

R环的形成及对基因组稳定性的影响

潘学峰^{1,2}, 姜楠¹, 陈细芳¹, 周晓宏¹, 丁良², 段斐²

1. 北京理工大学生命学院, 北京 100081;

2. 河北大学基础医学院, 保定 071002

摘要: R-环是由一个RNA:DNA杂交体和一条单链状态的DNA分子共同组成的三链核酸结构。其中, RNA:DNA杂交体的形成起因于基因转录所合成的RNA分子不能与模板分开, 或RNA分子重新与一段双链DNA分子中的一条链杂交。在基因转录过程中, 当转录泡遇到富含G碱基的非模板链区或位于某些与人类疾病有关的三核苷酸卫星DNA时, 转录泡后方累积的负超螺旋可促进R环形成。同时, 新生RNA分子未被及时加工、成熟或未被快速转运到细胞质等因素也会催生R环。研究表明, 细胞拥有多种管理R环的方法, 可以有效地管理R环的形成和处理已经形成的R环, 以尽量避免R环对DNA复制、基因突变和同源重组产生不利影响。文章重点分析了R-环的形成机制及R环对DNA复制、基因突变和同源重组的影响, 并针对R-环诱导的DNA复制在某些三核苷酸重复扩增有关的神经肌肉退行性疾病发生过程中的作用进行了分析和讨论。

关键词: RNA:DNA杂交体; R-环; 基因转录; DNA复制; 基因组稳定性

R-loop structure: the formation and the effects on genomic stability

Xuefeng Pan^{1,2}, Nan Jiang¹, Xifang Chen¹, Xiaohong Zhou¹, Liang Ding², Fei Duan²

1. School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;

2. School of Basic Medicine, Hebei University, Baoding 071002, China

Abstract: R-loop is a type of three-stranded nucleic acid structure that is made up of an RNA:DNA hybrid, formed due to failing separation of a nascent RNA molecule with transcribing template in transcription or by the re-annealing of RNA molecule with one of the two strands in a double stranded DNA molecule, along with the single stranded DNA, which is either the non-template strand in the transcription bubble or the RNA substituted DNA strand. Formation of R-loops can occur when transcription goes through a genomic DNA region having a tract of G bases in the non-template strand in the transcription bubble or through a type of triplet microsatellite DNA sequences that are known to be associated with certain human diseases. The negative supercoiling forces accumulated in the transcription bubble, and the misprocessing of RNA precursors, as well as the delayed utilizations and transportations of RNA molecules to cytoplasm promote R loop formation. Many studies show that cells can manage R loop formation with efficiency, and can also process the R-loops already formed in the cell, and by which, the bad effects of R-loops on DNA replication, gene mutation and homologous recombination can be regulated. This review summarizes the formation and the impacts of R-loops on DNA replication, mutation rates and the frequencies of homologous recombination, and also discusses the possible role of the R-loop induced

收稿日期: 2014-04-01; 修回日期: 2014-06-05

基金项目：北京理工大学自然科学基金项目（编号：3160012211215）和北京市自然科学基金项目（编号：5132014）资助

作者简介：潘学峰，博士，教授，研究方向：分子遗传学。E-mail: xuefengpancam@aliyun.com
DNA replication in mediating trinucleotide repeat expansions as seen with those frequently associated with human neuromuscular degenerative diseases.

Keywords: RNA:DNA hybrid; R-loop; gene transcription; DNA replication; genome stability

DNA复制是DNA聚合酶依半保留方式合成双链DNA的过程，而基因转录则是RNA聚合酶利用双链DNA中的一条链为模板合成RNA的过程。基因转录产生的RNA分子必须在转录泡后方与DNA模板分开，以容许两条被打开呈单链的DNA分子重新恢复为双链DNA。但是，发生在某些基因组位点处的基因转录所合成的RNA分子难于与其模板DNA分开，或很容易重新与模板DNA复性形成RNA:DNA杂交体。这种RNA:DNA杂交体与非模板链一起形成R环结构。

研究发现，R环结构会影响DNA复制叉的移动，引发基因组不稳定^[1~5]。为此，细胞将RNA修饰、加工、运输与转录延伸相互偶联，以尽可能使新生RNA分子被高效加工或被及时输送到细胞质中，以降低RNA:DNA杂交体的形成机会。同时，细胞还拥有能特异切割R环中RNA分子的核酸酶和能够打开RNA:DNA杂交体的解旋酶，清除已经形成的R环。另外，大肠杆菌(*Escherichia coli*) ColE1质粒的DNA复制、真核生物线粒体DNA的复制以及哺乳类动物免疫球蛋白类型转换(Immunoglobulin (Ig) class switching)等分子过程则需要借助基因转录形成R环结构之后才能进行^[6,7]。

1 与R环形成有关的要素及R环结构的稳定性

基因转录可否形成R环与3个要素有关：（1）位于转录泡内的非模板链DNA含有较多的G碱基；（2）转录泡后方积累过量的负超螺旋（Supercoiling）；（3）在转录区附近存在DNA切口。

对细菌的研究发现，R环通常出现在富含G碱基的非模板链部位。当G碱基在非模板链上呈簇（G-cluster）分布时，可以启动R环形成，而在这一起始位之后的一段富含G碱基区域则有助于R环成长。当在大肠杆菌(*E. coli*)细胞中转录多聚GC或多聚GT序列时发现，非模板链上G丰裕是基因转录出现R环的首要条件^[8~11]。

正常基因转录过程中，转录泡后方常会积累负超螺旋，这种负超螺旋可以使单链状态的DNA重新恢复为双链。在R环形成过程中，上述负超螺旋则促使RNA分子与模板DNA“退火”形成RNA:DNA杂交体（图1）。除此之外，由于R环形成时需要RNA分子和模板DNA发生交互缠绕，因此，出现在启动子下游的DNA缺口（DNA nick）也有助于R环的形成^[12]。

利用基于上述序列特征研发的计算机软件对已有66 803个基因DNA序列分析表明，多达59%的基因具有在基因转录中形成R环的能力。其中TP53、BRCA1、BRCA2、KRAS 和PTPRD等属于癌基因和抑癌基因，而ATM、PARK2、PTPRD和GLDC基因则与神经系统退行性疾病的发病有关^[13]。

一个R环的稳定性取决于R环内RNA分子的大小、DNA分子中脱氧嘧啶/脱氧嘌呤的比例，以及可能形成的 A•T/U 的数目^[14]。一般而言，R环中的RNA分子越长，R环越稳定；RNA与DNA分子所形成的氢键数目越多，R环越稳定。而当碱基数相同时，RNA:DNA杂交体比相同长度的双链DNA更稳定^[15]。

R环可以在基因转录的延伸（生长）和终止两个阶段生成^[16~18]。在真核细胞内，hnRNA的5'端和3'端加工、内含子拼接、新生mRNA分子组装成mRNP复合体等任意环节出现“故障”，均会促使R环在转录的延伸阶段形成^[16,20]（图1）。

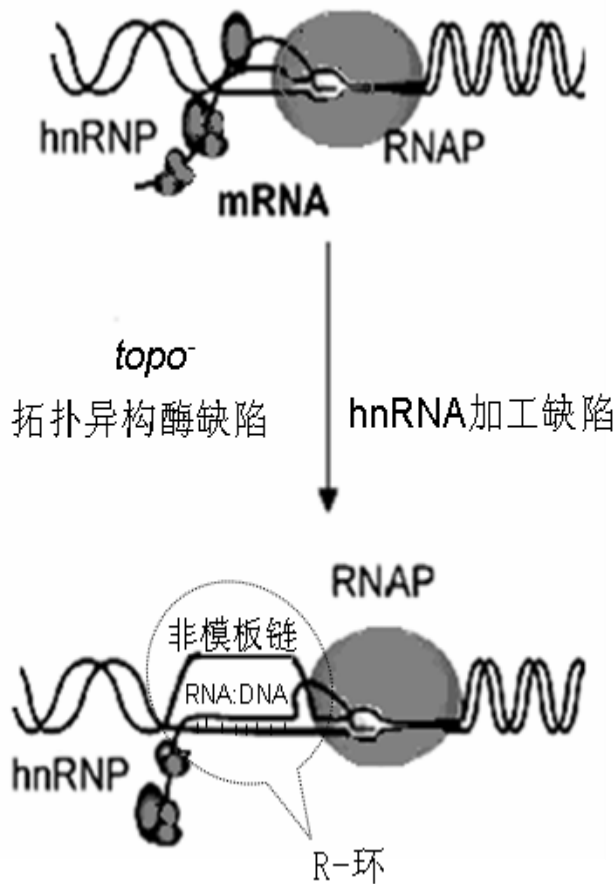


图1 RNA:DNA杂交体（R环）的形成

基因转录过程中由于转录泡积累的超螺旋扭力或RNA加工延迟促使新生mRNA在伸出RNAP复合体之后重新与DNA模板链形成氢键，形成RNA:DNA杂交体（R loop）。

对酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的研究表明，RNA转录延伸因子Sub-Yra1、Thp1-Sac3和THO-TREX-2等^[19~22]以及负责RNA向细胞质运输的蛋白质或与RNA更新（Turn-over）有关的降解酶体缺陷均能促进R环的形成^[19]。同样，原核基因转录和蛋白质翻译偶联等环节出现问题也会促生RNA分子与转录模板DNA复性形成R环^[17,18]。利用双环霉素抑制大肠杆菌细胞中Rho因子的RNA解旋酶活性，发现在依赖Rho因子终止的许多基因转录终止区出现R环^[23]；而灭活酵母细胞内的Sen1（RNA解旋酶通常与Rat1蛋白一起协助转录终止）^[24,25]，或缺失人类细胞内的Senataxin (SETX)（与酵母Sen1功能相同）也会在许多转录终止信号poly(A)的下游出现R环^[22,26,27]。

2 细胞对R环的监管

R环除干扰基因的转录之外，也会影响DNA复制。为此，细胞通过使用特异的核酸酶切除R环，利用拓扑异构酶调节转录泡后方负超螺旋数量，或利用转录延伸因子提高转录延伸

效率，或及时向细胞质转移新生的RNA分子等手段降低RNA与模板DNA的杂交机会，以及通过使用RNA/DNA解旋酶打开R环中的RNA:DNA杂交体等手段监控和管理R环的形成^[2,3,18]。例如，大肠杆菌细胞拥有可特异水解RNA:DNA杂交体分子中RNA的核酸酶RNase HA和B，它们分别以单体和异源三聚体的形式发挥作用。这些RNAase与用于处理“废弃”mRNA分子的RNase E家族具有高度同源性。同样，真核生物细胞中也拥有其同工酶RNaseH1、RNaseH2A、RNaseH2B、RNaseH2C和EVRK6等。与大肠杆菌RNase HA和HB相似，它们均能特异地降解R环中的RNA分子^[2,3,28~30]。临床研究发现，Aicardi-Goutières综合征即起因于患者细胞内的RNase H2的功能缺陷。此外，普遍存在于原核和真核细胞内的Top1 (topoisomerase 1或topA) 也会通过影响转录泡后方负超螺旋的累积而降低R环的形成几率^[31,32]。此外，大肠杆菌细胞内还存在着一种依赖ATP的蛋白质Cas3，可以在ATP缺乏时促进R环的形成，而在ATP充裕时解除已经形成的R环。这一现象暗示，R环的形成可能是一个受调节的过程^[33]。

此外，大肠杆菌细胞中的RecG 解旋酶、Rho RNA解旋酶则可以分别针对转录延伸和终止阶段的RNA:DNA杂交体发挥作用^[5,6,23]。同样，真核细胞中RecG的同工酶Pif1^[34]、DHX9 (RHA)^[35]和SAPK (Hog1)^[36]，以及Rho因子的同工酶Sen1/Senataxin^[24,25]均可以在基因转录的延伸和终止阶段规避或清除RNA:DNA杂交体（表1）。

由于上述蛋白中的一些成员可以协助DNA复制叉“跨越”RNA聚合酶II转录的基因区，可以对基因转录和DNA复制加以协调，因此，它们又被称为“转录-复制介导者”(Transcription replication mediator)（表1）。大肠杆菌的RecG既能清除RNA:DNA杂交体，也能参与DNA复制叉回转；酵母Sen1也能避免DNA复制叉和转录单位间发生“碰撞”，降低RNA:DNA杂交体和异常的DNA结构的形成机会^[36,38]。在上述过程中，Sen1通常与RNA结合蛋白Nrd1和Nab3形成复合体共同参与RNA聚合酶II催化的mRNA转录终止。该复合体主要负责缺乏Poly(A)（多聚腺嘌呤）信号的基因转录的终止，包括小分子核内RNA（small nuclear (snRNA)、小分子核仁RNA（small nucleolar (snoRNA)^[26]、隐性不稳定转录物（ cryptic unstable transcripts）^[27]，以及某些异常mRNA的转录终止等^[37]。研究表明，人体中Senataxin缺陷是诱发II型精神性视觉失明共济失调（Ataxia-ocular apraxia type 2, AOA2)^[39]和IV型肌萎缩性（脊髓）侧索硬化（Amyotrophic lateral sclerosis type 4, ALS4)^[40]等严重神经退行性疾病的主因。

表1 影响基因转录过程中RNA:DNA杂交体形成的蛋白因子或解旋酶

复制-转录介导者	来源	功能
RecG	大肠杆菌	RNA/DNA解旋酶
Rho	大肠杆菌	RNA 解旋酶
GreA	大肠杆菌	转录延伸因子
GreB	大肠杆菌	转录延伸因子
Pif1	酵母	RNA/DNA解旋酶，除参与打开RNA:DNA杂交体外还可以协助复制叉跨越基因组上DNA-蛋白质和基因高强度转录形成的障碍
Sen1/Senataxin	酵母、人类	RNA/DNA解旋酶，参与基因转录的终止
ASF/SF2	人类、鸡、酵母	参与hnRNA拼接/依赖拓扑异构酶I阻止RNA:DNA杂交体形成
THSC/TREX-2	酵母	促进mRNA转录和运输
THO/TREX	人类	促进转录延伸和运输 与恶性乳腺癌发病有关
Hpr1	酵母	THO/TREX家族成员
SRSF1	酵母	参与hnRNA拼接

DHX9 (RHA)	人类	RNA/DNA解旋酶，在X-连锁基因表达中发挥作用
SAPK(Hog1)	酵母	通过对Mrc1磷酸化针对逆境调节DNA复制与基因转录

3 基因转录与DNA复制之间的相互影响

原核细胞DNA复制速率和基因转录速率相差较大，分别为600~730核苷酸/秒和50核苷酸/秒。因此，原核细胞中同时进行的DNA复制和基因转录有可能会彼此“冲突”，表现为DNA复制器和RNA聚合酶之间延相反方向运动时的相撞或延相同方向运动时的追尾。与此不同，真核细胞中的DNA复制速率和基因转录速率比较接近，分别为17~33核苷酸/秒和大约17~72核苷酸/秒，因此，通常较少出现DNA复制器和RNA聚合酶之间的相撞或追尾。然而，在某些特定生理条件下，真核细胞内的基因转录模式会发生改变，使DNA复制和基因转录之间发生相撞或追尾的机会大大增高^[1,3,4,36,41]。DNA复制和基因转录之间的相互冲突以两种形式出现：一是基因转录所产生的拓扑学扭力干扰DNA复制；二是基因转录过程中形成R环，并借此影响DNA复制。一般认为，基因转录引发的拓扑学扭力对DNA复制的影响会更多地出现在两者相向运动之时。此时，RNA转录泡前方和DNA复制叉前方积累的正超螺旋扭力（Topological constraint）会同时减缓基因转录和DNA复制叉的移动速度。对大肠杆菌和酵母的研究表明，当DNA复制叉和转录泡相向相遇时，尽管DNA复制叉的移动速率减缓，但它却可以强力进入转录中的DNA区域，并被迫停止于该区域。此时，复制叉前方积累的过量的正超螺旋迫使DNA复制叉内的前导链和后随链上的新生DNA链相互复性形成“鸡爪”（Chicken-foot）结构（图2）^[42]。

基因转录形成的R环可直接阻挡复制叉的运动。研究发现，伴随着R环形成，RNA聚合酶通常会被“陷”在转录泡内。因此，在阻挡DNA复制叉移动时，R环和RNA聚合酶可能共同发挥了作用。例如，当基因转录发生在含有紫外线损伤的DNA区段时，RNA聚合酶就会被“陷”在转录泡内。在此情况下，RNA聚合酶直接参与了阻挡DNA复制叉地移动。除此之外，当R环中非模板单链DNA上发生损伤，如含有DNA加合物（DNA adduct），或折叠出了某些类型的非B型DNA二级结构，也会增加R环对DNA复制叉的阻挡力度^[43]。

在某些情况下，DNA复制叉的移动也可以“卸载”被陷住的RNA聚合酶。McGlynn等^[44]将只能单向复制的大肠杆菌ColE1的复制起始区分别拼接在染色体上rrnB操纵子的上、下游，人为造成DNA复制叉和转录复制器（RNAPs）相向或同向移动，发现只有当DNA复制叉和RNA聚合酶处于相向移动时，DNA复制叉才会卸载RNAPs，而两者同向移动时，DNA复制叉并不能卸载RNA聚合酶。

在某些生理逆境下，RNA聚合酶被陷在转录泡内可能是一种代表性的事件。为此，细胞采取合成“（p）ppGpp”分子（ppGpp 是针对逆境生长产生的一种严谨型反应调控因子）以降低“开放型”RNA聚合酶复合体（延伸阶段中的RNA聚合酶与DNA模板结合状态）与DNA模板的结合强度，释放被“陷住”的RNA聚合酶，并同时放行被阻挡的DNA复制叉^[44]。同时，GreA^[17,45]、GreB^[17]和DksA^[46]，以及Mfd(转录偶联的修复因子)等具有帮助解除“陷”在DNA损伤部位的RNA聚合酶复合体的功能^[47]。

4 R环与基因组的稳定

R环结构可以因其对DNA复制叉的阻挡衍生出一系列的DNA次级损伤，如DNA复制叉崩溃、复制叉逆转、DNA双链断裂（DSBs）和单链DNA空缺（ssDNA gap）等（图3）。这些类型的DNA损伤大多数需要启用包括同源重组在内的修复机制加以修复，以尽可能降低基因转录所引发的基因突变和基因的高频重组^[51~56]。

4.1 基因转录关联的高频重组

诸多研究表明，处于高频转录或位于R环中的非模板DNA单链非常容易受到损伤，包括DNA双链断裂或单链DNA断裂等。此时，细胞内的同源重组（HR）修复会被启动（图3）。

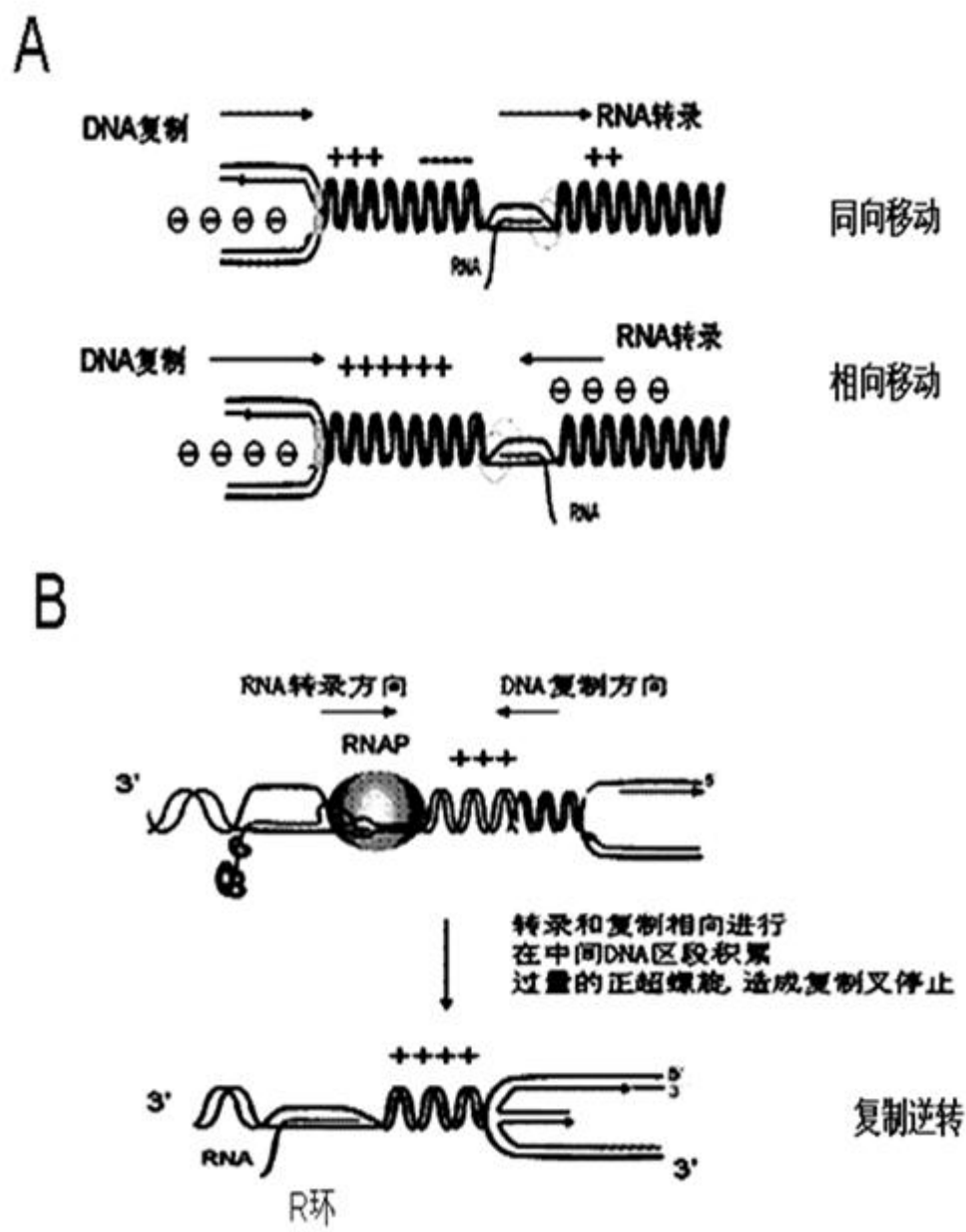


图2 超螺旋扭力对DNA复制叉和R环形成的影响

A: DNA复制叉和转录泡移动方向。两者相向移动时, 复制叉和转录泡前方积累的正超螺旋可同时降低DNA聚合酶的前进速度; B: 正超螺旋增加DNA复制叉内新合成的两条DNA链逆转 (fork reversal) 的几率; 而转录泡后方累积的负超螺旋除把DNA单链恢复为双链的同时也促进RNA:DNA杂交。

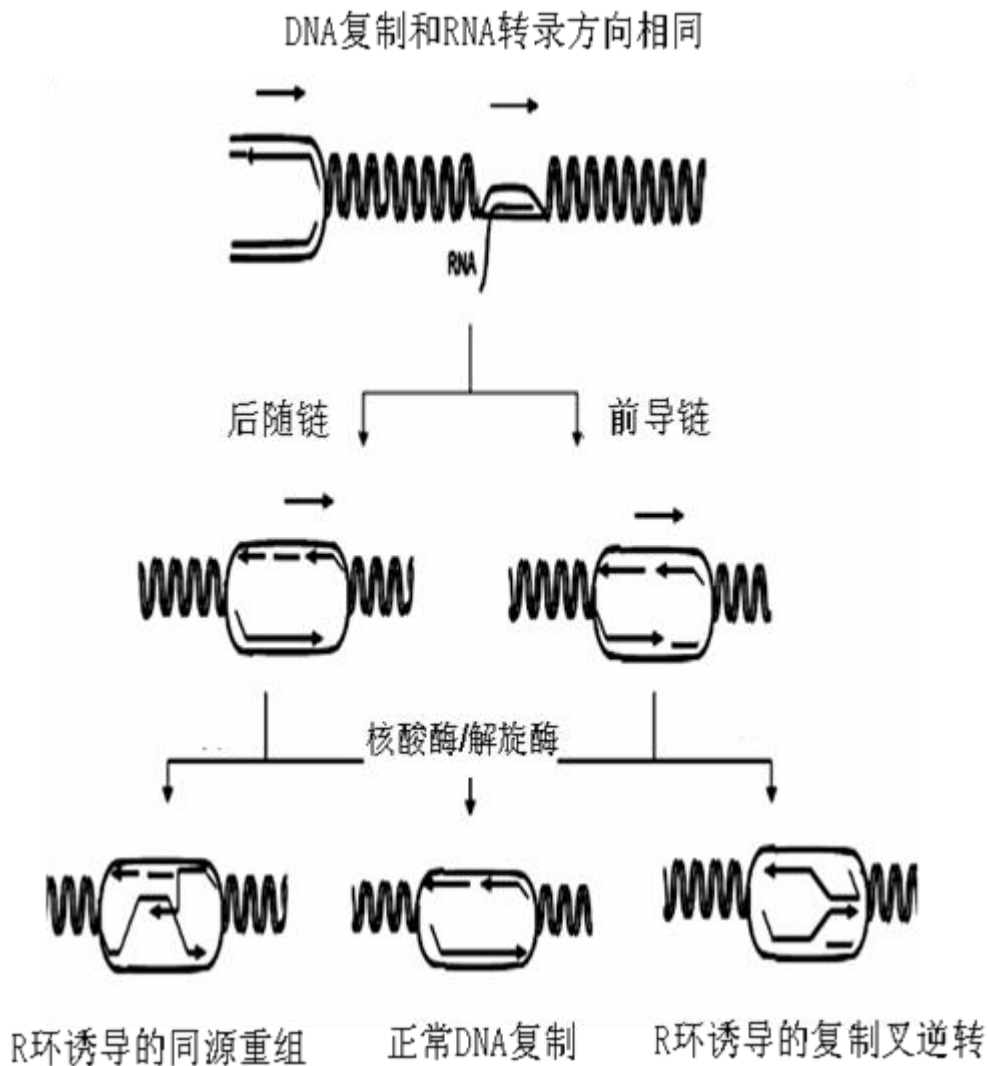


图3 R环对DNA复制及基因组稳定性的可能影响

以DNA复制叉和转录泡同向移动为例，DNA复制叉跨过R环时，分别造成DNA前导链和后随链的DNA复制的停止，此时，后续DNA复制取决于R环内RNA分子是否被成功修复，如果R环被成功修复，则DNA复制可以继续，否则诱发复制叉内的DNA重排。

同源重组主要用于修复DNA的双链断裂和单链空缺，分别在真核细胞S/G₂ 时相和原核细胞DNA复制过程中发挥作用。研究表明，基因转录所促生的R环可以激发同源重组。对裂殖酵母 (*S. pombe*) 和出芽酵母 (*S. cerevisiae*) 的研究发现，这类与基因转录关联的同源重组 (Transcription associated recombination, TAR) 往往伴随着RNA聚合酶I和II催化的基因转录过程，而且大多出现在DNA复制过程中。显然，它们与基因转录和DNA复制之间的“冲突”有关。酵母的THO缺陷株和大肠杆菌DksA突变株可以明确印证这一现象^[46,51,52]。在酵母细胞内，THO是由Tho2、Hpr1、Mft1和Thp2蛋白组成的复合体，主要负责基因转录的延伸。当人为造成该复合体功能缺陷时，酵母细胞内可高频出现R环结构，使基因转录延伸效率降低，并伴随高频的同源重组^[50]。同样，缺失DksA的大肠杆菌细胞中也会造成基因转录和DNA复制之间的“冲突”，并诱导DNA损伤应答和RecA依赖的同源重组反应^[46]。

因此，TAR出现的根本原因与基因转录形成R环结构有关。一种可能是R环结构中的单链DNA（非模板链）会更容易与同源重组蛋白识别和作用（图3），或R环的形成造成了DNA双链断裂^[50, 57]。

与其他类型的同源重组不同，大多数的TAR频繁地出现在只含有一个断端的双链DNA断裂处，表明TAR可能更倾向于发生在被停滞的DNA复制叉部位^[57]。

TAR的出现可能是细胞试图避免基因转录所引发的遗传不稳定性。在基因组的不稳定性方面，TAR究竟如何发挥作用目前尚不清楚。但可以肯定的是，TAR的发生有可能会避免基因转录对DNA复制的干扰。因此，TAR现象可能是原核和真核生物中普遍存在的一种DNA维护机制，但对基因组的稳定性维护却表现出双重调节作用^[57~59]。

4.2 基因转录引发基因突变

基因转录除提高TAR的同时，还能增高相关基因的突变率——转录关联的基因突变（Transcription-associated mutation, TAM）。与TAR一样，TAM几乎存在于所有物种的基因转录过程中。

TAM可能与单链DNA损伤有关。通常情况下，位于正常基因转录泡内的非模板DNA单链寿命短暂，会被负超螺旋重新恢复成双链。因此，发生损伤的机会很少。但在持续或高强度基因转录过程中，或者基因转录促生了R环，那么非模板DNA呈单链时间会被显著增长。此时的单链DNA变得更容易受损，并相应提高所在基因的突变率。本实验室的研究结果也表明，缺失RecG的大肠杆菌细胞会因持续的基因转录而使基因LacI的突变率大大提高（未发表）。

研究表明，脱氨基反应会选择性地发生在转录泡内的非模板DNA单链上。脱氨基反应可以使胞嘧啶脱氨基转换为尿嘧啶。这种脱氨基反应出现在单链DNA上的几率要比出现在双链高出140倍以上^[60]。同样，基因毒性物质4-硝基喹啉-1-氧化物或甲基-甲烷化物也会选择性地攻击基因转录泡中的非模板链，并使重组效率增加4000倍之多^[53]。Gómez-González等^[61]在人类B细胞内发现了一种针对非转录模板链上胞嘧啶脱氨基的激活诱导的胞嘧啶脱氨酶（Activation-induced cytidine deaminase-AID），该酶可以特异性增加非模板链胞嘧啶脱氨基反应的频率，并在很大程度上提高了非模板链的基因突变率。同时，有证据表明AID参与R环引发的DNA双链断裂反应过程。例如，常见于B淋巴细胞内的原癌基因*BCL6*、*RhoH*、*PIM1*和*PAX5*中出现的易位基因突变往往会发生在富含G碱基的DNA序列位点，这些位点都是R环形成的偏好部位。与上述位点基因突变有关的人类疾病过程中出现的DNA双链断裂的产生均与AID有关^[62]。

5 R环与三核苷酸扩增关联的神经肌肉系统退行性病变

脊髓-小脑共济失调综合征（SCA）、亨廷顿疾病、佛立德立希综合征、肌营养不良和脆性X染色体综合征等近40种人类神经-肌肉系统退行性疾病的发生与三核苷酸重复微卫星DNA CAG·CTG、GAA·TTC及CGG·CCG的扩增性和不稳定性有关。多年的研究积累表明，上述三核苷酸重复微卫星DNA在转录时会形成R环^[63~65]。例如，当在体外分别转录CTG、CGG、CAG、CCG、GAA和TTC时会在重复序列内形成R环（图5）^[64]。Lin等^[65]的研究发现，R环结构形成和CTG·CAG重复序列的不稳定性具有相关性。当转录富含GC碱基的

DNA模板链会和新生RNA链复性形成抗RNase A而对RNase H敏感的稳定R环^[65]。当RNase H1活性降低或敲除RNase H1和RNase H2时，转录依赖的CTG•CAG重复序列的不稳定性就会增加^[65]。McIvor等^[63]研究表明，在大肠杆菌和人类细胞中转录GAA•TTC及CTG•CAG重复序列时可被诱导形成R环，并促进重复序列本身的不稳定，导致扩增或缩减。

当前，欠缺还未见关于RNA:DNA杂交体介导三核苷酸重复序列扩增不稳定的分子解释。为此，本课题组基于自己的研究发现，提出了RNA:DNA杂交体内RNA分子诱发DNA复制的观点（图4）^[66]。我们认为，三核苷酸重复序列在转录过程中形成R环，其中的单链DNA（非模板链）发生断裂（图4，T0），之后由RNA引导的DNA复制产生与转录非模板链相同的单链三核苷酸重复序列，该序列与断裂的非模板链连接形成单链DNA空缺（图4，T3-6），随后单链DNA空缺经后续DNA复制填充，导致三核苷酸重复序列双链的不稳定性扩增^[66]。

同时，来自其他实验室的工作也表明，与上述疾病关联的三核苷酸重复微卫星序列易在DNA复制叉的后随链模板和基因转录过程中发生错误折叠，形成非B型二级结构。这些非B型DNA结构也会影响DNA复制或基因转录^[43,67,68]。

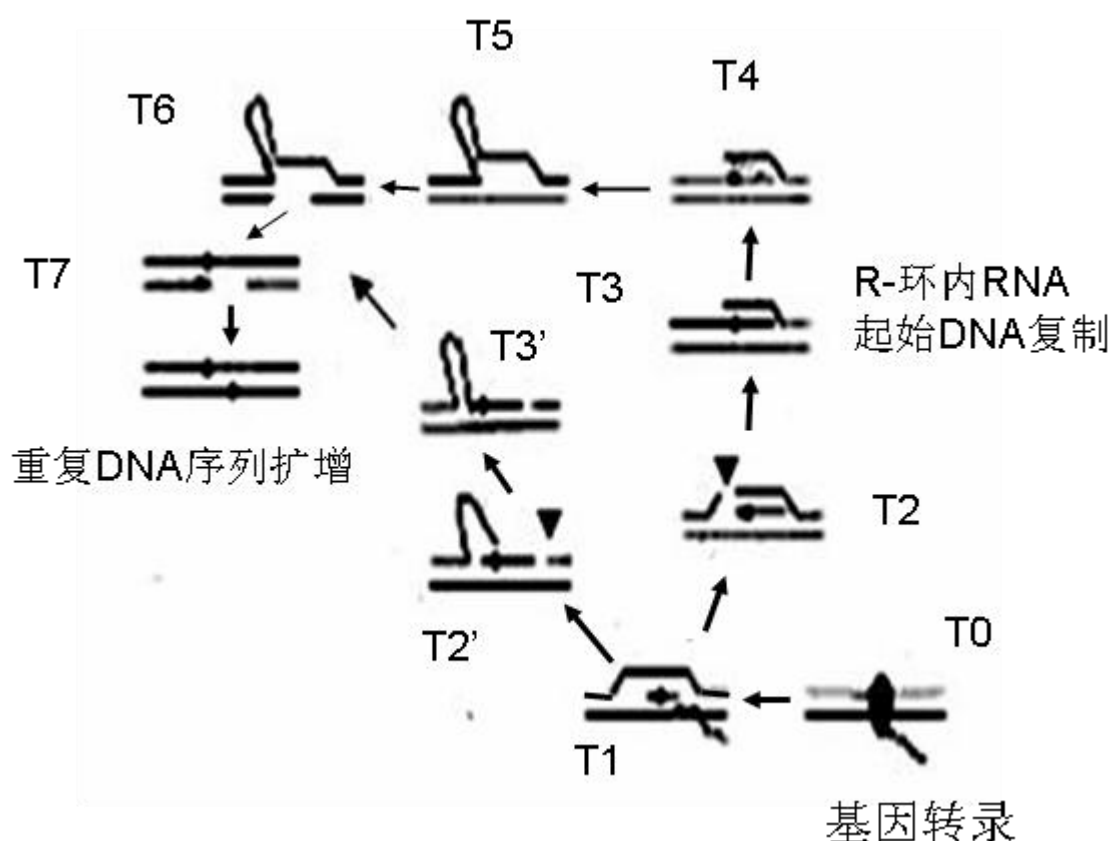


图4 R环引发的三核苷酸重复序列微卫星DNA的扩增机制

事实上，在三核苷酸重复序列转录过程中，无论是模板链还是非模板链上形成包括发卡在在内的非B型DNA结构都有可能干扰RNA聚合酶II的转录^[67]。对小鼠和人类细胞系的研究表明，识别错配碱基的MSH2/MSH3复合体均能与CAG和CTG重复序列形成的DNA

发卡结构内的错配对碱基结合^[68]，并因此增加转录关联的重复序列的不稳定性^[67,68]。

MSH2/MSH3 复合体能与致病三核苷酸重复序列形成的链内碱基错配对、“鼓包”（Bulge）或 DNA 环（loop）结合，形成 DNA-蛋白复合体。这些都可能成为基因转录中的“路障”，导致 RNA 聚合酶转录的终止^[43]。

6 R环与基因表达的表现遗传学控制

在特定生理条件下，基因组内基因转录形成的R环结构可能参与某些基因的表现遗传控制。在人类基因组中，这类R环通常出现在未被甲基化修饰的CpG岛的下游启动子和5' 非翻译区之间富含G碱基的区域^[69,70]。此时，R环结构中的单链DNA可能起着招募或保护某些与基因表观遗传修饰直接有关的蛋白因子的作用。研究表明，这种修饰有助于维持组蛋白H3K4的三价甲基化状态（与基因转录的活性有关）或使DNA处于去甲基化状态（需要DNA去甲基化蛋白复合体的催化）^[69,70]。

7 结语与展望

众所周知，出现在细胞周期S时相的基因转录会潜在影响DNA复制，引发转录和DNA复制间的“冲突”。为了避免这类冲突的发生，基因组在进化历程中选择性地把“转录”与“DNA复制”进行“同向”组织，以尽可能避免冲突。即便如此，基因转录与DNA复制之间发生“碰撞”或“追尾”的可能性依然不容忽视，尤其当基因转录促成R环之后，R环对DNA的复制干扰更加剧了问题的严重性。为此，生物采取利用转录-复制介导因子提高基因转录延伸和终止效率；利用高保守的RNaseH和RNA/DNA解旋酶等手段清除RNA:DNA杂交体。当前，围绕R环形成的分子过程及可能引发的基因组稳定性问题已经引起研究者的关注。围绕这一基本生物学问题的研究产出可以更好地理解基因转录诱发的基因突变和基因高频重组的生物学意义、某些三核苷酸重复序列在基因转录过程中形成R环所能发挥的病理学贡献，及基因转录在基因组进化进程中的作用。

参考文献

- [1] Helmrich A, Ballarino M, Nudler E, Tora L. Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nature Struct & Mol Boil*, 2013,20(4):412-418.
- [2] Aguilera A, Garcí'a-Muse T. R Loops: From transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol Cell*, 2012, 46(2):115-24.
- [3] Lin YL, Pasero P. Interference between DNA replication and transcription as a cause of genomic instability. *Current Genomics*, 2012,13(1):65-73.
- [4] Cook PR. The organization of replication and transcription. *Science*, 1999, 284(5421):1790-1795.
- [5] Kogoma T. Stable DNA Replication: Interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol and Mol Biol Rev*, 1997,61(2):212-238.

- [6] Masai H, Arai K. Mechanisms of primer RNA synthesis and D-loop/R-loop dependent DNA replication in *Escherichia coli*. *Biochimie*, 1996,78(11-12):1109-1117.
- [7] Roy D, Lieber MR. G clustering is important for the initiation of transcription-induced R-loops in vitro, whereas high G density without clustering is sufficient thereafter. *Mol Cell Biol*, 2009,29(11):3124-3133.
- [8] Kim N, Jinks-Robertson S. Guanine repeat-containing sequences confer transcription-dependent instability in an orientation-specific manner in yeast. *DNA Repair (Amst.)*, 2011,10(9):953-960.
- [9] Duquette ML, Handa P, Vincent JA, Tylor AF, Maizels N. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev*, 2004,18(13):1618-1629.
- [10] Krasilnikova MM, Samadashwily GM, Krasilnikov AS, Mirkin SM. Transcription through a simple DNA repeat blocks replication elongation. *EMBO J*, 1998,17(17):5095-5102.
- [11] Belotserkovskii BP, Neil AJ, Saleh SS, Shin JH, Mirkin SM, Hanawalt PC. Transcription blockage by homopurine DNA sequences: role of sequence composition and single-strand breaks. *Nucleic Acid Res*, 2013,41(3):1817-1828.
- [12] Roy D, Zhang Z, Lu Z, Hsieh CL, Lieber MR. Competition between the RNA transcript and the nontemplate DNA strand during R-loop formation in vitro: a nick can serve as a strong R-loop initiation site. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(1):146-159.
- [13] Wongsurawat T, Jenjaroenpun P, Kwok CK, Kuznetsov V. Quantitative model of R-loop forming structures reveals a novel level of RNA–DNA interactome complexity. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(2):e16.
- [14] Shaw NN, Arya DP. Recognition of the unique structure of DNA:RNA hybrids. *Biochimie*, 2008,90(7):1026-1039.
- [15] Roberts RW, Crothers DM. Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition. *Science*, 1992, 258(5087):1463–1466.
- [16] Molina-Navarro MM, Martinez-Jimenez CP, Rodriguez-Navarro S. Transcriptional elongation and mRNA export are coregulated processes. *Genet Res International*, 2011:652461.
- [17] Borukhov S, Lee J, Laptenko O. Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol Microbiol*, 2005,55(5):1315-1324.
- [18] Washburna RS, Gottesman ME. Transcription termination maintains chromosome integrity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011,108(2):792-797.
- [19] Jimeno S, Rondán AG, Luna R, Aguilera A. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO J*, 2002, 21(13):3526-3535.
- [20] Li X, Manley JL. Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell*, 2005,122,365-378.
- [21] Skourti-Stathaki K, Proudfoot NJ, Gromak N. Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Mol Cell*, 2011, 42(6):794-805.
- [22] Gómez-González B, García-Rubio M, Bermejo R, Gaillard H, Shirahige K, Marin A, Foiani M, Aguilera A. Genome-wide function of THO/TREX in active genes prevents R-loop-dependent replication obstacles. *EMBO J*, 2011, 30(15):3106-3119.
- [23] Stütt BL. *Escherichia coli* Transcription termination factor Rho binds and hydrolyzes ATP using a single class of three sites. *Biochem*, 2001,40(7), 2276-2281.
- [24] Kim HD, Choe J, Seo YS. The sen1(+) gene of *Schizosaccharomyces pombe*, a homologue of budding yeast SEN1, encodes an RNA and DNA helicase. *Biochem*, 1999, 38(44):14697-14710.

- [25] Mischo HE, Gómez-González B, Grzechnik P, Rondon AG, Wei W, Steinmetz L, Aguilera A, Proudfoot NJ. Yeast Sen1 helicase protects the genome from transcription-associated instability. *Mol Cell*, 2011, 41(1):21-32.
- [26] Steinmetz EJ, Conrad NK, Brow DA, Corden JL. RNA binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature*, 2001, 413(6853):327-331.
- [27] Thiebaut M, Kisseleva-Romanova E, Rougemaille M, Boulay J, Libri D. Transcription termination and nuclear degradation of cryptic unstable transcripts: a role for the nrd1-nab3 pathway in genome surveillance. *Mol Cell*, 2006, 23(6):853-864.
- [28] Anupama K, Leela JK, Gowrishankar J. Two pathways for RNase E action in *Escherichia coli* *in vivo* and bypass of its essentiality in mutants defective for Rho-dependent transcription termination. *Mol Microbiol*, 2011, 82(6):1330-1348.
- [29] Pan X, Ding Y, Shi L. The roles of SbcCD and RNaseE in the transcription of GAA•TTC repeats in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)*, 2009, 8(11):1321-1327.
- [30] Wahba L, Amon JD, Koshland D, Vuica-Ross M. RNase H and multiple RNA biogenesis factors cooperate to prevent RNA:DNA hybrids from generating genome instability. *Mol Cell*, 2011, 44(6):978-988.
- [31] El Hage A, French SL, Beyer AL, Tollervey D. Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis. *Genes Dev*, 2010, 24(14):1546-1558.
- [32] Tuduri S, Crabbe L, Conti C, Tourrière H, Holtgreve-Grez H, Jauch A, Pantescio V, De Vos J, Thomas A, Theillet C, Pommier Y, Tazi J, Coquelle A, Pasero P. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(11):1315-1324.
- [33] Howard JA, Delmas S, Ivancic-Bace I, Bolt EL. Helicase dissociation and annealing of RNA-DNA hybrids by *Escherichia coli* Cas3 protein. *Biochem J*, 2011, 439(1):85-95.
- [34] Boule JB, Zakian VA. The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA-DNA substrates. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(17):5809-5818.
- [35] Chakraborty P, Grosse F. Human DHX9 helicase preferentially unwinds RNA-containing displacement loops (R-loops) and G-quadruplexes. *DNA Repair (Amst)*, 2011, 10(6):654-665.
- [36] Duch A, Felipe-Abrio I, Barroso S, Yaakov G, Garcia-Rubio M, Aguilera A, de Nadal E, Posas F. Coordinated control of replication and transcription by a SAPK protects genomic integrity. *Nature*, 2013, 493(7430):116-119.
- [37] Alzu A, Bermejo R, Begnis M, Lucca C, Piccini D, Carotenuto W, Saponaro M, Brambati A, Cocito A, Foiani M, Liberi G. Senataxin associates with replication forks to protect fork integrity across RNA-Polymerase-II-transcribed Genes. *Cell*, 2012, 151(4):835-846.
- [38] Rondon AG, Mischo HE, Kawauchi J, Proudfoot NJ. Failsafe transcriptional termination for protein-coding genes in *S. cerevisiae*. *Mol Cell*, 2009, 36(1):88-98.
- [39] Suraweera A, Lim YC, Woods R, Birrell GW, Nasim T, Becherel OJ, Lavin MF. Functional role for senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, in transcriptional regulation. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(18):3384-3396.
- [40] Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Plus I, Irobi J, Dierick I, Abel A, Kennerson ML, Rabin BA, Nicholson GA, Auer-Grumbach M, Wagner K, Jonghe P, Griffin JW, Fischbeck KH, Timmerman V, Cornblath DR, Chance PF. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet*, 2004, 74(6):1128-1135.
- [41] French S. Consequences of replication fork movement through transcription units *in vivo*. *Science*, 1992, 258(5086):1362-1365.

- [42] Postow L, Ullsperger C, Keller RW, Bustamante C, Vologodskii AV, Cozzarelli NR. Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *J Biol Chem*, 2001,276(4):2790-2796.
- [43] Pan X, Xiao P, Li HQ, Dongxu Zhao, Fei Duan. The gratuitous repair on undamaged DNA misfold. *DNA Repair*, Inna Kruman (Ed.), 2011,401-430.
- [44] McGlynn P, Lloyd RG. Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals aRecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell*, 2000,101(1):35-45.
- [45] Kusuya Y, Kurokawa K, Ishikawa S, Ogasawara N, Oshima T. Transcription factor GreA contributes to resolving promoter-proximal pausing of RNA polymerase in *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol*, 2011,193(12),3090-3099.
- [46] Tehranchi AK, Blankschien MD, Zhang Y, Halliday JA, Srivatsan A, Peng J, Herman C, Wang JD. The transcription factor DksA prevents conflicts between DNA replication and transcription machinery. *Cell*,2010,141(4):595-605.
- [47] Ganesan A, Spivak G, Hanawalt PC. Transcription-coupled DNA repair in prokaryotes. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012,110:25-40.
- [48] Helmrich A, Ballarino M, and Tora L. Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Mol Cell*,2011,44(6):966-977.
- [49] Huertas P, and Aguilera A. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription associated recombination. *Mol Cell*, 2003,12(3):711-721.
- [50] Paulsen RD, Soni DV, Wollman R, Hahn AT, Yee MC, Guan A, Hesley JA, Miller SC, Cromwell EF. A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Mol Cell*, 2009,35(2):228-239.
- [51] Wellinger RE, Prado F, Aguilera A. Replication fork progression is impaired by transcription in hyperrecombinant yeast cells lacking a functional THO complex. *Mol Cell Biol*,2006,26(8):3327-3334.
- [52] Mirkin EV, Mirkin SM. Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol.Mol. Biol Rev*,2007,71(1):13-35.
- [53] Dutta D, Shatalin K, Epshtein V, Gottesman ME, Nudler E. Linking RNA polymerase backtracking to genome instability in *E. coli*. *Cell*, 2011,146(4):533-543.
- [54] Gottipati P, Helleday T. Transcription-associated recombination in eukaryotes: link between transcription, replication and recombination. *Mutagenesis*, 2009,24(3):203-210.
- [55] Rothstein R, Michel B, Gangloff S. Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes Dev*,2009,14(1):1-10.
- [56] Mortusewicz O, Herr P, Helleday T. Early replication fragile sites: where replication-transcription collisions cause genetic instability. *EMBO J*, 2013,32(4):493-495.
- [57] Savolainen L, Helleday T. Transcription-associated recombination is independent of XRCC2 and mechanistically separate from homology-directed DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res*,2009,37(2):405-412.
- [58] Stirling PC, Chan YA, Minaker SW, Aristizabal MJ, Barrett I, Sipahimalani P, Kobor MS, Hieter P. R-loop-mediated genome instability in mRNA cleavage and polyadenylation mutants. *Genes Dev*, 2012,26(2):163-175.
- [59] Bermejo R, Lai MS, Foiani M. Preventing replication stress to maintain genome stability resolving conflicts between replication and transcription. *Mol Cell*,2012,45(6):710-718.

- [60] Polak P, Arndt PF. Transcription induces strand-specific mutations at the 5' end of human genes. *Genome Res*, 2008, 18(8):1216-1223.
- [61] G ómez-Gonz ález B, Aguilera A. Activation-induced cytidine deaminase action is strongly stimulated by mutations of the THO complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007,104(20):8409-8414.
- [62] Robbiani DF, Bothmer A, Callen E, Reina-San-Martin B, Dorsett Y, Difilippantonio S, Bolland DJ, Chen HT, Corcoran AE, Nussenzweig A, Nussenzweig MC. AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell*, 2008,135(6):1028-1038.
- [63] McIvor EI, Polak U, Napierala M. New insights into repeat instability Role of RNA•DNA hybrids. *RNA Biol*, 2010,7(5):551-558.
- [64] Reddy K, Tam M, Bowater RP, Barler M, Tomlinson M, Edamura KN, Wang YH, Pearson CE. Determinants of R-loop formation at convergent bidirectionally transcribed trinucleotide repeats. *Nucleic Acids Res*, 2011,39(5):1749-1762.
- [65] Lin Y, Dent SY, Wilson JH, Wells RD, Napierala M. R loops stimulate genetic instability of CTG.CAG repeats. *Proc Natl Acad Sci USA*,2010,107(2):692-697.
- [66] Pan X. Mechanism of trinucleotide repeats instabilities: The necessities of repeat non-B secondary structure formation and the roles of cellular trans-acting factors. *Acta Genet Sin*, 2006, 33(1):1-11.
- [67] Salinas-Rios V, Belotserkovskii BP, Hanawalt PC. DNA slip-outs cause RNA polymerase II arrest *in vitro*: potential implications for genetic instability. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(17):7444-7454.
- [68] Lin Y, Wilson JH. Nucleotide excision repair, mismatch Repair, and R-Loops modulate convergent transcription-induced cell death and repeat Instability. *PLoS One*,2012,7(10):e46807.
- [69] Ginno PA, Lott PL, Christensen HC, Korf I, Chedin F. R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Mol Cell*,2012,45(6):814-825.
- [70] Smolle M, Workman JL. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochim Biophys Acta*, 2013,1829(1):84-97.