

实验室介绍



吴薇博士, 2022年8月起, 任中国科学院分子细胞科学卓越创新中心研究员、博士生导师、研究组长。该实验室主要通过开发新型DNA断裂和修复的高通量测序技术, 设计针对性的生物信息学分析方法, 研究不同体系下的DNA损伤的发生和修复机制。希望通过研究组织器官发育和复杂疾病产生过程中的损伤修复机制, 解析基因组变异来源, 为疾病诊断、治疗和药物开发提供新思路。

<http://wulab.sibcb.ac.cn/>

DNA双链断裂高通量测序技术的研究进展

吴树恒 梁羽 吴薇*

(多细胞体系结构与功能重点实验室,

中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 DNA双链断裂(DNA double-strand break, DSB)是最严重的DNA损伤类型, 研究其产生及修复机制对理解疾病发生、发展具有非常积极的意义。测序技术的发展推动了多种DSB高通量测序技术的诞生, 使得在全基因组范围内检测DSB“热点”及其修复加工过程成为可能。目前, 这些技术已经广泛应用到DSB研究领域, 促进了多个关键修复因子功能的解析及多种体系下断裂热点的鉴定, 加深了在染色体环境对DSB调控机制方面的理解, 让DSB的研究进入了一个新维度。结合实验室的相关研究内容, 该文将对DSB的产生、修复机制及目前已发表的DSB高通量检测技术进行简要概述和总结。

关键词 DNA损伤修复; DNA双链断裂; 高通量测序

High Throughput Sequencing Technologies for DNA Double-Strand Break

WU Shuheng, LIANG Yu, WU Wei*

(Key Laboratory of Multi-Cell Systems, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract The DSB (DNA double-strand break) is the most severe type of DNA damage. Studying the underlying mechanisms of DSB generation and repair will help to understand disease initiation and progression. In the past decade, the advent of next-generation sequencing has greatly promoted the development of sequencing-

收稿日期: 2024-05-30

接受日期: 2024-07-08

国家自然科学基金(批准号: 32370575)资助的课题

*通信作者。Tel: 021-54921381, E-mail: wuw@sibcb.ac.cn

Received: May 30, 2024

Accepted: July 8, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32370575)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921381, E-mail: wuw@sibcb.ac.cn

based methods for DSB detection, making it possible to identify the “hotspots” of DSB and measure the repair and processing events. These assays have been widely applied to investigate the roles of many key repair factors, DSB hotspots in different biological contexts, impact of chromatin context on DSB repair, opening a fascinating portal into DSB research. Combined with the laboratory’s research focus, this article will briefly summarize the sources of DSB, their repair pathways, and published genome-wide detection assays for DSB.

Keywords DNA damage and repair; DNA double-strand break; high throughput sequencing

基因组DNA是遗传信息的重要载体,同时也是细胞进行DNA复制和RNA转录的模板,这使得DNA结构和信息的完整性至关重要。在内源代谢过程中或受到外界环境刺激时,DNA的结构极易发生损伤,DNA双链在相同或邻近位置发生磷酸二酯键断裂或脱氧核糖破坏时会形成DNA双链断裂(DNA double-strand break, DSB)。DSB是DNA损伤类型中最为严重的一种。未被修复的DSB会威胁基因组稳定性,进一步引起细胞死亡,而DSB的错误修复会引起基因信息改变和染色体畸变,从而增加如癌症、神经退行性疾病、不育等疾病的发生风险。为防止DNA损伤引起的一系列严重后果,细胞在进化过程中形成了一套精密的DNA损伤响应和修复通路。研究DSB的产生及其修复过程对于深入理解疾病发生进展、肿瘤耐药机制和挖掘新型药物靶点具有非常积极的意义。

传统的DSB检测和定量的手段主要为脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、彗星实验(comet assay)、末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)催化的dUTP末端标记反应(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling, TUNEL)、免疫荧光等低通量实验技术,而下一代测序技术的出现使得高通量检测DSB成为可能,极大地推动了DSB相关机制的研究进展^[1]。本文将聚焦DSB这一损伤类型,总结迄今为止基于高通量测序技术检测DSB产生及加工的各类方法和应用场景。

1 DNA双链断裂的产生和修复机制

1.1 DSB的产生

在受到化疗药物处理、电离辐射、UV照射等外界刺激时,细胞中的DNA会受损引起DSB^[2],同时,DSB也可以在细胞正常代谢过程中内源性地发生^[3]。如在细胞进行增殖的过程中,复制机器遇到未修复的DNA损伤发生停滞或者掺入错误的碱基引起错

配都可能会导致DSB^[4]。此外,在转录、复制、重组等过程中,拓扑异构酶II会通过切割DNA链短暂地产生DSB来缓解DNA构象变化引起的拓扑压力^[5]。在一些特殊情况下,DSB会在体内程序性地发生,在一些重要生命过程中不可或缺。以减数分裂为例,来自父本和母本的同源染色体通过复制、配对和同源重组(homologous recombination, HR)交换部分遗传物质,以保证后代染色体数目的稳定和遗传信息的多样性,而哺乳动物减数分裂同源重组的起始就需要组蛋白甲基转移酶PRDM9识别特定DNA基序,招募拓扑异构酶样蛋白SPO11在此区域切割产生DSB^[6]。这些热点位置上产生的DSB会进行断裂末端切割加工产生单链DNA(single strand DNA, ssDNA)、DMC1介导的单链侵入等步骤完成同源重组修复,最终同源染色体之间形成交叉(crossover)和非交叉(non-crossover),实现部分遗传信息的互换^[7]。在哺乳动物淋巴细胞抗原多样性生成过程中也会主动产生DSB,主要通过RAG1/2蛋白、AID蛋白等引入DNA损伤和断裂,从而介导V(D)J重排、高频突变、类别转换等步骤,是将有限的抗体基因片段转化为天文数字的抗体基因库所必需的,对适应性免疫的建立非常关键^[8]。

1.2 DSB修复通路

非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和HR是DSB修复的主要途径(图1)。

NHEJ是一种在任何细胞时期都可以发生的修复方式,旨在将断裂末端进行直接连接以避免DSB暴露时间过长而发生更严重的后果,容易在DNA断裂处引入片段的插入/缺失。DSB末端暴露后会很快被KU70-KU80异质二聚体识别,并结合DNA-PKcs形成DNA-PK复合物,从而拉近两个断裂的DNA末端。DNA的结合会激活DNA-PKcs激酶活性,招募和磷酸化其他NHEJ和DNA修复蛋白,如DNA连接酶IV(DNA ligase 4, LIG4)、XRCC4、XLF等,使断裂DNA末端距离更接近从而形成短距离复合物,最

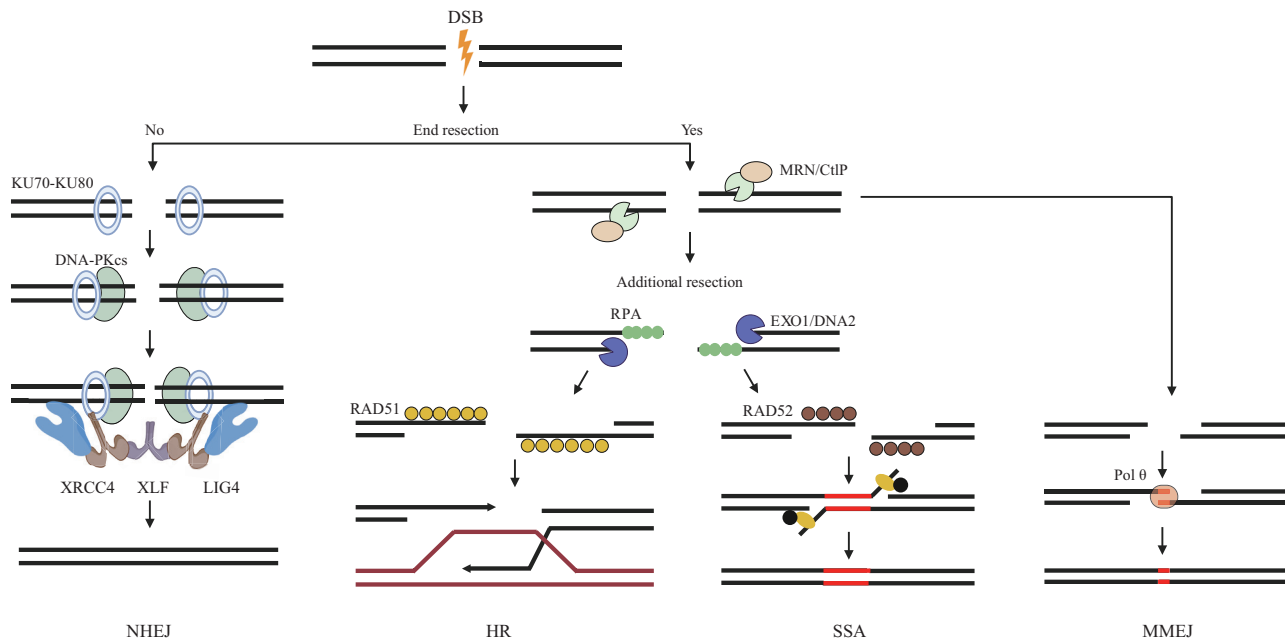


图1 DSB的主要修复途径

Fig.1 Main DSB repair pathways

终由LIG4直接完成末端连接^[9]。尽管LIG4可以容忍一定程度的碱基错配,但断裂的DNA末端结构在很多时候往往无法完美匹配进行直接连接,因此细胞内还包含大量DNA末端加工蛋白以保障末端连接的顺利进行。

与NHEJ不同,HR主要发生在S和G₂期,是一种以姐妹染色单体上的同源序列为模板的修复方式,因此具有较高的保真性。HR的发生起始于MRE11和CtIP介导的断裂末端切割。在哺乳动物细胞中,MRE11会和RAD50、NBS1形成MRN复合物,与CtIP互作,在断裂位点附近的5'端DNA链切割产生一个小缺口^[10],MRN的3'到5'的核酸外切酶活性会从缺口位置向断裂末端切割,同时核酸酶EXO1/DNA2从缺口处进行5'到3'方向切割,产生3'端ssDNA。为防止该单链DNA被降解,单链DNA结合蛋白RPA会结合到末端加工后产生的单链DNA上进行保护,随后RAD51被招募并置换掉RPA形成ssDNA-RAD51螺旋核蛋白丝,侵入姐妹染色单体形成重组中间产物D环(D-loop),利用同源片段进行DNA重新合成,完成HR修复^[11]。

除HR和NHEJ以外,还存在微同源末端连接(microhomology-mediated end joining, MMEJ)和单链DNA模板修复(single-strand annealing, SSA)这两种备选修复方式^[12]。MMEJ是一种与NHEJ相似的末

端连接修复通路,在MRN/CtIP起始DSB末端切割后,当断裂的两侧切割后暴露出2~20 bp长度的微同源序列时,这两段序列可以发生退火形成一个稳定的双链结构,而后招募DNA聚合酶和DNA连接酶分别填充双链上的间隙和完成DNA链的连接,通常会比NHEJ更长的DNA片段缺失^[13]。SSA通常依赖于RAD52,需要更长片段的同源序列,主要发生在一些串联重复元件的断裂修复过程,也是一种错误倾向性的修复方式^[14]。

2 DNA双链断裂的高通量测序检测技术

越来越多的研究发现DNA断裂在多种情境下会反复发生在特定的位置,一些较为经典的例子包括:(1) 肿瘤细胞中易发生染色体重排和基因拷贝数变异的普通脆性位点(common fragile site, CFS)集中在DNA复制较晚、富含AT序列的超大基因区域^[15];(2) DNA复制时,复制压力易使复制叉在A或T核苷酸重复序列(Poly-dA:dT)发生停滞,产生DSB^[16];(3) 微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)肿瘤细胞系在DNA解旋酶RecQ家族蛋白Werner缺陷时,会在发生大片段扩增的AT二核苷酸重复序列位置产生DSB^[17];(4) Cas9在单链向导RNA(single guide, sgRNA)靶向位点切割产生DSB^[18];(5) TOP2易在基因启动子区和CTCF/黏连蛋

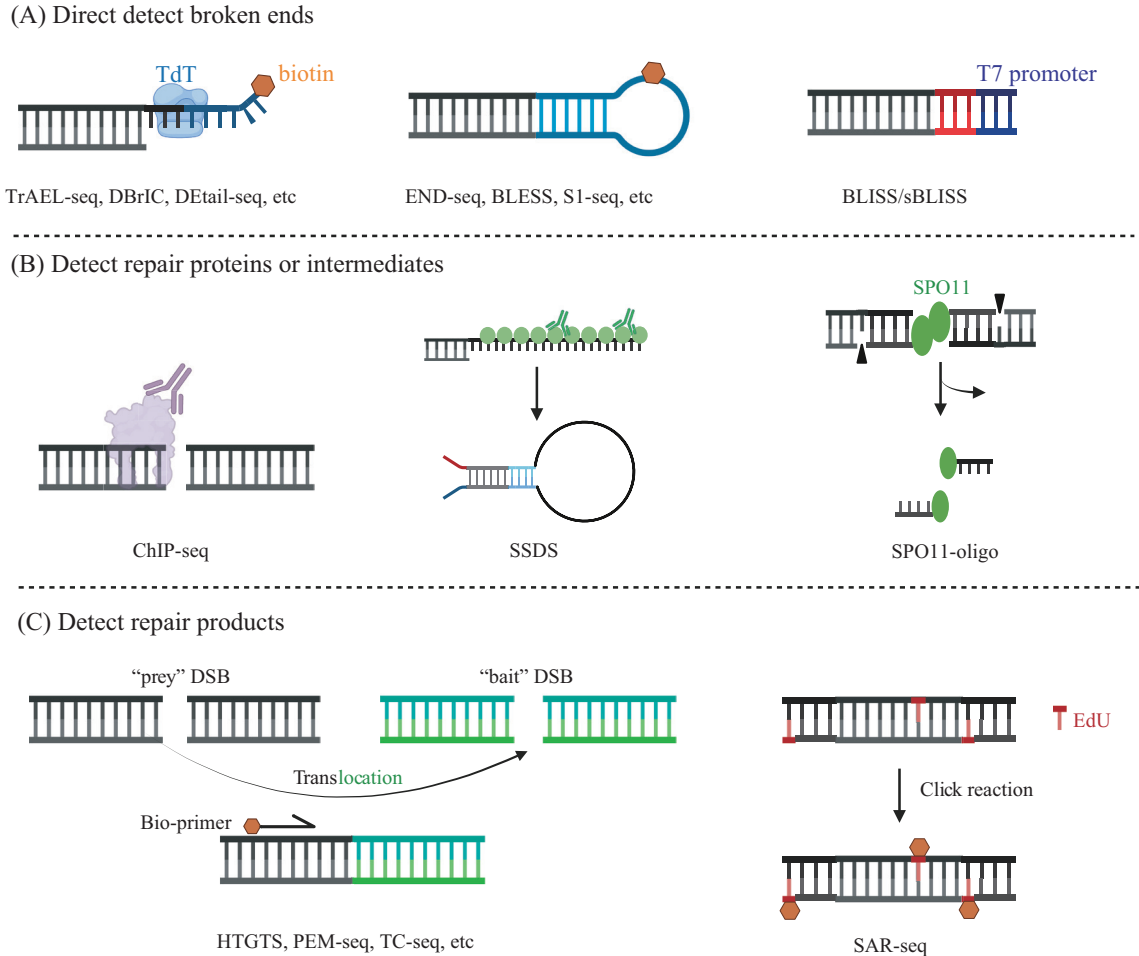


图2 主要的几种DSB测序检测技术原理示意

Fig.2 Methodological overview of main DSB detection sequencing technologies

白(cohesin)结合的染色体环锚处产生DSB^[19]; (6) 抗体基因进行V(D)J重组时, RAG1/2会在V、D、J基因片段两侧的重组信号序列(recombination signal sequence, RSS)切割产生DSB^[20]; (7) 减数分裂周期中, SPO11会在PRDM9特定结合序列切割产生DSB起始同源重组^[21]。此外, DNA断裂所在位置的染色体环境也可能会影响DNA断裂修复通路的选择, 引起不同的遗传变异后果^[22]。虽然, 传统的彗星实验等低通量实验方法能衡量细胞中整体的DNA断裂和损伤响应水平, 但无法定位基因组断裂发生的精确位置及描绘每个位点末端切割加工的情况, 而基于高通量测序的DSB检测技术将使这一切成为可能。

2010年, IACOVONI等^[23]通过把染色质免疫沉淀芯片(chromatin immunoprecipitation chip, ChIP-chip)和 γ -H2AX抗体相结合首次实现了全基因组的定点DSB响应过程的高通量检测。2011年, CHIARLE等^[24]开发了高灵敏度的易位检测技术HTGTS和

PAN等^[25]通过捕获减数分裂断裂加工释放的SPO11-oligo间接地捕获DSB信息, 最早成功地将高通量测序应用于DNA损伤修复研究。两年后, CROSETTO等^[26]开发了可直接检测DSB末端的BLESS技术。随后, 各类直接或间接检测DSB断裂和损伤应答的测序技术如雨后春笋般陆续涌现, 并广泛应用于机制研究中, 极大地推动了新机制的发现和领域的发展。这些技术根据检测的对象可分为以下三个大类: (1) 断裂末端的检测(图2A); (2) 修复蛋白或中间产物的检测(图2B); (3) 修复后产物的检测(图2C)。

2.1 断裂末端的直接检测

DSB断裂末端的直接检测技术根据捕获末端的方式, 主要有以下三种捕获方式(图2A)。

2.1.1 通过TdT在断裂的单链DNA末端添加核苷酸 TdT是一种特殊的DNA聚合酶, 可以不依赖模板在DNA的3'羟基末端连接核苷酸, 因此在DNA断裂的检测技术如TUNEL中广泛使用。基于相同

的原理,多个研究团队利用 TdT 该特性对断裂 DNA 末端进行标记,较常见的有通过 TdT 在断裂 DNA 末端添加带有生物素标记的单链或发夹结构的核苷酸序列,如 TrAEL-seq^[27]、BrlTL^[28]、DSB-seq^[29]和 DBrIC^[30],将基因组片段化后通过链霉亲和素磁珠富集被标记的 DNA 片段(见 2.1.2 中详细描述),进行扩增建库后测序得到发生了 DSB 的 DNA 序列信息(图 2A 左)。此外,与上述技术略有不同,DEtail-seq^[31]技术通过 TdT 在断裂末端添加 CT 为主的多核苷酸序列,再用 splinter 连接加上单链 DNA 建库接头,实现对断裂末端的捕获测序。

2.1.2 通过生物素化的核苷酸标记断裂末端
生物素是一种维生素 B 家族蛋白,可以和链霉亲和素蛋白紧密结合形成强大的非共价相互作用,这一牢固的相互作用特征使得生物素和链霉亲和素的配对在生物实验中得到了广泛的应用。多种 DNA 断裂末端的检测技术也同样利用了这一方法对断裂末端进行生物素标记,再用表面附着了链霉亲和素的磁珠对标记的 DNA 片段进行富集,而后进行建库测序。例如 END-seq^[32]、BLESS 及 BLESS 的衍生技术(DSBCapture^[33]、qDSB^[34]和 i-BLESS^[35])构建了带有生物素化核苷酸的发夹结构接头,与钝化后的断裂末端进行连接实现标记(图 2A 中);S1-seq^[36]使用了 5'端标记了生物素和经过封闭的寡核苷酸接头标记钝化处理后的双链 DNA 末端;Break-seq^[37]则是在对 DSB 断裂处进行末端修复过程中掺入了生物素-14-dATP 完成标记。

2.1.3 通过含 T7 启动子的寡核苷酸接头标记断裂末端
开发了 BLESS 的团队在 2017 年进一步开发了 BLISS 及优化版本 sBLISS^[38],BLISS 相关技术与 BLESS 的主要区别,在于应用了包含 T7 启动子序列的双链寡核苷酸接头,在连接到 DSB 断裂末端后,通过启动 T7 RNA 聚合酶介导的体外转录大量扩增 DSB 位置邻近序列(图 2A 右)。BLISS/sBLISS 方法可以在玻片上对细胞/组织内的 DSB 进行原位标记,可适用于细胞量较少时的情况。

上述提到的方法虽然都可以用来直接检测 DSB 信号,但因为在细胞处理和建库步骤等过程中的差异导致不同的方法在检测断裂的敏感度、信噪比以及位点精确性上各有不同。首先,大多数方法会采取甲醛交联或琼脂糖胶块方式固定细胞来防止细胞处理过程引入机械损伤,然而甲醛可能会产生非特

异性的交联作用引入噪音,琼脂糖胶块的方法可以避免这一影响,但是在琼脂糖胶块中对细胞和 DNA 进行处理需要耗费更多时间和处理条件的摸索。其次,不同的技术连接接头的方式使得所检测到的断裂位点有区别,TdT 的连接具有单链 DNA 偏好^[39],可能会影响未发生末端切割的 DSB 的连接效率。再次,对 DSB 末端进行钝化处理的技术可以捕获到末端切割加工的终止位置,但未进行钝化处理的方法无法获得这一信息。用于钝化的酶的选择也会一定程度上影响断裂位点检测的准确性、信噪比和捕获能力,例如 S1-seq 使用特异切割单链 DNA 的核酸酶 S1 切除悬挂单链 DNA,但同时会在可以形成三链 DNA 二级结构的多嘧啶/多嘌呤镜像重复序列产生大量富集信号^[40-41];END-seq 使用核酸外切酶 ExoVII/ExoT 进行钝化,可以显著提高信号的信噪比;BLESS、BLISS 等多种技术钝化均通过 T4 DNA 聚合酶,T4 DNA 聚合酶既带有 3'端向 5'端的外切酶活性同时又带有 5'端向 3'的聚合酶活性,因此检测到的位点不一定是准确的断裂或末端切割终止位点。一些 DSB 产生后末端有时不会是 3'-羟基和 5'-磷酸的理想连接状态,被称为“脏末端”,例如拓扑异构酶 II 在切割后会在断裂末端与酪氨酸残基形成共价键,从而干扰接头的连接,这种情况下钝化酶的选择就尤为重要,通过组合设计处理末端能力不同的核酸酶可以研究这一类型断裂的修复加工过程^[42-43]。

2.2 修复蛋白或中间产物的检测

DSB 的修复过程有非常多的蛋白参与,间接检测这些蛋白结合信号也常用于 DSB 损伤的鉴定和修复机制的研究。比起在实验室中搭建一套 DNA 断裂末端的直接检测方法,通过对这些蛋白进行 ChIP-seq 检测来间接获取断裂的位点和信号是常用的手段之一。ChIP-seq 是一项检测目标蛋白所结合的 DNA 片段的测序技术(图 2B 左),从 2007 年^[44]被开发到现在已发展得十分成熟,是表观遗传和基因组学领域最常用的技术之一,也是最早全基因组检测 DSB 信号(γ -H2AX)的方法,后续也被用于 XRCC4^[45]、LIG4^[46]、NBS1^[45,47]、MRE11^[48-49]、53BP1^[46,49]等其他重要 DSB 信号的检测。有一些蛋白,如 RAD51/RPA/DMC1 会结合在末端切割产生的 ssDNA 上,因此也在 ChIP-seq 的基础上发展出了富集这些蛋白所结合的单链 DNA 的检测方法,主要有 SSDS(single strand DNA sequencing)^[50]和链特异

性的ChIP-seq^[51]: SSDS于2012年被开发,利用单链DNA与双链DNA形成发夹结构能力的不同以实现富集(图2B中),用于减数分裂过程中DMC1/RAD51的检测^[52-58],后也用于研究HR修复过程中的RAD51/RPA结合^[16-17,32,48,59-60];链特异性的ChIP-seq利用基于TdT开发的Adaptase技术在单链DNA上进行加尾和接头连接反应,之前多用于研究复制过程核小体或组蛋白的传递和恢复^[61-62],现在也可用于检测DSB修复蛋白Ddc1、Dpb11、RPA、RAD51等结合的链特异性检测^[51]。

在DSB修复加工的过程中,也会产生一些特殊结构的中间产物。例如在减数分裂的断裂产生过程中,SPO11会在指定位点进行切割,MRN在断裂末端附近进行切割后SPO11结合的这段小的DNA片段会被释放出来,捕获这些释放的SPO11结合的寡核苷酸序列也可以定位DSB位点和获取强度信息。基于这个原理,MSKCC的Scott KEENEY团队开发了SPO11-oligo技术(图2B右),持续地应用在了酵母和小鼠体系中减数分裂断裂的一系列机制研究中^[21,25,63-69]。

上述这几种方法都有各自的缺陷,基于ChIP-seq的方法和SPO11-oligo都依赖于靶向的修复蛋白是否有较好的抗体;SSDS依赖于单链DNA形成发夹结构的能力,存在一定序列偏好;而链特异性的ChIP-seq依赖于TdT在DNA末端连接接头的的能力。

2.3 修复后产物的检测

除了HR以外的其他DSB修复通路,通常在修复后会产生染色体易位、DNA片段缺失/插入等类型的遗传信息变异,HTGTS及其类似(TC-seq^[70]、GEFTLC-seq^[71]和IDLV^[72])或衍生方法(PEM-seq^[73-74]、CSR-HTGTS^[75]、LAM-HTGTS^[76]和HTGTS-V(D)J-seq^[77])就是利用这个现象,通过在细胞中诱导产生一个“诱饵”断裂,然后捕获和该“诱饵”断裂位点发生了易位的基因组其他位置来检测DSB的发生和修复情况(图2C左)。这类方法的缺陷主要是需要预先在细胞中引入一个较强的DSB,或细胞内有较强的自发性DSB,且NHEJ较为活跃能产生一定量的易位,不能直接反映DSB的产生和处理中间过程。

除NHEJ以外,在大部分的修复过程中会发生DNA片段的重新合成,因此也可以在静息细胞或有丝分裂后细胞体系中,通过检测新合成的DNA片段区域,即修复区域,来捕获断裂信息。SAR-seq/Repair-seq是基于此原理开发的方法,通过将细胞与胸腺嘧

啶类似物EdU进行共培养,随后利用点击化学反应在EdU上连接生物素,再用链霉亲和素磁珠对含有生物素标记的EdU的DNA片段进行富集(图2C右),最初用于神经元内的DNA单链断裂的修复检测^[78-79],而后链特异性的SAR-seq技术也被用于研究G₁期的DSB修复机制^[48,60]。这类方法的缺点在于DNA复制也会进行DNA合成掺入大量EdU,无法与DNA断裂修复合成掺入的EdU进行区分,所以适用场景有限,仅限于静息细胞和有丝分裂后细胞体系。

3 总结和展望

基于测序的DSB检测方法发展极快地推动了DSB领域的研究进展,此外,这些技术也被应用到了多个其他领域,包括CRISPR/Cas9技术效率和安全性^[32,38,80]、端粒末端序列结构识别^[26]、DNA二级结构鉴定^[40]等方面的研究。当然,目前这些技术也还存在一些局限。首先,测序方法要检测到DSB信号的前提是DSB重复发生在同一位置或区域,如果是基因组上随机产生的损伤,则测序的方法就不太适用了。其次,大部分这些方法都需要进行PCR扩增,尽管有的方法在建库过程中添加了唯一分子标记(unique molecular identifier, UMI)来去除扩增引起的定量错误,但是依然无法完全保证绝对的定量准确,近期有团队开发了不需要进行PCR扩增的INDUCE-seq^[81],其也许是可以较好地进行DSB的定量的方法。最后,这些技术都是以一群细胞(最低也要10³个的细胞)为研究对象,而越来越多的研究发现细胞间存在异质性,进一步优化和发展单细胞的DSB检测技术将是非常吸引人的方向。综上所述,虽然DSB的测序检测技术还有提高的空间,但已显著增加了研究人员对DSB发生、修复、加工等过程的认知,将来也一定会为这个领域的研究发展创造更多的途径和可能。

参考文献 (References)

- [1] VERGARA X, SCHEP R, MEDEMA R H, et al. From fluorescent foci to sequence: illuminating DNA double strand break repair by high-throughput sequencing technologies [J]. DNA Repair, 2022, 118: 103388.
- [2] MEHTA A, HABER J E. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 6(9): a016428.
- [3] TUBBS A, NUSSENZWEIG A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer [J]. Cell, 2017, 168(4):

- 644-56.
- [4] CORTEZ D. Replication-coupled DNA repair [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(5): 866-76.
 - [5] POMMIER Y, NUSSENZWEIG A, TAKEDA S, et al. Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(6): 407-27.
 - [6] KEENEY S, LANGE J, MOHIBULLAH N. Self-organization of meiotic recombination initiation: general principles and molecular pathways [J]. *Annu Rev Genet*, 2014, 48: 187-214.
 - [7] BAUDAT F, IMAI Y, DE MASSY B. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(11): 794-806.
 - [8] ALT F W, ZHANG Y, MENG F L, et al. Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system [J]. *Cell*, 2013, 152(3): 417-29.
 - [9] STINSON B M, LOPARO J J. Repair of DNA double-strand breaks by the nonhomologous end joining pathway [J]. *Annu Rev Biochem*, 2021, 90: 137-64.
 - [10] PAULL T T. 20 years of Mre11 biology: no end in sight [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(3): 419-27.
 - [11] CEJKA P, SYMINGTON L S. DNA end resection: mechanism and control [J]. *Annu Rev Genet*, 2021, 55: 285-307.
 - [12] CECCALDI R, RONDINELLI B, D'ANDREA A D. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(1): 52-64.
 - [13] SFEIR A, SYMINGTON L S. Microhomology-mediated end joining: a back-up survival mechanism or dedicated pathway [J]? *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(11): 701-14.
 - [14] MCVEY M, KHODAVERDIAN V Y, MEYER D, et al. Eukaryotic DNA polymerases in homologous recombination [J]. *Annu Rev Genet*, 2016, 50: 393-421.
 - [15] DEBATISSE M, LE TALLEC B, LETESSIER A, et al. Common fragile sites: mechanisms of instability revisited [J]. *Trends Genet*, 2012, 28(1): 22-32.
 - [16] TUBBS A, SRIDHARAN S, VAN WIETMARSCHEN N, et al. Dual roles of poly(dA:dT) tracts in replication initiation and fork collapse [J]. *Cell*, 2018, 174(5): 1127-42, e19.
 - [17] VAN WIETMARSCHEN N, SRIDHARAN S, NATHAN W J, et al. Repeat expansions confer WRN dependence in microsatellite-unstable cancers [J]. *Nature*, 2020, 586(7828): 292-8.
 - [18] RAN F A, HSU P D, WRIGHT J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281-308.
 - [19] CANELA A, MAMAN Y, JUNG S, et al. Genome organization drives chromosome fragility [J]. *Cell*, 2017, 170(3): 507-21, e18.
 - [20] SCHATZ D G, SWANSON P C. V(D)J recombination: mechanisms of initiation [J]. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 167-202.
 - [21] LAM I, KEENEY S. Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 7(1): a016634.
 - [22] SCHEP R, BRINKMAN E K, LEEMANS C, et al. Impact of chromatin context on Cas9-induced DNA double-strand break repair pathway balance [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(10): 2216-30, e10.
 - [23] IACOVONI J S, CARON P, LASSADI I, et al. High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome [J]. *EMBO J*, 2010, 29(8): 1446-57.
 - [24] CHIARLE R, ZHANG Y, FROCK R L, et al. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells [J]. *Cell*, 2011, 147(1): 107-19.
 - [25] PAN J, SASAKI M, KNIEWEL R, et al. A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 719-31.
 - [26] CROSETTO N, MITRA A, SILVA M J, et al. Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(4): 361-5.
 - [27] KARA N, KRUEGER F, RUGG-GUNN P, et al. Genome-wide analysis of DNA replication and DNA double-strand breaks using TrAEL-seq [J]. *PLoS Biol*, 2021, 19(3): e3000886.
 - [28] SHASTRI N, TSAI Y C, HILE S, et al. Genome-wide identification of structure-forming repeats as principal sites of fork collapse upon ATR inhibition [J]. *Mol Cell*, 2018, 72(2): 222-38, e11.
 - [29] BARANELLO L, KOUZINE F, WOJTOWICZ D, et al. DNA break mapping reveals topoisomerase II activity genome-wide [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7): 13111-22.
 - [30] GREGOIRE M C, MASSONNEAU J, LEDUC F, et al. Quantification and genome-wide mapping of DNA double-strand breaks [J]. *DNA Repair*, 2016, 48: 63-8.
 - [31] XU W, LIU C, ZHANG Z, et al. DEtail-seq is an ultra-efficient and convenient method for meiotic DNA break profiling in multiple organisms [J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(6): 1392-407.
 - [32] CANELA A, SRIDHARAN S, SCIASCIA N, et al. DNA breaks and end resection measured genome-wide by end sequencing [J]. *Mol Cell*, 2016, 63(5): 898-911.
 - [33] LENSING S V, MARSICO G, HANSEL-HERTSCH R, et al. DSBCapture: *in situ* capture and sequencing of DNA breaks [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(10): 855-7.
 - [34] ZHU Y, BIERNACKA A, PARDO B, et al. qDSB-Seq is a general method for genome-wide quantification of DNA double-strand breaks using sequencing [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2313.
 - [35] BIERNACKA A, ZHU Y, SKRZYPCZAK M, et al. i-BLESS is an ultra-sensitive method for detection of DNA double-strand breaks [J]. *Commun Biol*, 2018, 1: 181.
 - [36] MIMITOU E P, YAMADA S, KEENEY S. A global view of meiotic double-strand break end resection [J]. *Science*, 2017, 355(6320): 40-5.
 - [37] HOFFMAN E A, MCCULLEY A, HAARER B, et al. Break-seq reveals hydroxyurea-induced chromosome fragility as a result of unscheduled conflict between DNA replication and transcription [J]. *Genome Res*, 2015, 25(3): 402-12.
 - [38] BOUWMAN B A M, AGOSTINI F, GARNERONE S, et al. Genome-wide detection of DNA double-strand breaks by insuspension BLISS [J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(12): 3894-941.
 - [39] MOTE A E A, BERDIS A J. Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804(5): 1151-66.
 - [40] MATOS-RODRIGUES G, VAN WIETMARSCHEN N, WU W, et al. S1-END-seq reveals DNA secondary structures in human cells [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(19): 3538-52, e5.
 - [41] MAEKAWA K, YAMADA S, SHARMA R, et al. Triple-helix potential of the mouse genome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(19): e2203967119.
 - [42] CANELA A, MAMAN Y, HUANG S N, et al. Topoisomerase II-

- induced chromosome breakage and translocation is determined by chromosome architecture and transcriptional activity [J]. *Mol Cell*, 2019, 75(2): 252-66,e8.
- [43] HUANG S N, MICHAELS S A, MITCHELL B B, et al. Exonuclease VII repairs quinolone-induced damage by resolving DNA gyrase cleavage complexes [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(10): eabe0384.
- [44] JOHNSON D S, MORTAZAVI A, MYERS R M, et al. Genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions [J]. *Science*, 2007, 316(5830): 1497-502.
- [45] DELLINO G I, PALLUZZI F, CHIARIELLO A M, et al. Release of paused RNA polymerase II at specific loci favors DNA double-strand-break formation and promotes cancer translocations [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(6): 1011-23.
- [46] CLOUAIRE T, ROCHER V, LASHGARI A, et al. Comprehensive mapping of histone modifications at DNA double-strand breaks deciphers repair pathway chromatin signatures [J]. *Mol Cell*, 2018, 72(2): 250-62,e6.
- [47] WIENERT B, WYMAN S K, RICHARDSON C D, et al. Unbiased detection of CRISPR off-targets *in vivo* using DISCOVER-Seq [J]. *Science*, 2019, 364(6437): 286-9.
- [48] PAIANO J, ZOLNEROWICH N, WU W, et al. Role of 53BP1 in end protection and DNA synthesis at DNA breaks [J]. *Genes Dev*, 2021, 35(19/20): 1356-67.
- [49] ZOU R S, MARIN-GONZALEZ A, LIU Y, et al. Massively parallel genomic perturbations with multi-target CRISPR interrogates Cas9 activity and DNA repair at endogenous sites [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(9): 1433-44.
- [50] KHIL P P, SMAGULOVA F, BRICK K M, et al. Sensitive mapping of recombination hotspots using sequencing-based detection of ssDNA [J]. *Genome Res*, 2012, 22(5): 957-65.
- [51] PERITORE M, REUSSWIG K U, BANTELE S C S, et al. Strand-specific ChIP-seq at DNA breaks distinguishes ssDNA versus dsDNA binding and refutes single-stranded nucleosomes [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(8): 1841-53,e4.
- [52] BHATTACHARYYA T, WALKER M, POWERS N R, et al. Prdm9 and meiotic cohesin proteins cooperatively promote DNA double-strand break formation in mammalian spermatocytes [J]. *Curr Biol*, 2019, 29(6): 1002-18,e7.
- [53] IMAI Y, BIOT M, CLEMENT J A, et al. PRDM9 activity depends on HELLS and promotes local 5-hydroxymethylcytosine enrichment [J]. *eLife*, 2020, 9: e57117.
- [54] MIHOLA O, LANDA V, PRATTO F, et al. Rat PRDM9 shapes recombination landscapes, duration of meiosis, gametogenesis, and age of fertility [J]. *BMC Biol*, 2021, 19(1): 86.
- [55] MIHOLA O, PRATTO F, BRICK K, et al. Histone methyltransferase PRDM9 is not essential for meiosis in male mice [J]. *Genome Res*, 2019, 29(7): 1078-86.
- [56] PAPANIKOS F, CLEMENT J A J, TESTA E, et al. Mouse ANKRD31 regulates spatiotemporal patterning of meiotic recombination initiation and ensures Recombination between X and Y sex chromosomes [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(5): 1069-85 e11.
- [57] SMAGULOVA F, BRICK K, PU Y, et al. Suppression of genetic recombination in the pseudoautosomal region and at subtelomeres in mice with a hypomorphic Spo11 allele [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 493.
- [58] PRATTO F, BRICK K, KHIL P, et al. DNA recombination. Recombination initiation maps of individual human genomes [J]. *Science*, 2014, 346(6211): 1256442.
- [59] CALLEN E, ZONG D, WU W, et al. 53BP1 enforces distinct pre- and post-resection blocks on homologous recombination [J]. *Mol Cell*, 2020, 77(1): 26-38,e7.
- [60] FOWLER F C, CHEN B R, ZOLNEROWICH N, et al. DNA-PK promotes DNA end resection at DNA double strand breaks in G₀ cells [J]. *eLife*, 2022, 11: e74700.
- [61] LI Z, DUAN S, HUA X, et al. Asymmetric distribution of parental H3K9me3 in S phase silences L1 elements [J]. *Nature*, 2023, 623(7987): 643-51.
- [62] YU C, GAN H, SERRA-CARDONA A, et al. A mechanism for preventing asymmetric histone segregation onto replicating DNA strands [J]. *Science*, 2018, 361(6409): 1386-9.
- [63] CLAEYS BOUUAERT C, TISCHFIELD S E, PU S, et al. Structural and functional characterization of the Spo11 core complex [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2021, 28(1): 92-102.
- [64] MU X, MURAKAMI H, MOHIBULLAH N, et al. Chromosome-autonomous feedback down-regulates meiotic DNA break competence upon synaptonemal complex formation [J]. *Genes Dev*, 2020, 34(23/24): 1605-18.
- [65] MURAKAMI H, LAM I, HUANG P C, et al. Multilayered mechanisms ensure that short chromosomes recombine in meiosis [J]. *Nature*, 2020, 582(7810): 124-8.
- [66] SANCHEZ A, ADAM C, RAUH F, et al. Exo1 recruits Cdc5 polo kinase to MutLgamma to ensure efficient meiotic crossover formation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(48): 30577-88.
- [67] SUBRAMANIAN V V, ZHU X, MARKOWITZ T E, et al. Persistent DNA-break potential near telomeres increases initiation of meiotic recombination on short chromosomes [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 970.
- [68] THACKER D, MOHIBULLAH N, ZHU X, et al. Homologue engagement controls meiotic DNA break number and distribution [J]. *Nature*, 2014, 510(7504): 241-6.
- [69] ZHU X, KEENEY S. High-resolution global analysis of the influences of Bas1 and Ino4 transcription factors on meiotic DNA break distributions in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2015, 201(2): 525-42.
- [70] OLIVEIRA T Y, RESCH W, JANKOVIC M, et al. Translocation capture sequencing: a method for high throughput mapping of chromosomal rearrangements [J]. *J Immunol Methods*, 2012, 375(1/2): 176-81.
- [71] DELANEY J R, LA SPADA A R. Protocol for mapping double-stranded DNA break sites across the genome with translocation capture sequencing [J]. *STAR Protoc*, 2023, 4(2): 102205.
- [72] GABRIEL R, LOMBARDO A, ARENS A, et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(9): 816-23.
- [73] LIU Y, YIN J, GAN T, et al. PEM-seq comprehensively quantifies DNA repair outcomes during gene-editing and DSB repair [J]. *STAR Protoc*, 2022, 3(1): 101088.
- [74] LIU M, ZHANG W, XIN C, et al. Global detection of DNA repair outcomes induced by CRISPR-Cas9 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(15): 8732-42.
- [75] ZHANG X, ZHANG Y, BA Z, et al. Fundamental roles of chromatin loop extrusion in antibody class switching [J]. *Nature*, 2019, 575(7782): 385-9.
- [76] HU J, MEYERS R M, DONG J, et al. Detecting DNA double-

- stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(5): 853-71.
- [77] DAI H Q, HU H, LOU J, et al. Loop extrusion mediates physiological Igh locus contraction for RAG scanning [J]. *Nature*, 2021, 590(7845): 338-43.
- [78] WU W, HILL S E, NATHAN W J, et al. Neuronal enhancers are hotspots for DNA single-strand break repair [J]. *Nature*, 2021, 593(7859): 440-4.
- [79] REID D A, REED P J, SCHLACHETZKI J C M, et al. Incorporation of a nucleoside analog maps genome repair sites in post-mitotic human neurons [J]. *Science*, 2021, 372(6537): 91-4.
- [80] HUANG M E, QIN Y, SHANG Y, et al. C-to-G editing generates double-strand breaks causing deletion, transversion and translocation [J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(2): 294-304.
- [81] DOBBS F M, VAN EIJK P, FELLOWS M D, et al. Precision digital mapping of endogenous and induced genomic DNA breaks by INDUCE-seq [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3989.