

# 復旦大學

## 本科畢業論文



論文題目：DNA 錯配修復基因在卵巢衰老中的功能研究

姓 名：李欣然 學 號：18307110466

院 系：生命科學學院

專 業：生物科學

指導教師：張鋒 職 稱：教授

單 位：生命科學學院

完成日期：2022 年 5 月 30 日

# DNA 错配修复基因在卵巢衰老中的 功能研究

完成人

李欣然

指导小组成员

张锋 教授

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
缩略词表.....	III
一、前言.....	1
1.1 DNA 错配修复（MMR）系统.....	1
1.1.1 MMR 系统的功能.....	1
1.1.2 MMR 系统的组成与作用.....	1
1.1.3 MMR 系统异常疾病.....	3
1.2 MutS 同源蛋白 6（MutS homolog 6, MSH6）.....	3
1.2.1 MSH6 的编码基因定位与蛋白结构.....	3
1.2.2 MutS $\alpha$ 复合体结构.....	4
1.2.3 MSH6 在 DNA 修复过程中功能作用.....	5
1.2.4 <i>MSH6</i> 遗传变异与肿瘤易感性.....	5
1.3 DNA 修复基因与女性生殖系统衰老的关联.....	5
1.3.1 DNA 修复基因突变可能导致 POI.....	6
1.3.2 <i>MSH6</i> 与卵巢衰老的关联研究.....	7
1.4 MSH6 功能在卵巢衰老中的作用研究.....	7
二、材料与方法.....	9
2.1 实验材料.....	9
2.1.1 小鼠品系.....	9

2.2 实验仪器.....	9
2.3 实验试剂.....	10
2.4 引物列表.....	10
2.5 实验方法.....	10
2.5.1 小鼠基因型鉴定.....	11
2.5.2 小鼠组织提取总 RNA.....	11
2.5.3 cDNA 的逆转录实验.....	12
2.5.4 实时定量 PCR.....	13
2.5.5 小鼠卵子促排与免疫荧光染色.....	13
三、研究结果.....	15
3.1 <i>Msh6</i> 突变体的构建与检测.....	15
3.2 <i>Msh6</i> 移码突变后的蛋白结构预测.....	15
3.3 MMR 基因在突变体卵巢中的表达量变化.....	16
3.4 <i>Msh6</i> 突变体卵子异常情况增加.....	16
3.5 <i>Msh6</i> 突变体卵泡发育异常.....	17
四、讨论.....	19
参考文献.....	21
致 谢.....	24

# 摘要

DNA 错配修复 (mismatch repair, MMR) 系统能够识别修复在 DNA 复制或重组过程中出现的碱基错配与错误插入或缺失, 对基因组稳定性有重要作用。近年来临床研究发现 MMR 系统的缺陷会导致微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 与自发突变率提高, 引发多种癌症易感性; 而最新研究表明 DNA 修复在卵巢衰老过程中有关键作用, MMR 系统核心蛋白 MutS $\alpha$  (MSH2 • MSH6) 中 MSH6 的功能缺失被证实与自然绝经年龄 (age at natural menopause, ANM) 提前相关, 并在一例散发早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 病例中发现 *MSH6* 杂合错义突变 c.3551T>A (p.Met1184Lys), 暗示 MSH6 与女性生殖系统疾病的关联。为进一步明确 MSH6 在卵巢衰老中的功能, 本课题利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Msh6* 突变的 C57BL/6J 小鼠。通过实时定量 PCR 对 *Msh6* 与 *Msh2* 进行表达量下调验证; 进一步研究生殖表型, 对促排卵子的免疫荧光结果显示, *Msh6* 突变体的卵子染色体异常情况增加; 组织学上对卵巢切片进行 HE 染色观察, 发现突变体卵泡发育明显弱于野生型, 且闭锁卵泡占比增加。综上所述, 我们通过动物模型研究表明, MSH6 参与保证卵泡正常发育过程, 其有害变异可能导致卵泡的异常闭锁, 从而影响 ANM 与 POI 进展。研究结果提示 MSH6 在卵巢衰老过程中的贡献, 拓展对女性生殖疾病致病方式的认知, 提供新的治疗靶点, 有望服务于 POI、ANM 提前等疾病的遗传分析和早期筛查。

**关键词:** MMR, *MSH6*, 卵巢衰老, ANM

# Abstract

DNA mismatch repair (MMR) system can recognize and repair base mismatches and erroneous insertions or deletions that occur during DNA replication and recombination, which plays a significant role in genome stability. In recent years, clinical studies have found that the abnormality of MMR system leads to microsatellite instability (MSI) and spontaneous mutation rate increases, triggering a variety of cancer susceptibility. Besides, latest research shows that DNA repair also has a key role in the ovarian aging process, and the function loss of MSH6 in MMR system core protein MutS $\alpha$  (MSH2·MSH6) has been confirmed to be associated with the earlier age at natural menopause (ANM). A heterozygous missense variant of *MSH6* c.3551T>A (p.Met1184Lys) was found in a case of sporadic premature ovarian insufficiency (POI), suggesting the association of MSH6 with female reproductive diseases. In order to further clarify the function of MSH6 in ovarian aging, this study used CRISPR/Cas9 technique to generate a C57BL/6J mouse model with a loss-of-function mutation of *Msh6*. The down-regulation of *Msh6* and *Msh2* was verified by real-time quantitative PCR. Further study on reproductive phenotype, the immunofluorescence results of superovulation showed that the chromosome abnormality increased in mutants. Histologically, HS staining of ovarian sections showed that ovarian follicle development of *Msh6* mutant was significantly weaker than wild-type female controls, and the proportion of atresia follicles increased. In conclusion, our animal model study suggests that MSH6 is involved in ensuring the normal development of follicles, whose harmful variation may lead to abnormal atresia of follicles, thus affecting the ANM and progress of POI. Our results suggest MSH6 contributes to ovarian aging, expand the understanding of the pathogenesis of female reproductive diseases, provide new therapeutic targets, and are expected to serve for genetic analysis and early screening of diseases such as POI and advance ANM.

**Keywords:** MMR, *Msh6*, ovarian aging, ANM

## 缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
ANM	Age at natural menopause	自然绝经年龄
ATPase	adenosine triphosphatase	三磷酸腺苷酸酶
bp	base pair	碱基对
Cas	CRISPR associated protein	CRISPR 相关蛋白
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat	规律成簇间隔短回文重复
D1-5	Domain1-5	结构域 1-5
dMMR	MMR deficiency	MMR 系统缺陷
Exo1	exonuclease 1	核酸外切酶 1
GTBP	G/T Binding Protein	人类 G/T 结合蛋白
GWAS	genome-wide association studies	全基因组关联研究
Het	heterozygote	杂合子
hMSH6	human MSH6	人类 MSH6
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancers	遗传性非息肉性大肠癌
Homo	homozygote	纯合子
HR	homologous recombination	同源重组
IDL	insertion/deletion loop	插入/缺失环
LS	lynch syndrome	林奇综合征
Mb	magebase	兆碱基
MMR	mismatch repair	错配修复
MSH6	MutS homolog 6	MutS 同源蛋白 6
MSI	microsatellite Instability	微卫星不稳定性
NGS	next generation sequencing	下一代基因测序
NLSs	nuclear localization sequences	核定位序列
NMD	nonsense-mediated mRNA decay	无义突变介导 mRNA 降解

PCNA	Proliferating Cellular Nuclear Antigen	增殖细胞核抗原
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PFA	Paraformaldehyde	多聚甲醛
POI	premature ovarian insufficiency	卵巢功能不全
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction	实时定量聚合酶链式反应
RFC	replication factor C	复制因子 C
RPA	Replication Protein A	复制蛋白 A
ssDNA	single strand DNA	单链 DNA
WES	whole exome sequencing	全外显子测序
WT	wildtype	野生型

---

# 一、前言

## 1.1 DNA 错配修复 (MMR) 系统

DNA 错配修复系统是一种用于识别修复在 DNA 复制和重组过程中可能出现的碱基错误插入，缺失和错配以及某些形式 DNA 损伤的系统，能够纠正错配并阻止异源重组，保证基因组的稳定性和完整性。MMR 系统的缺失会导致自发变异性提高 50-1000 倍，导致碱基置换、移码突变以及同源序列之间错误重组的发生率大大提高<sup>[1]</sup>。

### 1.1.1 MMR 系统的功能

MMR 系统广泛存在于生物体中，进化上非常保守，主要功能是修复 DNA 复制过程中产生的错配，包括单碱基错配和 2 个以上的插入或缺失；以及修复自然条件下重组产生的异源双链核酸的错配部分。同时，MMR 系统与 DNA 损伤应答相关，通过系统识别并处理损伤，激活损伤信号传导途径，导致细胞周期停止；MMR 蛋白充当 DNA 损伤的传感器，参与凋亡信号传导<sup>[2]</sup>。B 细胞发育中由于基因重排导致的抗体分化、细胞凋亡等，也均有 MMR 系统的参与。综上，MMR 系统涉及多种 DNA 修复过程相关的细胞通路，对于基因组的稳定性有着复杂作用。

### 1.1.2 MMR 系统的组成与作用

MMR 系统由多种特异性修复 DNA 碱基错配的酶分子组成，根据功能结构分为 MutS、MutL 和 MutH 三个蛋白家族。MutS 负责识别错配位点并与之结合，随后 MutL 蛋白与 MutS-DNA 形成复合体，增强其稳定性，并激活 MutH 内切酶活性，协同解旋酶和单链结合蛋白将错配序列切除。

MMR 系统的作用过程可以分为三个步骤：

1) MutS 家族蛋白错配识别：真核生物为 MutS $\alpha$  (MSH2·MSH6) 或 MutS $\beta$  (MSH2·MSH3)

2) 核酸外切酶去除错配：哺乳动物核酸外切酶 1 (exonuclease 1, Exo1) 依赖于 MutS 与 MutL $\alpha$  (MLH1·PMS2)、复制因子 C (replication factor C, RFC)、增殖细胞核抗原 (Proliferating Cellular Nuclear Antigen, PCNA) 发挥作用

3) DNA 合成: RFC、PCNA 和复制蛋白 A (Replication Protein A, RPA) 辅助 DNA 聚合酶进行 DNA 合成。

MMR 系统依赖于新合成子链的识别信号, 能够识别子链去除错配。革兰氏阴性菌利用瞬时半甲基化识别 (亲链具有甲基化标记, 而子链尚未形成); 但在真核生物中, 其识别机制被怀疑与 DNA 复制中单链 DNA (single strand DNA, ssDNA) 的缺口有关, 而单链 DNA (ssDNA) 缺口可能与错配处距离几百个碱基对。最新提出的人类 MMR 作用模型描述了错配发生于前导链或后随链的错配修复方式 (图 1.1) [3]。

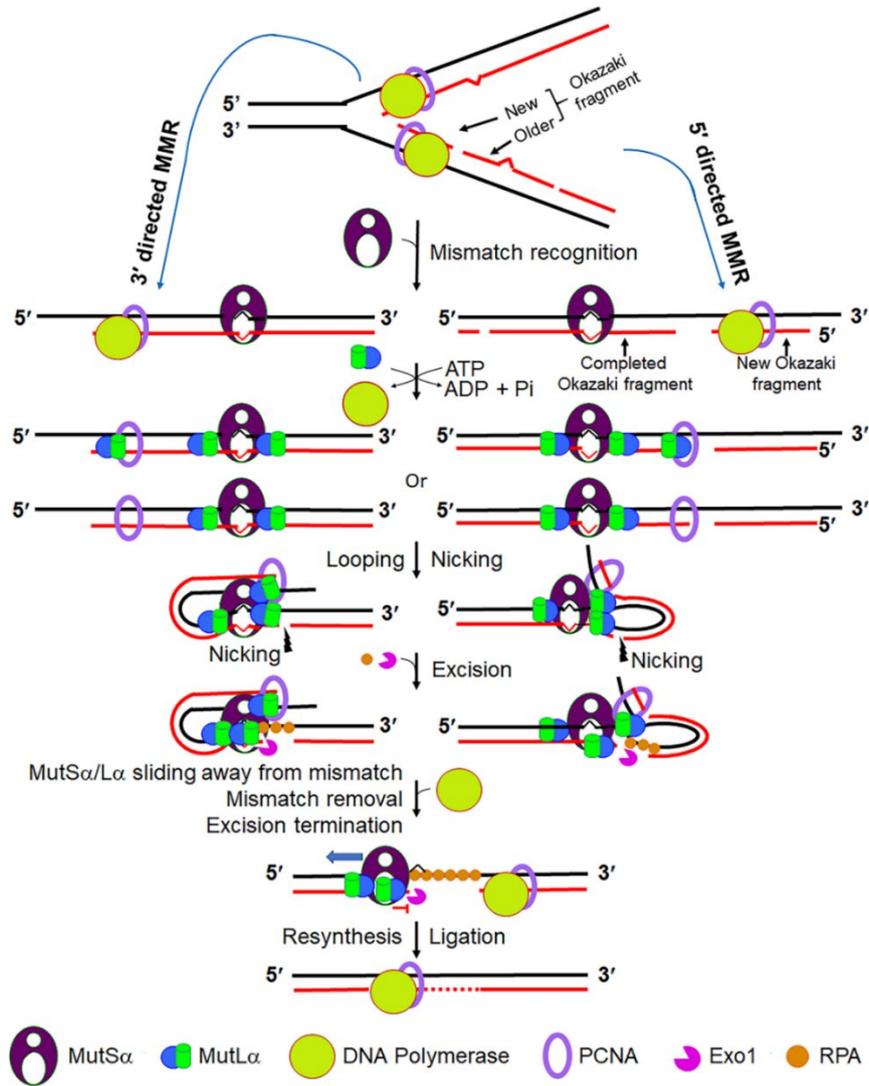


图 1.1. 人类 MMR 作用模型<sup>[3]</sup>

MutSα 识别错配位点, 以 ATP 依赖的方式募集 MutLα, 形成稳定的起始复合物; 在三元复合物中, MutLα–MutLα 或 PCNA–MutLα /MutSα 相互作用使错配和 ssDNA 断裂处靠近, 形成茎环; MutLα 招募 Exo1 在缺口处进行 5'→3'的切除, 到达错配处时, MutSα 或 MutSα–MutLα 复合物滑落提供作用空间; 产生的缺口最终由 DNA 聚合酶与连接酶完成修复

### 1.1.3 MMR 系统异常疾病

MMR 系统缺陷 (MMR deficiency, dMMR) 即 DNA 修复错配通路功能的丧失会导致高变异性, 并且未校正的插入缺失环 (insertion/deletion loop, IDL) 会使得重复序列易发生复制错误, 从而导致微卫星不稳定性 (MSI); 同时, dMMR 会降低由 MMR 途径识别 DNA 损伤所诱导凋亡的敏感性<sup>[4]</sup>。

现有的临床和众多研究已经发现 MMR 系统异常导致多种癌症易感性。已知的遗传性非息肉性大肠癌 (HNPCC) 或称林奇综合征 (lynch syndrome, LS) 的产生, 主要由 MMR 系统中四个关键编码基因 *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* 和 *PSM2* 的遗传变异引起, 现已作为诊断标准之一<sup>[5]</sup>; 此类基因目前可能是最常见的癌症易感基因, 在人群中的突变频率估计为 1/100 到 1/180<sup>[6]</sup>。HNPCC 的特征是易患多种癌症, 包括大肠癌和子宫内膜癌, 以及许多其他器官部位, 包括卵巢、胃、小肠、肝胆道、胰腺、泌尿道、前列腺、脑和皮肤皮脂腺的肿瘤<sup>[7]</sup>。HNPCC 是一种遗传异质性疾病, *MSH2* 基因相关的缺陷占临床病例的 60%, 而 *MLH1* 基因缺陷占 30%, 这两个基因的缺陷占 HNPCC 患者的绝大多数<sup>[8]</sup>。

### 1.2 MutS 同源蛋白 6 (MutS homolog 6, MSH6)

人类 G/T 结合蛋白 (G/T Binding Protein, GTBP) 被鉴定为 MutS 同源家族的新成员人类 MSH6 (human MSH6, hMSH6)。研究表明, 错配结合因子 hMutS $\alpha$  是由 100 kDa MSH2 与 160 kDa GTBP 组成的异二聚体<sup>[9]</sup>, 在 DNA 错配修复和 DNA 损伤应答等过程中起到重要作用。因 GTBP 与酿酒酵母 MSH6 有 26.6% 的氨基酸同一性, 被命名为人类 MSH6 (hMSH6)<sup>[10]</sup>。hMutS $\alpha$  依赖于 ATP 的存在可以识别并结合 DNA 错配位点, 沿 DNA 骨架进行不依赖于水解的滑动扩散<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.1 MSH6 的编码基因定位与蛋白结构

*MSH6* 定位在人染色体 2p16.3, 与 *MSH2* 的距离不超过 0.5 Mb, 因此两个基因可能是通过复制原始的 *MutS* 修复基因产生的<sup>[12]</sup>。*MSH6* 包含 150 个氨基酸的高度保守区域, 该区域含有与腺嘌呤核苷酸和镁的结合基序 (称为 Walker-A/B 基序), 具有 ATP 水解酶活性, 在所有 MutS 同源物中均存在。此外, *MSH6* 具有保守的 Phe-X-Glu 基序, 能够识别结合几种不同的 DNA 结构畸变, 从而引发不同的细胞反应, 并包含 hMutS $\alpha$  入核所需的核定位序列 (nuclear localization

sequences, NLSs)。尽管 MMR 多被视为复制后的 DNA 修复机制，但 MMR 蛋白在细胞周期的所有阶段都有表达且有一定活性<sup>[13]</sup>。

### 1.2.2 MutSa 复合体结构

MSH6 与 MSH2 有部分共享结构域，不同的是 MSH6 含有独特的 N 端无序结构域。MSH2 与 MSH6 共享了结构域 1-5 (Domain1-5, D1-5)，可以二聚化为一个不对称的异源二聚体，D1 是 DNA 错配结合结构域，D4 (钳位区域) 允许非特异性 DNA 结合，而 D5 具有 ATP 结合和水解 (ATPase) 活性 (图 1.2) <sup>[13]</sup>。MSH6 的 N 末端无序结构域具有丰富的碱性氨基酸，包括染色体结合相关蛋白质的特征 PWWP 序列，保守 PIP 序列 (其缺失影响 MSH6 与 PCNA 的共定位)，三个核定位序列 (NLSs)，20 个磷酸化位点 (多数位点是 CK2, CDK, MAPK, ATM/ATRA 和 Aurora 激酶的识别基序)，说明 N 末端结构在 MMR 和 DNA 损伤信号传导中起重要作用<sup>[14]</sup>。

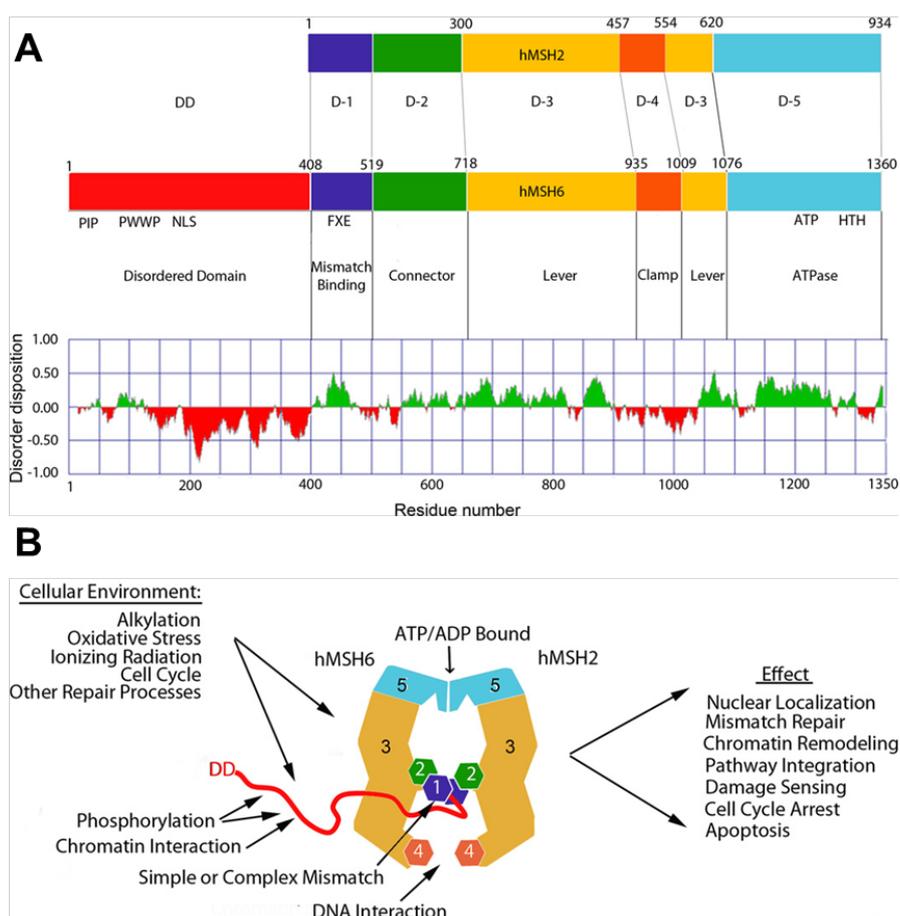


图 1.2. MutSa 复合体结构<sup>[13]</sup>

(A) 比较线性阵列中的 MSH2 与 MSH6 结构域；(B) DNA 结合构型中的 MutSa，简要列出了细胞环境及其对 hMutSa 的影响 (数据来源<sup>[15]</sup>)

有研究在酿酒酵母中发现, *MSH6* 的删除会导致 *MSH2* 水平下降 50%。*MutS $\alpha$*  复合物结构的稳定性受 *MSH2-MSH6* 相互作用、乙酰化和泛素化的影响, *MSH6* 的缺失可能会导致 *MSH2* 的不稳定与降解, 进而影响 MMR 作用过程<sup>[16]</sup>。

### 1.2.3 *MSH6* 在 DNA 修复过程中功能作用

*MSH6* 的 N 端无序结构域介导了大量蛋白互作与 *MSH6* 的磷酸化激活。在细胞质中与 *MSH2* 异源二聚化后, *MSH6* 的 NLSs 帮助通过核孔复合物转运入核; PIP 基序可能帮助 *MSH6* 结合 PCNA, 从而被招募牵引至 DNA 复制叉; CK2 识别基序中的磷酸化可能增加 G/T 错配的结合能力, 说明 CK2 诱导磷酸化对 DNA 错配特异性活性有调节作用; PKC 激酶对 *MSH6* 的磷酸化作用, 能够提高 MMR 系统的核定位与染色体结合活性, 可能与烷基化处理的细胞应答通路有关<sup>[13]</sup>。

作为 MMR 依赖性 DNA 损伤反应及其他 DNA 修复途径沟通的关键蛋白, *MSH6* 可能还有更丰富的调节性细胞作用<sup>[13]</sup>。除了错配修复, *MutS $\alpha$*  也被证明与其他类型的碱基病变有关, 包括碱基切除修复、转录耦联修复与双链断裂修复。

### 1.2.4 *MSH6* 遗传变异与肿瘤易感性

*MSH6* 作为 MMR 系统中的关键蛋白, *MSH6* 的遗传突变会导致癌症易感性, 但与典型 HNPCC 有差异。研究表明, 小鼠模型中 *Msh6* 基因的突变导致小鼠的寿命缩短与癌症易感性, 但没有显示出 MSI 的相关症状<sup>[17]</sup>。此特点可以由细胞模型验证: 在 *MSH6* 缺失的情况下, 细胞的单碱基错配修复能力下降, 但仍然能够修复碱基的插入/缺失环 (IDL)<sup>[18]</sup>, 临床中的 *MSH6* 的缺陷与非典型性 HNPCC 有关, 其遗传变异主要呈现为单碱基取代突变, 导致蛋白失去全部或部分功能活性<sup>[10]</sup>, 一般引起的突变表型不及 *MSH2* 严重, 且外显率显著降低 (70 岁之前患结直肠癌的概率为男性 22%, 女性 10%, 而 50 岁之前风险与正常人相同)<sup>[19]</sup>。特别的是, 对于女性 *MSH6* 遗传变异携带者, 子宫内膜癌的易感性增加<sup>[20, 21]</sup>, 是普通人群的 26 倍<sup>[22]</sup>, 且 *MSH2* 和 *MSH6* 是卵巢癌的主要易感基因<sup>[23]</sup>。这些证据都暗示了 *MSH6* 与女性生殖系统的特殊关联。

## 1.3 DNA 修复基因与女性生殖系统衰老的关联

DNA 修复基因与女性生殖功能的衰老相关。有研究在全基因组关联研究

(genome-wide association studies, GWAS) 中, 揭示与总结了 DNA 修复相关基因与自然绝经年龄 (ANM) 的关联: 随着年龄增长, 卵泡中双链 DNA 断裂的积累伴随着关键 DNA 修复基因如 *BRCA1*, *MRE11*, *Rad51* 和 *ATM* 的下调, 表明 DNA 修复在卵巢衰老过程中的重要功能<sup>[24]</sup>。MMR 系统作为 DNA 修复的关键组成, 同样与生殖衰老有较强的相关性。

### 1.3.1 DNA 修复基因突变可能导致 POI

针对早发性卵巢功能不全 (POI) 患者的下一代基因测序 (next generation sequencing, NGS), 尤其是全外显子测序 (whole exome sequencing, WES) 发现新的致病位点, 主要集中于 DNA 损伤修复、同源重组和减数分裂过程的基因中 (图 1.3) <sup>[25]</sup>。

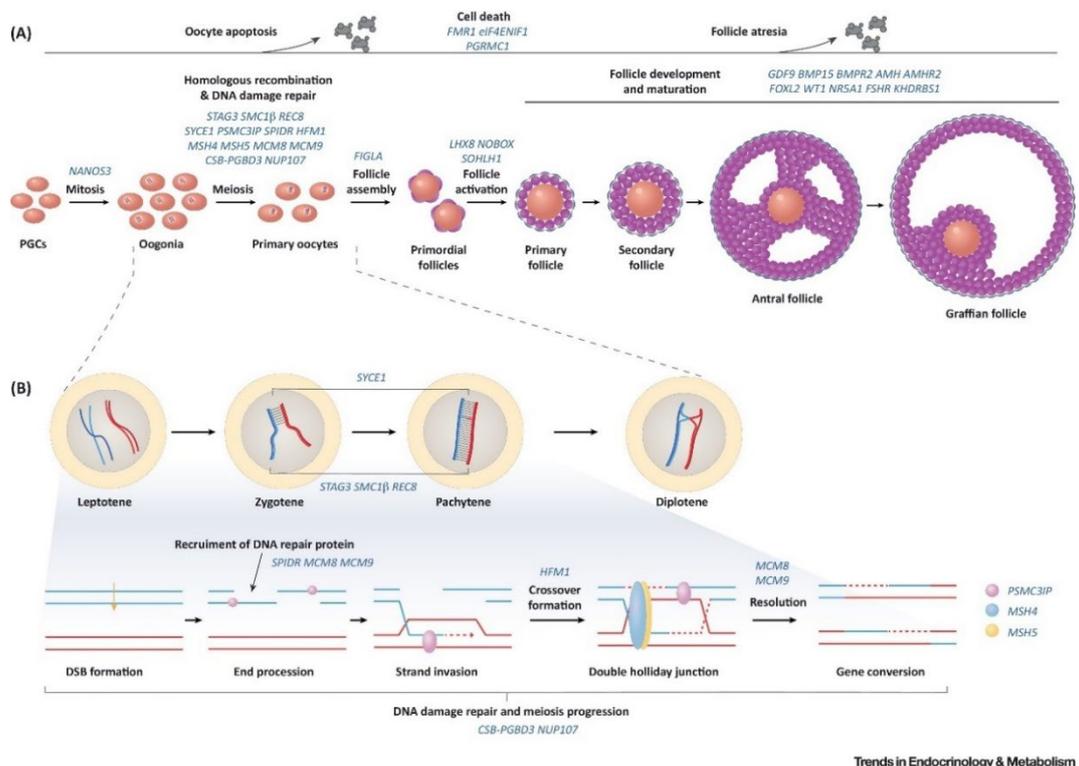


图 1.3. 参与卵子和卵泡发生的 POI 致病基因的示意图<sup>[25]</sup>

DSB, 双螺旋断裂 (double-strand break); PGCs, 原始颗粒细胞 (primordial granulosa cells)

同时, MMR 系统中的 MutSy (MSH4-MSH5 复合体) 已被证明在减数分裂过程中有重要作用, 其通过结合并稳定染色体重组中间体, 保证染色体的精确分离<sup>[26]</sup>。有研究在两个患有 POI 姐妹的 *MSH5* 基因中鉴定出一个新的纯合性错义突变 (c.1459G> T, p.D487Y), 并在小鼠中发现同源突变 *MSH5*<sup>D486Y/D486Y</sup> 导

致无卵母细胞的萎缩性卵巢；体外功能研究表明，突变型 *MSH5* 破坏了减数分裂过程中的 DNA 同源重组（homologous recombination, HR）修复。从 200 名散发性 POI 患者 *MSH5* 的 Sanger 测序中，另外鉴定出三个杂合突变<sup>[27]</sup>，表明 *MSH5* 的遗传变异可能是 POI 潜在的致病原因之一。

### 1.3.2 *MSH6* 与卵巢衰老的关联研究

DNA 修复基因的下调与卵巢衰老有关，已有研究发现 *MSH6* 的较低表达与 ANM 提前有关，但对于 DNA 修复影响 ANM 的具体机制与模式尚未确定<sup>[28]</sup>。最近有研究通过全外显子组测序（WES）在散发或家族性卵巢早衰（POI）患者中发现减数分裂重组相关基因的影响，其中包含 *MSH6* 的错义突变（c.3551T>A, p.Met1184Lys）<sup>[29]</sup>。此位点位于 *MSH6* 的 ATP 酶活性区域，可能会影响 *MSH6* 与 ATP 的关键作用，其异常还需要进一步利用模型进行研究。

*MSH6* 对卵巢功能的影响与其参与 DNA 修复的功能有密切关系。*MSH6* 在 MMR 系统中重要功能与在 HR、DSB 等 DNA 修复过程中的潜在作用，都与减数分裂过程中染色体组的稳定性有关，*MSH6* 的功能可能会对卵子与卵泡发生过程产生影响。若生殖细胞中的 DNA 损伤无法得到有效修复，可能导致细胞凋亡途径的激活，阻止潜在的有害突变向后代传播；而细胞凋亡的增加会过早消耗卵母细胞池从而导致 ANM 的提前<sup>[28]</sup>。*MSH6* 生育力有关 SNP 的发现暗示其在卵巢功能中的重要作用，而进一步的研究仍然欠缺。

以上的研究表明 DNA 修复在卵巢衰老过程中有重要功能，其遗传突变导致的功能缺失可能会影响卵子卵泡发生时基因组的稳定性，从而导致相关的疾病与表型，如 ANM 提前、POI 甚至不育症等。目前在肿瘤相关领域对 *MSH6* 有着较为充分的分子机制、遗传学方面研究，但对于 *MSH6* 在卵巢功能方面的研究尚不足。

### 1.4 *MSH6* 功能在卵巢衰老中的作用研究

*MSH6* 蛋白参与 DNA 复制中错配修复过程，对于基因组的稳定性有重要意义，对 *MSH6* 遗传突变的功能研究有利于增强我们对于 *MSH6* 在生物体内作用模式的理解，进而加深对于 MMR 系统作用过程的认识。其次，DNA 修复在卵巢衰老过程中有一定功能作用，*MSH6* 的功能缺失被证实与自然绝经年龄相关，通过小鼠模型探究 *MSH6* 在卵巢衰老中的作用模式与影响，能够完善对 *MSH6*

在减数分裂过程中功能与机制的了解，并拓展对于遗传疾病致病方式的认知，为相关疾病如 POI、不育症等提供重要的治疗靶点，对于临床的诊断、治疗与预防具有重要意义，有望服务于相关疾病的遗传分析和早期筛查。

课题主要利用 *MSH6* 缺陷小鼠模型进行卵巢功能变化的探究实验，通过对其生育力、卵巢发育情况、卵子卵泡发生情况进行检测，同时观察卵子减数分裂过程中纺锤体与染色体行为形态，进一步研究相关分子表型的变化，分析 MMR 系统异常对生殖系统的影响。

## 二、材料与amp;方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 小鼠品系

本课题构建基因 *Msh6* 缺陷小鼠模型，基因编辑服务由百格基因科技（江苏）有限公司提供。采用 C57BL/6J 品系小鼠，应用 CRISPR-Cas9 系统，设计靶向 *Msh6* 基因 2 号外显子（Exon2）区域（图 2.1）内的 sgRNA 实现 Cas9 蛋白的特异性切割及修复，完成基因编辑目的。编辑获得的 F<sub>0</sub> 代小鼠与野生型小鼠交配产生 F<sub>1</sub> 代小鼠进行 *Msh6* 基因突变情况鉴定，筛选得到 Exon2 中 10-bp deletion 品系。

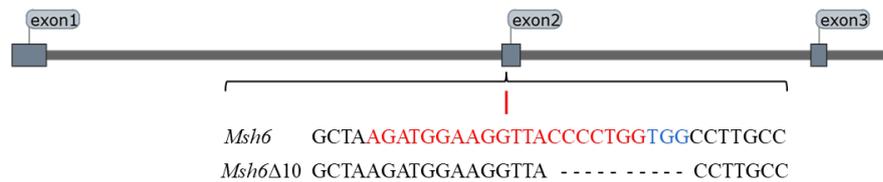


图 2.1. 构建 *Msh6*<sup>-/-</sup> 突变体模式图

红色表示 sgRNA 靶位点序列，位于 Exon2 内部；蓝色表示 PAM 序列；靶序列下面为 10 碱基缺失的移码突变

### 2.2 实验仪器

- 1) ProFlex PCR 仪（Life）
- 2) 2.5  $\mu$ l、10  $\mu$ l、20  $\mu$ l、100  $\mu$ l、200  $\mu$ l 和 1 ml 移液枪（Eppendorf）
- 3) 大中小 tip 头（Kirgen）
- 4) Centrifuge 5430 台式离心机（Eppendorf）
- 5) 超微量分光光度计 NanoDrop 2000（ThermoFisher）
- 6) 电泳系统 EPS 300（Tannon）
- 7) 凝胶成像仪 2500R（Tannon）
- 8) 1.5 ml、2 ml 离心管（Axygen）
- 9) 恒温金属浴（奥盛仪器）
- 10) 恒温水浴锅（天根生物）
- 11) 电子天平（Sartorius）
- 12) qPCR 仪（Bio-Rad）

- 13) 1 ml 注射器 (圣光医药制品)
- 14) 载玻片与盖玻片 (江苏世泰实验仪器)
- 15) -80°C 冰箱 (ThermoFisher)
- 16) -4°C 及 -20°C 冰箱 (海尔)
- 17) 涡旋震荡器 MX-S (DragonLab)
- 18) 倒置共聚焦显微镜 LSM 880 (Zeiss)

### 2.3 实验试剂

- 1) AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme)
- 2) AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN)
- 3) PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa)
- 4) SuperScript III Reverse transcriptase (Invitrogen)
- 5) Mouse Direct PCR Kit (bimake)
- 6) HiScript II Q-RT SuperMix for qPCR (+ qDNA wiper)
- 7) 2×TSINGKE Master Mix (擎科生物 TSINGKE)
- 8) 4%多聚甲醇固定液, PBS, DEPC 水, 无水乙醇, 50×TAE, M2 培养基  
(生工生物工程股份有限公司)

### 2.4 引物列表

表 2.1 主要实验引物

引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>Msh6</i> -1F	AAGTTCCTTGAACCTTCTTCT
<i>Msh6</i> -1R	CCATTACCTCTTACCTGTAT
<i>Msh6</i> -q-1F	GGAGCCGTGGCCCGGTCTGCCCGTC
<i>Msh6</i> -q-1R	TCTTAGCCCAAACCAAATCACC
<i>Msh6</i> -q-2F	GTCTCATACCAGGTTCCC
<i>Msh6</i> -q-2R	ATCTTCCACCGCATCTA
<i>Msh6</i> -qP1F	GGGAAATCTGTCCGTGTT
<i>Msh6</i> -qP1R	CTCAGCCGTGTCTTTACTT
<i>Msh2</i> -q-1F	GCACCCGTTCCCTTAATGT
<i>Msh2</i> -q-1R	TGTATGTTGATTTACCTCCC
<i>Msh2</i> -q-2F	AGAACAAAGGCGAGTATGA
<i>Msh2</i> -q-2R	AGTGAGCCAGCACATCG

### 2.5 实验方法

### 2.5.1 小鼠基因型鉴定

小鼠出生约两周后剪趾编号，剪下的脚趾或解剖前剪尾尖 0.5-1 cm，放于 1.5 ml 离心管内，加入 100  $\mu$ l Buffer L 与 2  $\mu$ l Protease Plus，离心后置于 56°C 水浴中组织消化 2 h；之后置于 95°C 金属浴加热 5 min 使蛋白酶失活。离心后取上清液根据以下反应体系与条件进行 *Msh6* 基因型鉴定。

PCR 反应体系：

成分	体积 ( $\mu$ l)
5 $\times$ PrimeSTAR GXL Buffer	10
dNTP Mixture	4
Msh6-1F (10 $\mu$ M)	1
Msh6-1R (10 $\mu$ M)	1
DNA 模板	1
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	1
ddH <sub>2</sub> O	32
Total	50

PCR 反应条件：

程序	温度 ( $^{\circ}$ C)	时间 (min)	循环 (次)
变性	94	3	} 30
	94	0.25	
退火	56	0.25	
延伸	72	0.5	
	72	5	
	12	$\infty$	

### 2.5.2 小鼠组织提取总 RNA

1) 解剖小鼠摘取两侧卵巢，分别放入 4%PFA 中，一侧留待 HE 染色切片，另一侧组织用于抽提总 RNA。采用 QIAGEN 公司 AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit 提取总 RNA。

2) 研磨组织：取出组织放入 2 ml 收集管 (RNase-free)，加入高压灭菌过的直径 3 mm 磁珠 (默认样品 20-30 mg) 与 600  $\mu$ l Buffer RLT，后加入 1%  $\beta$ -ME。

用研磨机将组织块研磨至肉眼不可见（20 Hz，2 min）。

3) 取出磁珠，将研磨后的组织液室温下全速离心 3 min；取上清液（550-600  $\mu$ l）滴入 AllPrep DNA Spin，室温下 10000 rpm 离心 30 s。

4) 取出 DNA 柱放入新的收集管，放入冰盒冷藏，待后续提取 DNA；剩余液体加入 430  $\mu$ l 无水乙醇吹打混匀，分两次加入 RNeasy Spin，室温 10000 rpm 离心 30 s。

5) 取出 RNA 柱放入新的收集管，放入冰盒冷藏，待后续提取 RNA；剩余液体转移到新的 1.5 ml EP 管中，冷藏待蛋白质抽提。

6) 洗脱 DNA：在 DNA 管加入 500  $\mu$ l Buffer AW1，室温下 1000 rpm 离心 30 s，倒去收集管中的液体；加入 500  $\mu$ l Buffer AW2，室温下全速离心 2 min，弃去收集管；将 DNA 柱放入新收集管，室温下空转全速离心 1 min，弃去收集管；继续将 DNA 柱放入新 1.5 ml EP 管，加 50  $\mu$ l DEPC 水，室温下孵育 2 min，室温下 10000 rpm 离心 1 min（可以将收集管中加入 DNA 柱重复孵育和离心，提高 DNA 浓度）。

7) 洗脱 RNA：在 RNA 管加入 700  $\mu$ l Buffer RW1，室温下 10000 rpm 离心 30 s，倒去收集管中的液体；加入 500  $\mu$ l Buffer RPE，室温下 10000 rpm 离心 30 s，倒去收集管中的液体；再次加入 500  $\mu$ l Buffer RPE，室温下 10000 rpm 离心 2 min，弃去收集管；将 RNA 柱放入新收集管，室温下空转全速离心 1 min，弃去收集管；放入新 1.5 ml 收集管，加 50  $\mu$ l DEPC 水，室温下孵育 2 min；室温下 10000 rpm 离心 1 min（可将收集管中加入 RNA 柱重复孵育和离心，提高 RNA 浓度）。取上清液测浓度。

### 2.5.3 cDNA 的逆转录实验

将组织抽提的总 RNA 逆转录为 cDNA 用于后续 qPCR 实验，采用 Vazyme 公司 HiScript II Q-RT SuperMix for qPCR (+ qDNA wiper) 试剂盒。

去基因组 DNA：取 PCR 管，于冰上加入 1  $\mu$ g RNA 与 4  $\mu$ l 4 $\times$ gDNA wiper Mix，以 DEPC 水补齐 16  $\mu$ l，吹打混匀离心后，42 $^{\circ}$ C 于 PCR 仪上反应 2 min。

逆转录反应：在反应后的体系中加入 4  $\mu$ l 5 $\times$ HiScript II Q-RT SuperMix，吹打混匀离心后，按以下程序于 PCR 仪上完成反应：

温度	时间
50°C	15 min
85°C	15 s
4°C	∞

得到 cDNA 溶液冷藏保存。

#### 2.5.4 实时定量 PCR

将得到的 cDNA 稀释 5-10 倍，作为 qPCR 模板，以小鼠 *Gapdh* 基因为内参，配置反应体系：

成分	体积 (μl)
2×AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix	10
cDNA 模板	1
DEPC 水	8.2
Primer-F	0.4
Primer-R	0.4
Total	20

混合液加入 96 孔 qPCR 板中，样本与引物均设置 3 个重复实验，封膜，振荡离心后，上 Bio-Rad qPCR 仪器，按以下程序完成反应：

温度	时间	循环数
95°C	2 min	
95°C	15 s	} 40 次
60°C	30 s	
95°C	15 s	
60°C	30 s	
95°C	15 s	

#### 2.5.5 小鼠卵子促排与免疫荧光染色

1) 卵子促排：晚 19:00-21:00 时间内，向小鼠的中下部腹腔注射孕马血清促性腺激素 (PMSG) 10 IU，48 h 后注射人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 10 IU，12 h 后解剖小鼠取输卵管及卵巢。

2) 取卵子：取出的输卵管迅速放置于 4% PFA 中，防止卵子形态和状态发

生改变。24 h 后，于解剖显微镜下 M2 培养基液滴中剥出卵子，放入 0.2 ml 离心管。

3) 透明质酸酶消化与洗涤：卵子收集完毕后，加入 100  $\mu$ l 1mg/mL 的透明质酸酶（提前 37°C 预热），吹打混匀后，在 37°C 金属浴中 1500 rpm，5 min，中间取出吹打 1-2 次。在解剖镜下将卵子转移到新鲜 M2 液滴中，将透明质酸酶洗去。

4) 封闭：配置封闭液 5% PBST 加入 10% 驴血清。取离心管加入 100  $\mu$ l 封闭液加入卵子，37°C 金属浴 1500 rpm，1 h。

5) 孵一抗：一抗混合液配制 5% PBST，10% 驴血清，1:1000 的  $\alpha$ -tubulin-mouse-488、H3S10P-mouse-647、DAPI。在离心管中加入 100  $\mu$ l 一抗混合液，37°C 金属浴 1500 rpm，5 h 或过夜。

6) 洗去一抗：离心管瞬时离心 1 min，弃上清液，加入 200  $\mu$ l PBS。吹打混匀后，再次离心 1 min，弃上清液。用 PBS 共清洗 3 遍，每次 1-5 min。

7) 制片与观察：将剩余卵母细胞和少量液体吸出，滴在载玻片中心，静置，待卵子沉淀后吸去多余液体；滴加封片剂进行封片，盖上盖玻片。用共聚焦显微镜进行观察与拍摄。

# 三、研究结果

## 3.1 *Msh6* 突变体的构建与检测

通过 CRISPR/Cas9 系统建立 *Msh6* 基因编辑小鼠，经过繁育获得突变纯合子 *Msh6*<sup>-/-</sup> (homozygote, Homo)、突变杂合子 *Msh6*<sup>+/-</sup> (heterozygote, Het) 小鼠模型，利用 Sanger 测序进行基因型鉴定，*Msh6* 基因在 Exon2 内部发生 10 碱基的缺失 (*Msh6* c.408\_417del)。

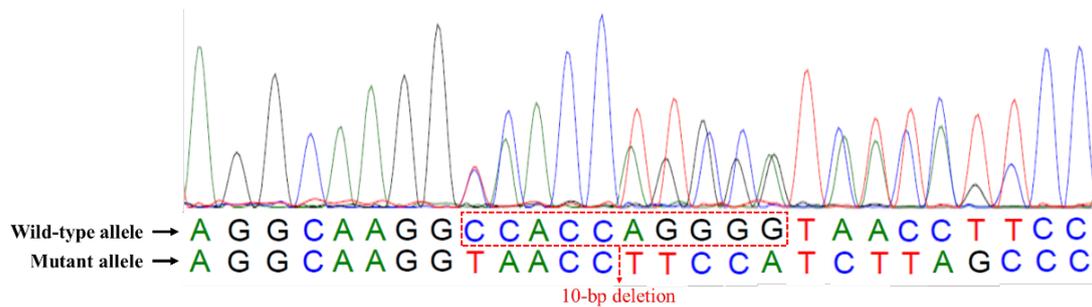


图 3.1. *Msh6*<sup>+/-</sup> 突变体杂合子 (Het) Sanger 测序 (反向) 结果

红色虚线框出缺失碱基位置

## 3.2 *Msh6* 移码突变后的蛋白结构预测

*Msh6* 基因 Exon2 上发生 10 碱基缺失突变 c.408\_417del (图 3.2A)，导致蛋白编码阅读框的改变，发生移码突变终止密码子提前，翻译过程异常终止 (p.Pro104Leufs\*3) 产生 N 端多肽，只含有部分氨基酸不具备功能，且此类结构不稳定，容易被降解。

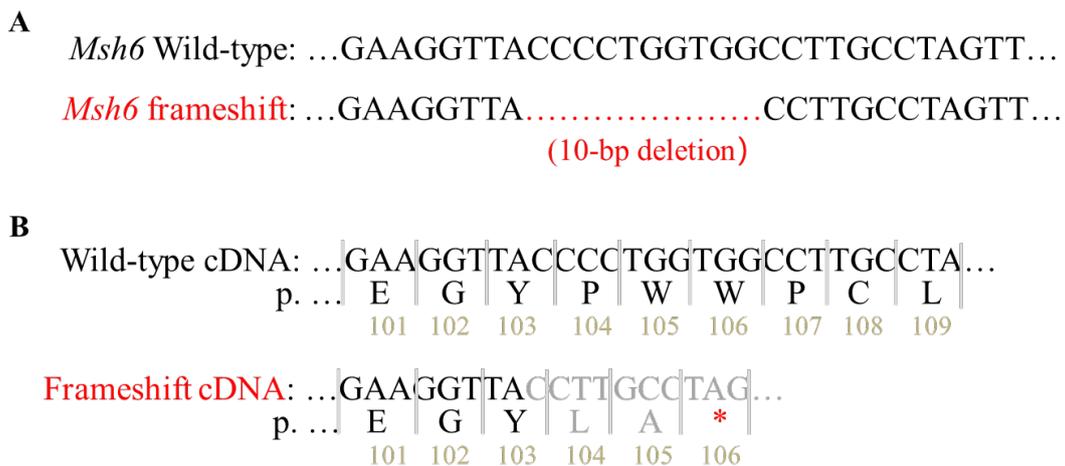


图 3.2. *Msh6* 移码突变对蛋白编码的影响

(A) *Msh6* 基因经过基因编辑后产生的 10 碱基缺失导致移码突变；红色省略号表示缺失序列；(B) 突变导致 *Msh6* 的翻译过程提前终止；\*表示终止密码子

### 3.3 MMR 基因在突变体卵巢中的表达量变化

选取同窝 9 周龄雌鼠，包含  $Msh6^{+/+}$ 、 $Msh6^{+/-}$ 、 $Msh6^{-/-}$  三种基因型，检测并比较其卵巢组织中 MMR 基因 ( $Msh6$  及  $Msh2$ ) 的 RNA 表达水平。结果显示，从  $Msh6$  的表达量看，与野生型 (WT) 小鼠相比，Het 小鼠下调约 34%，Homo 小鼠下调约 91%，差异显著；而  $Msh2$  表达量呈现下降趋势，显著性不强 (图 3.3)。

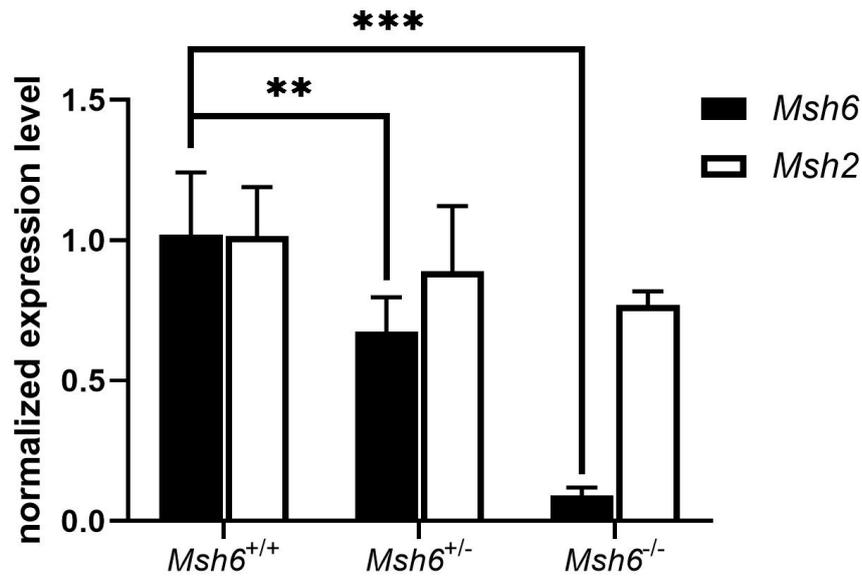


图 3.3.  $Msh6$  突变体的 MMR 基因表达水平

Het 与 Homo 雌鼠卵巢中  $Msh6$  的表达下调分别约为 34%、91%； $Msh2$  表达有不显著下降趋势以 WT 雌鼠作为对照标准，表达水平由  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  量化得到，采用 Student's  $t$ -test 计算显著性 P 值，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$

$Msh6$  为编辑目的基因，其 mRNA 发生结构变化，所翻译蛋白提前截断，为翻译依赖性的无义突变介导 mRNA 降解 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) 系统所识别，对相应 mRNA 进行清除，导致水平下调。而在 MSH6 蛋白缺乏的情况下，理论上 MSH2 蛋白不稳定，含量下降，影响  $Msh2$  基因 mRNA 出现少量降解。

### 3.4 $Msh6$ 突变体卵子异常情况增加

考虑到 MMR 基因缺陷影响减数分裂中染色体组的稳定性，造成卵子卵泡发生异常；为获得更好的卵子促排效果，选取生殖潜力较大的 5 周龄雌鼠实验。对  $Msh6$  纯合及杂合突变雌鼠进行促排处理，收集成熟卵子对其细胞核、纺锤体

(丝)、染色体进行免疫荧光染色，通过共聚焦显微镜观察减数分裂情况（图 3.4A-E）。结果显示，*Msh6* 突变纯合子与杂合子都出现非常显著的异常情况，如纺锤体散乱分布、错误多极聚集、染色体不规则排列等。根据染色体行为统计卵子异常率，从数量上看，*Msh6* 缺陷造成一定异常率的增加，但并不显著，且 Het 与 Homo 之间也没有表现出明显差异。上述结果表明，MSH6 对卵子发生过程有一定影响，缺失后增加其异常情况的程度，而数量上变化不显著。

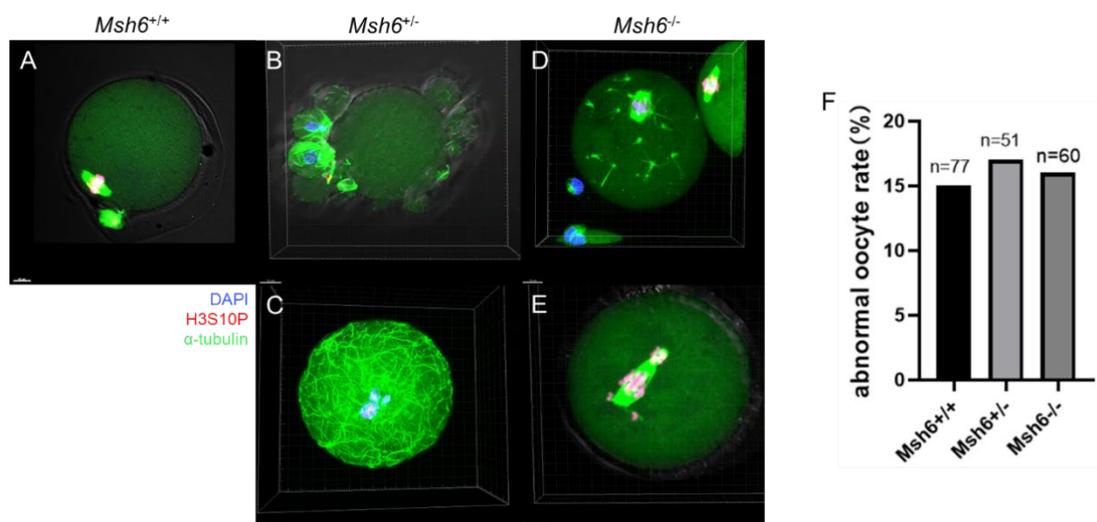


图 3.4. *Msh6* 突变体卵子异常情况

(A-E) 野生型 (A)、*Msh6*<sup>+/-</sup> 突变杂合子 (B-C)、*Msh6*<sup>-/-</sup> 突变纯合子 (D-E) 卵子减数分裂过程中染色体与纺锤体分布情况；蓝色 DAPI，细胞核染料；红色 H3S10P，抗磷酸化组蛋白 H3S10 染色；绿色  $\alpha$ -tubulin，抗微管蛋白染色；(F) 统计不同基因型（野生型、*Msh6*<sup>+/-</sup>、*Msh6*<sup>-/-</sup>) 卵子异常率；n 为各类基因型分析的卵子数量

### 3.5 *Msh6* 突变体卵泡发育异常

为了从组织学上观察 *Msh6* 突变体表型，选取同窝不同基因的 9 周龄小鼠，做卵巢切片 HE 染色处理，于显微镜下观察。野生型与纯合突变小鼠卵巢大小相似，而杂合突变个体卵巢明显较小，可能由于个体差异导致；观察整体卵泡情况可发现野生型小鼠卵巢的卵泡发育更活跃，有大量发育中各级卵泡（图 3.5A-C）；此外，与野生型小鼠相比，*Msh6* 突变体同样能观察到一定数量的始基卵泡，但正常发育卵泡数量少，闭锁卵泡数量显著增多（图 3.5D-F）。

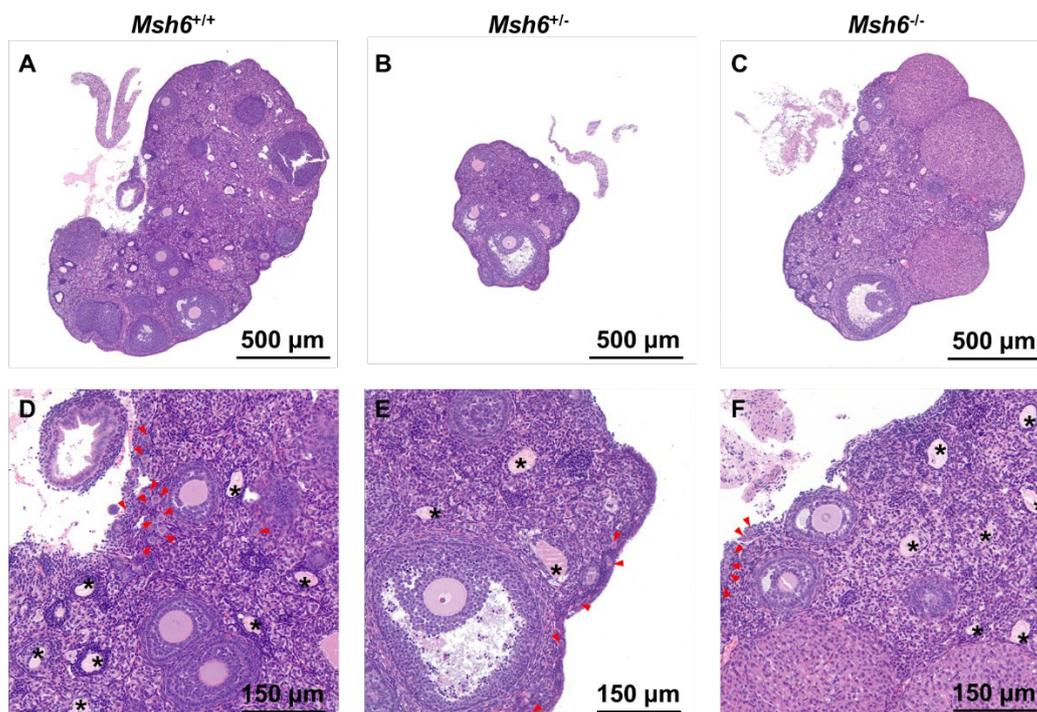


图 3.5. *Msh6* 突变体卵巢 HE 染色

(A-C) 野生型 (A)、*Msh6*<sup>+/-</sup> 突变杂合子 (B)、*Msh6*<sup>-/-</sup> 突变纯合子 (C) 小鼠卵巢切片，突变体含有的正常卵泡数减少；(D-F) 相应基因型小鼠卵巢局部放大图，突变体与野生型均有始基卵泡存在，而突变体闭锁卵泡比例显著升高；红色箭头指示始基卵泡，星号\*指示闭锁卵泡

## 四、讨论

MSH6 是 DNA 错配修复系统的重要组成蛋白，以保守的进化模式存在于广泛的生物体中，维持 DNA 复制过程的高保真度。在真核生物中，MSH6 与 MSH2 形成异源二聚体 MutS $\alpha$ ，在 MMR 系统中起识别错配与起始修复反应的作用，参与不同形式的 DNA 修复机制，包括碱基切除修复、同源重组和转录偶联修复<sup>[30]</sup>。在人类中，*MSH6* 的遗传变异导致非典型性 HNPCC，其表型较弱于 MMR 中的其他关键基因（如 *MSH2*，*MLH1*），体现为外显率降低、表现时间延迟等，同时对于女性而言子宫内膜癌及卵巢癌的易感性增加，对于 *MSH6* 有害突变携带者而言，到 75 岁患有卵巢癌的概率为 13%<sup>[31]</sup>。MSH6 功能缺陷影响 DNA 在有丝分裂中的修复功能，导致肿瘤易感性；而减数分裂过程中 DNA 复制与重组的修复也一定程度依赖于 MMR 系统，卵巢衰老伴随着相关基因的表达下调。同时，以往研究中在 POI 散发病例中发现 *MSH6* 的突变，c.3551T>A（p.Met1184Lys）影响 MSH6 的 ATP 酶作用，导致 MSH6 相关修复通路的异常。因此，MSH6 可能通过影响有丝分裂与减数分裂过程而在雌性生殖系统中发挥重要作用，本课题以小鼠为模型探索 MSH6 功能在卵巢衰老中的作用。

过往研究表明，*Msh6*<sup>-/-</sup> 小鼠表现为肿瘤易感性增加，寿命缩短但可育<sup>[18]</sup>。我们通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建动物模型，造成移码突变蛋白截断变异失去功能，并通过 qRT-PCR 验证其卵巢内的低 *Msh6* 表达；由于一部分 MSH2 会与 MSH6 结合为异源二聚物发挥作用，我们同样检测 *Msh2* 的表达量，表现出一定的下调。表明小鼠模型其卵巢的 MMR 系统出现一定损伤。

考虑 MSH6 功能缺陷可能影响有丝分裂与减数分裂过程，本课题研究了突变体的卵子卵泡发育情况，利用超速排卵技术获得卵子进行免疫荧光染色，观察染色体与纺锤体分布，*Msh6*<sup>+/-</sup> 与 *Msh6*<sup>-/-</sup> 雌鼠卵子可以观察到更为显著的异常，但统计异常率与野生型差异不明显，可能是由于促排操作本身会排出大量异常卵子，影响卵泡自然发育过程。组织学上，HE 切片显示 *MSH6* 突变体卵泡发育活跃性降低，闭锁的概率增加；而从始基卵泡来看差异不大，还需要进一步定量分析。

同时，有文章指出人类女性 *MSH6* 表达量的下降与 ANM 提前有关；随着衰

老过程，人类和小鼠卵巢的 MSH6 水平下降。*MSH6* 突变导致的 MSH6 水平下调，可能通过 DNA 修复功能的缺陷影响卵泡发育，导致人类女性生育终止时期的提前。综上，本课题通过 *Msh6* 缺陷小鼠模型的研究表明，MSH6 参与保证卵泡正常发育，其有害变异可能导致卵泡的异常闭锁，从而发生 ANM 提前。

由于疫情本研究未能完成全部计划，仍存有一定不足和发展空间，主要集中在突变体卵巢储备量的定量研究与卵巢衰老的表型研究。因此后续研究可以对突变体进行卵巢重构计算各阶段卵泡数量，结合小鼠生育力研究，定量表征生育力变化；同时，检查衰老相关的生化指标，如 Amh、p21 水平、血清 FSH 水平等，明确突变体卵巢衰老情况。

## 参考文献

- 1 Iyer R R, Pluciennik A, Burdett V, Modrich P L. DNA mismatch repair: functions and mechanisms[J]. *Chemical Reviews*, 2006,106(2):302-323.
- 2 Wang Y, Qin J J P o t N A o S. MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation[J]. 2003,100(26):15387-15392.
- 3 Ortega J, Lee G S, Gu L, Yang W, Li G-M. Mismatch-bound human MutS–MutL complex triggers DNA incisions and activates mismatch repair[J]. *Cell research*, 2021,31(5):542-553.
- 4 Pouligiannis G, Frayling I M, Arends M J. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome[J]. *Histopathology*, 2010,56(2):167-179.
- 5 Cerretelli G, Ager A, Arends M J, Frayling I M. Molecular pathology of Lynch syndrome[J]. *The Journal of Pathology*, 2020,250(5):518-531.
- 6 WCoTE B. Digestive system tumours[J]. WHO Classification of Tumours, 5th edn IARC, 2019.
- 7 Møller P, Seppälä T, Bernstein I, Holinski-Feder E, Sala P, Evans D G, et al. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database[J]. *Gut*, 2017,66(3):464-472.
- 8 Hamosh A, Scott A F, Amberger J S, Bocchini C A, McKusick V A. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders[J]. *Nucleic acids research*, 2005,33(suppl\_1):D514-D517.
- 9 Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, Lettieri T, Hughes M, D'Arrigo A, et al. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells[J]. *Science*, 1995,268(5219):1912-1914.
- 10 Marsischky G T, Filosi N, Kane M F, Kolodner R. Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair[J]. *Genes & development*, 1996,10(4):407-420.
- 11 Gradia S, Subramanian D, Wilson T, Acharya S, Makhov A, Griffith J, et al. hMSH2–hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA[J]. *Molecular cell*, 1999,3(2):255-261.
- 12 Papadopoulos N, Nicolaides N C, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells[J]. *Science*, 1995,268(5219):1915-1917.
- 13 Edelbrock M A, Kaliyaperumal S, Williams K J. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2013,74353-66.
- 14 Kaliyaperumal S, Patrick S M, Williams K J. Phosphorylated hMSH6: DNA mismatch versus DNA damage recognition[J]. *Mutation Research/Fundamental*

- and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2011,706(1-2):36-45.
- 15 Warren J J, Pohlhaus T J, Changela A, Iyer R R, Modrich P L, Beese L S. Structure of the human MutS $\alpha$  DNA lesion recognition complex[J]. *Molecular cell*, 2007,26(4):579-592.
  - 16 Arlow T, Kim J, Haye-Bertolozzi J E, Martínez C B, Fay C, Zorensky E, et al. MutS $\alpha$  mismatch repair protein stability is governed by subunit interaction, acetylation, and ubiquitination[J]. *G3 (Bethesda)*, 2021,11(3).
  - 17 Edelmann W, Yang K, Umar A, Heyer J, Lau K, Fan K, et al. Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility[J]. *Cell*, 1997,91(4):467-477.
  - 18 Wei K, Kucherlapati R, Edelmann W. Mouse models for human DNA mismatch-repair gene defects[J]. *Trends Mol Med*, 2002,8(7):346-353.
  - 19 Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome[J]. *Jama*, 2011,305(22):2304-2310.
  - 20 Wijnen J, Leeuw W d, Vasen H, Klift H v d, Møller P, Stormorken A, et al. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations[J]. *Nature genetics*, 1999,23(2):142-144.
  - 21 Wagner A, Hendriks Y, Meijers-Heijboer E, De Leeuw W, Morreau H, Hofstra R, et al. Atypical HNPCC owing to MSH6 germline mutations: analysis of a large Dutch pedigree[J]. *Journal of medical genetics*, 2001,38(5):318-322.
  - 22 Baglietto L, Lindor N M, Dowty J G, White D M, Wagner A, Gomez Garcia E B, et al. Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers[J]. *Journal of the national cancer institute*, 2010,102(3):193-201.
  - 23 Pavanello M, Chan I H, Ariff A, Pharoah P D, Gayther S A, Ramus S J. Rare Germline Genetic Variants and the Risks of Epithelial Ovarian Cancer[J]. *Cancers*, 2020,12(10):3046.
  - 24 Titus S, Li F, Stobezki R, Akula K, Unsal E, Jeong K, et al. Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans[J]. *Science translational medicine*, 2013,5(172):172ra121-172ra121.
  - 25 Jiao X, Ke H, Qin Y, Chen Z-J. Molecular genetics of premature ovarian insufficiency[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2018,29(11):795-807.
  - 26 He W, Rao H B D P, Tang S, Bhagwat N, Kulkarni D S, Ma Y, et al. Regulated Proteolysis of MutS $\gamma$  Controls Meiotic Crossing Over[J]. *Molecular cell*, 2020,78(1):168-183.
  - 27 Guo T, Zhao S, Zhao S, Chen M, Li G, Jiao X, et al. Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency[J]. *Human molecular genetics*, 2017,26(8):1452-1457.
  - 28 Perry J R, Hsu Y-H, Chasman D I, Johnson A D, Elks C, Albrecht E, et al. DNA mismatch repair gene MSH6 implicated in determining age at natural menopause[J]. *Human molecular genetics*, 2014,23(9):2490-2497.
  - 29 Luo W, Guo T, Li G, Liu R, Zhao S, Song M, et al. Variants in homologous recombination genes EXO1 and RAD51 related with premature ovarian insufficiency[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*,

2020,105(10):e3566-e3574.

- 30 Pitsikas P, Lee D, Rainbow A J. Reduced host cell reactivation of oxidative DNA damage in human cells deficient in the mismatch repair gene hMSH2[J]. *Mutagenesis*, 2007,22(3):235-243.
- 31 Møller P, Seppälä T T, Bernstein I, Holinski-Feder E, Sala P, Evans D G, et al. Cancer risk and survival in path\_MMR carriers by gene and gender up to 75 years of age: a report from the Prospective Lynch Syndrome Database[J]. *Gut*, 2018,67(7):1306-1316.

# 致谢

时光荏苒，一恍然已是终曲，我仍稚气未退，但深知这四年的学习生活改变了我太多。二十岁的我在复旦闷头探索，虽有不少遗憾与未竟之事，感念更多的是鞭策自我走出舒适区的勇敢与过程的非凡体验，我感恩复旦给予我这样的机会与鼓舞。复旦满足并超越了我对于大学的美好幻想，在初入校园时，我就意识到这段象牙塔的时光会是我一生最闪闪发亮的日子，这里如此美好、精彩，到处皆是有着力量与理想的灵魂；我曾全力享受过这里的日子，让我知晓了自己的无知，获得了认知自我与世界的方法，启发了我思考如何过好的一生，我心满意足。

本毕业设计始于我进入张锋老师课题组实习，在张老师的指导与林晓琪师姐手把手的帮助下完成；虽然囿于疫情，许多核心工作未能如期开展，但前期大量的学习与实践已经让我对科学研究形成初步感知。首先在此感谢张锋老师、林晓琪师姐对本课题设计与开展无微不至的指导，感谢张锋老师课题组所有成员，毫无保留地为我答疑解惑，接纳关怀我，给了我在复旦的又一个港湾。其次感谢撰写论文期间，在封控校园内给予我支持帮助，缓解我焦虑情绪的人们；感谢时常交流讨论的杨子艺、刘婧萱、黄静波同学，我们在生活与学习上相互扶持；感谢一同闲谈散步娱乐的鲍奕霖、叶子豪、潘梁恺同学，他们的真挚可爱给我带来许多快乐；感谢南区 38&39 号楼的所有同学阿姨及住楼辅导员石盼华老师，让本该艰难的封控生活也充满温情。

在复旦的日子里，感谢父母家人一直牵挂照顾着我，支持我的一切决定；感谢所有对我有过帮助与指导的老师，他们真正将学生放在心上，以自己的经历与所学教书育人；感谢希德书院自管会，在学生工作上伴随见证我四年的成长，尤其感谢金大森老师、杨宁宁学姐、朱丛林学长对我工作的帮助与包容，感谢所有前辈与学弟学妹，我们曾携手建设属于我们的家园；感谢生命科学学院的全体师生，让我了解并爱上了生物这门学科，给予我自由包容的探索科创、交流学习、分享热爱的平台；感谢帮助过我的辅导员们，特别是我的班级辅导员易润秋与戴佳倩老师，同为学生的他们温柔而强大，付出真心关照指引我们，这些优秀的人是我的榜样与目标。最后感谢我的所有挚友，纵使一程相伴，但

始终真诚以待，相互信任与支持，他们是我这四年收获的至宝，有着各自独特的美好与灿烂，与他们的故事是永远是我未来孤独时的慰藉。

回望过去，也最感谢四年来不懈努力的我自己，面对挑战奋力尝试，面对选择坚持本心，依旧带着稚气曲折前行；未来，愿我面对现实不忘坚守理想主义，怀着真诚与勇气，去生活、去奋斗、去爱。

就此本科生涯画上了句号，其中两年半的疫情让校园生活有了不少缺失，我们本该热烈地创造毕业回忆、热烈地追忆与畅想、热烈地哭和笑，在复旦我们曾走过的每个角落，拥抱我们爱的每一个人。如今我们急匆匆告别，听着朋友们收拾行李的声音写下这段致谢，我倍觉伤感，惟愿疫情早日结束，让我们好好表达感谢、好好离别。

愿所有复旦毕业生独立自由前程灿烂！

2022年5月25日晚写于复旦大学南苑