



R-loop的调控及其生理功能*

张译匀¹⁾ 叶素敏¹⁾ 金建平^{1,2,3)**}(¹⁾ 浙江大学生命科学研究院, 杭州 310058; ²⁾ 浙江大学绍兴研究院生命科学分中心, 绍兴 321000; ³⁾ 浙江大学癌症中心, 杭州 310058)

摘要 R环(R-loop)是一种DNA:RNA杂合链(DNA:RNA hybrids),由一条RNA单链侵入双链DNA,与其中一条DNA模板链结合,从而释放出一条DNA单链而产生。R-loop在细胞生命活动中扮演着重要角色,与基因组稳定性、转录调控,以及表观修饰等重要生物学过程有着密不可分的关系。很多因素参与对R-loop的调控,例如RNA转录和加工、染色体的修饰、DNA损伤反应等;同时,许多酶蛋白,如核糖核酸酶、解旋酶和拓扑异构酶等也参与调节细胞内的R-loop水平。了解R-loop的调控机制及其生物学功能有助于更好地理解基因组稳定性的维持机制,为治疗骨髓增生异常综合征、白血病、乳腺癌、前列腺癌等疾病开拓新思路。

关键词 R环, DNA:RNA杂合链, 基因组稳定性, 转录, DNA损伤反应

中图分类号 Q52, Q74

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0123

1 R-loop的基本功能

R环(R-loop)是细胞内在DNA:RNA杂合链和双链DNA上的被置换的单链DNA之间形成的一种特殊的三链核酸结构(图1)。最初, DNA:

RNA杂合链多被认为是在冈崎片段合成过程中形成的,以及转录过程中RNA聚合酶活性中心内形成的杂合链。之后的研究发现,在体内可以以顺反式的方式形成一种更长的DNA:RNA杂合链,由此催生出R-loop的基本概念^[1](图1)。当一条新

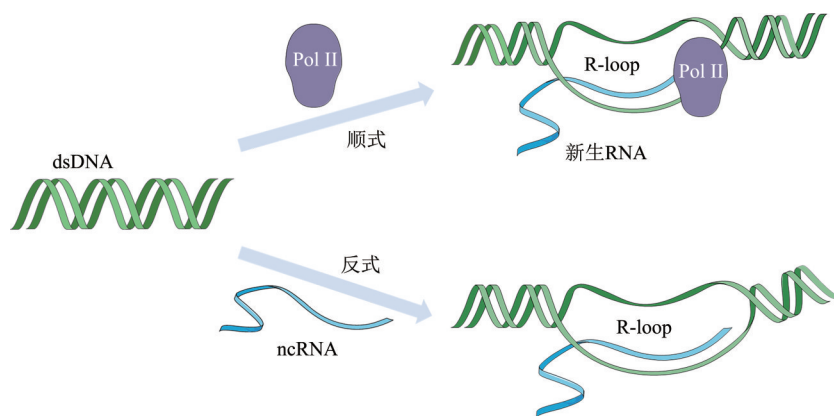


Fig. 1 R-loop can be formed in cis or in trans

图1 R-loop可以通过顺式或反式形成

当RNA聚合酶转录一些特殊的序列时,双链DNA展开,新生的RNA退火到RNAPII后面的DNA模板链上,暴露出一条游离的DNA单链,从而导致R-loop的产生(顺式)。此外,在其他遥远位置的一条RNA可以和另一个位点的同源DNA链杂交形成R-loop(反式),例如基于非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)的R-loop。

* 国家自然科学基金(32150014, 31970734),国家重点研发计划(2022YFC3401500)和中央高校基本业务费资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 15168487596, E-mail: jianping_jin@zju.edu.cn

收稿日期: 2023-04-06, 接受日期: 2023-04-17

生的RNA与模板DNA结合,暴露出一条游离的单链DNA,从而形成一种非B型的DNA结构,这种长可达1~2 kb的三链核苷酸结构被称为R-loop^[2-3]。R-loop是A型RNA和B型DNA之间形成的杂合体,其稳定性比双链DNA更高^[4]。R-loop曾被认为是—种罕见的转录副产物,但是,越来越多的证据表明,R-loop可以在细菌到人类等生物体细胞内频繁地形成,进而影响转录并导致基因组的不稳定性^[4],哺乳动物基因组上约有5%的区域会形成R-loop,多数集中在转录起始区域和转录终止区域^[5]。另一方面,R-loop对转录终止^[6]、基因调控^[7]、线粒体稳定性^[8]等生物学过程也有着积极的作用。然而,细胞是怎样抑制R-loop的负面作

用、同时又保证其积极作用,从而维持细胞内稳态的机制仍有很多亟待解决的疑问。本文将对R-loop的调控机制及其生理功能的研究进展、R-loop的检测方法进行综述及讨论。

2 R-loop的调控

R-loop的调控网络错综复杂。越来越多不同生理过程中的蛋白质被发现参与R-loop的调控(图2)。目前有研究针对已发表的R-loop数据集进行整合,构建了系统化的R-loop调控网络数据集^[8]。本文也对已发表的R-loop调控因子进行分类归纳(表1),并进行讨论。

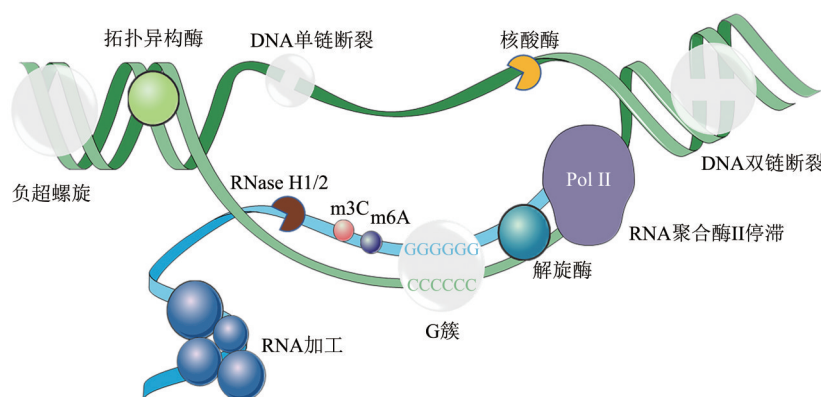


Fig. 2 Regulators of R-loop

图2 R-loop的调控因子

R-loop多在富含鸟嘌呤的区域形成。DNA单链断裂、DNA双链断裂、负超螺旋、RNA聚合酶停滞,以及RNA和染色质的修饰也会导致R-loop的积累。一些拓扑异构酶、核酸酶、解旋酶、RNA加工因子,以及核糖核酸酶RNase H1和RNase H2都可以清除R-loop。

Table 1 Regulators of R-loop in mammalian cells

表1 哺乳动物细胞中的R-loop的调控因子

生物学类型	调控因子
转录和RNA加工	ADAR, ADARB1, APOBEC3G, ATRX, BUB3, EWSR1, EXOSC10, EXOSC3, FUS, GLE1, GRSF1, HNRNPD, HNRNPU, MTREX, MYCN, NONO, PAF1, PARP1, POLDIP3, POLR3A, POLR3G, PPP1R10, RBM14, RBM8A, RNGTT, RNPS1, RPRD1B, SAP130, SF3A3, SF3B1, SF3B3, SFPQ, SLU7, SMN1, SNRPA1, SP1, SRSF1, SRSF2, SSBP1, SUPT5H, SUPT6H, TARDBP, TCEA1, TCOF1, TERF2, THOC1, TREX1, U2AF1, WDR33, XPO1, XRN2, YTHDC1, ZBTB24, ZNF207
RNA修饰和染色质修饰	ALKBH2, ALKBH3, CDCA7, DNMT3B, EXOG, HELLS, INO80, KAT8, METTL3, METTL8, MECP2, OGG1, PHF2, PRMT5, SMARCA4, SMARCA1, SSRP1, SUPT16H, YTHDF2
DNA损伤应答	APTX, ATM, ATR, BRCA1, BRCA2, CHEK1, CHEK2, DDB2, ERCC6, ERCC6L2, FANCA, FANCD2, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FMR1, MDC1, MRE11, RAD1, RAD51, RAD52, RAD9A, RPA1, RPA2, RPA3, SAMHD1, TP53, TRDMT1, XRCC5
拓扑异构酶	TOP1, TOP3B
核酸内切酶	APEX1, ENDOG, FEN1
核糖核酸酶	RNASEH1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C
解旋酶	AQR, BLM, DDX1, DDX11, DDX17, DDX18, DDX19B, DDX21, DDX23, DDX39B, DDX41, DDX43, DDX47, DDX5, DHX33, DHX9, NCL, PIF1, RECQL, RECQL4, RECQL5, RTEL1, SETX, SUPV3L1, WRN

2.1 转录和RNA加工对R-loop的调控

正常生理情况下, 转录过程中信使核糖核蛋白体通过对新生RNA进行加工以帮助其出核。而当RNA聚合酶转录一些特殊的序列时, 负超螺旋双链DNA展开, 这可能使模板DNA与新生RNA退火, 暴露出一条游离的DNA单链, 从而导致R-loop的产生。这也是著名的Thread back模型^[9]。R-loop多在富含鸟嘌呤(G-rich)的区域形成, 该区域可被称为G簇。通常在5'端附近包含4个及以上连续鸟嘌呤残基的RNA更易于形成R-loop^[10], 比如嘌呤含量很高的抗体基因的转换区(switch region)^[11]。R-loop的形成起始后, DNA:RNA杂交链被延长, 并通过随后的G-rich序列稳定下来。当鸟嘌呤的含量降低, 延长减少, R-loop的形成停止^[7]。在G簇附近形成的R-loop可以保护该区域不被甲基化, 从而保证基因转录终止过程的正常进行^[12]。除了G-rich序列之外, 其他因素也可以促进R-loop的形成。例如, 转录泡后面分叉上的负超螺旋增加可以提高新生RNA和模板链DNA之间相互作用的可能性^[13]。此外, 即使G-rich序列位于起始G簇的远端, 非模板链上的缺口也可以促进新生RNA与模板链的DNA结合^[14]。除了顺式的R-loop形成方式之外, 近年来, 有研究表明R-loop也可以反式形成, 即在一个位点转录的RNA可以和另一个位点的同源DNA结合形成R-loop^[15](图1)。

因为R-loop的形成机制和转录密不可分, 所以其水平也受转录的调控。在基因富集区的高转录基因上可以检测到更多的R-loop, 包括rRNA和tRNA位点; 反之, 基因密度较低的区域上R-loop则较少, 并且其位置也是动态变化的^[16]。单链DNA(single strand DNA, ssDNA)结合蛋白隔离非模板ssDNA也可以促进R-loop的形成, 如线粒体ssDNA结合蛋白稳定了R-loop的形成^[17]。无论是单链还是双链DNA的断裂, 都可以提供一个自由的3' DNA末端, 这有利于新生RNA和DNA杂交形成R-loop^[18]。除了DNA之外, 长链非编码RNA, 如Lnc530也会与R-loop结合, 并与DDX5和TDP-43形成复合体来抑制R-loop^[19]。

R-loop的水平与正常细胞的高转录水平相关, 但其水平的增加不仅仅是高转录的结果, RNA加工、输出和剪切等功能的异常, 同样会导致R-loop的积累^[20]。早期的研究发现, 与转录延长和RNA输出有关的THO/TREX复合体中导致转录缺陷的

hpr1突变体会引起R-loop的异常积累^[21], 并且THO与Sin3A组蛋白去乙酰化酶复合物相互作用可以抑制R-loop的形成^[22]。这些现象都暗示了转录和RNA加工、RNA输出过程可以参与对R-loop的调控。研究者发现, 用RNA剪接抑制剂异银杏素(isoginkgetin, ISO)处理细胞后, 会导致R-loop的积累以及DNA损伤, 暗示了RNA的剪接可以参与R-loop的调控^[23]。该研究发现了一系列RNA剪接因子, 包括SF3A3、SF3B3、SNRPA1、SUPT6H、PHF5等与U2小核糖核蛋白复合体有关的剪接因子被抑制后会导致R-loop的积累^[23]。在骨髓增生异常综合征、白血病等疾病中, 一些RNA剪接因子的失调或突变会导致R-loop的异常, 例如SF3B1、U2AF1、SRSF2等, 并引起DNA损伤、细胞凋亡、基因组稳定性等生理过程的改变^[24-26]。这些都证明了RNA的加工与出核可以参与R-loop的调控, 并且大多数是抑制R-loop的形成。

2.2 RNA修饰和染色质修饰对R-loop的调控

真核生物中, 甲基化和去甲基化是调控DNA和RNA代谢的重要修饰途径。其中, N⁶-甲基腺苷(m⁶A)是最为普遍的调控RNA代谢的修饰^[27]。和甲基化及去甲基化相关的甲基转移酶、去甲基酶和甲基化结合蛋白都会参与R-loop的调控。甲基转移酶可以在RNA上加上甲基, 介导RNA的甲基化修饰。如METTL3甲基转移酶可以介导R-loop在DNA双链断裂处积累, 防止被m⁶A修饰的RNA被降解, 以促进RNA与DNA的杂合^[28]; 被SUMO化修饰后的METTL8可以进入细胞核, 修饰RNA上的m³C以增强RNA的稳定性, 从而促进R-loop形成^[29]。甲基化结合蛋白可以识别甲基化修饰的信息, 并参与下游RNA的翻译、降解等过程, 例如YTHDF2可以与R-loop结合, 阻止有m⁶A修饰的R-loop积累^[30]。去甲基酶可以去除RNA上的甲基, 例如去甲基化酶ALKBH2和ALKBH3可以移除R-loop上的1-meA和3-meC^[31], 这可能会导致RNA的不稳定, 从而抑制R-loop。

除了RNA的修饰之外, 染色质的修饰也可以调控R-loop。DNMT3B和CDCA7通过甲基化DNA来抑制R-loop的形成^[32]。甲基化CpG的结合蛋白MeCP2同样可以抑制R-loop的积累, 但其机制仍不清楚^[33]。蛋白质的翻译后修饰可以参与R-loop的调控, 例如, PRMT5可以通过甲基化DDX5从而介导R-loop的降解^[34]。去甲基化酶PHF2通过使

H3K9me2在启动子处保持低水平来抑制R-loop的形成^[35]。组蛋白乙酰转移酶KAT8可以抑制R-loop的形成,从而抑制其介导的DNA复制压力^[36]。

2.3 DNA损伤应答对R-loop的调控

为了应对在生长发育时遇到的DNA损伤和基因组不稳定性带来的危害,细胞进化出了一系列应对DNA损伤的机制,包括对DNA损伤的检测和修复。这些机制与R-loop的调控存在密不可分的关系。DNA损伤检查点是检测DNA损伤的重要环节之一,例如丝氨酸蛋白激酶ATM、ATR、CHK1和CHK2都可以通过抑制R-loop的积累以保障基因组的稳定性^[37]。ATM-CHK2信号通路通常是检测到DNA双链断裂(double strand break, DSB)后激活的,而ATR-CHK1信号通路主要感应会诱导单链DNA断裂产生的一系列压力而激活的,包括复制压力等。有研究表明,ATM-CHK2的缺陷会引发R-loop的积累,但其导致的DNA断裂并不依赖于R-loop,研究者因此推测这种积累是由于未修复的DNA双链断裂形成的。ATR-CHK1的缺陷也会导致R-loop的积累,但其引起的部分DNA断裂是依赖于R-loop的^[37]。

细胞还可以通过DNA修复的机制来抑制R-loop的积累。同源重组相关蛋白BRCA1和BRCA2的缺陷会导致R-loop的增加。BRCA1可以直接识别R-loop^[38],并与SETX互作一起防止R-loop导致的DNA损伤、复制压力和基因组不稳定性^[39];BRCA2也可以通过促进RNA聚合酶II的释放、招募RNase H2到DNA双链断裂处的R-loop上^[38]、刺激DDX5的解旋酶活性等方式来抑制R-loop的积累。范可尼贫血(Fanconi anemia, FA)通路中的许多因子都参与R-loop的调控,缺乏FANCA、FANCD2、FANCG、FANCL、FANCM等FA因子会造成R-loop的积累,从而影响DNA复制和转录,产生DNA损伤^[38, 40-42]。核苷酸切除修复通路中两个内切酶——XPF和XPG可以修复基因组上不同类型的DNA损伤。XPF和XPG先前被证明可以在体外切割免疫球蛋白位点S区形成的R-loop^[11]。它们也可以在体内抑制因NF- κ B激活、AQR缺失、TOP1cc停滞等原因引起的R-loop积累,并阻止因R-loop积累而造成的DNA双链断裂^[43-45]。

2.4 拓扑异构酶对R-loop的调控

转录和复制都会积累DNA正超螺旋,而DNA正超螺旋的形成会在相反的方向上产生等量的负超

螺旋,这会促进R-loop的形成。拓扑异构酶可以通过减少负超螺旋,减少新生mRNA与模板DNA上G簇结合的可能性,从而抑制R-loop的积累。拓扑异构酶1(topoisomerase, TOP1)的抑制剂喜树碱(camptothecin, CPT)可以刺激R-loop的形成^[46]。TOP1和TOP2都被证明可以缓解扭转应力,并防止rDNA位点的R-loop的聚集^[47],TOP1缺失的细胞会在高表达基因的转录终止区域形成依赖于R-loop的DNA双链断裂,并降低复制叉的速度^[48]。TOP3B也可以通过减少负超螺旋来抑制R-loop,并保障转录正常进行,从而保护细胞免于DNA损伤,减少染色体易位的频率^[49]。

2.5 核糖核酸酶和解旋酶对R-loop的调控

及时清除过多的R-loop是维持细胞内稳态的必要措施。不同的酶可以进行互补作用,以防止R-loop的过度积累。虽然R-loop可以拮抗RNase A,但是RNase H1和RNase H2可以利用5'→3'外切酶活性去除R-loop中的RNA单链^[50]。这些酶在原核生物和真核生物中是高度保守的,并且是已知的唯一能特异地分解杂合RNA的核糖核酸酶。邹力实验室^[51]发现,复制蛋白A(replication protein A, RPA)可以结合单链DNA,促进RNase H1与R-loop的结合,从而抑制R-loop的积累。在RNase H2上游,双链RNA特异性腺苷脱氨酶ADAR1p110则可以识别DNA:RNA杂合链内的错配碱基对,从而促进RNase H2对RNA链的消化,导致端粒R-loop的降解^[52-53]。

细胞中还具有去除R-loop的解旋酶,可以解开R-loop或者抑制它的产生。酵母中的SEN1及其在人类中的同源基因SETX被发现与R-loop的调控有关。SEN1最初被鉴定为一种DNA和RNA解旋酶,在体外具有5'→3' RNA-DNA解旋活性^[54]。SETX的失活会导致转录终止位点上R-loop的增加,并且依赖于其解旋酶活性^[55]。Hasanova等^[56]的研究表明,SEN1/SETX在解开R-loop中,特别是在转录终止过程中起作用。在人和酵母细胞中,解旋酶AQR通过对RNA的加工过程降解R-loop,并介导同源重组修复。敲低AQR会引发细胞在S期的DNA损伤^[43, 57]。很多DEAD-box和DEAH-box家族的解旋酶可以抑制R-loop的形成,例如DDX1^[58]、DDX5^[49]、DDX11^[59]、DDX19B^[60]、DDX21^[61]、DDX23^[62]、DDX39B^[63]、DDX43^[64]、DDX47^[40]、DHX9^[65]都被证明可以参与R-loop的降解。除此之外,BLM的解旋酶活性受TOP1刺激

而被激活后抑制 R-loop 的形成^[66], 线粒体 RNA 解旋酶 SUPV3L1 可以抑制有害线粒体 R-loop 的积累^[67]。但是, 解旋酶并不全都参与解开 R-loop。在剪接体缺陷的情况下, DEAH-box 蛋白 DHX9 可以促进 R-loop 的积累^[68], DDX1 可以将 RNA G 四链体转换为 R-loop 以促进 IgH 的类别转换重组^[69]。

3 R-loop的生理功能

虽然对于 R-loop 导致基因组不稳定性的研究更为广泛, 但是 R-loop 的作用是一把双刃剑, 对多种生理过程不仅有着负面的作用, 更有着无法替代的积极作用 (图 3)。细胞通过不同的调控机制维持 R-loop 的稳态, 在保证其积极作用的情况下消除其不利影响。R-loop 的调控与其功能密不可分, 相辅相成。很多生理过程既可以是 R-loop 的调控机制, 也可以是 R-loop 导致的结果, 如 DNA 损伤应答、转录和复制等。因此, 如此复杂的调控网络给 R-loop 的研究带来了巨大的挑战。

R-loop 对生命活动发挥的积极作用常常被忽视。R-loop 是很多重要生物学过程必需的中间产物, 例如 S 区的 R-loop 是免疫球蛋白类开关重组 (immunoglobulin class switch recombination, ICSR) 过程的天然来源^[2]; CRISPR-Cas9 系统中, 由 gRNA 和双链 DNA 形成的 R-loop 直接引导 Cas9 核酸酶活性, 产生 DNA 双链断裂^[70]。R-loop 对基因的表达也起着重要的调控作用, 例如在拟南芥中, 启动子区域的 R-loop 能够沉默长链非编码 RNA COOLAIR 的表达, 进而调节开花位点对低温的响应^[71]。R-loop 不仅可以调控单个基因的表达, 也

可以调控整体的基因表达水平。R-loop 可以保护 CpG 岛的启动子免于甲基化修饰, 保障基因转录的通畅^[5]。由于 R-loop 多在基因的转录起始和终止区域形成, 暗示其可以调控基因的转录。R-loop 的位置会影响 RNA 聚合酶从染色体上释放的区域, 从而调控基因的转录终止过程^[6]。R-loop 也可以在 RNA 聚合酶 II 后的 G-rich 区域形成, 招募 SETX 降解新生 RNA 链, 终止转录过程^[72]。当 DNA 双链断裂时, 细胞可利用 R-loop 的新生 RNA 作为桥梁, 以其为模板介导双链 DNA 断裂的修复过程^[73]。

R-loop 对生命活动的不利影响同样不容忽视, 严重时会导致细胞的死亡。R-loop 可以诱导哺乳动物细胞中的细胞周期检查点激活、DNA 损伤和染色体重排^[74]。R-loop 可以暴露化学性质更不稳定的单链 DNA, 容易引发与转录相关的突变和重组^[75]。R-loop 也可能直接阻断 DNA 的复制, 导致分叉塌陷与 DNA 双链断裂^[76]。R-loop 导致的基因组不稳定性与癌症的发生发展有关。异常 R-loop 引发先天免疫的激活可能导致许多疾病, 如神经退行性变和癌症^[77]。在一些综合征、人类神经紊乱和癌症中都发现了大量的 R-loop 积累^[78-79]。乳腺癌中 BRCA2 的减少导致了 R-loop 的积累^[80], 在白血病、淋巴瘤、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、睾丸癌、结肠腺癌、直肠腺癌、黑色素瘤和胶质母细胞瘤的细胞系中 RAD51 水平增加促进了 R-loop 的形成^[81]。自身免疫性疾病 Wiskott-Aldrich 综合征也与 R-loop 有关, 在辅助性 T 淋巴细胞中, WAS 蛋白的缺失会导致 R-loop 积累^[82]。总之, R-loop 和许多人类疾病病因之间的因果关系十分重要, 但仍有许多疑点值得进一步探究。

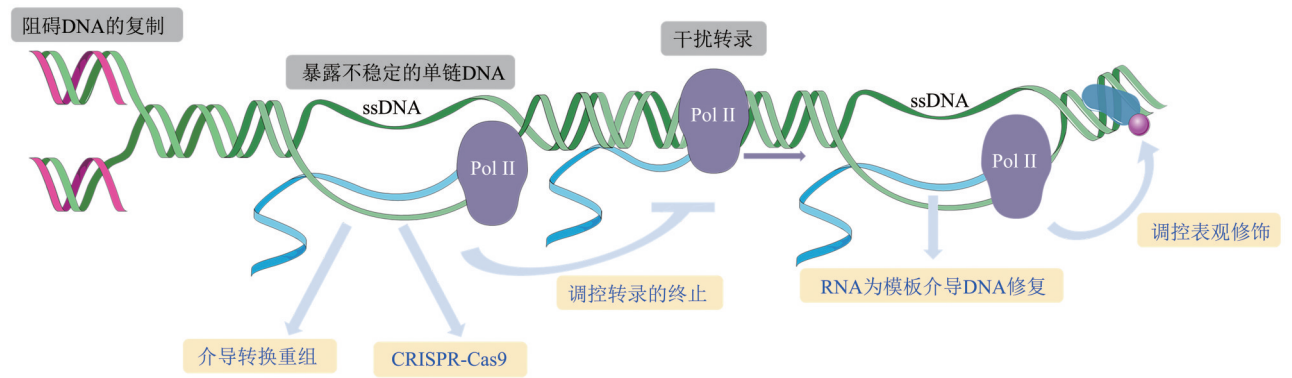


Fig. 3 Functions of R-loops
图3 R-loop的功能

R-loop对生物体有很多有利影响, 包括参与转换重组过程和CRISPR-Cas9对DNA的破坏。转录终止区域的R-loop可以阻碍RNA聚合酶的前进, 从而调控转录的终止。

4 研究R-loop的常用手段

由于R-loop被如此精细地调控,并能具有重要的生理功能,研究者们开发了多种多样研究R-loop的方法(表2)。最初人们在体外通过X射线^[83]、电子显微镜^[84]观察到了R-loop的结构。R-loop结构中的单链DNA的胞嘧啶残基可以在非变性条件下被亚硫酸氢盐修饰,因此一些早期的研究利用该原理和Sanger测序,在特定的基因组位点上探测R-loop^[2]。迁移位移分析、原位杂交也常被用于研究R-loop。

随着能特异性识别R-loop的S9.6抗体出现,R-loop的研究方法也得到了更好的改进。S9.6抗体不依赖于序列而能和R-loop结合,因此利用该抗体可以对R-loop进行免疫荧光检测、提取基因组后进行dot blot检测,还可以用S9.6做免疫沉淀,再进行qPCR分析和全基因组测序,此方法也叫做DNA:RNA免疫沉淀测序技术(DNA:RNA hybrid immunoprecipitation and sequencing, DRIP-seq)^[85]。为了提高DRIP-seq的分辨率、特异性或敏感性,研究者基于DRIP进行了改进,例如,将DRIP与亚硫酸氢盐印迹技术相结合,可以识别R-loop的ssDNA,如bisDRIPseq(bisulfite DNA:RNA hybrid immunoprecipitation and sequencing)技术^[86]。S1-DRIP-seq通过S1核酸酶切,在超声前去除R-loop的非模板ssDNA,以防止其在免疫沉淀过程中重新和模板DNA退火,但是其对AT富集的区域检测有偏好性^[20]。DRIPc-seq是用DNase I处理后,将R-loop中的RNA逆转录成cDNA之后再行测序^[5]。除此之外,近年来也发明了基于S9.6抗体开发的CUT&TAG和CUT&RUN技术^[87]。

DRIP-seq技术也有局限性。S9.6抗体对R-loop的亲合力仅为对双链RNA亲和力的5倍,因此可

能与双链RNA结合造成大量的假阳性结果^[88],尤其是细胞质内AU富集的双链RNA会影响检测结果^[62]。而DRIP技术检测到的R-loop所在DNA区域的长度也依赖于其打断基因组的手段,如超声或酶切,这对实验结果会带来一定的影响。此外,DRIP-seq流程中的甲醛交联会增加假阳性检测的数量。DRIP-seq不仅可以检测到R-loop,还可以检测到它们相关的DNA和RNA片段^[89]。RNA的一部分可能参与R-loop的形成,而其他部分并没有参与,既包含单链区域,也包含双链区域,这种情况无法被DRIP-seq鉴别区分。因此,在利用S9.6检测R-loop时,用RNase H1做阴性对照是必要的。

针对这些问题,付向东实验室利用失去催化活性的RNase H1开发了一种更精确地检测R-loop的手段,称为R-ChIP^[90]。R-ChIP是在细胞中表达外源催化失活的RNase H1。这种失活的RNase H1在不清除R-loop的前提下结合RNA:DNA杂合链。随后,进行RNase H1的染色质免疫沉淀(chromatin Immunoprecipitation, ChIP),并构建文库进行测序。RNase H1对RNA:DNA杂合链的亲合力是双链RNA的25倍,双链DNA的100倍,相较于DRIP-seq准确性更高^[91]。同时,R-ChIP具有可在体内检测、分辨率更高等优点。但R-ChIP也存在一些缺点,如RNaseH1有可能只结合基因组中一部分R-loop而非全部。此外,由于与其他因子的结合竞争或某些特殊的DNA/染色质结构的形成,外源RNase H1可能无法完全结合部分R-loop。由于RNase H1和S9.6抗体识别的是RNA:DNA杂合链而非整个R-loop结构,所以迄今为止的R-loop检测方法都不能将R-loop与其他类型的RNA:DNA杂合链区分开来。基于RNase H1的HBD结构域可以识别并结合R-loop的机制,研究者进一步开发了基于RNase H1的MapR、BisMapR^[92]、CUT&RUN、CUT&TAG^[87]等一系列技术。

Table 2 Technologies for detecting R-loop

表2 检测R-loop的技术

策略	检测方法
基于RNase H1的检测手段	DRIVE-seq、R-ChIP、MapR、BisMapR、HBD-based CUT&TAG、HBD-based CUT&RUN
基于S9.6抗体的检测手段	DRIP-seq、DRIPc-seq、S1-DRIP1-seq、ssDRIP-seq、bisDRIP-seq、S9.6-based CUT&TAG、S9.6-based CUT&RUN
其他检测手段	X射线、电子显微镜、亚硫酸盐足迹分析

5 总结与展望

过去几十年对 R-loop 的研究加深了对基因组稳定性和基因表达调控的理解, 并为一些疾病的发生发展和治疗提供了新的思路, 但仍有一些科学问题亟待解决。在正常的生理状况下, 基因组上的 R-loop 保障了表观遗传修饰、转录调控、DNA 修复等生理过程的正常进行。但是, 一些病理性的 R-loop 又会导致 DNA 双链断裂, 引发基因组的不稳定性。那么, 什么类型的 R-loop 是对生物体有益的? 什么类型的 R-loop 会导致基因组的不稳定性以至于引起细胞死亡或疾病的发生呢? 基因组上不同区域的 R-loop 是否具有特定的功能? 不同调控因子是否调控基因组上所有的 R-loop, 还是只调控特定区域的 R-loop? 针对这些问题, 将 R-loop 进行归类分析, 并将其特征与不同的功能对应联系起来, 可以更好地理解 R-loop 的调控机制与功能。除此之外, 目前的研究中对 R-loop 的调控机制与功能的区分并不严谨。例如, DNA 损伤会导致 R-loop 的积累, 但过多的 R-loop 也会导致 DNA 损伤。那么在实验中观察到的 DNA 损伤现象, 究竟是 R-loop 的成因, 还是 R-loop 积累的结果? 除了 DNA 损伤之外, 转录调控、DNA 修复等生理过程与 R-loop 的上下游关系也需要谨慎对待。总而言之, R-loop 作为一个高度动态、调控精细、功能强大且普遍存在的结构, 探索其调控机制和功能可以帮助我们更深入了解基因组上多种多样的生理过程, 为治疗与 R-loop 相关的疾病提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Feretzaki M, Pospisilova M, Valador Fernandes R, *et al.* RAD51-dependent recruitment of TERRA lncRNA to telomeres through R-loops. *Nature*, 2020, **587**(7833):303-308
- [2] Yu K, Chedin F, Hsieh C L, *et al.* R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol*, 2003, **4**(5):442-451
- [3] Santos-Pereira J M, Aguilera A. R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nat Rev Genet*, 2015, **16**(10):583-597
- [4] Aguilera A, García-Muse T. R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol Cell*, 2012, **46**(2):115-124
- [5] Sanz L A, Hartono S R, Lim Y W, *et al.* Prevalent, dynamic, and conserved R-Loop structures associate with specific epigenomic signatures in mammals. *Mol Cell*, 2016, **63**(1):167-178
- [6] Skourti-Stathaki K, Kamieniarz-Gdula K, Proudfoot N J. R-loops induce repressive chromatin marks over mammalian gene terminators. *Nature*, 2014, **516**(7531):436-439
- [7] Balk B, Maicher A, Dees M, *et al.* Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, **20**(10):1199-1205
- [8] 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**(D1):D303-D315
- [9] Drolet M, Bi X, Liu L F. Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J Biol Chem*, 1994, **269**(3):2068-2074
- [10] Roy D, Lieber M R. 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
- [11] Tian M, Alt F W. Transcription-induced cleavage of immunoglobulin switch regions by nucleotide excision repair nucleases *in vitro*. *J Biol Chem*, 2000, **275**(31):24163-24172
- [12] Ginno PA, Lim Y W, Lott P L, *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**(10):1590-1600
- [13] Massé E, Drolet M. R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli* topA mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol*, 1999, **294**(2):321-332
- [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**(1):146-159
- [15] Wahba L, Gore S K, Koshland D. The homologous recombination machinery modulates the formation of RNA-DNA hybrids and associated chromosome instability. *Elife*, 2013, **2**:e00505
- [16] Villarreal O D, Mersaoui S Y, Yu Z, *et al.* Genome-wide R-loop analysis defines unique roles for DDX5, XRN2, and PRMT5 in DNA/RNA hybrid resolution. *Life Sci Alliance*, 2020, **3**(10):e202000762
- [17] Posse V, Al-Bejadili A, Uhler J P, *et al.* RNase H1 directs origin-specific initiation of DNA replication in human mitochondria. *PLoS Genet*, 2019, **15**(1):e1007781
- [18] Aguilera A, Gómez-González B. DNA-RNA hybrids: the risks of DNA breakage during transcription. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, **24**(5):439-443
- [19] Gong D, Wang L, Zhou H, *et al.* Long noncoding RNA Lnc530 localizes on R-loops and regulates R-loop formation and genomic stability in mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Rep*, 2023, **18**(4):952-968
- [20] Wahba L, Costantino L, Tan F J, *et al.* S1-DRIP-seq identifies high expression and polyA tracts as major contributors to R-loop formation. *Genes Dev*, 2016, **30**(11):1327-1338
- [21] Huertas P, Aguilera A. Cotranscriptionally formed DNA: RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell*, 2003, **12**(3):711-721
- [22] Salas-Armenteros I, Pérez-Calero C, Bayona-Feliu A, *et al.* Human THO-Sin3A interaction reveals new mechanisms to prevent R-loops that cause genome instability. *EMBO J*, 2017,

- 36(23):3532-3547
- [23] Tanikawa M, Sanjiv K, Helleday T, *et al.* The spliceosome U2 snRNP factors promote genome stability through distinct mechanisms; transcription of repair factors and R-loop processing. *Oncogenesis*, 2016, **5**(12):e280
- [24] Singh S, Ahmed D, Dolatshad H, *et al.* SF3B1 mutations induce R-loop accumulation and DNA damage in MDS and leukemia cells with therapeutic implications. *Leukemia*, 2020, **34**(9):2525-2530
- [25] Nguyen H D, Leong W Y, Li W, *et al.* Spliceosome mutations induce R loop-associated sensitivity to ATR inhibition in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res*, 2018, **78**(18):5363-5374
- [26] Flach J, Jann J C, Knaflitz A, *et al.* Replication stress signaling is a therapeutic target in myelodysplastic syndromes with splicing factor mutations. *Haematologica*, 2021, **106**(11):2906-2917
- [27] Roundtree I A, Evans M E, Pan T, *et al.* Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell*, 2017, **169**(7):1187-1200
- [28] 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**(3):425-442.e7
- [29] Zhang L H, Zhang X Y, Hu T, *et al.* The sumoylated METTL8 induces R-loop and tumorigenesis *via* m3C. *iScience*, 2020, **23**(3):100968
- [30] Abakir A, Giles T C, Cristini A, *et al.* N6-methyladenosine regulates the stability of RNA:DNA hybrids in human cells. *Nat Genet*, 2020, **52**(1):48-55
- [31] Falnes P Ø, Bjørås M, Aas P A, *et al.* Substrate specificities of bacterial and human AlkB proteins. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(11):3456-3461
- [32] Unoki M, Sharif J, Saito Y, *et al.* CDCA7 and HELLS suppress DNA: RNA hybrid-associated DNA damage at pericentromeric repeats. *Sci Rep*, 2020, **10**(1):17865
- [33] Marchena-Cruz E, Camino L P, Bhandari J, *et al.* DDX47, MeCP2, and other functionally heterogeneous factors protect cells from harmful R loops. *Cell Rep*, 2023, **42**(3):112148
- [34] Mersaoui S Y, Yu Z, Coulombe Y, *et al.* Arginine methylation of the DDX5 helicase RGG/RG motif by PRMT5 regulates resolution of RNA:DNA hybrids. *EMBO J*, 2019, **38**(15):e100986
- [35] Pappa S, Padilla N, Iacobucci S, *et al.* PHF2 histone demethylase prevents DNA damage and genome instability by controlling cell cycle progression of neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(39):19464-19473
- [36] Singh D K, Pandita R K, Singh M, *et al.* MOF suppresses replication stress and contributes to resolution of stalled replication forks. *Mol Cell Biol*, 2018, **38**(6):e00484-17
- [37] Barroso S, Herrera-Moyano E, Muñoz S, *et al.* The DNA damage response acts as a safeguard against harmful DNA-RNA hybrids of different origins. *EMBO Rep*, 2019, **20**(9):e47250
- [38] D'Alessandro G, Whelan D R, Howard S M, *et al.* BRCA2 controls DNA: RNA hybrid level at DSBs by mediating RNase H2 recruitment. *Nat Commun*, 2018, **9**(1):5376
- [39] Hatchi E, Skourti-Stathaki K, Ventz S, *et al.* BRCA1 recruitment to transcriptional pause sites is required for R-loop-driven DNA damage repair. *Mol Cell*, 2015, **57**(4):636-647
- [40] Okamoto Y, Abe M, Itaya A, *et al.* FANCD2 protects genome stability by recruiting RNA processing enzymes to resolve R-loops during mild replication stress. *FEBS J*, 2019, **286**(1):139-150
- [41] Schwab R A, Nieminiusz J, Shah F, *et al.* The fanconi anemia pathway maintains genome stability by coordinating replication and transcription. *Mol Cell*, 2015, **60**(3):351-361
- [42] Okamoto Y, Iwasaki W M, Kugou K, *et al.* Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**(6):2932-2944
- [43] Sollier J, Stork C T, García-Rubio M L, *et al.* Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Mol Cell*, 2014, **56**(6):777-785
- [44] He Y, Pasupala N, Zhi H, *et al.* NF-κB-induced R-loop accumulation and DNA damage select for nucleotide excision repair deficiencies in adult T cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(10):e2005568118
- [45] Cristini A, Ricci G, Britton S, *et al.* Dual processing of R-loops and topoisomerase I induces transcription-dependent DNA double-strand breaks. *Cell Rep*, 2019, **28**(12):3167-3181.e6
- [46] Marinello J, Chillemi G, Bueno S, *et al.* Antisense transcripts enhanced by camptothecin at divergent CpG-island promoters associated with bursts of topoisomerase I-DNA cleavage complex and R-loop formation. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(22):10110-10123
- [47] El Hage A, French S L, Beyer A L, *et al.* Loss of topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis. *Genes Dev*, 2010, **24**(14):1546-1558
- [48] Promonet A, Padioleau I, Liu Y, *et al.* Topoisomerase 1 prevents replication stress at R-loop-enriched transcription termination sites. *Nat Commun*, 2020, **11**(1):3940
- [49] Yang Y, McBride K M, Hensley S, *et al.* Arginine methylation facilitates the recruitment of TOP3B to chromatin to prevent R loop accumulation. *Mol Cell*, 2014, **53**(3):484-497
- [50] Wahba L, Amon J D, 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**(6):978-988
- [51] Nguyen H D, 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**(5):832-847.e4
- [52] Shiromoto Y, Sakurai M, Minakuchi M, *et al.* ADAR1 RNA editing enzyme regulates R-loop formation and genome stability at telomeres in cancer cells. *Nat Commun*, 2021, **12**(1):1654
- [53] Zheng Y, Lorenzo C, Beal P A. DNA editing in DNA/RNA hybrids by adenosine deaminases that act on RNA. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(6):3369-3377
- [54] Kim H D, Choe J, Seo Y S. The sen1(+) gene of *Schizosaccharomyces pombe*, a homologue of budding yeast SEN1, encodes an RNA and DNA helicase. *Biochemistry*, 1999, **38**(44):14697-14710
- [55] Skourti-Stathaki K, Proudfoot N J, 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
- [56] Hasanova Z, Klapstova V, Porrua O, *et al.* Human senataxin is a bona fide R-loop resolving enzyme and transcription termination

- factor. *Nucleic Acids Res*, 2023, **51**(6):2818-2837
- [57] Sakasai R, Isono M, Wakasugi M, *et al.* Aquarius is required for proper CtIP expression and homologous recombination repair. *Sci Rep*, 2017, **7**(1):13808
- [58] Li L, Monckton E A, Godbout R. A role for DEAD box 1 at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 2008, **28**(20):6413-6425
- [59] Hirota Y, Lahti J M. Characterization of the enzymatic activity of hChlR1, a novel human DNA helicase. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(4):917-924
- [60] Hodroj D, Recolin B, Serhal K, *et al.* An ATR-dependent function for the Ddx19 RNA helicase in nuclear R-loop metabolism. *EMBO J*, 2017, **36**(9):1182-1198
- [61] Song C, Hotz-Wagenblatt A, Voit R, *et al.* SIRT7 and the DEAD-box helicase DDX21 cooperate to resolve genomic R loops and safeguard genome stability. *Genes Dev*, 2017, **31**(13):1370-1381
- [62] Sridhara S C, Carvalho S, Grosso A R, *et al.* Transcription dynamics prevent RNA-mediated genomic instability through SRPK2-dependent DDX23 phosphorylation. *Cell Rep*, 2017, **18**(2):334-343
- [63] Pérez-Calero C, Bayona-Feliu A, Xue X, *et al.* UAP56/DDX39B is a major cotranscriptional RNA-DNA helicase that unwinds harmful R loops genome-wide. *Genes Dev*, 2020, **34**(13-14):898-912
- [64] Talwar T, Vidhyasagar V, Qing J, *et al.* The DEAD-box protein DDX43 (HAGE) is a dual RNA-DNA helicase and has a K-homology domain required for full nucleic acid unwinding activity. *J Biol Chem*, 2017, **292**(25):10429-10443
- [65] Cristini A, Groh M, Kristiansen M S, *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**(6):1891-1905
- [66] Grierson P M, Acharya S, Groden J. Collaborating functions of BLM and DNA topoisomerase I in regulating human rDNA transcription. *Mutat Res*, 2013, **743-744**:89-96
- [67] Silva S, Camino L P, Aguilera A. Human mitochondrial degradosome prevents harmful mitochondrial R loops and mitochondrial genome instability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(43):11024-11029
- [68] Chakraborty P, Huang J T J, Hiom K. DHX9 helicase promotes R-loop formation in cells with impaired RNA splicing. *Nat Commun*, 2018, **9**(1):4346
- [69] 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**(4):650-662.e8
- [70] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096):816-821
- [71] Sun Q, Csorba T, Skourti-Stathaki K, *et al.* R-loop stabilization represses antisense transcription at the *Arabidopsis FLC* locus. *Science*, 2013, **340**(6132):619-621
- [72] Skourti-Stathaki K, Proudfoot N J, 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
- [73] Keskin H, Shen Y, Huang F, *et al.* Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair. *Nature*, 2014, **515**(7527):436-439
- [74] García-Muse T, Aguilera A. R loops: from physiological to pathological roles. *Cell*, 2019, **179**(3):604-618
- [75] Muers M. Mutation: the perils of transcription. *Nat Rev Genet*, 2011, **12**(3):156
- [76] Gan W, Guan Z, Liu J, *et al.* R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes Dev*, 2011, **25**(19):2041-2056
- [77] Crossley M P, Song C, Bocek M J, *et al.* R-loop-derived cytoplasmic RNA-DNA hybrids activate an immune response. *Nature*, 2023, **613**(7942):187-194
- [78] Perego M G L, Taiana M, Bresolin N, *et al.* R-loops in motor neuron diseases. *Mol Neurobiol*, 2019, **56**(4):2579-2589
- [79] Richard P, Manley J L. R loops and links to human disease. *J Mol Biol*, 2017, **429**(21):3168-3180
- [80] Lomonosov M, Anand S, Sangrithi M, *et al.* Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev*, 2003, **17**(24):3017-3022
- [81] Klein H L. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair (Amst)*, 2008, **7**(5):686-693
- [82] Sarkar K, Han S S, Wen K K, *et al.* R-loops cause genomic instability in T helper lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, **142**(1):219-234
- [83] Milman G, Langridge R, Chamberlin M J. The structure of a DNA-RNA hybrid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967, **57**(6):1804-1810
- [84] Thomas M, White R L, Davis R W. Hybridization of RNA to double-stranded DNA: formation of R-loops. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **73**(7):2294-2298
- [85] Chan Y A, Aristizabal M J, Lu P Y, *et al.* Genome-wide profiling of yeast DNA:RNA hybrid prone sites with DRIP-chip. *PLoS Genet*, 2014, **10**(4):e1004288
- [86] Dumelie J G, Jaffrey S R. Defining the location of promoter-associated R-loops at near-nucleotide resolution using bisDRIP-seq. *Elife*, 2017, **6**:e28306
- [87] 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**(8):eabe3516
- [88] Hartono S R, 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**(3):272-284
- [89] Vanoosthuyse V. Strengths and weaknesses of the current strategies to map and characterize R-loops. *Noncoding RNA*, 2018, **4**(2):9
- [90] Chen J Y, Zhang X, Fu X D, *et al.* R-ChIP for genome-wide mapping of R-loops by using catalytically inactive RNASEH1. *Nat Protoc*, 2019, **14**(5):1661-1685
- [91] Nowotny M, Cerritelli S M, Ghirlando R, *et al.* Specific recognition of RNA/DNA hybrid and enhancement of human RNase H1 activity by HBD. *EMBO J*, 2008, **27**(7):1172-1181
- [92] Yan Q, Shields E J, Bonasio R, *et al.* Mapping native R-loops genome-wide using a targeted nuclease approach. *Cell Rep*, 2019, **29**(5):1369-1380.e5

Functions and Regulations of R-loop*

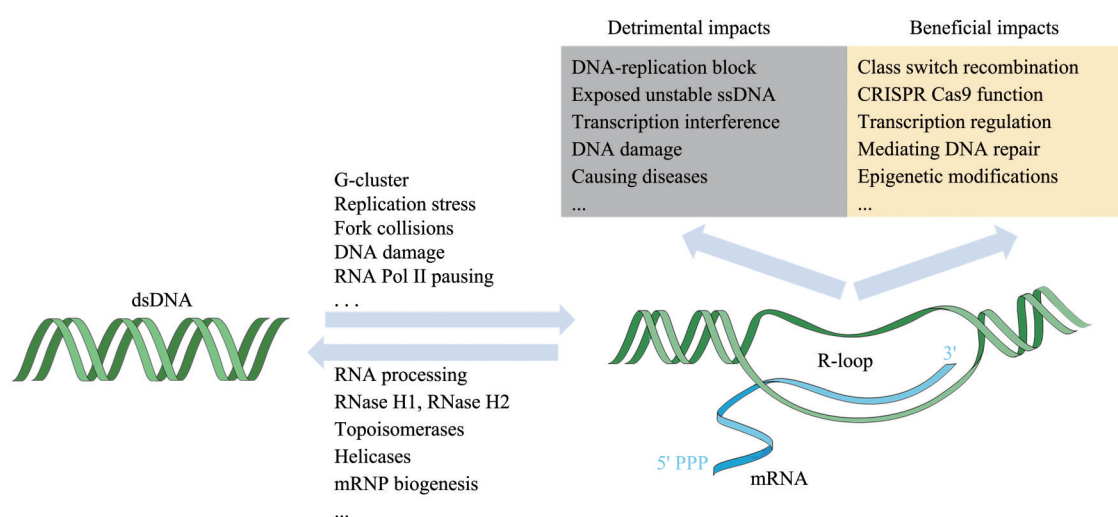
ZHANG Yiyun¹⁾, YE Sumin¹⁾, JIN Jianping^{1,2,3)**}

¹⁾Life Sciences Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

²⁾Center for Life Sciences, Shaoxing Institute, Zhejiang University, Shaoxing 321000, China;

³⁾Cancer Center, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Graphical abstract



Abstract R-loops are formed during transcription when the nascent RNA generated by RNA polymerases hybridizes with its complementary DNA template, giving rise to a region of DNA:RNA hybrid and a displaced single-stranded DNA. R-loops are stable structures that have important beneficial physiological functions, but also could pose a threat to genomic stability. Unscheduled R-loops induce cell cycle checkpoint activation, DNA damage, and chromosome rearrangement in mammalian cells. R-loops expose unstable single-stranded DNA, which is prone to transcription-related mutations and recombination. R-loops may also directly block DNA replication, leading to DNA double strand breaks. Abnormal accumulations of R-loops have been found in some syndromes, human neurological disorders, and cancers. On the other hand, R-loops also play positive roles in physiological processes, such as epigenetic modification, DNA repair, gene regulation and mitochondrial stability. R-loops forming on transcription-termination regions, promote RNA polymerase pausing before termination. R-loops are regulated delicately in cells. Collisions between replication and transcription cause accumulation of R-loops. Replication stress, DNA damage and RNA Pol II pausing also induce R-loop formation. To resolve

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32150014, 31970734), National Key Research and Development Program of China (2022YFC3401500), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities.

** Corresponding author.

Tel: 86-15168487596, E-mail: jianping_jin@zju.edu.cn

Received: April 6, 2023 Accepted: April 17, 2023

R-loops when they form, cell evolve numerous dissolution mechanisms. Ribonuclease RNase H1 and RNase H2 bind to R-loops and then catalyze the cleavage of RNA. Helicases, such as SETX, DHX9, DDX21, unwind the RNA from the R-loops. Defects in RNA processing factors, chromatin modulators, DNA repair proteins, cause accumulation of R-loops, suggesting they are involved in R-loop regulations. To detect R-loops, several methods have been developed and are mainly based on the S9.6 antibody and the HBD domain of RNase H1, however, both of them possess some issues. Understanding the regulatory mechanisms of R-loop formation and clearance could help us better know how cells maintain genomic stability and prevent disease development. In this review article, we summarized functions and regulations of R-loops. We also discussed methodologies used to detect R-loops. Finally, we proposed some future perspectives of R-loop research.

Key words R-loop, DNA:RNA hybrid, genomic stability, transcription, DNA damage responses

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0123