



真核细胞DNA复制的多层级调控*

张丁嵘** 刘 阳** 刘栩豪 胡家志***

(北京大学生命科学院, 北大-清华生命科学联合中心, 北京 100871)

摘要 DNA复制是生命体最基础的代谢过程。在人细胞中, 数千个DNA复制源在染色质环境下被同时激活, 共同起始DNA复制过程并完成基因组的拷贝。复制过程有组织地进行, 既受到染色质环境的约束和调控, 又需协调与其他DNA代谢事件的关系, 以保证基因组DNA和表观遗传信息准确且稳定地继承。随着研究技术的发展和研究数据的积累, 系统性、整体性地研究真核细胞, 尤其是哺乳动物细胞, 在复杂染色质环境下的DNA复制是未来的研究趋势。本文将从多个角度总结真核DNA复制在染色质环境中的多层级调控模式, 期望为今后的研究带来启示。

关键词 DNA复制, 染色质环境, 多层级调控

中图分类号 Q75

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0284

DNA复制是生命体最基础的生物学过程之一, 控制着遗传信息的精确完整传递。在真核细胞中, 多个DNA复制源同时被细胞利用以保证基因组DNA可以在限定的时间内准确地完成拷贝。细胞作为一个复杂的反应容器, 每时每刻均发生着多个生物学过程, 因此DNA复制也不能排它性存在, 需与多种染色质代谢活动共存。传统的研究集中于对DNA复制过程的描述以及体外重建, 为了解从病毒到人的DNA复制提供了非常重要的知识框架。但是, 将DNA复制置于染色质的背景中, 目前仍有大量的问题待回答: DNA复制与基因转录是如何相互协调的? 染色质三维结构如何影响DNA复制, 反之, DNA复制如何影响染色质结构和表观信息等的重构? 哺乳动物细胞中, 复制相关蛋白质和DNA序列是否存在与病毒、原核生物和低等真核生物不同的选择方式? 等等。本文将总结DNA复制各层级的调控机制以及有待解决的问题(图1)。

1 蛋白质层次上的复制机器架构

在过去近半个世纪的时间里, 通过对模式生物的深入探索, 研究者们首先在蛋白质水平上逐步解析了复制起始发生的机制及其和细胞周期的紧密联系。1963年, Jacob等^[1]对大肠杆菌的遗传模式进

行观察和总结, 提出了复制子(replicon)模型, 即DNA复制的起始由起始子(initiator)和复制子(replicator)决定。其中, 起始子作为反式作用因子, 识别并结合顺式作用元件——复制子, 从而启动DNA复制。后续研究发现, 真核生物的复制起始过程也有类似规律, 但机制上更复杂。1980年, Harland和Laskey^[2]在非洲爪蟾的卵细胞中发现, DNA会通过一个结合到染色质上的因子启动DNA复制。但该因子在复制过程中又会从染色质上脱离, 从而确保基因组在同一细胞周期中能且仅能复制一次。这一复制调控过程与细胞周期中核膜周期性的破坏和重建关联紧密: 复制许可总是伴随着有丝分裂过程中核膜的消失而发生, 而当核膜重建后则被抑制^[3]。这些发现暗示着复制起始需要先经历一个准备期才能发生, 且这一过程可能与细胞周期存在联系。

而后在酵母、非洲爪蟾及其他真核生物里进行的一系列研究鉴定了一些复制许可因子(replication licensing factor, RLF)。复制起始识别

* 国家自然科学基金(32122018, 323B2010)资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 010-62744611, E-mail: hujz@pku.edu.cn

收稿日期: 2024-07-01, 接受日期: 2024-08-23

复合体 (origin recognition complex, ORC) 和微小染色体维持复合体 (mini-chromosome maintenance complex, MCM) 被发现是复制许可所必需的, 并在真核生物细胞中被证明参与复制起始过程^[4-9]。随后, 细胞周期蛋白 6 (cell division cycle 6, Cdc6)、染色质许可与 DNA 复制因子 1 (chromatin licensing and DNA replication factor 1, Cdt1) 和转换激活蛋白 1 (switch activating protein 1, Sap1) 也被发现在复制许可过程中起重要作用^[10-17]。通过基因组印记方法在酵母中进行的分析发现, ORC 蛋白在整个细胞周期都结合在染色质上, 并且在 G1 期这些结合位点会扩展变宽, 使邻近区域也免于核酸酶的消化^[18]。该发现意味着从有丝分裂结束到进入 S 期前的这一阶段内, 细胞会在 ORC 的基础上组装一种复制前体复合物 (pre-replication complex, pre-RC)。整个 pre-RC 的形成过程逐渐被解析 (图 1): ORC 蛋白复合体首先与染色质 DNA 结合, 之后与 Cdc6 形成复合体, 而该复合体会进一步招募 Cdt1 以及 MCM2-7, 在复制源

(replication origin) 处形成 ORC-Cdc6-Cdt1-MCM 复合物 (OCCM)^[19-20]。此后, Cdc6 和 Cdt1 分子会先后从 OCCM 中有序地释放^[21-22]。在单个 MCM2-7 被装载的基础上, 第二个相同的 MCM2-7 复合体可能以类似的方式被招募到同一位点上, 最终两个 MCM2-7 六聚体会以“头对头”的形式在 DNA 上对向排列, 形成双六聚体 (double hexamer, DH)^[19-20, 23]。在 G1 期, MCM 复合体会过量地装载到 DNA 上来, 使染色质上结合的 MCM 分子数是 ORC 蛋白的 10~50 倍左右^[12, 24-26], 这暗示着同一复制源位置可能装载多个 MCM DH, 该现象在体外重建 pre-RC 的过程中得到了证实^[23, 27-28]。人细胞及果蝇的染色质免疫沉淀测序 (chromatin immunoprecipitation and parallel sequencing, ChIP-seq) 数据显示, ORC 与 MCM 蛋白在染色质上的分布位点不一致, 表现出解偶联的现象^[26, 29-31]。ORC 和 MCM 的解偶联现象意味着环状的 MCM DH 在激活之前具备在 DNA 上滑动的能力, 从而脱离它最初被装载到的 ORC 结合位点^[27, 29]。

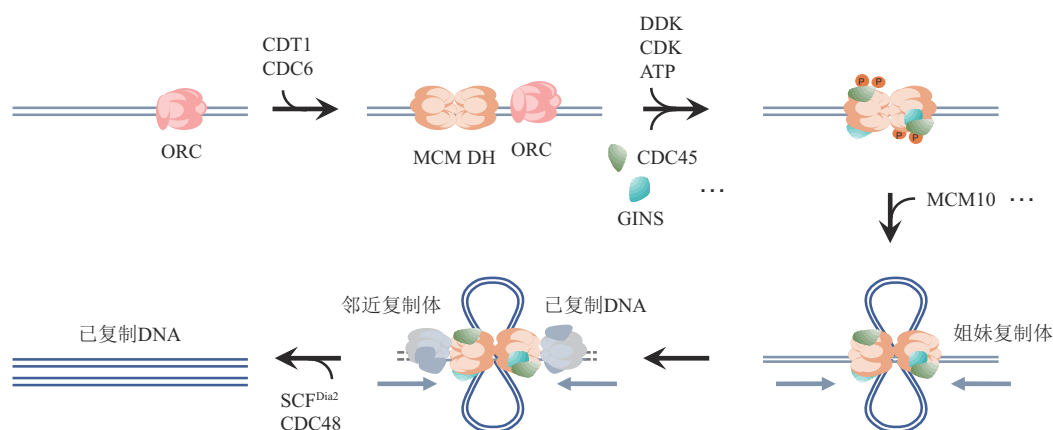


Fig. 1 Protein level regulation during the initiation and termination of DNA replication in human cells

图1 人类细胞中DNA复制起始和终止阶段的蛋白质水平调控

ORC蛋白招募MCM到染色质上, 使其以双二聚体的形式排布。在DDK和CDK的磷酸化作用下, CDC45, GINS和MCM2-7组装成为CMG复合体, 并在MCM10的作用下形成激活状态的姐妹复制体。在细胞内, 姐妹复制体相互偶联并协同执行DNA复制过程。在复制终止阶段, 两个相邻的复制体相遇, 伴随DNA构象的变化, E3泛素化连接酶SCF^{Dia2}和CDC48参与将复制解旋酶从染色质上解离。

MCM2-7复合物是复制解旋过程中的重要引擎, 但是它的活性较弱, 在装载后仍需被进一步激活才能发挥解旋酶活性, 形成活跃的复制体 (replisome)^[32] (图 1)。MCM2-7复合物的激活至少需要两种激酶: Dbf4 依赖的激酶 (Dbf4 dependent kinase, DDK) 和细胞周期依赖性激酶 (cyclin dependent kinase, CDK)^[28, 33]。其中 CDK 的活性随着细胞周期的进程而波动, 说明它可能起

着类似开关的作用。pre-RC 首先在低 CDK 水平的 G1 期进行组装, 当进入 S 期后, CDK 和 DDK 进一步激活 pre-RC 使其成为活跃的复制体。同时 S 期高水平的 CDK 活性又会抑制新 pre-RC 的形成, 避免基因组位点未经历 G1 期的许可过程就启动复制, 这有效保证了一个细胞周期内复制在同一位置仅进行一次^[34-36]。在体外的解旋酶激活过程中, DDK 磷酸化 MCM DH, 而 CDK 则会磷酸化 Sld2 和

Sld3, 共同促进解旋酶复合体 Cdc45/MCM2-7/GINS (CMG) 的组装以及起始前复合体 (pre-initiation complex, pre-IC) 的形成^[37]。一般每个复制源处会形成两个CMG复合体, 在激活初期是以头对头的形式存在^[28]。MCM10会辅助激活两个CMG并使得它们相互错过, 从对向变为背向, 最终形成一对反方向行进的姐妹复制体 (sister replisome)^[28, 38-39]。尽管MCM复合体以DH的形式排列, 但尚不清楚激活过程是严格以一对DH为单位, 还是也允许非DH的两个邻近的MCM被同时激活。此外, 每一轮的DNA复制过程中仅有部分MCM复合体被激活, 剩余的未激活MCM的命运也未知, 它们有可能参与到停顿的复制叉的激活^[28, 40]。

每一个复制叉都有自己完整的生命周期。一般而言, 复制叉在DNA复制起始位点形成, 沿着DNA双链行进, 最终在合适的位置终止, 完成复制过程。在这一过程中, 复制叉需要连续、稳定地运行, 顺利通过基因组上的各种障碍, 保证经过的区域被完整复制。作为复制体的核心组分, CMG解旋酶需要在延伸过程中保持稳定, 不轻易从DNA上脱落。而在DNA复制终止过程中, 两个CMG解旋酶需要从模版上迅速解离, 同时停止新DNA的合成。因此, CMG复合体在DNA复制的终止阶段也受到一系列调控作用 (图1)。在芽殖酵母中的研究表明, 两个CMG可能在相遇后相互绕过对方, 继续延伸一段距离, 跨过另一方向复制叉后随链合成的起始点, 触发DNA构象的变化。而后, E3泛素化连接酶SCF^{Dia2}会介导CMG复合体

中MCM2-7亚基的泛素化, 同时, 细胞周期蛋白48 (Cdc48) 被招募, 参与和帮助复制解旋酶从染色质上解离^[41-44]。但是最近的一些证据表明, 复制叉相遇可能不是DNA复制终止的信号, 而扭曲张力可能在这个过程中发挥重要的作用^[45-47]。

2 DNA序列上的DNA复制调控

从低等生命到高等真核生物的进化过程中, 基因组大小发生了剧烈演变。可以预见的是, DNA复制起始位点的数目也会随之而变。原核生物大肠杆菌仅有单个DNA序列明确的复制起点, 而酵母等简单真核生物已经可以同时利用数百个复制源以加速DNA复制, 且这些复制源仍然具有一定的DNA序列依赖性^[42, 48]。芽殖酵母的基因组存在自主复制元件 (autonomous replication sequence, ARS), 这些元件中普遍包含一段相对保守的11 bp序列 (5-(A/T)TTTA(T/C)(A/G)TTT(A/T)-3), 即自主保守序列 (autonomous consensus sequence, ACS), 它们可以被ORC识别和结合, 建立复制许可并促进DNA复制起始^[7]。基于对DNA复制相关蛋白质和序列的理解, 研究者们已经利用纯化蛋白质在体外实现了在酵母ARS上的DNA复制起始和延伸的基本过程^[23, 27-28, 49-50]。人细胞的基因组更加巨大, 数千个DNA复制位点同时执行DNA合成^[30, 51-52]。因此, 研究者们一直试图寻找人细胞DNA复制源的序列特征及其调控规律, 即DNA复制起始位点是否存在保守的一致性序列。为此, 研究者们开发了一系列高通量测序方法来鉴定人细胞的DNA复制起始位点 (表1和下文)。

Table 1 High-throughout sequencing methods for identifying replication initiation zones
表1 鉴定人细胞DNA复制起始的高通量测序方法

方法	碱基类似物	靶向的复制特征	鉴定的数目	复制起始位点或区域的大小	局限性	参考文献
ChIP-seq	-	复制起始相关蛋白, 如ORC蛋白	~52 000	~550 bp	倾向于染色质开放区域	[53]
SNS-seq	-	新生前导链	50 000~250 000	~0.5 kb	假阳性较高, 如G4结构可被错误保留	[54-57]
Bubble-seq	-	复制泡	>100 000	14~20 kb	受限制性内切酶位点的分布影响	[58]
OK-seq	EdU	冈崎片段	5 000~10 000	6~150 kb	偏好复制起始效率高的区域	[59]
EdU/HU-seq	EdU	新生DNA	~6 000	0.2~450 kb	偏好早期复制起始区; 包含休眠复制起始区	[51, 60]
Repli-seq	BrdU	新生DNA	1 000~2 000	340 kb	对密集的复制起始区的解析能力较差	[61]
NAIL-seq	EdU和BrdU	新生DNA	>2 000	50~70 kb	偏好早期复制起始区	[30]

DNA复制起始的发生依赖pre-RC的形成, 因此最直接的复制起始位点鉴定方案可以通过捕获人

细胞中染色质上的ORC或MCM结合位点来确定DNA复制起始位点。在酵母中, 基于ChIP-seq鉴

定的ORC结合位点与ARS共定位^[29]。但是,同样的方法鉴定的宫颈癌HeLa细胞系以及淋巴母细胞瘤K562细胞系中的ORC1和ORC2结合位点比那些具有序列特异性的转录因子要更宽,暗示着ORC可能被招募到特定区域上^[53, 62]。MCM复合体在染色质上的结合区域相较ORC更加宽泛,这与其在染色质上的过量装载及可移动性特征相一致^[30-31]。然而,在每个细胞中,仅有部分MCM蛋白被激活并促使DNA复制起始。因此,ORC或MCM在染色质上的结合位点可能无法直接指征DNA复制起始发生的真实位置。

另一类方法则通过捕获和富集DNA复制中间体来获得全基因组范围内的DNA复制起始位点。SNS-seq (small nascent leading strand sequencing) 的策略是富集5'端带有RNA引物的新生先导链(leading strand)来确定DNA复制起始^[55]。SNS-seq通过提取正在分裂的细胞中1~2 kb的单链DNA片段,并利用lambda核酸外切酶消化掉无RNA引物的保护单链DNA,从而富集新生先导链并进行测序。Bubble-seq则依赖DNA复制起始时产生的复制泡(replication bubble)结构:使用限制酶打断正在复制的基因组DNA,并利用二维胶(2D gel)技术富集复制泡结构用于测序^[58]。OK-seq (Okazaki fragment sequencing) 则通过掺入胸苷类似物EdU的方法捕捉和富集复制过程中的冈崎DNA片段(Okazaki fragment),从而鉴别DNA复制事件发生的位置^[59]。因为冈崎片段具有方向性,可以准确区分其位于沃森(Watson)或者克里克(Crick)链,因而可以计算出复制叉的行进方向,从而推断出复制起始和终止事件^[59, 63]。

基于核苷类似物标记新生DNA链的策略,近年来也建立了一系列鉴定复制起始事件的新方法,如Repli-seq、EdU/HU-seq和NAIL-seq (nucleoside analog incorporation loci sequencing) 等^[30, 51, 61]。胸苷类似物,如BrdU或EdU等,可以被哺乳动物细胞高效摄取并掺入新生DNA链^[64]。新生链的富集则通过特异性抗体富集BrdU或链霉亲和素富集经点击反应(click reaction)偶联生物素的EdU而实现。Repli-seq和EdU/HU-seq主要是使用BrdU或EdU单信号插入和富集的方案,而NAIL-seq则同时利用BrdU和EdU以相互验证和去除杂信号,可以提高分辨率和准确率^[30]。为提高DNA复制起始位点的分辨率,该类方法通常依赖细胞周期同步化以富集DNA复制起始事件。EdU/HU-seq通过羟基

脲(hydroxyurea, HU)限制DNA复制延伸以确保碱基类似物富集在DNA复制起始位点附近。然而,羟基脲可能导致异常DNA复制起始的发生,如激活休眠复制源等,因此无法准确揭示生理条件下DNA复制起始的特征^[30]。而NAIL-seq则通过CDK抑制剂将免疫细胞严格地同步化至G1/S期的转折点。2010年,Hansen等^[61]改造Repli-seq以分析哺乳动物DNA复制时序,通过将S期细胞用BrdU标记并按细胞周期进程先后顺序分为多份,测定每份细胞中正在进行DNA复制的区域,可以在一定分辨率上动态监测基因组水平复制从发生到终止的全过程。

尽管已经开发了多种高通量方法,目前尚未有决定性证据表明人类的复制源具有严格的序列依赖。首先,各种检测方法得到的复制源的数目和位置差异都较大,难以获得一致性结论。如SNS-seq在人细胞里鉴定到50 000~250 000个复制起始点,Bubble-seq在人细胞里鉴定到超过100 000个复制起始点,但它们之间仅有33%~65%的位点存在重叠^[65]。同时,各类方法得到的复制源在尺寸上差异也较大,如SNS-seq鉴定到的起始区域在0.5 kb左右,OK-seq鉴定的区域范围在6~150 kb,而NAIL-seq鉴定到的起始区范围大多在50~70 kb左右^[30, 55, 58-59],因此很难在人类细胞中准确定义复制源的位置。这其中,技术本身的局限性可能是制约复制源鉴定准确性、一致性的关键因素,但同时也暗示着在人体细胞内,复制源并不存在一个严格的决定序列,而更可能是以复制起始区域(replication initiation zone)的形式存在。后续的一些研究虽然在人和小鼠的基因组中发现复制源附近存在G富集序列相关的核小体缺失区,且这些短的基序(motif)主要以CpG岛(CpG island)以及G四联体(G4 structure)的形式存在,但这些结构主要提高了复制源的利用效率,而非特异性地决定复制起始^[57, 66]。近期,也有研究表明多聚腺嘌呤或胸腺嘧啶序列可以利于DNA双链打开并起始复制^[51](图2),而利用无酶活的Cas9也可以促进DNA复制起始^[30],但这同样无法作为复制起始的决定性因素。因此,目前的研究尚未在哺乳动物的复制源中总结出统一的序列规律,这间接说明基因组序列本身可能并不是调控复制起始的关键因素,而DNA的二级结构反而在局部促进了DNA复制的起始。

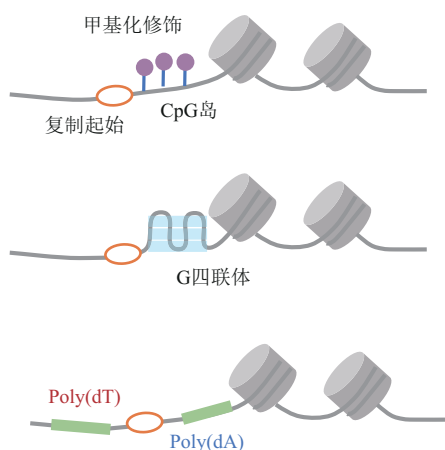


Fig. 2 Regulation of DNA replication at DNA sequence level

图2 DNA序列水平的复制调控

核小体缺失区中的部分DNA序列特征与复制起始之间存在相关性。如在G富集的DNA序列中, 甲基化修饰的CpG岛以及G四联体结构, 可以提高复制源的利用效率。多聚腺嘌呤 (Poly(dA)) 或多聚胸腺嘧啶 (Poly(dT)) 等序列利于双链DNA被打开以进行复制起始。

3 染色质结构上的DNA复制调控

在高通量测序技术大规模应用前, 细胞学和显微成像的方法是研究细胞核环境中DNA复制动态的主要途径。研究者们利用核苷类似物如氘化胸苷 (^3H -thymidine) 或卤化核苷 (如BrdU) 标记S期细胞, 并结合荧光抗体进行检测, 可以追踪复制过程中新生DNA在细胞核内的时空动态^[67-69]。他们发现, 在S期早期, 正在发生复制的区域以“焦点”的形式定位在核内特定位置, 且随着复制进行到晚期时, 逐步转移到核膜或者核仁的边缘位置。在这些观察的基础上, “复制焦点”的概念被正式提出, 并使领域内初步认识到染色质的亚核定位和复制时序之间存在紧密联系^[69-71]。复制焦点的时空动态性使领域内意识到, 复制机器 (replication machinery) 在行使功能的过程中会保持空间距离上的邻近, 可能以更大规模的“复制工厂 (replication factory)”的形式进行复制^[72-73]。

最近20年, 高通量测序技术的发展极大地推进了我们的认识。以Hi-C (high-throughput chromosome conformation capture) 为代表的染色质构象捕获技术不断发展, 使哺乳动物的染色质三维

结构也被系统解析, 其中染色质区室 (compartments)、拓扑相关结构域 (topologically associating domains, TADs)、染色质环 (chromatin loops) 等层级结构被相继发现和阐明^[74-76]。这些发现表明, 基因组在三维空间上呈现规律的组织 and 折叠结构。早期复制的区域通常在基因密集的A类染色质区室, 这些位置为活跃开放的染色质区域且染色质可及性高^[30, 76-78]; 而晚期复制的区域通常与核纤层、核仁附近的区域重叠, 其染色质通常呈现紧密且抑制的状态, 与B类区室相对应^[61, 76, 79-80]。在B细胞的发育过程中, 这一规律得到充分体现: 在未发生V(D)J重组的B细胞早期发育阶段, 开放的IgH区域在S期早期复制; 然而到了B细胞发育的晚期, 未参与V(D)J重组或者未能产生抗体编码外显子的沉默IgH区域转变为晚期复制^[81]。小鼠胚胎细胞的分化过程中会发生一系列染色质由A向B区室的转变^[82]。以此模型为基础的DNA复制研究发现复制时序由早到晚的转变与A到B区室的转换高度对应。这促进了复制结构域 (replication domain) 概念的提出^[82-83]。这些发现说明, DNA复制发生的时间和染色质的组分或性质高度相关。

S期早期的复制起始事件通常与TAD或染色质环锚点形成的隔绝边界共定位^[45, 84-85], 暗示染色质折叠形成的三维结构单元可能对复制起调控作用。此外, 染色质环的锚定点附近存在多种其他DNA代谢事件, 比如活跃的基因转录也在S期的锚定点附近同频发生^[86-87]。这些元素都可能参与对DNA复制的调节。然而敲除基因组上的TAD边界, TAD内部的复制时序并不发生明显改变^[88], 表明染色质环结构边界的隔绝作用并不直接决定DNA复制时序。但黏连蛋白 (Cohesin) 的快速降解却可影响约1/3基因组区域上的DNA复制时序, 可能是由于黏连蛋白介导的染色质环挤出过程主动调节复制起始在染色质环的边界聚集 (图3), 这对稳定复制时序较为关键^[85]。

因为DNA复制会覆盖整个基因组, TAD锚定点和染色质环边界的复制会破坏染色质三维结构, 因此DNA复制过程必伴随着染色质三维结构的重塑。2017年, Nagano等^[89]利用单细胞水平的原位Hi-C技术研究了细胞周期进程中染色质三维结构的变化规律。他们发现, 随着细胞从G1期进入S期, 染色质环边界的隔绝能力逐渐减弱, 暗示DNA复制调节了染色质三维结构的动态变化。近

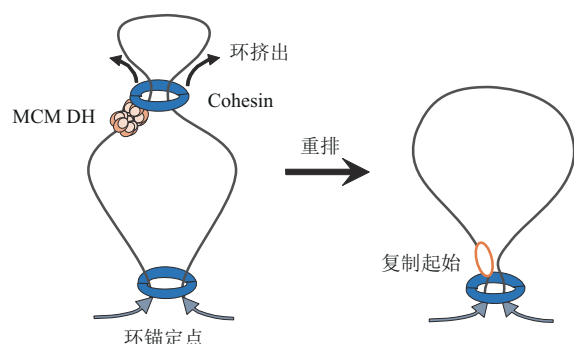


Fig. 3 The regulatory mechanism of cohesin-mediated loop extrusion in DNA replication initiation

图3 染色质环对复制起始的调控过程

Cohesin通过环挤出的形式在DNA上滑动。在这一过程中，Cohesin可以与MCM双六聚体相互作用从而介导MCM DH重排，最终导致MCM DH富集于染色质环的锚定点附近并介导复制起始。

期，本实验室开发了一种捕获新生DNA链上染色质互作的技术Repli-HiC，用于解析DNA复制过程中染色质三维结构的动态变化^[45]。Repli-HiC在人K562细胞和小鼠胚胎干细胞中的数千个位点捕捉到了一种新的染色质相互作用结构——染色质喷泉(chromatin fountains)。染色质喷泉结构指征着DNA复制叉在延伸过程中以偶联的形式存在(图1)，且这种偶联具体表现为两种形式：同一复制源起始的两个姐妹复制叉可以在整个复制延伸过程中持续性偶联；而来自两个不同复制源的一对复制叉在染色质相互作用的促进下也有机会偶联并协同行进，最终决定DNA复制终止。复制叉的偶联现象表明“复制工厂”是以两个“复制机器”为基本单元。此种形式的复制工厂的机制和意义尤其值得进一步研究。

4 转录与DNA复制调控

复制和转录是同时发生的两大染色质代谢事件，在整个S期的复制过程中，转录事件仍然在部分基因区活跃发生^[86-87]，因此两大事件必然相遇。复制和转录之间需以一定的策略协调和运行，否则复制可能与转录发生冲突(transcription-replication conflicts, TRC)，进而产生内源性DNA损伤威胁基因组的稳定性，并最终可能导致肿瘤发生^[90-92]。在哺乳动物细胞中，一些长转录基因上发生的复制、转录冲突，可能加剧染色质脆性位点(common fragile sites, CFS)或反复DNA断裂簇(recurrent DNA break clusters, RDC)的形成^[93-97]。

早期通过荧光显微镜的观察，Wei等^[98]发现转录和复制会在染色质上以网状结构“镶嵌”分布，这意味着两大事件既在空间上相互邻近，又需要具备一定的独立性。近年来，更高分辨率的高通量测序技术发现DNA复制在起始阶段与转录是“互斥”分布，表明复制起始会被限制在活跃转录区域之外^[30, 51]。究其机制，转录可将结合在染色质上但尚未激活的MCM复合物进行重分布(图4)，从而避免复制起始在转录区发生，降低二

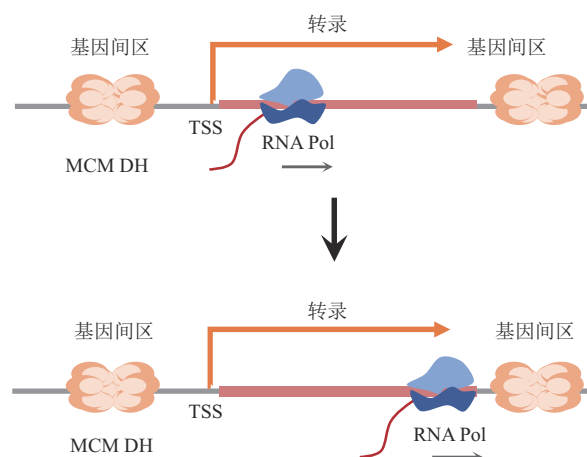


Fig. 4 Transcription-mediated redistribution of MCM double hexamer

图4 转录介导MCM双六聚体的重排

在G1期，介导转录的RNA聚合酶可以推动未激活的MCM DH，导致MCM DH富集于非转录区，以确保复制起始和转录互不干扰。

者TRC的频率，从而维护基因组的稳定性^[30]。而由复制起始过渡到延伸阶段时，复制和转录会以各种形式相遇，并可能产生不同类型的冲突。如果复制机器中的DNA聚合酶 ϵ 和转录机器以相同方向在同一模板链上延伸，二者是顺向行进的，则可能避免潜在的碰撞；如果复制和转录机器以对向的形式由两侧往中间行进、相遇，则容易产生有危害性的R环(R-loop)结构并积累DNA损伤，威胁基因组稳定性并产生复制压力，而这一过程经常伴随着ATR信号通路的激活^[99-101]。整体上，领域内认为对向形式的冲突(HO-TRC)比顺向形式冲突(CD-TRC)对基因组稳定性的威胁更大，因此细胞会尽量避免HO-TRC的发生。在人细胞中，为了规避复制、转录对向冲突的风险，复制倾向于在较长的活跃基因的转录起始位点(transcription start site, TSS)的上游发生^[102]。在这种情况下，复制

又可以顺着转录方向跨越整个转录区,并在邻近TTS附近的区域发生复制终止,这有效降低了冲突发生的频率。因此,染色质中的转录事件在很大程度上协调着复制起始发生的位置,并可能指导着复制叉跨越转录区的模式,而这间接塑造了复制时序。近期,单细胞水平上复制时序的研究支持了这一观点。通过对小鼠胚胎发育过程中受精卵到囊胚时期的连续性观察,Nakatani等^[103]发现,伴随合子基因组的激活(zygotic genome activation),复制时序会逐步建立,同时A、B染色质的区室化过程以及表观遗传学印记的分布愈加明确,而在二细胞期利用 α -amanitin处理破坏掉由RNA聚合酶II介导的转录起始和延伸,可以阻碍复制时序的建立,证明了转录在建立复制时序过程中的主动性。

近些年来,一些转录相关的顺式作用元件也被发现可调控复制时序,如David Gilbert实验室^[88]在小鼠胚胎干细胞的基因组中筛选出的早期复制控制序列(early replication control elements, ERCEs)。ERCEs可以介导不依赖于染色质结构蛋白的远距离相互作用,驱动A、B染色质区室的分化,同时是一些细胞特异的转录因子(如P300、Oct4、Sox2、Nanog)的结合位点,因此被认为具备一定的增强子的特性。约33.9%及20.2%的ERCEs在基因组上与增强子或超级增强子重合。同时,ERCEs之间存在一定的冗余性,说明它们可以协同发挥功能。敲除ERCEs导致染色质区室化和活跃转录事件的消失,并伴随着复制起始的时间由早到晚转变,说明这类元件可能调控着局部的染色质状态,从而影响复制时序。

5 表观遗传修饰与DNA复制调控

在真核生物中,核小体是包裹DNA并折叠成为染色质的基本单位。每个核小体由~147 bp的DNA缠绕组蛋白的八聚体构成。组蛋白和DNA的物理接触具有高度动态性,细胞通过对组蛋白特定的N端残基进行翻译后修饰,可以改变其理化性质,进而影响它与DNA结合的特性。对于特定的基因组区域而言,组蛋白与DNA动态结合的生理过程,塑造了染色质的可及性:当DNA与组蛋白的结合较为松散时,局部的染色质表现为开放状态,利于染色质代谢活动的进行;而DNA和组蛋白的紧密结合则会使局部的染色质区域维持关闭和沉默的状态。通常情况下,开放染色质环境下的DNA容易被复制蛋白结合,因而优先被利用进行

复制起始。因此,在人和小鼠早期复制起始的A类染色质区室经常存在组蛋白H3、H4赖氨酸残基的乙酰化(如H3ac和H4ac)或组蛋白H3第4位赖氨酸的甲基化(如H3K4me1, 2, 3)^[54, 104-106]。一些特定的乙酰基转移酶,如HBO1被证实参与组蛋白H4的乙酰化并影响DNA复制的许可过程^[107-112],进一步加强了组蛋白的表观遗传信息和DNA复制之间的紧密联系。此外,一些组蛋白变体如H2A.Z,也被发现对DNA复制的起始过程至关重要。含有H2A.Z变体的核小体可以通过结合甲基化酶SUV420H1,促进核小体上H4组蛋白第20位赖氨酸发生二甲基化修饰(H4K20me2),进而招募ORC1亚基,帮助DNA复制起始的发生^[113](图5)。一些影响表观遗传的反式作用因子同样在调控复制时序的过程中发挥重要作用,如酵母中一些与染色质表观修饰状态读写及重塑相关的蛋白质如Fhk1、Fhk2、Sir2、Rpd3等可调控复制时序^[114-116],然而在哺乳动物中相应的同源蛋白却并不发挥该功能^[117]。

另外,DNA水平的表观遗传修饰,特别是DNA的甲基化,在复制时序的稳态维持中也有重要作用(图5)。DNA甲基化通过对基因启动子附近的CpG岛序列进行动态修饰,可以影响该位置的双价组蛋白修饰(H3K4me3和H3K27me3)的分布,进而调控基因的表达状态^[118],并间接影响DNA复制时序。此外,DNA甲基化通过招募组蛋白甲基转移酶(如SUV39H1/H2),可以在局部建立H3K9me3的组蛋白修饰,参与异染色质的形成和维持,可影响ORC蛋白的招募和稳定结合^[119]。DNA甲基化还可通过稳定H3K9me3防止所在区域过早或过晚地起始复制,确保复制起始的时空精确性^[120]。Du等^[121]在人的结肠癌细胞系HCT116中敲除DNA甲基化转移酶DNMT1及DNA的从头甲基化转移酶DNMT3B,致使基因组范围内DNA甲基化水平整体降低,进而发现低甲基化区域在细胞群体中表现出复制起始点选择的异质性和不确定性,并伴随着复制时序紊乱以及染色质区室化特性的削弱,印证了上述观点。

反之,DNA复制也影响着表观信息的稳定。Rif1蛋白被发现并证明在低等真核生物到高等哺乳动物中调控着复制时序^[122-126]。David Gilbert实验室^[127]在人细胞中降解RIF1蛋白,并在单细胞水平建立DNA复制时序的变化图谱,发现复制时序的紊乱伴随着表观遗传标记的丢失或错误分配以及

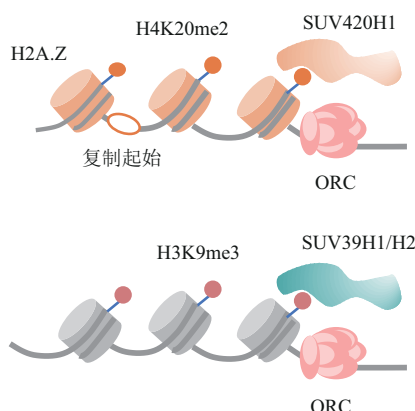


Fig. 5 Regulation of replication initiation by histone modifications or variants

图5 组蛋白修饰或变体对复制起始的影响

组蛋白变体H2A.Z和甲基化酶SUV420H1结合,促进核小体H4赖氨酸残基发生二甲基化修饰(H4K20me2),进而招募ORC并帮助复制起始。此外,组蛋白甲基转移酶SUV39H1/H2可以在染色质局部区域建立H3K9me3修饰,从而稳定ORC蛋白在染色质上的排布并调节复制起始时序。

染色质的重新折叠:后者在RIF1降解的第一个S期内就发生明显改变,而前者则需要得多代细胞的累积中慢慢形成。这表明DNA复制对基因组的表观遗传状态维持至关重要。

6 总结和展望

真核生物的DNA复制发生在染色质上,因而受到染色质环境及其代谢过程的调控。从酵母到人类这样高等哺乳动物的演化过程中,染色质环境逐渐复杂:酵母的染色质没有复杂的多层级结构,仅具备尺度较小的,以基因为单位的自相关结构域(self-associating domains)^[128-129];而人体细胞的染色体会在细胞核内形成庞大的染色质疆域,每一条染色体都具有非常复杂的多层级结构^[130]。在这样的情况下,人体的DNA复制既会受到更复杂的染色质环境的调控和约束,又需要有组织地运行,不断协调与其他DNA代谢事件的关系,在保证DNA和表观遗传信息稳定遗传的情况下维护基因组的稳定性。哺乳动物复制系统的复杂性给研究带来了巨大挑战,也致使领域内对人类自身DNA复制的独特机制了解尚不深入。要理解和探索其中的规律,需要在细胞内建立新的技术体系,为生命系统提供新的测度,将蛋白质、DNA序列、染色质环境及其代谢过程等多个层级的信息整合起来,系统性地分析这一生物学过程(图1)。

复制叉的生命周期伴随着复制源起始、延伸和终止多个过程。在人细胞中,复制源的许可和激活受到多个层级的调控,复制起始具有高度的随机性,其背后的机制尚未被解释清楚。在复制的延伸阶段,复制机器和染色质环境之间存在动态的交互作用,一方面,复制机器的稳定延伸需要染色质环境中多种信号的监督和调控,另一方面,复制在延伸过程中需要将整个基因组重新打开,进行拷贝,并重建整个秩序,这一过程伴随着染色质高级结构的破坏和重建。然而,复制机器是如何协调并完成这一复杂步骤的,尚未明确。而在复制的终止阶段,复制叉汇合和合成终止蔓延到整个复制过程。由于受到复制起始和延伸过程的影响,复制终止位置的随机性更大,且触发复制终止的具体机制也尚未明晰。此外,染色质环境下的复制机器并不是孤立存在的,而是具有复杂的空间组织模式。伴随着复制叉偶联现象的发现,复制叉生命周期中的所有过程都需要在新的视角下重新审视,这为领域研究带来了巨大挑战,也为系统性研究该领域提供了全新的机遇。

参 考 文 献

- [1] Jacob F, Brenner S, Cuzin F. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1963, **28**: 329-348
- [2] Harland R M, Laskey R A. Regulated replication of DNA microinjected into eggs of *Xenopus laevis*. Cell, 1980, **21**(3): 761-771
- [3] Blow J J, Laskey R A. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. Nature, 1988, **332**(6164): 546-548
- [4] Rowles A, Chong J P, Brown L, *et al.* Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*. Cell, 1996, **87**(2): 287-296
- [5] Kubota Y, Mimura S, Nishimoto S I, *et al.* Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of xenopus DNA replication licensing factor. Cell, 1995, **81**(4): 601-609
- [6] Madine M A, Khoo C Y, Mills A D, *et al.* MCM3 complex required for cell cycle regulation of DNA replication in vertebrate cells. Nature, 1995, **375**(6530): 421-424
- [7] Bell S P, Stillman B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. Nature, 1992, **357**(6374): 128-134
- [8] Romanowski P, Madine M A, Rowles A, *et al.* The *Xenopus* origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. Curr Biol, 1996, **6**(11): 1416-1425
- [9] Carpenter P B, Mueller P R, Dunphy W G. Role for a *Xenopus* Orc2-related protein in controlling DNA replication. Nature, 1996, **379**(6563): 357-360

- [10] Cocker J H, Piatti S, Santocanale C, *et al.* An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature*, 1996, **379**(6561): 180-182
- [11] Coleman T R, Carpenter P B, Dunphy W G. The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell*, 1996, **87**(1): 53-63
- [12] Donovan S, Harwood J, Drury L S, *et al.* Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(11): 5611-5616
- [13] Hofmann J F, Beach D. cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *EMBO J*, 1994, **13**(2): 425-434
- [14] Nishitani H, Lygerou Z, Nishimoto T, *et al.* The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature*, 2000, **404**(6778): 625-628
- [15] Aparicio O M, Weinstein D M, Bell S P. Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*, 1997, **91**(1): 59-69
- [16] Guan L, He P, Yang F, *et al.* Sap1 is a replication-initiation factor essential for the assembly of pre-replicative complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, 2017, **292**(15): 6056-6075
- [17] Noguchi C, Noguchi E. Sap1 promotes the association of the replication fork protection complex with chromatin and is involved in the replication checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 2007, **175**(2): 553-566
- [18] Diffley J F, Cocker J H, Dowell S J, *et al.* Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins *in vivo*. *Cell*, 1994, **78**(2): 303-316
- [19] Frigola J, Remus D, Mehanna A, *et al.* ATPase-dependent quality control of DNA replication origin licensing. *Nature*, 2013, **495**(7441): 339-343
- [20] Yuan Z, Schneider S, Dodd T, *et al.* Structural mechanism of helicase loading onto replication origin DNA by ORC-Cdc6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(30): 17747-17756
- [21] Tica S, Friedman L J, Ivica N A, *et al.* Single-molecule studies of origin licensing reveal mechanisms ensuring bidirectional helicase loading. *Cell*, 2015, **161**(3): 513-525
- [22] Fernández-Cid A, Riera A, Tognetti S, *et al.* An ORC/Cdc6/MCM2-7 complex is formed in a multistep reaction to serve as a platform for MCM double-hexamer assembly. *Mol Cell*, 2013, **50**(4): 577-588
- [23] Evrin C, Clarke P, Zech J, *et al.* A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(48): 20240-20245
- [24] Burkhardt R, Schulte D, Hu D, *et al.* Interactions of human nuclear proteins P1Mcm3 and P1Cdc46. *Eur J Biochem*, 1995, **228**(2): 431-438
- [25] Mahbubani H M, Chong J P, Chevalier S, *et al.* Cell cycle regulation of the replication licensing system: involvement of a Cdk-dependent inhibitor. *J Cell Biol*, 1997, **136**(1): 125-135
- [26] Powell S K, MacAlpine H K, Prinz J A, *et al.* Dynamic loading and redistribution of the Mcm2-7 helicase complex through the cell cycle. *EMBO J*, 2015, **34**(4): 531-543
- [27] Remus D, Beuron F, Tolun G, *et al.* Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell*, 2009, **139**(4): 719-730
- [28] Douglas M E, Ali F A, Costa A, *et al.* The mechanism of eukaryotic CMG helicase activation. *Nature*, 2018, **555**(7695): 265-268
- [29] Gros J, Kumar C, Lynch G, *et al.* Post-licensing specification of eukaryotic replication origins by facilitated Mcm2-7 sliding along DNA. *Mol Cell*, 2015, **60**(5): 797-807
- [30] Liu Y, Ai C, Gan T, *et al.* Transcription shapes DNA replication initiation to preserve genome integrity. *Genome Biol*, 2021, **22**(1): 176
- [31] Kirstein N, Buschle A, Wu X, *et al.* Human ORC/MCM density is low in active genes and correlates with replication time but does not delimit initiation zones. *eLife*, 2021, **10**: e62161
- [32] Ilves I, Petojevic T, Pesavento J J, *et al.* Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell*, 2010, **37**(2): 247-258
- [33] Labib K. How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells?. *Genes Dev*, 2010, **24**(12): 1208-1219
- [34] Piatti S, Böhm T, Cocker J H, *et al.* Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a “point of no return” after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes Dev*, 1996, **10**(12): 1516-1531
- [35] Krude T, Musahl C, Laskey R A, *et al.* Human replication proteins hCdc21, hCdc46 and P1Mcm3 bind chromatin uniformly before S-phase and are displaced locally during DNA replication. *J Cell Sci*, 1996, **109**(Pt 2): 309-318
- [36] Arias E E, Walter J C. Strength in numbers: preventing rereplication *via* multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev*, 2007, **21**(5): 497-518
- [37] Zou L, Stillman B. Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science*, 1998, **280**(5363): 593-596
- [38] Georgescu R, Yuan Z, Bai L, *et al.* Structure of eukaryotic CMG helicase at a replication fork and implications to replisome architecture and origin initiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(5): E697-E706
- [39] Terui R, Berger S E, Sambel L A, *et al.* Single-molecule imaging reveals the mechanism of bidirectional replication initiation in Metazoa. *Cell*, 2024, **187**(15): 3992-4009.e25
- [40] Todorov I T, Attaran A, Kearsley S E. BM28, a human member of the MCM2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication. *J Cell Biol*, 1995, **129**(6): 1433-1445
- [41] Maric M, Maculins T, De Piccoli G, *et al.* Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication. *Science*, 2014, **346**(6208): 1253596
- [42] Dewar J M, Walter J C. Mechanisms of DNA replication

- termination. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, **18**(8): 507-516
- [43] Moreno S P, Bailey R, Campion N, *et al*. Polyubiquitylation drives replisome disassembly at the termination of DNA replication. *Science*, 2014, **346**(6208): 477-481
- [44] Dewar J M, Budzowska M, Walter J C. The mechanism of DNA replication termination in vertebrates. *Nature*, 2015, **525**(7569): 345-350
- [45] Liu Y, Zhangding Z, Liu X, *et al*. Fork coupling directs DNA replication elongation and termination. *Science*, 2024, **383**(6688): 1215-1222
- [46] Jenkyn-Bedford M, Jones M L, Baris Y, *et al*. A conserved mechanism for regulating replisome disassembly in eukaryotes. *Nature*, 2021, **600**(7890): 743-747
- [47] Fachinetti D, Bermejo R, Cocito A, *et al*. Replication termination at eukaryotic chromosomes is mediated by Top2 and occurs at genomic loci containing pausing elements. *Mol Cell*, 2010, **39**(4): 595-605
- [48] O'Donnell M, Langston L, Stillman B. Principles and concepts of DNA replication in bacteria, Archaea, and Eukarya. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, **5**(7): a010108
- [49] Kurat C F, Yeeles J T P, Patel H, *et al*. Chromatin controls DNA replication origin selection, lagging-strand synthesis, and replication fork rates. *Mol Cell*, 2017, **65**(1): 117-130
- [50] Yeeles J T P, Janska A, Early A, *et al*. How the eukaryotic replisome achieves rapid and efficient DNA replication. *Mol Cell*, 2017, **65**(1): 105-116
- [51] Tubbs A, Sridharan S, van Wietmarschen N, *et al*. Dual roles of poly(dA: dT) tracts in replication initiation and fork collapse. *Cell*, 2018, **174**(5): 1127-1142.e19
- [52] Chagin V O, Casas-Delucchi C S, Reinhart M, *et al*. 4D visualization of replication foci in mammalian cells corresponding to individual replicons. *Nat Commun*, 2016, **7**: 11231
- [53] Miotto B, Ji Z, Struhl K. Selectivity of ORC binding sites and the relation to replication timing, fragile sites, and deletions in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(33): E4810-E4819
- [54] Martin M M, Ryan M, Kim R, *et al*. Genome-wide depletion of replication initiation events in highly transcribed regions. *Genome Res*, 2011, **21**(11): 1822-1832
- [55] Besnard E, Babled A, Lapasset L, *et al*. Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(8): 837-844
- [56] Picard F, Cadoret J C, Audit B, *et al*. The spatiotemporal program of DNA replication is associated with specific combinations of chromatin marks in human cells. *PLoS Genet*, 2014, **10**(5): e1004282
- [57] Cayrou C, Ballester B, Peiffer I, *et al*. The chromatin environment shapes DNA replication origin organization and defines origin classes. *Genome Res*, 2015, **25**(12): 1873-1885
- [58] Mesner L D, Valsakumar V, Karnani N, *et al*. Bubble-chip analysis of human origin distributions demonstrates on a genomic scale significant clustering into zones and significant association with transcription. *Genome Res*, 2011, **21**(3): 377-389
- [59] Petryk N, Kahli M, d'Aubenton-Carafa Y, *et al*. Replication landscape of the human genome. *Nat Commun*, 2016, **7**: 10208
- [60] Macheret M, Halazonetis T D. Intragenic origins due to short G1 phases underlie oncogene-induced DNA replication stress. *Nature*, 2018, **555**(7694): 112-116
- [61] Hansen R S, Thomas S, Sandstrom R, *et al*. Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(1): 139-144
- [62] Dellino G I, Cittaro D, Piccioni R, *et al*. Genome-wide mapping of human DNA-replication origins: levels of transcription at ORC1 sites regulate origin selection and replication timing. *Genome Res*, 2013, **23**(1): 1-11
- [63] Wu X, Liu Y, d'Aubenton-Carafa Y, *et al*. Genome-wide measurement of DNA replication fork directionality and quantification of DNA replication initiation and termination with Okazaki fragment sequencing. *Nat Protoc*, 2023, **18**(4): 1260-1295
- [64] Yu Y, Arora A, Min W, *et al*. EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to [(3)H]thymidine uptake for *in vitro* measurement of mice T-cell proliferations. *J Immunol Methods*, 2009, **350**(1/2): 29-35
- [65] Hyrien O. Peaks cloaked in the mist: the landscape of mammalian replication origins. *J Cell Biol*, 2015, **208**(2): 147-160
- [66] Cayrou C, Coulombe P, Vigneron A, *et al*. Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res*, 2011, **21**(9): 1438-1449
- [67] Taylor J H. Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster. *J Biophys Biochem Cytol*, 1960, **7**(3): 455-464
- [68] Stubblefield E. Analysis of the replication pattern of Chinese hamster chromosomes using 5-bromodeoxyuridine suppression of 33258 Hoechst fluorescence. *Chromosoma*, 1975, **53**(3): 209-221
- [69] Nakamura H, Morita T, Sato C. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Exp Cell Res*, 1986, **165**(2): 291-297
- [70] Mills A D, Blow J J, White J G, *et al*. Replication occurs at discrete foci spaced throughout nuclei replicating *in vitro*. *J Cell Sci*, 1989, **94** (Pt 3): 471-477
- [71] Pardoll D M, Vogelstein B, Coffey D S. A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell*, 1980, **19**(2): 527-536
- [72] Cook P R. The organization of replication and transcription. *Science*, 1999, **284**(5421): 1790-1795
- [73] Hozák P, Cook P R. Replication factories. *Trends Cell Biol*, 1994, **4**(2): 48-52
- [74] Lieberman-Aiden E, van Berkum N L, Williams L, *et al*. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 2009, **326**(5950): 289-293
- [75] Dixon J R, Selvaraj S, Yue F, *et al*. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 2012, **485**(7398): 376-380

- [76] Rao S S P, Huntley M H, Durand N C, *et al.* A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, 2014, **159**(7): 1665-1680
- [77] Hiratani I, Ryba T, Itoh M, *et al.* Genome-wide dynamics of replication timing revealed by *in vitro* models of mouse embryogenesis. *Genome Res*, 2010, **20**(2): 155-169
- [78] Nordman J, Orr-Weaver T L. Regulation of DNA replication during development. *Development*, 2012, **139**(3): 455-464
- [79] Dileep V, Ay F, Jiao S, *et al.* Topologically associating domains and their long-range contacts are established during early G1 coincident with the establishment of the replication-timing program. *Genome Res*, 2015, **25**(8): 1104-1113
- [80] Ryba T, Hiratani I, Lu J, *et al.* Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Res*, 2010, **20**(6): 761-770
- [81] Guan Z, Hughes C M, Kosiyatrakul S, *et al.* Decreased replication origin activity in temporal transition regions. *J Cell Biol*, 2009, **187**(5): 623-635
- [82] Miura H, Takahashi S, Poonperm R, *et al.* Single-cell DNA replication profiling identifies spatiotemporal developmental dynamics of chromosome organization. *Nat Genet*, 2019, **51**(9): 1356-1368
- [83] Pope B D, Ryba T, Dileep V, *et al.* Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature*, 2014, **515**(7527): 402-405
- [84] Emerson D J, Zhao P A, Cook A L, *et al.* Cohesin-mediated loop anchors confine the locations of human replication origins. *Nature*, 2022, **606**(7915): 812-819
- [85] Wu J, Liu Y, Zhangding Z, *et al.* Cohesin maintains replication timing to suppress DNA damage on cancer genes. *Nat Genet*, 2023, **55**(8): 1347-1358
- [86] Liu Y, Chen S, Wang S, *et al.* Transcriptional landscape of the human cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(13): 3473-3478
- [87] Bruno F, Coronel-Guisado C, González-Aguilera C. Collisions of RNA polymerases behind the replication fork promote alternative RNA splicing in newly replicated chromatin. *Mol Cell*, 2024, **84**(2): 221-233.e6
- [88] Jiao S, Chakraborty A, Dileep V, *et al.* Identifying *cis* elements for spatiotemporal control of mammalian DNA replication. *Cell*, 2019, **176**(4): 816-830.e18
- [89] Nagano T, Lubling Y, Várnai C, *et al.* Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution. *Nature*, 2017, **547**(7661): 61-67
- [90] García-Muse T, Aguilera A. Transcription-replication conflicts: how they occur and how they are resolved. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, **17**(9): 553-563
- [91] Gómez-González B, Aguilera A. Transcription-mediated replication hindrance: a major driver of genome instability. *Genes Dev*, 2019, **33**(15/16): 1008-1026
- [92] Zeman M K, Cimprich K A. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol*, 2014, **16**: 2-9
- [93] 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**(6): 966-977
- [94] Wilson T E, Arlt M F, Park S H, *et al.* Large transcription units unify copy number variants and common fragile sites arising under replication stress. *Genome Res*, 2015, **25**(2): 189-200
- [95] Glover T W, Berger C, Coyle J, *et al.* DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet*, 1984, **67**(2): 136-142
- [96] Corazzi L, Ionasz V S, Andrejev S, *et al.* Linear interaction between replication and transcription shapes DNA break dynamics at recurrent DNA break Clusters. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 3594
- [97] Wei P C, Chang A N, Kao J, *et al.* Long neural genes harbor recurrent DNA break clusters in neural stem/progenitor cells. *Cell*, 2016, **164**(4): 644-655
- [98] Wei X, Samarabandu J, Devdhar R S, *et al.* Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science*, 1998, **281**(5382): 1502-1506
- [99] Hamperl S, Boccek M J, Saldivar J C, *et al.* Transcription-replication conflict orientation modulates R-loop levels and activates distinct DNA damage responses. *Cell*, 2017, **170**(4): 774-786.e19
- [100] Stoy H, Zwicky K, Kuster D, *et al.* Direct visualization of transcription-replication conflicts reveals post-replicative DNA: RNA hybrids. *Nat Struct Mol Biol*, 2023, **30**(3): 348-359
- [101] Kumar C, Batra S, Griffith J D, *et al.* The interplay of RNA: DNA hybrid structure and G-quadruplexes determines the outcome of R-loop-replisome collisions. *eLife*, 2021, **10**: e72286
- [102] Chen Y H, Keegan S, Kahli M, *et al.* Transcription shapes DNA replication initiation and termination in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, **26**(1): 67-77
- [103] Nakatani T, Schauer T, Altamirano-Pacheco L, *et al.* Emergence of replication timing during early mammalian development. *Nature*, 2024, **625**(7994): 401-409
- [104] Cadoret J C, Meisch F, Hassan-Zadeh V, *et al.* Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(41): 15837-15842
- [105] Sequeira-Mendes J, Díaz-Uriarte R, Apedaile A, *et al.* Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells. *PLoS Genet*, 2009, **5**(4): e1000446
- [106] Karnani N, Taylor C M, Malhotra A, *et al.* Genomic study of replication initiation in human chromosomes reveals the influence of transcription regulation and chromatin structure on origin selection. *Mol Biol Cell*, 2010, **21**(3): 393-404
- [107] Burke T W, Cook J G, Asano M, *et al.* Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1. *J Biol Chem*, 2001, **276**(18): 15397-15408
- [108] Iizuka M, Stillman B. Histone acetyltransferase HBO1 interacts

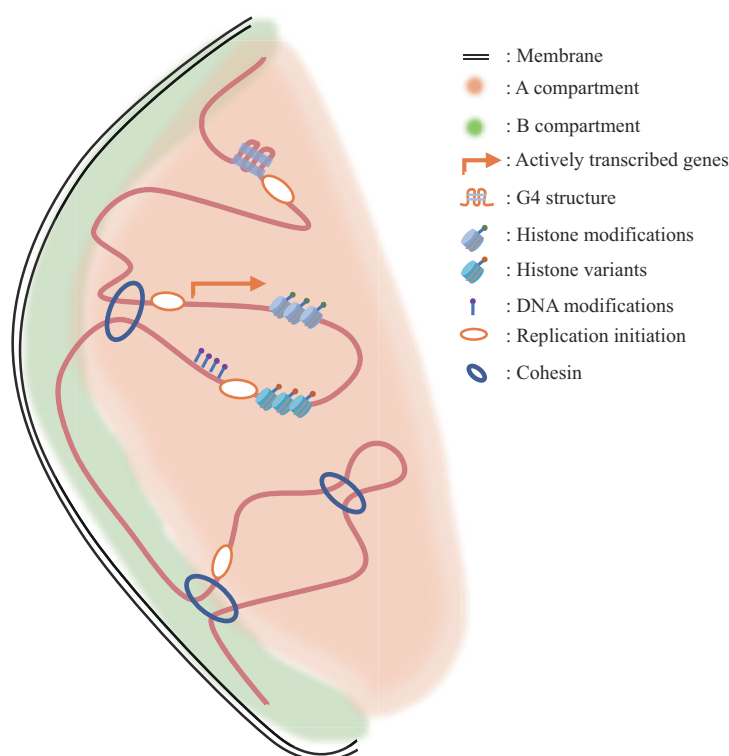
- with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem*, 1999, **274**(33): 23027-23034
- [109] Iizuka M, Matsui T, Takisawa H, *et al.* Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(3): 1098-1108
- [110] Miotto B, Struhl K. HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1. *Genes Dev*, 2008, **22**(19): 2633-2638
- [111] Miotto B, Struhl K. HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin. *Mol Cell*, 2010, **37**(1): 57-66
- [112] Wong P G, Glozak M A, Cao T V, *et al.* Chromatin unfolding by Cdt1 regulates MCM loading *via* opposing functions of HBO1 and HDAC11-geminin. *Cell Cycle*, 2010, **9**(21): 4351-4363
- [113] Long H, Zhang L, Lv M, *et al.* H2A. Z facilitates licensing and activation of early replication origins. *Nature*, 2020, **577**(7791): 576-581
- [114] Aparicio J G, Viggiani C J, Gibson D G, *et al.* The Rpd3-Sin3 histone deacetylase regulates replication timing and enables intra-S origin control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(11): 4769-4780
- [115] Knott S R V, Viggiani C J, Tavaré S, *et al.* Genome-wide replication profiles indicate an expansive role for Rpd3L in regulating replication initiation timing or efficiency, and reveal genomic loci of Rpd3 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, 2009, **23**(9): 1077-1090
- [116] Yoshida K, Bacal J, Desmarais D, *et al.* The histone deacetylases sir2 and rpd3 act on ribosomal DNA to control the replication program in budding yeast. *Mol Cell*, 2014, **54**(4): 691-697
- [117] Vouzas A E, Gilbert D M. Mammalian DNA replication timing. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2021, **13**(7): a040162
- [118] Baylin S B, Jones P A. A decade of exploring the cancer epigenome —biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*, 2011, **11**: 726-734
- [119] Bartke T, Vermeulen M, Xhemalce B, *et al.* Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell*, 2010, **143**(3): 470-484
- [120] Wu R, Wang Z, Zhang H, *et al.* H3K9me3 demethylase Kdm4d facilitates the formation of pre-initiative complex and regulates DNA replication. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(1): 169-180
- [121] Du Q, Smith G C, Luu P L, *et al.* DNA methylation is required to maintain both DNA replication timing precision and 3D genome organization integrity. *Cell Rep*, 2021, **36**(12): 109722
- [122] Hayano M, Kanoh Y, Matsumoto S, *et al.* Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast. *Genes Dev*, 2012, **26**(2): 137-150
- [123] Hiraga S I, Alvino G M, Chang F, *et al.* Rif1 controls DNA replication by directing Protein Phosphatase 1 to reverse Cdc7-mediated phosphorylation of the MCM complex. *Genes Dev*, 2014, **28**(4): 372-383
- [124] Hiraga S I, Monerawela C, Katou Y, *et al.* Budding yeast Rif1 binds to replication origins and protects DNA at blocked replication Forks. *EMBO Rep*, 2018, **19**(9): e46222
- [125] Foti R, Gnan S, Cornacchia D, *et al.* Nuclear architecture organized by Rif1 underpins the replication-timing program. *Mol Cell*, 2016, **61**(2): 260-273
- [126] Seller C A, O'Farrell P H. Rif1 prolongs the embryonic S phase at the *Drosophila* mid-blastula transition. *PLoS Biol*, 2018, **16**(5): e2005687
- [127] Klein K N, Zhao P A, Lyu X, *et al.* Replication timing maintains the global epigenetic state in human cells. *Science*, 2021, **372**(6540): 371-378
- [128] Hsieh T H S, Weiner A, Lajoie B, *et al.* Mapping nucleosome resolution chromosome folding in yeast by micro-C. *Cell*, 2015, **162**(1): 108-119
- [129] Shao Y, Lu N, Wu Z, *et al.* Creating a functional single-chromosome yeast. *Nature*, 2018, **560**(7718): 331-335
- [130] Finn E H, Misteli T. Molecular basis and biological function of variability in spatial genome organization. *Science*, 2019, **365**(6457): eaaw9498

Multilayered Regulation of The Eukaryotic DNA Replication*

ZHANG-DING Zheng-Rong**, LIU Yang**, LIU Xu-Hao, HU Jia-Zhi***

(PKU-THU Center for Life Sciences, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Graphical abstract



Abstract DNA replication is a fundamental DNA metabolism process in living organisms. In human cells, thousands of DNA replication origins are activated simultaneously within the chromatin environment to initiate the replication process and eventually complete genome duplication. This process is regulated by the chromatin environment and coordinated with other chromatin metabolism events, ensuring accurate inheritance of genomic and epigenetic information. With the rapid development of research techniques and the massive accumulation of research data, the systematic understanding of DNA replication in eukaryotic cells, especially in mammals, within complex chromatin environments is a future research trend. Here, we review the multilayered regulatory modes of DNA replication from initiation to termination in the chromatin environment, offering insights for future research.

Key words DNA replication, chromatin environment, multi-levels of regulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0284

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32122018, 323B2010).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-10-62744611, E-mail: hujz@pku.edu.cn

Received: July 1, 2024 Accepted: August 23, 2024