

DOI: 10.13376/j.cblls/2022119

文章编号: 1004-0374(2022)09-1071-09

· 评述与综述 ·

# 染色质R环的生理功能研究进展

耿慧超, 陈 亮\*

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

**摘要:** R环作为一种染色质高级结构, 在基因组中广泛存在, 受细胞精密调控, 并与基因转录、DNA复制、表观遗传修饰等基因组活动高度偶联。R环功能具有两面性: 一方面R环作为路障, 在未及时清除时干预转录与复制, 改变局部表观遗传修饰环境, 最终影响基因表达和基因组稳定性, 并与多种重大疾病的发生相关; 另一方面, R环在多种模式生物体内随发育高度动态变化, 参与干细胞干性维持和分化调控, 以及B细胞免疫球蛋白类型转换的DNA重组等过程, 显示R环具有重要生理作用, 也是相关领域当下热点研究方向之一。该文将聚焦近年对R环生理功能的研究进展, 重点讨论R环在生理条件下的调控机制和功能以及未来潜在的研究方向。

**关键词:** R环; 表观遗传学; 基因组功能

**中图分类号:** Q343.2 **文献标志码:** A

## Physiological functions of R-loops on chromatin

GENG Hui-Chao, CHEN Liang\*

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** R-loops are widely distributed in the genome, being precisely regulated and associated with gene transcription, DNA replication and epigenetic modification, which may lead to both pathological and physiological outcomes. On one hand, R-loops are in general considered as road blocks to interfere with transcriptions and replications, change the local epigenetic configurations and eventually disrupt gene expressions and genomic stabilities, implicating in a variety of major diseases. On the other hand, recent studies show that the levels of R-loops undergo dynamic change during the development of many model organisms. R-loops have been shown to participate in stem cell maintenance and differentiation, as well as DNA recombination during B-cell immunoglobulin (Ig) class switch recombination (CSR), suggesting the important physiological impact of R-loops, which becomes one of the most popular research topics in the field. This review focuses on recent research progress of R-loops under physiological conditions, including the regulatory mechanism and function of R-loop and future research directions.

**Key words:** R-loop; epigenetics; functions of the genome

### 1 R环调控与功能概述

#### 1.1 R环的产生与特征

R环(R-loop)是由RNA与模板DNA单链配对形成的杂合链与游离的非模板DNA链共同组成的三链结构, 于1976年通过电子显微镜在体外环境下首次被报道<sup>[1]</sup>。1994年, Drolet等<sup>[2]</sup>在大肠杆菌突变体中首次证实活体生命中存在R环。尽管R环与三链体结构(RNA:DNA triplex)都是RNA:DNA

杂合体, 但存在本质区别。R环是RNA与双链DNA(dsDNA)通过Watson-Crick氢键配对而非Hoogsteen碱基形成, 其稳定性远高于三链体结构或DNA双链<sup>[3]</sup>。从细菌(如大肠杆菌)、真菌(如酵母菌)、高等植物(如拟南芥)到人类细胞, R环广泛分布

收稿日期: 2022-03-22; 修回日期: 2022-04-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32171289)

\*通信作者: E-mail: liang\_chen@whu.edu.cn

于核基因组和其他含有基因组序列的亚结构中,例如线粒体和植物叶绿体<sup>[4-7]</sup>。R环在基因组内以顺式(*cis*)和反式(*trans*)的形式存在,顺式R环的RNA片段主要来自原位转录新生的RNA。反式R环的RNA片段可能由远端RNA互补配对形成,多发生在转录调控中,例如在拟南芥的反义lncRNA(antisense lncRNA)调控*FLC*基因的通路中,反义R环促进了该调控作用<sup>[8]</sup>。

R环产生机制的主流模型为thread-back:转录中RNA聚合酶(RNAP)的上游DNA处于负超螺旋和潜在开链状态,促使新生RNA和DNA单链互补配对形成R环<sup>[9]</sup>。哺乳动物细胞中,由RNAP I、II与III转录的RNA均可形成R环,显示RNA可来源于几乎所有类型的RNA<sup>[10-12]</sup>。R环在物种间具有一定保守性,形成序列通常呈现高GC%、GC-skew(如人类)、AT-skew(如植物和酵母)、与G4联体(G-quadruplex)偶联等特征<sup>[13]</sup>。此外,启动子下游的DNA缺口(DNA nick)也能促进DNA和RNA相互缠绕,从而形成R环<sup>[14]</sup>。基于基因组G cluster<sup>[15]</sup>设计的计算软件预测,人类基因组59%的基因有形成R环的潜力<sup>[16]</sup>。

## 1.2 R环调控相关蛋白

目前已知调控R环的蛋白主要有以下几类:一是通过阻止RNA与DNA杂交,减少R环过度积累的蛋白,包括有效转录延伸、终止、多聚腺苷酸化、RNA剪接、包装和输出所需蛋白;二是调控DNA拓扑结构,进而影响RNA与DNA杂交的蛋白,包括多个拓扑异构酶;三是参与维持基因组完整性的蛋白,在DNA修复和R环形成之间存在动态相互作用;四是特异性降解R环中RNA的RNase H家族成员,以及可以解开RNA/DNA杂合链的解旋酶家族蛋白<sup>[17]</sup>。R-loopBase编目了迄今为止调节R环的最完整可靠的蛋白质综合列表,并通过PPI网络分析和GO富集分析揭示了R环调节蛋白的功能关联<sup>[18]</sup>。

## 1.3 R环的生理和病理功能

人和酵母中的多项研究表明,R环具有两面性。一方面R环的形成会导致基因组的不稳定性增加。R环中游离的单链DNA(ssDNA)很容易受胞苷脱氨酶(AID)等损伤因子攻击发生断裂。R环结构也可以对DNA复制叉产生阻挡而导致DNA复制叉崩溃、逆转、DNA双链断裂(DBS)、DNA空缺(ssDNA gap)等<sup>[19-21]</sup>,从而导致同源重组事件。现已知R环可诱发多种癌症,如乳腺癌和卵巢癌<sup>[22]</sup>;神经退行

性疾病,如IV型肌萎缩侧索硬化症(ALS4)和II型共济失调眼神经失用症(AOA2)<sup>[23]</sup>;三核苷酸扩增疾病,如Friedreich共济失调(FRDA)和脆性X综合征(FXS)<sup>[24]</sup>以及早衰<sup>[25]</sup>。另一方面,R环具有重要生理功能(图1),如作为线粒体基因组复制起始所需的引物<sup>[4]</sup>;促进RNAP II在转录终止前的暂停和卸载<sup>[26]</sup>;酵母rDNA的复制<sup>[12]</sup>;DNA双链断裂处招募损伤修复因子<sup>[27]</sup>以及维持端粒稳定性<sup>[25]</sup>等。由此可见,R环在生理和病理上都扮演重要的角色。

## 2 R环参与的生理功能

### 2.1 R环调控信使RNA转录起始和终止

R环招募转录因子调控转录表达的现象广泛存在,其中很多是通过反义lncRNA产生的<sup>[28-29]</sup>。在拟南芥中,lncRNA *APOLO*通过短序列互补和DNA-RNA双链的形成来识别并入侵靶点,随后它捕获植物Polycomb抑制复合物1(LHP1)组分,调节局部染色质三维构象和多个远端无关的生长素应答基因的表达,展示出一种多靶标的、远距离的R环调节形式<sup>[30]</sup>。在人体中,*VIM*基因转录起始位点下游700 bp左右位置表达的反向RNA *VIM-AS1*会形成R环帮助招募转录因子NF- $\kappa$ B<sup>[31]</sup>。lncRNA和增强子RNA(eRNA)的启动子区常与R环结构关联,其转录前起始复合物(preinitiation complex)的活性和转录活性都依赖于R环活性<sup>[32]</sup>。R环的形成在全基因组范围可阻滞约500个染色质区域的反向转录<sup>[33]</sup>。

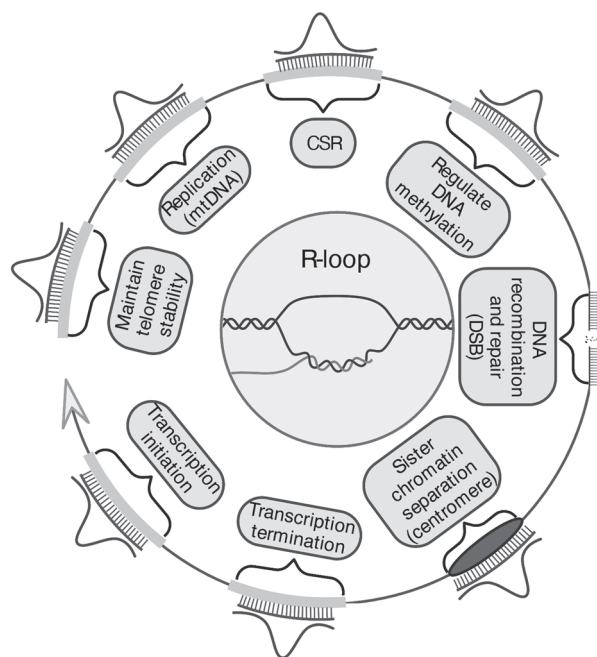


图1 R环的部分生理功能(Created with BioRender.com)

转录过程中形成的 R 环由于开链形成的超螺旋结构很容易对附近的蛋白质机器产生影响。在基因区, R 环作为路障对上游 RNAP 产生阻滞效应<sup>[20, 34]</sup>。在转录终止区, RNAP II 容易在一些多聚腺嘌呤下游富含 G 的区段暂停, 并在上游处产生 R 环。R 环消解过程依赖解旋酶 Senataxin, 并促进外切酶 Xrn2 降解下游转录本和 RNAP II 转录终止<sup>[26]</sup>。进一步研究发现, R 环可以促进反向转录并形成双链 RNA, 招募 DICER、AGO1/2、G9a, 造成转录终止区域 H3K9-me2 形成, 促进 RNAP II 暂停和转录终止<sup>[35]</sup>。后续研究发现更多的解旋酶和 RNA m6A 修饰均可通过调控 R 环动态促进转录终止<sup>[36-37]</sup>。全基因组分析显示, 约有 2 000 个左右的基因转录终止区富含 G 且可能形成 R 环<sup>[38]</sup>。但有趣的是, Senataxin 虽然也是 RNAP III 转录终止所需, 但这一过程与 R 环无关<sup>[39]</sup>, 而且全基因组数据显示 H3K9 甲基化仅在特定基因的转录终止区富集<sup>[40]</sup>。这些结果显示, R 环并非转录终止的唯一机制, 并且其调控非常动态, 更深入全面的转录终止机制解析需要未来进一步的研究。

## 2.2 rDNA 转录

rDNA 转录区是 R 环非常富集的基因组区域, 以酵母细胞为例, rDNA 表达重复序列约占酵母基因组的 10%, 而约 50% 的 R 环测序信号均会比对到 rDNA 区域<sup>[41]</sup>。早期研究显示, rDNA 区域的 R 环水平的升高将会阻碍 rRNA 的转录生成<sup>[42]</sup>, 可能是由于 R 环引发了 ATR/ATM DNA 损伤修复通路<sup>[43]</sup>。此外, rRNA 基因区的 R 环也被发现与升高的 DNA 重组率<sup>[44-45]</sup>、RNAP 堆积<sup>[12]</sup> 以及复制叉暂停<sup>[12, 46]</sup> 等多个基因组缺陷密切相关。多项研究也表明, rRNA 基因区产生的 R 环需被及时清除, 多项机制参与其中。例如, 在哺乳动物细胞中, RNase H1 和 Top1 沿 rDNA 分布并与 R 环产生的位点重合。当两种蛋白质缺失时, R 环的积累加剧, 说明 Top1 和 RNase H1 的功能互补, 共同抑制 RNAP I 转录相关的 R 环积累<sup>[47]</sup>。另外, microRNA (miRNA) 加工复合物被报道可消除 RPG (ribosomal protein gene) 基因处的 R 环, 促进其转录延伸和基因表达。该过程需要 DDX5 解旋酶参与, 但不依赖 miRNA 加工复合物的核糖核酸酶活性或 miRNA<sup>[48]</sup>。然而, 一项研究表明, RNAP I 转录限制造成持久的 R 环, 该 R 环的 RNA 部分可作为引物引导 rRNA 基因区的 DNA 复制起始<sup>[12]</sup>。RNAP II 通过在 rRNA 基因间区行使转录功能并造成 R 环的产生从而形成一个

分子屏障, 以此阻止 RNAP I 在该区域转录出正义基因间区非编码 RNA (sincRNA), 从而破坏核仁结构和 rRNA 的表达, 也能在 rRNA 基因两侧的 IGS 区影响 RNAP I 的募集, 维持核仁组织结构和完整性<sup>[49]</sup>。

## 2.3 线粒体DNA复制

线粒体 DNA 复制由固定的复制起始位点开始, 首先由线粒体 RNAP 从复制起始位点的启动子转录合成一段 RNA, 并形成稳定的 RNA/DNA 杂合链, 即 R 环<sup>[4-5]</sup>。RNA 链随即被 RNase H1 降解为短片段, 产生的 3'-OH 可以被 DNA 聚合酶  $\gamma$  识别并启动线粒体 DNA 的复制<sup>[50]</sup>。RNase H1 定位于细胞核与线粒体, 其对于线粒体功能尤其重要, RNase H1 敲除小鼠为胚胎致死, 在 RNase H1 缺失的组织中可以观察到线粒体 DNA 显著减少, R 环水平上升, 转录与复制受阻, 线粒体融合与分裂的情况发生显著变化并最终导致细胞凋亡<sup>[51-52]</sup>。但有趣的是, 研究显示一些与线粒体 DNA 复制无关的 R 环可在线粒体的各处形成, 其机制与潜在功能有待进一步研究<sup>[53]</sup>。

## 2.4 常染色体DNA复制与DNA损伤修复

一般意义上讲, R 环是复制叉进程的物理障碍, 特别是在一些能形成 DNA 二级结构的序列区域, 而 PrimPol 可以介导复制引物的重新合成, 缓解 R 环对复制的影响<sup>[54]</sup>。稳定的 DNA/RNA 杂合链可能通过末端切除或再复制产生大片段单链 DNA 区域, 并有可能发生缺失 (deletion) 或加倍 (duplication) 造成染色质的重排<sup>[55]</sup>。缺失 RNaseH 基因的酵母细胞进行的全基因组筛查实验结果显示, 许多参与维持 DNA 复制叉的因子, 如 MRN 复合物, 可抑制 R 环及相关的 DNA 损伤<sup>[56]</sup>。针对 DNA 损伤修复基因的 siRNA 文库筛选也显示 ATM/ATR 等损伤修复通路对于应对 R 环造成的 DNA 损伤至关重要<sup>[57]</sup>。但是, 也有体外质粒、噬菌体和酵母实验表明 R 环中的 RNA 部分可以作为引物促进 DNA 复制, 例如在酵母 rRNA 基因区<sup>[12, 58-59]</sup>。

另一方面, 虽然稳定的 R 环通常对基因组稳定性的影响是负面的——造成单链或双链损伤<sup>[45]</sup>, 但 DSB 处会产生 DNA/RNA 杂合链。早期研究发现在细胞中过表达的 RNase H 酶活突变蛋白会在激光引发的 DSB 处快速富集<sup>[60]</sup>, 后续研究发现不同类型的损伤造成的 DSB 都可造成 R 环的累积<sup>[61]</sup>。而对于 R 环的潜在作用, Ohle 等<sup>[62]</sup> 发现在 DSB 末端切除后与单链 DNA 互补形成的杂合链会阻止单链结合蛋白 RPA 的结合与末端切除的持续进行,



避免产生过长的单链 DNA, 阻碍修复进程; 但有趣的是, 研究人员发现 R 环是动态的, 过于稳定或降解过快的 R 环都会妨碍 DNA 损伤修复的正常进行。但在敲除 R 环调控因子 SETX 的细胞中, DSB 引发的大片段 DNA 缺失的频率却更高, 说明 R 环不是控制末端切除的决定因素<sup>[63]</sup>。对于杂合链的功能, 其形成后可能招募多个 DNA 损伤修复蛋白, 例如 RAD52、XPG、BRCA1 和 BRCA2<sup>[64-65]</sup>, 而其动态消解过程则由 Senataxin、RNase H1/2 等完成, 其后裸露出的单链 DNA 被 RAD51 结合并介导同源重组修复<sup>[64, 66]</sup>。

RPA 可能通过直接与 RNA 结合促进杂合链形成<sup>[65, 67]</sup>。关于 DSB 处杂合链中 RNA 部分的来源, 有研究表明是 RNAP II 结合末端切除后的单链 DNA 转录形成的, 并且依赖 MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) 复合物<sup>[68-69]</sup>。而该区域可能招募 RNAP II 延伸的激活因子, 如 CDK9 等, 也支持原位转录生成 RNA<sup>[70]</sup>。DSB 处产生 R 环的现象也许并不是普遍发生的, 可能只在 RNAP II 结合的区域才会出现 RNAP II 转录暂停及 R 环产生<sup>[71]</sup>。但另一项研究表明是 RNAP III 在 DSB 处生成 RNA, 并形成 R 环保护 3' 端的单链免于降解<sup>[11]</sup>。此外, 由 METTL3-m6A-YTHDC1 介导的 RNA m6A 修饰也可促进 DSB 处的 DNA/RNA 杂合链形成, 并促进招募 RAD51、BRCA1 进行同源重组修复<sup>[72]</sup>。因此, 关于杂合链的来源和机制可能是多样的, 需要进一步深入研究。

## 2.5 类别转换重组(class switch recombination, CSR)

早期体外实验发现, 当使用超螺旋质粒体外表达含有多聚嘌呤的 IgA 交换区域时会形成稳定的 R 环, 长约 140 nt<sup>[73-74]</sup>。这一现象后来在真核细胞中被证实, 当 B 细胞的  $\gamma 3$  或  $\gamma 2b$  交换区的转录被激活时可在该区域形成 R 环, 长度可达 1 kb<sup>[75]</sup>。对于该区域的潜在作用, 近年研究表明, 在小鼠 B 细胞的 IgH 类型转换区, 解旋酶 DDX1 会结合并打开内含子区域 RNA 形成的 G 四连体结构, 促进形成 IgH S 区域的 R 环, 最终帮助 AID 蛋白招募至该区域并促进 CSR<sup>[76]</sup>。在另一项研究中, R 环被发现可以促进复制相关解旋酶 Mcm 复合体的招募, 拉近交换区域的空间距离, 促进重组发生<sup>[77]</sup>。交换区的交换强度取决于鸟嘌呤的富集程度以及 WGCW 序列的数量, 因为鸟嘌呤的多少是 R 环延伸长度的重要决定因素<sup>[78]</sup>。关于 R 环促进重组的机制, R 环可能不直接导致重组, 其形成后会抑制 AID 的结合与模板链 DNA 的突变, 当 RNase H1 将 R 环降解后,

AID 才能作用于两条 DNA 链产生双链断裂和高效重组<sup>[79]</sup>。

## 2.6 端粒维持和着丝粒

TERRA (telomeric repeat-containing RNA) 通常会在染色质末端形成 R 环<sup>[25, 80-81]</sup>, 其形成受细胞周期的严格调控。TERRA 在 S 期早期形成, 并在 S 期晚期端粒开始进行复制时被 RNase H 酶降解<sup>[80]</sup>。在 S 期, TCOF1 蛋白离开核仁后通过与 TRF2 蛋白互作被招募至端粒并抑制 RNAP II 对 TERRA 的转录, 而敲除 TCOF1 后导致的 TERRA 和 R 环水平升高会引发复制叉暂停和端粒脆性上升<sup>[82]</sup>。另外, 参与端粒 R 环调控的因子还有 NONO、SFPQ 和 ATRX 等<sup>[83-84]</sup>。TERRA 倾向于与短的端粒结合并形成 R 环, 这一过程受到重组酶 RAD51 和其结合蛋白 BRCA2 的正调控, 以及 RNase H 与 TRF1 的负调控。其中, RAD51 可直接与 TERRA 结合并促进其入侵同源 DNA 链形成 R 环<sup>[85]</sup>。而在缺失 Rat1 和 RNase H2 的情况下, 短端粒的 TERRA 和 R 环水平上升又会激活 DDR 反应 (DNA damage response), 并促进 RAD51 的招募<sup>[80]</sup>。端粒 R 环可促进依赖于重组的端粒延伸并推迟细胞衰老进程, 当过表达 RNase H 时, 端粒重组速率与端粒延伸都受到抑制, 衰老进程加快<sup>[25]</sup>。

除端粒外, 研究显示, R 环也会在着丝粒处形成并发挥重要功能。在有丝分裂期 (M 期), 着丝粒的 R 环通过结合单链 DNA 的 RPA 蛋白招募 ATR 蛋白, 后者通过 Chk1 磷酸激酶活性激活 Aurora B 蛋白, 从而避免姐妹染色单体分离过程中可能形成的分离滞后以及子代细胞染色质异倍体等基因组不稳定性现象<sup>[86]</sup>。与其他区域的 R 环类似, 着丝粒 R 环水平过高也将导致染色质稳定性下降。例如, 当除去 CENP-A 蛋白后, 着丝粒转录本和 R 环水平都会上升, 由此干扰复制叉进程<sup>[87]</sup>, 过多的 R 环累积也将破坏动粒的方向正确性和染色质稳定性<sup>[88]</sup>。

## 2.7 R环的DNA甲基化调控

哺乳动物细胞的全基因组 R 环图谱数据显示其富集区域与 CpG 岛具有一定关联性, 这些 CpG 岛呈现显著的 GC 偏好性特征, 如启动区 CpG 岛非模板链富集鸟嘌呤而模板链富集胞嘧啶<sup>[10, 89]</sup>。含有 R 环的 CpG 岛维持低甲基化水平, 提示 R 环可能参与调控该区域的 DNA 甲基化修饰<sup>[38, 89]</sup>。功能研究表明, DNA 甲基化酶 DNMT1、DNMT3B1 与 RNA/DNA 杂合链的亲合性低于双链 DNA, 因此无法与含 R 环的启动子区域有效结合并对胞嘧啶进行甲基

化修饰<sup>[89-90]</sup>。此外, 对于已被甲基化的区域, 例如反义长非编码基因 *TARID*, 其与 *TCF21* 基因呈现头对头排列方式。*TARID* 转录本与 *TCF21* 启动子区可形成 R 环被 GADD45A 蛋白识别, 并特异性招募 DNA 去甲基化酶 TET1 和胸腺嘧啶糖基化酶 TDG, 从而促进 DNA 去甲基化及 *TCF21* 的转录<sup>[28, 91-92]</sup>。过表达外源 RNase H1 则显著抑制 TET1 与近 4 000 个识别位点的结合, 表明 R 环对 TET1 的招募作用在基因组中普遍存在<sup>[91]</sup>, 而另一项研究也发现 R 环潜在影响人类基因组中超过 1 200 个基因启动子区域的甲基化修饰<sup>[90]</sup>。

## 2.8 R环与组蛋白修饰

由于大多数 R 环由新生 RNA 原位杂交形成, 因此 R 环与转录激活的组蛋白修饰高度相关, 包括 H3K4me3 和 H3K27Ac 等<sup>[10, 40]</sup>。有趣的是, 全基因组分析结果显示部分 R 环与转录抑制相关组蛋白修饰 H3K27me3 关联, 且多为发育相关基因, 表明 R 环可能与该修饰调控相关<sup>[93]</sup>。有研究表明在小鼠干细胞中, R 环可以促进染色质调控蛋白复合物 Tip60-p400 与基因组的结合, 却抑制多梳抑制复合物 PRC2 的结合<sup>[94]</sup>。但这一调控机制可能只适用于部分基因。例如, 内含子非编码 RNA ANRASSF1 可招募 PRC2 复合物到 *RASSF1A* 基因的启动子区, 降低该基因的表达水平并促进细胞增殖; 在该调控过程中, R 环的存在并未抑制 PRC2 的结合<sup>[29]</sup>。还有一部分 PRC 调控基因形成的 R 环发挥的作用是招募 PRC1 和 PRC2 复合物, 抑制 RNAP II 转录活性<sup>[95]</sup>。同时, PRC2 对 R 环的影响可能也很复杂, 有研究表明破坏细胞内的 PRC2 复合物虽然可以消除其对不含 R 环基因的抑制作用, 但对 R 环本身并无影响<sup>[95]</sup>。在果蝇中, PRC2 复合物会促进 RNA/DNA 杂合链的形成<sup>[96]</sup>。而在另一些研究中, LSD1 可以去除活跃基因启动子区域组蛋白 H3K4 甲基化修饰, 进而容许 PRC2 复合物对组蛋白 H3K27 位点进行甲基化修饰, 而 H3K27 甲基化位点可作为 DDX19A 结合位点, 招募 DDX19A 去除位于活跃启动子的 R 环, 继而促进 LSD1 和 PRC2 的功能。该正反馈途径最终造成目标基因被抑制<sup>[97]</sup>。

在 DNA 损伤修复过程中, R 环可能如前文所述招募 PRC1/PRC2 复合物<sup>[95]</sup>, 而后者在 DSB 处的转录沉默中发挥重要作用<sup>[98]</sup>。在 DNA 拓扑异构酶抑制剂存在的情况下, R 环水平升高可导致抑制性表观遗传修饰增加, 造成 *FXN* 基因转录失活<sup>[24]</sup>。R 环造成组蛋白 H3S10 位点磷酸化水平上升和染色质

凝聚<sup>[99]</sup>, 但是对于特定基因如 *Snord116*, R 环的产生则促进染色质的解聚<sup>[100]</sup>。有趣的是, 当组蛋白 H3S10 位点突变后, R 环本身并不能引发 DNA 损伤反应, 说明 R 环本身不是造成基因组不稳定的充分必要条件<sup>[101]</sup>。

## 2.9 R环与干细胞干性维持和分化调控

在人类干细胞及多个谱系分化的细胞类型中, DRIP-seq 数据表明 R 环主要出现在基因区 (~34%) 和基因间区 (~50%), 其次是启动子区 (~8%) 和转录终止区 (~8%)<sup>[93]</sup>。另外大量 R 环富集在重复序列, 比如 LINE、SINE 和 rRNA 重复序列<sup>[93]</sup>。在动态变化方面, 在干细胞中 R 环随转录在部分多能性相关基因中出现, 随分化进程会在谱系相关的基因区域形成, 但依然会在部分多能性相关基因上保留, 提示 R 环可能会参与干细胞干性维持和分化调控<sup>[93]</sup>。有趣的是, 一项小鼠干细胞的 R 环图谱研究显示, R 环主要富集于活跃转录区, 但也有小部分 R 环与 PcG 区域结合, 显示 R 环可能对该区域进行调控。功能性实验表明, R 环促进 Tip60-p400 和特定目标基因结合, 限制 PRC2 结合, 从而促进胚胎干细胞分化<sup>[94]</sup>。在另一项工作中, GRO-seq 结果显示 R 环阳性的 PcG 区域和阴性区域的转录水平相似, 表明 R 环在这些区域对转录水平的调控有限, R 环不是低水平转录的内在特征<sup>[95]</sup>。

## 3 R环生理功能研究展望

### 3.1 发展新的高精度R环测序技术

全面研究 R 环的生理功能, 需要运用能准确捕获或标记 R 环的技术。现有关于捕获 R 环的高通量测序技术已有 10 余种, 主要基于 S9.6 单抗和 RNase H1 蛋白对 R 环的识别。关于各种方法已经有非常多的优秀综述评价其优缺点<sup>[102-104]</sup>。简言之, 尽管各种方法都能提供全基因组的 R 环图谱, 但是基于 S9.6 抗体的 DRIP-seq 系列方法存在信号特异性不足以及酶切基因组 DNA 的低分辨率问题<sup>[105-106]</sup>。基于 RNase H 的 R-ChIP 及其衍生方法在特异性和分辨率方面更具有优势<sup>[107]</sup>, 但是也存在构建细胞系繁琐以及 RNase H 是否能全面结合基因组 R 环的疑虑<sup>[102]</sup>。由于领域内缺乏判定 R 环的金标准, 未来开发能够精准捕获 R 环的新技术与验证体系将会对推进 R 环研究、解决领域若干相左结论起到重要作用; 同时, 如能在组织和机体水平获得高置信度的 R 环图谱, 进而获取组织特异性的 R 环图谱, 对 R 环的生理功能研究具有重大意义。精准的 R 环定

位能帮助判断其与其他染色质特征或过程的时空关系<sup>[108]</sup>。

### 3.2 获取机体水平R环图谱并研究其潜在生理功能

目前R环研究大多集中在细胞模型中,虽然在基因转录、DNA复制和表观遗传调控等方面均发现R环具有重要调节作用,但对其在发育、干细胞干性维持和疾病发生发展中作用的认知还很有限。利用干细胞分化策略,科学家对不同分化阶段和类型的细胞的R环进行全基因组对比,获得大量区域的动态变化特征,显示R环水平随发育受到严格调控<sup>[93]</sup>。而对于多细胞生物,目前已获得拟南芥和果蝇组织的R环图谱。其中,拟南芥的R环水平在不同发育阶段保持相对稳定,但也表现出一定的组织特异性<sup>[109]</sup>。对果蝇的研究发现,果蝇胚胎基因组中很多PRE (polycomb response element) 区域都含有R环结构,并处于转录抑制状态,与上述体外实验发现的PRC2与R环存在调控关系的结论相吻合<sup>[96]</sup>。

对于R环在机体水平的功能,有研究表明缺失H3K9甲基化修饰的*met-2/set-25*双突变线虫不育,且其生殖细胞中的转座子元件和重复序列出现转录去抑制化和R环,并造成基因组大片段插入和丢失<sup>[110]</sup>。在拟南芥中,AtALBA1和AtALBA2为R环的识别蛋白,并在基因组稳定性维持中发挥重要作用<sup>[111]</sup>; lncRNA *APOLO* 在远端与WAG2和AZG2形成R环,从而参与对拟南芥根的发育调控<sup>[30]</sup>。

### 3.3 从调控蛋白深入研究R环功能的分子机制

至今发现且报道了超过100个R环调控因子,而筛选实验列举的潜在调控蛋白更是多出一个数量级<sup>[36, 112]</sup>,这就产生了几个重要的科学问题:(1)这些蛋白调控R环的机制是什么;(2)不同蛋白是独立还是协同发挥作用;(3)不同蛋白调控R环的生理意义是什么<sup>[61]</sup>。举例来说,现有研究已发现DDX解旋酶家族中的许多成员都能调控R环,但细胞为何需要这么多种DDX蛋白实现相同的功能,以及每个DDX蛋白是否具有特异性都还未知。此外,由于机体某一生理功能可能受特定区域的R环调控,例如上述的rDNA表达以及CSR,而现有的研究基本都使用过表达RNase H1抑制整体R环水平并观察表型,无法做到聚焦具体区域的R环,不利于准确理解调控蛋白在特定基因组位点的R环调控。未来利用CRISPR/Cas9系统结合RNase H1也许可以做到准确调控某个区域,达到精准研究某个R环功能的目的<sup>[49]</sup>。

### [参 考 文 献]

- [1] Thomas M, White RL, Davis RW. Hybridization of RNA to double-stranded DNA: formation of R-loops. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73: 2294-8
- [2] Drolet M, Bi X, Liu LF. Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J Biol Chem*, 1994, 269: 2068-74
- [3] Roberts RW, Crothers DM. Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition. *Science*, 1992, 258: 1463-6
- [4] Xu B, Clayton DA. A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 580-9
- [5] Yang MY, Bowmaker M, Reyes A, et al. Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell*, 2002, 111: 495-505
- [6] Cheng L, Wang W, Yao Y, et al. Mitochondrial RNase H1 activity regulates R-loop homeostasis to maintain genome integrity and enable early embryogenesis in *Arabidopsis*. *PLoS Biol*, 2021, 19: e3001357
- [7] Yang Z, Hou Q, Cheng L, et al. RNase H1 cooperates with DNA gyrases to restrict R-loops and maintain genome integrity in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*, 2017, 29: 2478-97
- [8] Sun Q, Csorba T, Skourti-Stathaki K, et al. R-loop stabilization represses antisense transcription at the *Arabidopsis FLC* locus. *Science*, 2013, 340: 619-21
- [9] Costantino L, Koshland D. The Yin and Yang of R-loop biology. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 34: 39-45
- [10] Chen L, Chen JY, Zhang X, et al. R-ChIP using inactive RNase H reveals dynamic coupling of R-loops with transcriptional pausing at gene promoters. *Mol Cell*, 2017, 68: 745-57.e5
- [11] Liu S, Hua Y, Wang J, et al. RNA polymerase III is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Cell*, 2021, 184: 1314-29.e10
- [12] Stuckey R, Garcia-Rodriguez N, Aguilera A, et al. Role for RNA:DNA hybrids in origin-independent replication priming in a eukaryotic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 5779-84
- [13] Nadel J, Athanasiadou R, Lemetre C, et al. RNA:DNA hybrids in the human genome have distinctive nucleotide characteristics, chromatin composition, and transcriptional relationships. *Epigenetics Chromatin*, 2015, 8: 46
- [14] Roy D, Zhang Z, Lu Z, et al. 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: 146-59
- [15] 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: 3124-33
- [16] Wongsurawat T, Jenjaroenpun P, Kwok CK, et al. Quantitative model of R-loop forming structures reveals a novel level of RNA-DNA interactome complexity. *Nucleic*



- Acids Res, 2012, 40: e16
- [17] Groh M, Gromak N. Out of balance: R-loops in human disease. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004630
- [18] Lin R, Zhong X, Zhou Y, et al. R-loopBase: a knowledgebase for genome-wide R-loop formation and regulation. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: D303-15
- [19] Helmrich A, Ballarino M, Tora L. Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Mol Cell*, 2011, 44: 966-77
- [20] Huertas P, Aguilera A. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell*, 2003, 12: 711-21
- [21] Paulsen RD, Soni DV, Wollman R, et al. A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Mol Cell*, 2009, 35: 228-39
- [22] Bhatia V, Barroso SI, Garcia-Rubio ML, et al. BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2. *Nature*, 2014, 511: 362-5
- [23] Groh M, Albulescu LO, Cristini A, et al. Senataxin: genome guardian at the interface of transcription and neurodegeneration. *J Mol Biol*, 2017, 429: 3181-95
- [24] Groh M, Lufino MM, Wade-Martins R, et al. R-loops associated with triplet repeat expansions promote gene silencing in *Friedreich ataxia* and fragile X syndrome. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004318
- [25] Balk B, Maicher A, Dees M, et al. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 1199-205
- [26] 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: 794-805
- [27] Keskin H, Shen Y, Huang F, et al. Transcript RNA-templated DNA recombination and repair. *Nature*, 2014, 515: 436-9
- [28] Arab K, Park YJ, Lindroth AM, et al. Long noncoding RNA *TARID* directs demethylation and activation of the tumor suppressor *TCF21* via GADD45A. *Mol Cell*, 2014, 55: 604-14
- [29] Beckedorff FC, Ayupe AC, Crocci-Souza R, et al. The intronic long noncoding RNA *ANRASSF1* recruits PRC2 to the *RASSF1A* promoter, reducing the expression of *RASSF1A* and increasing cell proliferation. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003705
- [30] Ariel F, Lucero L, Christ A, et al. R-loop mediated *trans* action of the *APOLO* long noncoding RNA. *Mol Cell*, 2020, 77: 1055-65.e4
- [31] Boque-Sastre R, Soler M, Oliveira-Mateos C, et al. Head-to-head antisense transcription and R-loop formation promotes transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 5785-90
- [32] Tan-Wong SM, Dhir S, Proudfoot NJ. R-loops promote antisense transcription across the mammalian genome. *Mol Cell*, 2019, 76: 600-16.e6
- [33] Raghunathan N, Kapshikar RM, Leela JK, et al. Genome-wide relationship between R-loop formation and antisense transcription in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 3400-11
- [34] Belotserkovskii BP, Soo Shin JH, Hanawalt PC. Strong transcription blockage mediated by R-loop formation within a G-rich homopurine-homopyrimidine sequence localized in the vicinity of the promoter. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 6589-99
- [35] Skourti-Stathaki K, Kamieniarz-Gdula K, Proudfoot NJ. R-loops induce repressive chromatin marks over mammalian gene terminators. *Nature*, 2014, 516: 436-9
- [36] Cristini A, Groh M, Kristiansen MS, et al. RNA/DNA hybrid interactome identifies DXH9 as a molecular player in transcriptional termination and R-loop-associated DNA damage. *Cell Rep*, 2018, 23: 1891-905
- [37] Yang X, Liu QL, Xu W, et al. m<sup>6</sup>A promotes R-loop formation to facilitate transcription termination. *Cell Res*, 2019, 29: 1035-8
- [38] Ginno PA, Lim YW, Lott PL, et al. GC skew at the 5' and 3' ends of human genes links R-loop formation to epigenetic regulation and transcription termination. *Genome Res*, 2013, 23: 1590-600
- [39] Rivosecchi J, Laroche M, Teste C, et al. Senataxin homologue Sen1 is required for efficient termination of RNA polymerase III transcription. *EMBO J*, 2019, 38: e101955
- [40] Sanz LA, Hartono SR, Lim YW, et al. Prevalent, dynamic, and conserved R-loop structures associate with specific epigenomic signatures in mammals. *Mol Cell*, 2016, 63: 167-78
- [41] Wahba L, Costantino L, Tan FJ, et al. S1-DRIP-seq identifies high expression and polyA tracts as major contributors to R-loop formation. *Genes Dev*, 2016, 30: 1327-38
- [42] El Hage A, French SL, Beyer AL, et al. Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis. *Genes Dev*, 2010, 24: 1546-58
- [43] Velichko AK, Petrova NV, Luzhin AV, et al. Hypoosmotic stress induces R loop formation in nucleoli and ATR/ATM-dependent silencing of nucleolar transcription. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 6811-25
- [44] Wahba L, Gore SK, Koshland D. The homologous recombination machinery modulates the formation of RNA-DNA hybrids and associated chromosome instability. *Elife*, 2013, 2: e00505
- [45] Wahba L, Amon JD, Koshland D, et al. RNase H and multiple RNA biogenesis factors cooperate to prevent RNA:DNA hybrids from generating genome instability. *Mol Cell*, 2011, 44: 978-88
- [46] Amon JD, Koshland D. RNase H enables efficient repair of R-loop induced DNA damage. *Elife*, 2016, 5: e20533
- [47] Shen W, Sun H, De Hoyos CL, et al. Dynamic nucleoplasmic and nucleolar localization of mammalian RNase H1 in response to RNAP I transcriptional R-loops. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 10672-92

- [48] Jiang X, Prabhakar A, Van der Voorn SM, et al. Control of ribosomal protein synthesis by the Microprocessor complex. *Sci Signal*, 2021, 14: eabd2639
- [49] Abraham KJ, Khosraviani N, Chan JNY, et al. Nucleolar RNA polymerase II drives ribosome biogenesis. *Nature*, 2020, 585: 298-302
- [50] Posse V, Al-Behadili A, Uhler JP, et al. RNase H1 directs origin-specific initiation of DNA replication in human mitochondria. *PLoS Genet*, 2019, 15: e1007781
- [51] Cerritelli SM, Frolova EG, Feng C, et al. Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in RNaseH1 null mice. *Mol Cell*, 2003, 11: 807-15
- [52] Lima WF, Murray HM, Damle SS, et al. Viable RNaseH1 knockout mice show RNaseH1 is essential for R loop processing, mitochondrial and liver function. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 5299-312
- [53] Brown TA, Tkachuk AN, Clayton DA. Native R-loops persist throughout the mouse mitochondrial DNA genome. *J Biol Chem*, 2008, 283: 36743-51
- [54] Svikovic S, Crisp A, Tan-Wong SM, et al. R-loop formation during S phase is restricted by PrimPol-mediated repriming. *EMBO J*, 2019, 38: e99793
- [55] Costantino L, Koshland D. Genome-wide map of R-loop-induced damage reveals how a subset of R-loops contributes to genomic instability. *Mol Cell*, 2018, 71: 487-97.e3
- [56] Chang EY, Tsai S, Aristizabal MJ, et al. MRE11-RAD50-NBS1 promotes Fanconi Anemia R-loop suppression at transcription-replication conflicts. *Nat Commun*, 2019, 10: 4265
- [57] Barroso S, Herrera-Moyano E, Munoz S, et al. The DNA damage response acts as a safeguard against harmful DNA-RNA hybrids of different origins. *EMBO Rep*, 2019, 20: e47250
- [58] Belanger KG, Kreuzer KN. Bacteriophage T4 initiates bidirectional DNA replication through a two-step process. *Mol Cell*, 1998, 2: 693-701
- [59] Itoh T, Tomizawa J. Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980, 77: 2450-4
- [60] Britton S, Deroncourt E, Delteil C, et al. DNA damage triggers SAF-A and RNA biogenesis factors exclusion from chromatin coupled to R-loops removal. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 9047-62
- [61] Marnef A, Legube G. R-loops as Janus-faced modulators of DNA repair. *Nat Cell Biol*, 2021, 23: 305-13
- [62] Ohle C, Tesorero R, Schermann G, et al. Transient RNA-DNA hybrids are required for efficient double-strand break repair. *Cell*, 2016, 167: 1001-13.e7
- [63] Brustel J, Kozik Z, Gromak N, et al. Large XPF-dependent deletions following misrepair of a DNA double strand break are prevented by the RNA:DNA helicase Senataxin. *Sci Rep*, 2018, 8: 3850
- [64] D'Alessandro G, Whelan DR, Howard SM, et al. BRCA2 controls DNA:RNA hybrid level at DSBs by mediating RNase H2 recruitment. *Nat Commun*, 2018, 9: 5376
- [65] Mazina OM, Keskin H, Hanamshet K, et al. Rad52 inverse strand exchange drives RNA-templated DNA double-strand break repair. *Mol Cell*, 2017, 67: 19-29.e3
- [66] Cohen S, Puget N, Lin YL, et al. Senataxin resolves RNA:DNA hybrids forming at DNA double-strand breaks to prevent translocations. *Nat Commun*, 2018, 9: 533
- [67] Nguyen HD, Yadav T, Giri S, et al. Functions of replication protein A as a sensor of R loops and a regulator of RNaseH1. *Mol Cell*, 2017, 65: 832-47.e4
- [68] Michelini F, Pitchiaya S, Vitelli V, et al. Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 2017, 19: 1400-11
- [69] Sharma S, Anand R, Zhang X, et al. MRE11-RAD50-NBS1 complex is sufficient to promote transcription by RNA polymerase II at double-strand breaks by melting DNA ends. *Cell Rep*, 2021, 34: 108565
- [70] Pessina F, Giavazzi F, Yin Y, et al. Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 1286-99
- [71] Niehrs C, Luke B. Regulatory R-loops as facilitators of gene expression and genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 167-78
- [72] Zhang C, Chen L, Peng D, et al. METTL3 and N6-methyladenosine promote homologous recombination-mediated repair of DSBs by modulating DNA-RNA hybrid accumulation. *Mol Cell*, 2020, 79: 425-42.e7
- [73] Reaban ME, Griffin JA. Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. *Nature*, 1990, 348: 342-4
- [74] Reaban ME, Lebowitz J, Griffin JA. Transcription induces the formation of a stable RNA-DNA hybrid in the immunoglobulin  $\alpha$  switch region. *J Biol Chem*, 1994, 269: 21850-7
- [75] Yu K, Chedin F, Hsieh CL, et al. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol*, 2003, 4: 442-51
- [76] Ribeiro de Almeida C, Dhir S, Dhir A, et al. RNA helicase DDX1 converts RNA G-quadruplex structures into R-loops to promote IgH class switch recombination. *Mol Cell*, 2018, 70: 650-62.e8
- [77] Wiedemann EM, Peycheva M, Pavri R. DNA replication origins in immunoglobulin switch regions regulate class switch recombination in an R-loop-dependent manner. *Cell Rep*, 2016, 17: 2927-42
- [78] Zhang ZZ, Pannunzio NR, Hsieh CL, et al. The role of G-density in switch region repeats for immunoglobulin class switch recombination. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 13186-93
- [79] Maul RW, Chon H, Sakhuja K, et al. R-loop depletion by over-expressed RNase H1 in mouse B cells increases activation-induced deaminase access to the transcribed strand without altering frequency of isotype switching. *J Mol Biol*, 2017, 429: 3255-63
- [80] Graf M, Bonetti D, Lockhart A, et al. Telomere length determines TERRA and R-loop regulation through the cell cycle. *Cell*, 2017, 170: 72-85.e14
- [81] Pfeiffer V, Crittin J, Grolimund L, et al. The THO complex component Thp2 counteracts telomeric R-loops and



- telomere shortening. *EMBO J*, 2013, 32: 2861-71
- [82] Nie X, Xiao D, Ge Y, et al. TRF2 recruits nucleolar protein TCOF1 to coordinate telomere transcription and replication. *Cell Death Differ*, 2021, 28: 1062-75
- [83] Nguyen DT, Voon HPJ, Xella B, et al. The chromatin remodelling factor ATRX suppresses R-loops in transcribed telomeric repeats. *EMBO Rep*, 2017, 18: 914-28
- [84] Petti E, Buemi V, Zappone A, et al. SFPQ and NONO suppress RNA:DNA-hybrid-related telomere instability. *Nat Commun*, 2019, 10: 1001
- [85] Feretzaki M, Pospisilova M, Valador Fernandes R, et al. RAD51-dependent recruitment of TERRA lncRNA to telomeres through R-loops. *Nature*, 2020, 587: 303-8
- [86] Kabeche L, Nguyen HD, Buisson R, et al. A mitosis-specific and R loop-driven ATR pathway promotes faithful chromosome segregation. *Science*, 2018, 359: 108-14
- [87] Giunta S, Herve S, White RR, et al. CENP-A chromatin prevents replication stress at centromeres to avoid structural aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2015634118
- [88] Mishra PK, Chakraborty A, Yeh E, et al. R-loops at centromeric chromatin contribute to defects in kinetochore integrity and chromosomal instability in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 2021, 32: 74-89
- [89] Ginno PA, Lott PL, Christensen HC, et al. R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Mol Cell*, 2012, 45: 814-25
- [90] Grunseich C, Wang IX, Watts JA, et al. Senataxin mutation reveals how R-loops promote transcription by blocking DNA methylation at gene promoters. *Mol Cell*, 2018, 69: 426-37.e7
- [91] Arab K, Karaulanov E, Musheev M, et al. GADD45A binds R-loops and recruits TET1 to CpG island promoters. *Nat Genet*, 2019, 51: 217-23
- [92] Li Z, Gu TP, Weber AR, et al. Gadd45a promotes DNA demethylation through TDG. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 3986-97
- [93] Yan P, Liu Z, Song M, et al. Genome-wide R-loop landscapes during cell differentiation and reprogramming. *Cell Rep*, 2020, 32: 107870
- [94] Chen PB, Chen HV, Acharya D, et al. R loops regulate promoter-proximal chromatin architecture and cellular differentiation. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22: 999-1007
- [95] Skourti-Stathaki K, Torlai Triglia E, Warburton M, et al. R-loops enhance polycomb repression at a subset of developmental regulator genes. *Mol Cell*, 2019, 73: 930-45.e4
- [96] Alecki C, Chiwara V, Sanz LA, et al. RNA-DNA strand exchange by the *Drosophila* polycomb complex PRC2. *Nat Commun*, 2020, 11: 1781
- [97] Pinter S, Knodel F, Choudalakis M, et al. A functional LSD1 coregulator screen reveals a novel transcriptional regulatory cascade connecting R-loop homeostasis with epigenetic regulation. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 4350-70
- [98] Ui A, Nagaura Y, Yasui A. Transcriptional elongation factor ENL phosphorylated by ATM recruits polycomb and switches off transcription for DSB repair. *Mol Cell*, 2015, 58: 468-82
- [99] Castellano-Pozo M, Santos-Pereira JM, Rondon AG, et al. R loops are linked to histone H3 S10 phosphorylation and chromatin condensation. *Mol Cell*, 2013, 52: 583-90
- [100] Powell WT, Coulson RL, Gonzales ML, et al. R-loop formation at *Snord116* mediates topotecan inhibition of *Ube3a*-antisense and allele-specific chromatin decondensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 13938-43
- [101] Garcia-Pichardo D, Canas JC, Garcia-Rubio ML, et al. Histone mutants separate R loop formation from genome instability induction. *Mol Cell*, 2017, 66: 597-609.e5
- [102] Crossley MP, Bocek M, Cimprich KA. R-loops as cellular regulators and genomic threats. *Mol Cell*, 2019, 73: 398-411
- [103] Garcia-Muse T, Aguilera A. R loops: from physiological to pathological roles. *Cell*, 2019, 179: 604-18
- [104] Vanoosthuysse V. Strengths and weaknesses of the current strategies to map and characterize R-loops. *Noncoding RNA*, 2018, 4: 9
- [105] Hartono SR, Malapert A, Legros P, et al. The affinity of the S9.6 antibody for double-stranded RNAs impacts the accurate mapping of R-loops in fission yeast. *J Mol Biol*, 2018, 430: 272-84
- [106] Smolka JA, Sanz LA, Hartono SR, et al. Recognition of RNA by the S9.6 antibody creates pervasive artifacts when imaging RNA:DNA hybrids. *J Cell Biol*, 2021, 220: e202004079
- [107] Crossley MP, Brickner JR, Song C, et al. Catalytically inactive, purified RNase H1: a specific and sensitive probe for RNA-DNA hybrid imaging. *J Cell Biol*, 2021, 220: e202101092
- [108] Wang K, Wang H, Li C, et al. Genomic profiling of native R loops with a DNA-RNA hybrid recognition sensor. *Sci Adv*, 2021, 7: eabe3516
- [109] Xu W, Li K, Li S, et al. The R-loop atlas of *Arabidopsis* development and responses to environmental stimuli. *Plant Cell*, 2020, 32: 888-903
- [110] Zeller P, Padeken J, van Schendel R, et al. Histone H3K9 methylation is dispensable for *Caenorhabditis elegans* development but suppresses RNA:DNA hybrid-associated repeat instability. *Nat Genet*, 2016, 48: 1385-95
- [111] Yuan W, Zhou J, Tong J, et al. ALBA protein complex reads genic R-loops to maintain genome stability in *Arabidopsis*. *Sci Adv*, 2019, 5: eaav9040
- [112] Wang IX, Grunseich C, Fox J, et al. Human proteins that interact with RNA/DNA hybrids. *Genome Res*, 2018, 28: 1405-14