]。

3 总结

临床应用级别的多能干细胞必须严格保障遗传物质的稳定性。通常情况下,多能干细胞需要进行大量扩增才能获得足够量的细胞,以应用于临床。在大量扩增过程中,干细胞常常会产生和积累多种内源性DNA突变及损伤。因此,深入理解多能干细胞如何在快速分裂中维持DNA稳定性,特别是寻找调控遗传物质稳定性的干细胞特异表达的关键因子,并研究培养扩增条件能否影响及如何影响这些因子的表达和功能,将有助于提高多能干细胞的遗传物质稳定性。虽然干细胞的遗传物质稳定性调控研究已经受到了国际越来越多的关注^[9],但目前已知的调控机制仍然非常有限,还需要更多的工作去发现新的干细胞特异的调控分子并构建完善的调控网络。同时,理解干细胞干性和遗传物质稳定性之间可能的互作关系也是未来重要的研究方向。

参考文献 (References)

- 1 Tichy ED, Stambrook PJ. DNA repair in murine embryonic stem cells and differentiated cells. *Exp Cell Res* 2008; 314(9): 1929-36.
- 2 Zhao B, Zhang WD, Duan YL, Lu YQ, Cun YX, Li CH, *et al.* Filia is an ESC-specific regulator of DNA damage response and safeguards genomic stability. *Cell Stem Cell* 2015; 16(6): 684-98.
- 3 Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, Liu Y, Liu ST, Da Cruz AB, *et al.* Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* 2008; 26(9): 2266-74.
- 4 Cho YM, Kwon S, Pak YK, Seol HW, Choi YM, Park DJ, *et al.* Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(4): 1472-8.
- 5 Xu X, Duan S, Yi F, Ocampo A, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab* 2013; 18(3): 325-32.
- 6 Ge XQ, Han J, Cheng EC, Yamaguchi S, Shima N, Thomas JL, *et al.* Embryonic stem cells license a high level of dormant origins to protect the genome against replication stress. *Stem Cell Reports* 2015; 5(2): 185-94.
- 7 Zhao B, Zhang W, Cun Y, Li J, Liu Y, Gao J, *et al.* Mouse embryonic stem cells have increased capacity for replication fork restart driven by the specific Filia-Floped protein complex. *Cell Res* 2018; 28(1): 69-89.
- 8 Zalzman M, Falco G, Sharova LV, Nishiyama A, Thomas M, Lee SL, *et al.* Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells. *Nature* 2010; 464(7290): 858-63.
- 9 Vitale I, Manic G, De Maria R, Kroemer G, Galluzzi L. DNA damage in stem cells. *Mol Cell* 2017; 66(3): 306-19.
- 10 Oliveira PH, da Silva CL, Cabral JM. Concise review: genomic instability in human stem cells: current status and future challenges. *Stem Cells* 2014; 32(11): 2824-32.
- 11 Hong Y, Cervantes RB, Tichy E, Tischfield JA, Stambrook PJ. Protecting genomic integrity in somatic cells and embryonic stem cells. *Mutat Res* 2007; 614(1/2): 48-55.
- 12 Gonfloni S. Targeting DNA damage response: threshold, chromatin landscape and beyond. *Pharmacol Ther* 2013; 138(1): 46-52.
- 13 Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(8): 616-27.
- 14 Farber-Katz SE, Dippold HC, Buschman MD, Peterman MC, Xing M, Noakes CJ, *et al.* DNA damage triggers golgi dispersal via DNA-PK and GOLPH3. *Cell* 2014; 156(3): 413-27.
- 15 Cevher MA, Kleiman FE. Connections between 3'-end processing and DNA damage response. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010; 1(1): 193-9.
- 16 Rooney JP, George AD, Patil A, Begley U, Bessette E, Zappala MR, *et al.* Systems based mapping demonstrates that recovery from alkylation damage requires DNA repair, RNA processing, and translation associated networks. *Genomics* 2009; 93(1): 42-51.
- 17 Reinhardt HC, Cannell IG, Morandell S, Yaffe MB. Is post-transcriptional stabilization, splicing and translation of selective mRNAs a key to the DNA damage response? *Cell Cycle* 2011; 10(1): 23-7.
- 18 Lagerwerf S, Vrouwe MG, Overmeer RM, Fouteri MI, Mullenders LH. DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst)* 2011; 10(7): 743-50.
- 19 de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 1999; 13(7): 768-85.
- 20 Boucas J, Riabinska A, Jokic M, Herter-Sprie GS, Chen S, Höpker K, *et al.* Posttranscriptional regulation of gene expression: adding another layer of complexity to the DNA damage response. *Front Genet* 2012; 3: 159.
- 21 Panier S, Ichijima Y, Fradet-Turcotte A, Leung CC, Kaustov L, Arrowsmith CH, *et al.* Tandem protein interaction modules organize the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand

- breaks. *Mol Cell* 2012; 47(3): 383-95.
- 22 Liang Y, Lin SY, Brunicardi FC, Goss J, Li K. DNA damage response pathways in tumor suppression and cancer treatment. *World J Surg* 2009; 33(4): 661-6.
- 23 Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, Passegué E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 8(1): 16-29.
- 24 Stambrook PJ, Tichy ED. Preservation of genomic integrity in mouse embryonic stem cells. *Adv Exp Med Biol* 2010; 695: 59-75.
- 25 Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 2002; 1(2): 103-10.
- 26 Fillion TM, Qiao M, Ghule PN, Mandeville M, van Wijnen AJ, Stein JL, *et al.* Survival responses of human embryonic stem cells to DNA damage. *J Cell Physiol* 2009; 220(3): 586-92.
- 27 Chuykin IA, Lianguzova MS, Pospelova TV, Pospelov VA. Activation of DNA damage response signaling in mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle* 2008; 7(18): 2922-8.
- 28 Tichy ED, Pillai R, Deng L, Liang L, Tischfield J, Schwemberger SJ, *et al.* Mouse embryonic stem cells, but not somatic cells, predominantly use homologous recombination to repair double-strand DNA breaks. *Stem Cells Dev* 2010; 19(11): 1699-711.
- 29 Serrano L, Liang L, Chang Y, Deng L, Maulion C, Nguyen S, *et al.* Homologous recombination conserves DNA sequence integrity throughout the cell cycle in embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20(2): 363-74.
- 30 Liu JC, Guan X, Ryan JA, Rivera AG, Mock C, Agrawal V, *et al.* High mitochondrial priming sensitizes hESCs to DNA-damage-induced apoptosis. *Cell Stem Cell* 2013; 13(4): 483-91.
- 31 Dumitru R, Gama V, Fagan BM, Bower JJ, Swahari V, Pevny LH, *et al.* Human embryonic stem cells have constitutively active Bax at the Golgi and are primed to undergo rapid apoptosis. *Mol Cell* 2012; 46(5): 573-83.
- 32 Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, *et al.* p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 2005; 7(2): 165-71.
- 33 Pines A, Kelstrup CD, Vrouwe MG, Puigvert JC, Typas D, Misovic B, *et al.* Global phosphoproteome profiling reveals unanticipated networks responsive to cisplatin treatment of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2011; 31(24): 4964-77.
- 34 Carreras Puigvert J, von Stechow L, Siddappa R, Pines A, Bahjat M, Haazen LC, *et al.* Systems biology approach identifies the kinase *csnk1a1* as a regulator of the DNA damage response in embryonic stem cells. *Sci Signal* 2013; 6(259): ra5.
- 35 Zheng P, Dean J. Role of Filia, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryo-genesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(18): 7473-8.
- 36 Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113(5): 643-55.
- 37 Traven A, Heierhorst J. SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins. *Bioessays* 2005; 27(4): 397-407.
- 38 Wu L. Role of the BLM helicase in replication fork management. *DNA Repair (Amst)* 2007; 6(7): 936-44.
- 39 Zhang SS, Hernmerich P, Grosse F. Centrosomal localization of DNA damage checkpoint proteins. *J Cell Biochem* 2007; 101(2): 451-65.
- 40 Xiong J, Todorova D, Su NY, Kim J, Lee PJ, Shen Z, *et al.* Stemness factor Sall4 is required for DNA damage response in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 2015; 208(5): 513-20.
- 41 Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 2014; 16(1): 2-9.
- 42 Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: Ten years after. *Mol Cell* 2007; 28(5): 739-45.
- 43 Bass TE, Luzwick JW, Kavanaugh G, Carroll C, Dungrawala H, Glick GG, *et al.* ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nat Cell Biol* 2016; 18(11): 1185.
- 44 Lee YC, Zhou Q, Chen J, Yuan J. RPA-binding protein ETAA1 is an ATR activator involved in DNA replication stress response. *Curr Biol* 2016; 26(24): 3257-68.
- 45 Techer H, Koundrioukoff S, Azar D, Wilhelm T, Carignon S, Brisson O, *et al.* Replication dynamics: biases and robustness of DNA fiber analysis. *J Mol Biol* 2013; 425(23): 4845-55.
- 46 Sirbu BM, Couch FB, Cortez D. Monitoring the spatiotemporal dynamics of proteins at replication forks and in assembled chromatin using isolation of proteins on nascent DNA. *Nat Protoc* 2012; 7(3): 594-605.
- 47 Schwab RA, Niedzwiedz W. Visualization of DNA replication in the vertebrate model system DT40 using the DNA fiber technique. *J Vis Exp* 2011(56): e3255.
- 48 Savatier P, Lapillonne H, Jirmanova L, Vitelli L, Samarut J. Analysis of the cell cycle in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 2002; 185: 27-33.
- 49 Banath JP, Bañuelos CA, Klovov D, MacPhail SM, Lansdorp PM, Olive PL. Explanation for excessive DNA single-strand breaks and endogenous repair foci in pluripotent mouse embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2009; 315(8): 1505-20.
- 50 Ahuja AK, Jodkowska K, Teloni F, Bizard AH, Zellweger R, Herador R, *et al.* A short G1 phase imposes constitutive replication stress and fork remodelling in mouse embryonic stem cells. *Nat Commun* 2016; 7: 10660.
- 51 Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell* 2010; 37(4): 492-502.
- 52 Davies SL, North PS, Hickson ID. Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14(7): 677-9.