

增强子 RNA 研究现状

程霄¹, 杨琼², 谭镇东¹, 谭娅^{1,4}, 蒲红州³, 赵雪¹, 张顺华¹, 朱砾¹

1. 四川农业大学动物科技学院, 成都 611130;
2. 成都农业科技职业学院, 成都 6111305;
3. 四川省南江县农业局, 巴中 635600;
4. 贵州省畜牧兽医研究所, 贵阳 550005

摘要: 增强子是真核生物基因表达调控的主要顺式作用元件, 能有效促进基因表达。活化的增强子可以转录生成增强子 RNA (enhancer RNAs, eRNAs), 其合成受到信号系统和信号转录因子的约束。eRNAs 与其他转录本(如 lncRNAs 和 mRNAs)相比, 其长度更短、稳定性更差、组织特异性更强。此外, eRNAs 对增强子与启动子之间的染色质环(looping)的形成和稳定有一定的作用, 并能促进靶基因的表达。目前, 越来越多的研究发现 eRNAs 在发育和疾病发生等生物学过程中扮演着重要角色, 但是其功能研究一直进展缓慢, 调控机制尚不清楚。本文概述了 eRNAs 的特征、研究方法和功能特性, 探讨了 eRNAs 作为潜在治疗靶标的可能性, 以期为 eRNAs 的后续研究提供参考。

关键词: 增强子 RNA; 转录本; 染色质环; 功能特性

The current research status of enhancer RNAs

Xiao Cheng¹, Qiong Yang², Zhendong Tan¹, Ya Tan^{1,4}, Hongzhou Pu³, Xue Zhao¹, Shunhua Zhang¹, Li Zhu¹

1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;
2. Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Chengdu Agricultural College, Chengdu 611305, China;
3. Agricultural Bureau of Nanjiang Sichuan Province, Bazhong 635600, China;
4. Animal Husbandry and Veterinary Institute of Guizhou Province, Guiyang 550005, China

Abstract: Enhancers are key *cis*-acting gene regulatory elements in eukaryotes, which can effectively promote the expression of target genes. Emerging evidence showed that enhancers in activation state could be transcribed to enhancer RNAs (eRNAs), the processes of which are regulated by various signaling systems and actions of signal-dependent transcription factors. Compared with the other transcripts (e.g. lncRNA, mRNA), eRNAs have shorter sequences, lower stability, and higher tissue specificity. eRNAs play roles in the initiation or stabilization of enhanc-

收稿日期: 2017-01-11; 修回日期: 2017-07-07

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(编号: 16ZC2838, 2015NZ0013, 2016NZ0089), 四川省科技富民强县专项行动计划项目和四川省教育厅科研项目(编号: 16ZB0038)资助[Supported by the Science and Technology Project of Sichuan Province (Nos.16ZC2838, 2015NZ0013, 2016NZ0089), the Technology Fumin County Special Action Plan Project of Sichuan Province and the Scientific Research Project of Sichuan Province Department of Education (No.16ZB0038)]

作者简介: 程霄, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 591283590@qq.com

通讯作者: 张顺华, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 猪遗传育种。E-mail: 363445986@qq.com

朱砾, 教授, 博士生导师, 研究方向: 猪遗传育种。E-mail: zhuli7508@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.17-010

网络出版时间: 2017/8/9 16:27:49

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170809.1627.002.html>

er-promoter looping, and promote the expression of target genes. Recent studies have further showed that eRNAs have crucial roles in biological processes, such as development and disease initiation and progression. However, functional studies of eRNAs are currently lacking, and the regulatory mechanisms of eRNAs are still uncertain. Herein, we focus on the features, research methods and functional properties of eRNAs, and discuss the possibility of using eRNAs as therapeutic targets. We hope this discussion might provide some insights for further research on eRNAs.

Keywords: enhancer RNAs (eRNAs); transcript; chromatin looping; functional characteristic

基因表达的时空调控模式参与细胞发育、分化以及凋亡等多种生物学过程,特别是调控转录起始的启动子和增强子是决定这类生物学过程的关键调控元件。由于启动子最接近转录起始位点(transcription start sites, TSSs),像“开关”一样控制基因活动。而位于 TSS 位点远端的增强子只有启动子存在时才能发挥作用,但对启动子不具有物种特异性,即其对异源基因也具有增强功能。研究表明,增强子还可以跨基因起作用^[1],甚至可以跨染色体起作用^[2]。目前已有大量研究结果表明,活化的增强子可以转录生成一类非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA) 并将其命名为增强子 RNA (enhancer RNAs, eRNAs)^[1,3,4]。这些 eRNAs 可由增强子单向或者双向转录而来,这种转录机制使得它们在生物体中的作用更加复杂。先前的研究中 eRNAs 被当作转录副产物,但随着深度测序的迅猛发展,越来越多的研究发现 eRNAs 通过一种特殊的方式操纵增强子活性来参与基因的调控,因此可能会成为一个潜在的治疗靶点。但是由于技术手段和工具的限制,人们对 eRNAs 的认识还比较模糊,功能研究也较为滞后。本文主要对 eRNAs 的特征、研究方法以及功能特性进行了概述,并且探讨了 eRNAs 作为治疗疾病潜在的工具和靶标等的可能性,以期更好地理解增强子的转录和生物学功能。

1 增强子

一个单细胞在生物机体发育过程中会产生不同的细胞类型和器官,通过表达不同的基因,从而获得机体不同的形态和功能,这些基因的表达首先是基因组 DNA 募集大量的 RNA 聚合酶 II (RNA Pol II) 转录生成 RNA。除了转录起始点邻近的启动子参与转录外,远距离的增强子也会参与转录^[5]。增强子

是基因组上的一段 DNA 序列,可使启动子发生转录的频率大大增强,从而显著地提高基因的转录效率。在真核生物基因表达调控中,增强子可通过启动子来增加转录,是非常重要的顺式作用元件。与启动子不同的是,增强子能够上调较远距离的基因,但距离的长度并不能确定^[2]。1981 年, Banerji 等^[6]在 SV40 病毒基因区域中发现一段长为 72 bp 的 DNA 片段,可提高报告基因启动子的表达约 200 倍,这也是增强子被首次报道。同样,在动物基因组中也发现了类似的增强子^[7,8]。大量的研究发现增强子在不同的细胞类型和发育系统中扮演着重要的角色^[9-11]。据推测,在人类基因组中存在超过 40 多万可能的增强子^[12,13],其数量远远超过蛋白编码基因,说明增强子在基因调控中的作用高度复杂。增强子可以募集转录辅激活因子[如乙酰转移酶 P300、CREB 结合蛋白(cAMP response element-binding protein (CREB) binding protein, CBP)]和多种转录因子(transcription factors, TFs),并且还存在着特殊的染色质修饰标志,如组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸的单甲基化作用(H3K4me1)与三甲基化作用(H3K4me3)等^[5,14]。此外,通过特定的组蛋白标记可以区分增强子的活性状态^[5,15,16],如静态增强子同时富集 H3K4me1 和 H3K27me3 组蛋白标记,而 H3K27ac 和 H3K4me1 组蛋白标记同时富集在活性增强子上^[17,18]。活化的增强子典型特征是缺乏染色体的基本结构单位——核小体,使增强子具有可接近性,更容易结合转录因子行使其功能^[19]。增强子可以在特殊发育阶段活化并募集大量转录因子调控特定细胞类型基因表达,对细胞类型和细胞谱系定向发育发挥精准的时空调控作用。大量研究表明,增强子序列的变异会改变转录因子的结合位点,造成生物体一些基因错误的表达,最终导致一些疾病如癌症等的发生^[20-22]。

2 eRNAs 概述

2.1 eRNAs 从增强子区域转录而来

活化的增强子被广泛转录并生成一类 ncRNA, 即 eRNAs (图 1A)^[4,23,24]。如在小鼠(*Mus musculus*)皮质神经元(cortical neurons)中, 运用全基因组测序的方法发现依赖刺激的神经元增强子被活化后可转录生成 eRNAs^[23]。此外, eRNAs 在巨噬细胞(macrophages)、乳腺癌细胞(breast cancer cells)或前列腺癌细胞(prostate cancer cells)中大量存在且具有很强的调控功能^[25,26]。增强子被转录时的主要特征是拥有特殊的染色质组蛋白修饰标志: H3K4me1/2 与 H3K4me3 的比值较高、存在 H3K27ac、缺乏 H3K27me3^[27]。eRNAs 的生成过程除了大量的 RNA Pol II 外, 这些基因组结合位点还可募集一些先锋转录因子(pioneer transcription factors, pTFs)^[28]、谱系决定转录因子(lineage-determining transcription factors, LDTFs)以及相关的调节蛋白[如整合因子(integrator)、中介因子(mediator)、组蛋白乙酰转移酶 P300、一般共激活物 CBP 等]^[21,29]。此外, 研究发现在癌症模型中增强子区域通常富集高密度的 TFs、辅酶因子(cofactors, CoFs)和增强子表观修饰标记等, 且该区域附近还出

现了大量高表达的基因, 这个区域被研究者命名为超级增强子(super enhancers, SEs)^[30]。进一步研究表明, 富集在 SEs 部位的这些分子表达水平与普通增强子相比至少要高一个数量级^[30], 生成 eRNAs 的水平更高(图 1B)^[31,32]。

2.2 eRNAs 的合成受信号系统和信号转录因子的约束

一旦细胞发生终末分化或者受外界环境影响时, 细胞信号系统会动态地调节增强子, 从而影响细胞的命运。Heintzman 等^[33]用干扰素 γ (interferon gamma, IFN γ)处理 HeLa 细胞, 发现信号转导与转录激活子 1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)被募集到具有 H3K4me1 组蛋白修饰标志的增强子上, 促使增强子活化, 相比未受刺激的细胞, 其可生成更多的 eRNAs。在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激巨噬细胞的研究中也发现类似的结果^[34]。增强子的转录还受 NF- κ B、p53 以及核受体等信号通路相关转录因子的调节^[21]。Li 等^[35]研究雌二醇(oestradiol, E2)处理过的人乳腺癌细胞, 发现人乳腺癌细胞 E2 结合的雌激素受体 α (oestrogen receptor α , ER- α)会引起增强子区域增加 eRNAs 生成并且上调邻近的编码基因。因此, eRNAs 的合成不

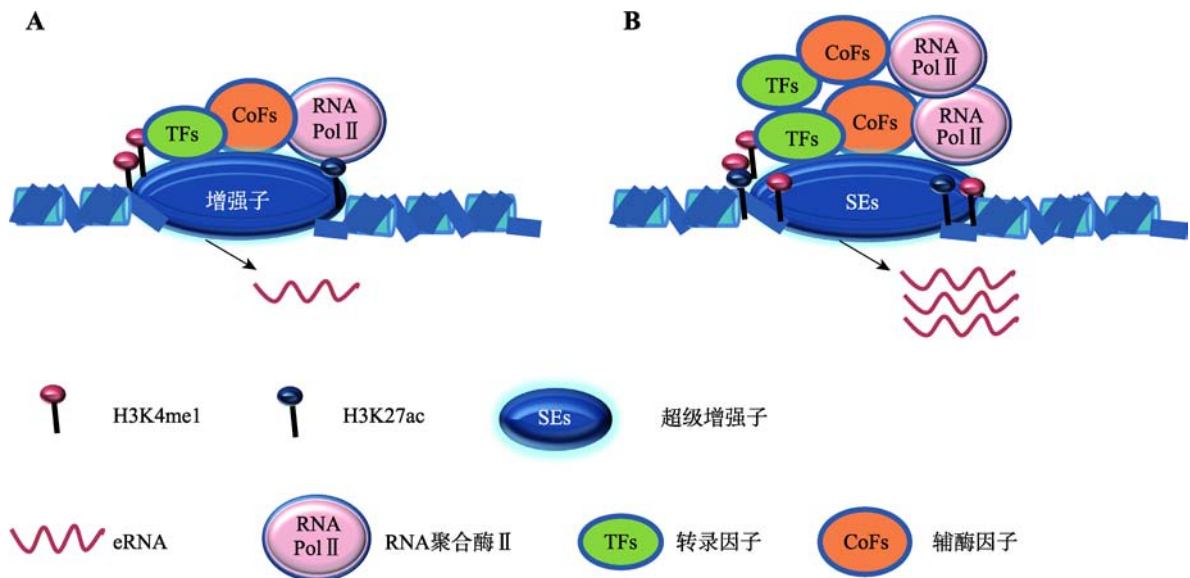


图 1 eRNAs 来源

Fig. 1 The origin of eRNAs

A: 活化的增强子募集 RNA Pol II、TFs 和 CoFs 等因子转录生成 eRNAs; B: 超级增强子募集大量的 RNA Pol II、TFs 和 CoFs 等因子转录生成 eRNAs, 与普通增强子相比, 其具有更高的分子信号水平募集能力, 并生成更多的 eRNAs。

仅受信号系统和信号相关转录因子的调控, 还与邻近基因的表达高度相关^[25,35,36]。

2.3 eRNAs 分类

活化的增强子可以单向或者双向转录生成 eRNAs, 这种方向性转录产生了不同类型的 eRNAs。但是, 由于目前的技术手段还存在局限性, 可能还存在一些未知的 eRNAs 类型没有被鉴定出来, 使得 eRNAs 在现有研究中的分类还不完全。目前发现的 eRNAs 类型主要是非多聚腺苷酸化(polyA⁻)(图 2A)和多聚腺苷酸化(polyA⁺)(图 2B)的 eRNAs^[4,23,37]。两者的主要区别是: (1)长度: polyA⁺eRNAs 比 polyA⁻eRNAs 更长; (2)染色质特征: polyA⁺相对于 polyA⁻eRNAs 拥有较低的 H3K4me1/me3 组蛋白修饰比例; (3)方向性: polyA⁺eRNAs 一般是从增强子区域单向转录而来, 也称 1d-eRNAs, 而从增强子区域双向转录的通常是 polyA⁻eRNAs, 也称 2d-eRNAs, 后一种转录现象比较常见^[4]。Gioacchino 等^[4]推测, 在转录的作用位点存在单向或双向的方向性, 其可能是由于转录位点募集转录前起始复合物(preinitiation-complex, PIC)或其他转录因子产生间接性的结合, 但目前的研究并不能很好地解释这一现象。有趣的是, 最近 Kowalczyk 等^[38]通过敲除 *Nprl3* 基因的启动子结构来研究该基因增强子的变化, 结果表明活化的基因内增强子可以充当组织特异性的启动子的功能。

此外, 该增强子除了转录生成一种短链 polyA⁻eRNAs, 还能转录生成一种长链 polyA⁺多外显子 eRNAs(multiexonic enhancer RNAs, meRNAs), meRNAs 的表达体现了增强子转录机制的复杂性^[38]。

2.4 eRNAs 与其他转录本的区别

由于增强子转录产物多样, 使得 eRNAs 的长度不确定, 但 eRNAs 的长度一般不超过几百核苷酸^[39]。Vucicevic 等^[40]通过分析 GENCODE 数据库中长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNAs), 发现 2695 个 lncRNAs 与具有组织特异性表达特征的 eRNAs 存在一定的重叠区域, 并且这些 RNA 的表达可以预测增强子区域的活性, 这种 RNA 被称为 lncRNAs 或 eRNAs。该结果在一定程度上表明部分 eRNAs 就长度而言可能类似 lncRNAs, 但目前的研究并不能清楚解释这类 eRNAs 与 lncRNAs 的关系。在 TSS 位点运用全基因组测序的方法可以区别 eRNAs 与 lncRNAs、mRNAs 的分子特征, eRNAs 与其他转录本的组蛋白修饰有差异, eRNAs 在 TSS 处拥有高水平的 H3K4me1、低水平的 H3K4me3、低密度的 CpG, 而 mRNAs 和 lncRNAs 在这些方面的水平刚好相反^[37,41]。Lam 等^[36]发现 eRNAs 的半衰期比 mRNAs 和 ncRNAs 短。但是通过对总的 RNA Pol II 富集以及新生 RNA 转录本分析, 发现 eRNAs 与 mRNAs 和 lncRNAs 在 TSS 位点有相似的转录起

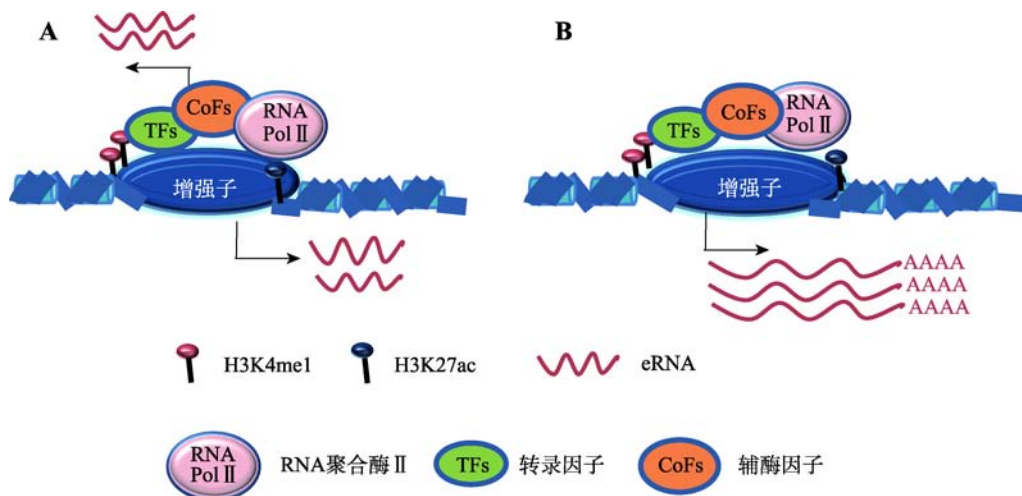


图 2 eRNAs 类型

Fig. 2 The types of eRNAs

A: 增强子双向转录生成非多聚腺苷酸化的 eRNAs (polyA⁻, 2d-eRNAs); B: 增强子单向转录生成多聚腺苷酸化的 eRNAs (polyA⁺, 1d-eRNAs)。

始率^[21]。此外,相比 mRNAs 和 lncRNAs 而言,eRNAs 的表达具有极强的组织和细胞特异性^[21,42]。

2.5 eRNAs 研究方法

eRNAs 是由基因中的增强子序列转录而来,因而对 eRNAs 单个转录本的鉴定和功能研究首先要在全基因组水平上鉴定增强子。最初,Stormo 等^[43]运用转录因子基序匹配法(transcription factor motif matches)初步检测增强子的序列特征(增强子元件),即转录因子结合位点的一段 6~10 bp 长的特异 DNA 基序(DNA motif)。该结合位点具有保守性,通过对整个基因组序列进行扫描式分析,可以获得转录因子基序相互匹配的序列,从而检测增强子^[44,45]。通过对不同物种的同源 DNA 序列进行比对分析,即比较基因组学(comparative genomics)的方法发现脊椎动物不同物种间高度保守的序列富集着大量的增强子元件,这些增强子元件在早期发育阶段时可被活化^[46]。虽然在早期研究中成功地利用比较基因组学识别增强子,但该方法仍存在一定的局线性,如在转基因小鼠实验中检测到成百上千的保守基因序列无增强子功能,这些序列可能行使其他重要转录调控功能。在近期的研究中可通过全基因组测序的方法鉴定增强子,如:(1)通过对增强子相关联的因子(如转录因子、转录辅因子 p300)以及组蛋白修饰(如 H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac)进行染色质免疫共沉淀结合高通量测序(chromatin immunoprecipitation coupled with high through-put sequencing, ChIP-seq)技术预测增强子在基因组中的定位情况^[47,48];(2)通过 DNase 消化结合高通量测序(DNase I coupled to high-throughput sequencing, DNase-seq)对全基因组假定增强子的预测^[49];(3)通过染色体构象俘获技术(chromosome conformation capture, 3C)及三维 DNA 筛选和交联技术(3D DNA selection and ligation, 3D-DSL)研究增强子在行使功能时与启动子的相互作用^[50]。增强子全基因组的鉴定将会为其转录本 eRNAs 的研究提供重要的理论基础。

运用增强子特有的属性进行全基因定位后,活化的增强子大多数情况下会发生转录。因此,eRNAs 的鉴定通常定位到那些具有组蛋白修饰(H3K27ac、H3K4me1)活化的增强子中。全基因组新生转录本测序(global run-on sequencing, GRO-seq)和原位延伸转

录本测序(native elongating transcript sequencing, NET-seq)技术是专门测量新生成 RNA 的方法^[51,52],这将是研究活化的增强子被转录过程的有力工具。

eRNAs 常见研究方法还包括:用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)或锁核酸(locked nucleic acid, LNA)方法干扰 eRNAs 表达^[53];运用 CRISPR/Cas9 系统在基因座中插入或缺失 DNA 片段研究 eRNAs 的功能^[54];利用 RNA 纯化染色质分离结合测序(chromatin isolation by RNA purification coupled with sequencing, ChIRP-seq)研究 eRNAs 在基因组内结合位点及与染色质的交互作用^[55]。然而,对 eRNAs 的研究还面临着一些挑战,如增强子广泛分布在基因组非编码序列中,增加了其鉴定难度。增强子作为顺式作用调控元件相对于被调控基因的位置是高度可变的^[2],并且个别增强子可调控多个基因,说明其作用的复杂性。此外,并不是所有的增强子都转录生成 eRNAs。Kim 等^[23]研究发现仅仅一半左右的基因间增强子转录生成 eRNAs,其他的研究中也发现一定数量活化的增强子检测不到转录本^[56-58]。尽管对 eRNAs 的研究还存在一定局限性,但随着深度测序技术的迅猛发展,人们会更系统和更全面地认识 eRNAs 在发育和疾病发生等生物学过程中的意义(表 1)。

3 eRNAs 功能

由于增强子转录机制的复杂性,出现了不同类型的 eRNAs,并且它们的功能存在不一致性。因此,长期以来人们对于 eRNAs 是否发挥作用存在着争议。

3.1 eRNAs 的噪音论和功能论

RNA Pol II 不断的扫描浏览整个基因组,它们会在基因组中寻找最佳 TSS 位点,因为该位点的转录起始效率是随机位点的 10 000 倍^[60]。具有相对低的转录水平^[39,57]、差的进化保守性^[61]和高的染色质可接近性的活化增强子会转录大量的 eRNAs。这些 eRNAs 可能是 RNA Pol II 随机结合 TSS 位点转录生成的,或许由于增强子和启动子地域位置的相近使得启动子转录时募集的 RNA Pol II 偶尔去碰撞增强子,触发增强子随机转录。这些转录本大多数很难用标准的 RNA 分析方法去检测,因为缺乏功能的任

表 1 eRNAs 常见研究方法

Table 1 The common research methods on eRNAs

目的	方法	方法简介	参考文献
预测增强子	比较基因组学	利用 FASTA、BLAST 和 CLUSTAL W 等序列比对工具, 对不同物种的同源 DNA 序列进行比对分析, 结合增强子元件序列特征, 预测假定的增强子	[46]
新生 RNA 分析	原位延伸转录本测序 (NET-seq)	运用全基因组的方法可直接对活细胞中新生转录本相关的 RNA 聚合酶 进行测序分析	[52]
	全基因组新生转录本测序 (GRO-seq)	该方法通过对细胞进行迅速冷冻, 使细胞核内正在转录的复合体处于冻结状态, 然后提取细胞核, 加入 Run on 缓冲液, 使其重新恢复 RNA 的转录。利用抗 BrdU 抗体提取带 BrdU 标记的新生成 RNA, 用于下一步高通量测序分析	[51]
敲除 RNA 分析	锁核酸(LNA)	主要运用 LNA 特殊的双环核苷酸衍生物结构, 其对细胞质和细胞核中的 DNA、RNA 具有很好的识别能力和强大的亲和力, 进而干扰它们的转录	[53]
染色质状态检测	DNase 消化结合高通量测序 (DNase-seq)	运用高通量测序技术分析全基因组对酶敏感的“染色质打开”区域的 DNase I 超敏感位点进行全基因组假定增强子等调控区域的预测	[19]
基因组定位	染色质免疫共沉淀结合测序 (ChIP-seq)	通过 DNA 片段测序相关的转录因子、共调节因子、转录后修饰以及一些组蛋白标志的变异体等因子来进行基因组定位	[47]
染色体的相互作用	三维 DNA 筛选和交联 (3D-DSL)	在预先选定的基因组区域鉴定染色体的相互作用	[22]
	染色体构象俘获(3C)	主要用来分析染色体在空间结构中相互作用的趋势	[59]
RNA 与染色体的相互作用	RNA 纯化染色质分离结合测序(ChIRP-seq)	通过设计生物素或链霉亲和素探针, 富集目标 RNA 后, 与其共同作用的 DNA 染色体片段就会附到磁珠上, 最后通过 qRT-PCR、测序、免疫印迹法和质谱分析等分析目的 RNA、DNA 和蛋白质之间的关系	[55]

何标志。另外, 这些转录本很快被 RNA 监管系统——RNA 外泌体(exosome, 一种参与细胞内 RNA 降解和加工的核糖核酸外切酶复合物)降解^[62]。因此, 部分增强子转录生成的 eRNAs 可能不具有生物学功能。Kowalczyk 等^[38]发现在基因内增强子区域转录生成的 meRNAs 在形成过程中 RNA Pol II 的参与水平很低, 推断它们可能是增强子转录的副产物, 或者它们的功能还没有被发现^[63]。这些现象说明有些 eRNAs 只是 RNA Pol II 随意碰撞增强子产生的噪音。

此外, eRNAs 的作用还存在另一种争议, 即它自身可以发挥作用。在一些研究中发现增强子的转录会影响靶基因的表达^[64,65]。最近大量的研究运用短发夹 RNA(short hairpin RNA)、siRNA^[35,56,66~68]以及 LNA 等技术^[36,69,70]有效敲除细胞核里的 eRNAs 转录本, 由于 eRNAs 特异地被敲除, 引起同源编码基因的下调。人类基因组中存在极大数量的 eRNAs^[39,57,71], 对于 eRNAs 自身作用的争议, 足以说明 eRNAs 功能的不专一性。尽管一些研究表明

eRNAs 通过它们自身或者其他方式发挥一定作用, 但是还需要大量的证据去阐明它们的生物学作用。

3.2 eRNAs 促使形成染色质环(looping)

染色质互作实验表明增强子与蛋白编码基因的启动子形成了一个染色质环, 并且增强子产生了大量的 eRNAs^[72,73](图 3)。Harismendy 等^[22]发现 *NR1P1* 或者 *GREB1* 基因座增强子区域在 *ERa* 刺激下产生大量 eRNAs, 运用 siRNA 干扰技术降低这些 eRNAs 的表达可导致增强子和启动子之间的作用减弱(图 3), 同时减少了编码基因的活化水平。这种 *ERa* 诱导的 eRNAs 可以对染色质环起到调节作用。eRNAs 的降解将会弱化黏连蛋白(cohesion)对增强子的募集, 并且敲除黏连蛋白会完全破坏染色质环以及基因的活化^[35]。因此, eRNA 可能通过调节、介导中介物和黏连蛋白复合物的互作来促进增强子-启动子的相互作用。这些结果说明 eRNAs 对增强子与启动子之间的染色质环的形成和稳定可能有一定的作

用,但是黏连蛋白对增强子募集的定量效果仍然不太清楚。然而,Hah 等^[63]通过化学试剂抑制 RNA 聚合酶 II 的延伸来减少 eRNAs 和一些编码基因的表达,发现 *P2RY2* 和 *GREB1* 基因座抑制 RNA 聚合酶 II 的延伸对增强子与启动子之间的作用影响不大。造成这些差异结果的原因可能是 siRNA 干扰 eRNAs 表达与化学试剂抑制 RNA 聚合酶 II 延伸进而影响 eRNAs 表达的作用机制不同,或者特异的基因增强子区域反应的机制不同。

3.3 eRNAs 调控基因表达

eRNAs 影响基因表达已有很多报道^[63,74,75],这种影响一般存在两种模式:一种是初期形成的 eRNAs 能够募集它合成部位的蛋白复合物使局部活化(顺式作用);另一种是 eRNAs 可以募集远距离甚至是其他染色体上相关的蛋白复合物发挥远端调控作用(反式作用)(图 3)。研究发现,在雌激素诱导下的 RNA(*FOXCI-eRNA*)可以明显上调同一染色体上的邻近编码基因的表达,说明 *FOXCI-eRNA* 的存在

可以顺式调控同一基因座上其他基因的表达。然而,运用 ChIRP-seq 技术并不能检测到 *FOXCI-eRNA* 对远端编码基因的调控作用^[35]。但是,*KLK3-eRNA* 和 *DRR-eRNA* 的发现为 eRNAs 的反式调控作用提供了有力证据^[56,76]。*KLK3-eRNA* 是人类前列腺癌细胞血管舒缓素相关肽酶 3 (kallikrein related peptidase 3, *KLK3*) 基因增强子区域生成的^[76],*DRR-eRNA* 是小鼠肌肉细胞肌源性分化因子 1(myogenic differentiation 1, *MyoD1*) 基因末端调节区域(distal regulatory regions, *DRR*) 生成的^[56],这两个 eRNAs 一旦降解,会影响邻近编码基因的表达甚至其他染色体上许多基因的表达。另有研究发现,eRNAs 与一般共激活物 CBP 结合调控它们所在的染色体组蛋白的乙酰化,从而调控基因的表达^[77]。然而,这并不能排除这些 eRNAs 除了结合一般共激活物 CBP 还会影响其他一些转录因子、辅活化因子或信号分子,从而间接影响这些靶基因的表达,因此还需要更深入的研究 eRNAs 的反式作用。此外,还发现 *KLK3-eRNA* 和 *DRR-eRNA* 是多聚腺苷酸化的,而 *FOXCI-eRNA* 是

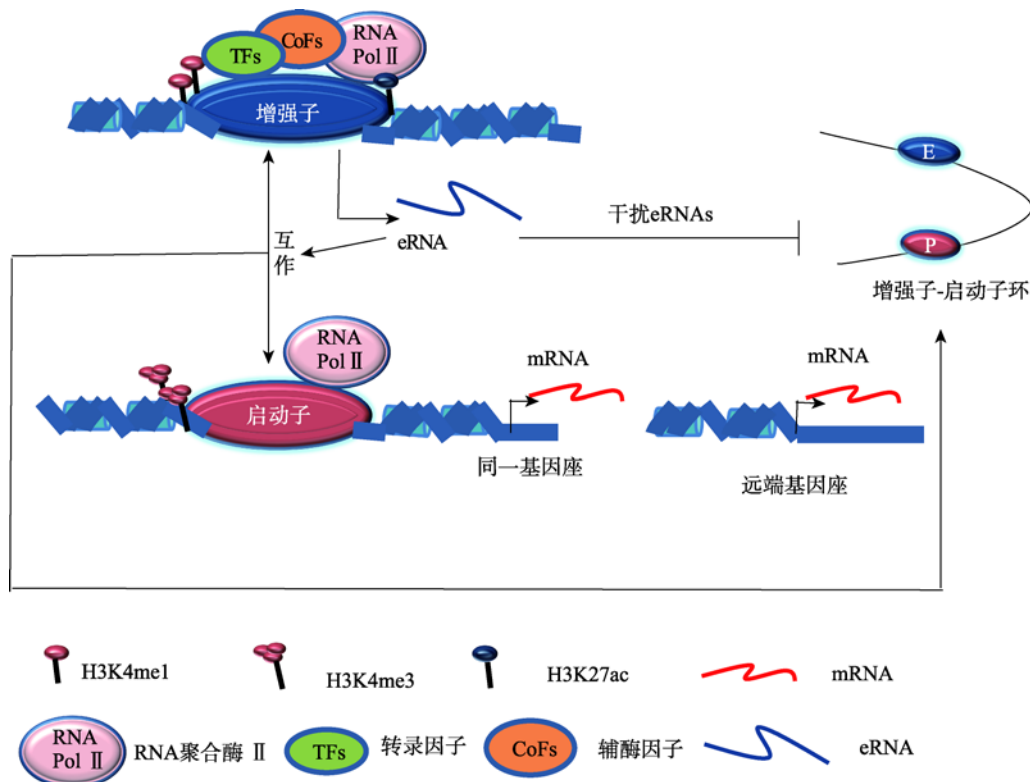


图 3 增强子 RNA 的作用

Fig. 3 The functions of enhancer RNA

非多聚腺苷酸化的,或许这就是它们对基因调控方式有所不同的原因。因此,推测 eRNAs 行使其反式调控作用或许与多聚腺苷酸化和其他转录后加工有关。

4 eRNAs 在疾病中的研究进展

eRNAs 除了在调节基因表达中扮演重要作用外,一些与疾病相关的遗传突变往往发生在增强子区域,使得 eRNAs 的表达水平异常^[78]。因而对 eRNAs 表达水平的干扰将是一种治疗疾病的方法。

4.1 基因变异影响 eRNAs 合成

增强子的活性与增强子转录密切相关,但有研究发现增强子区域存在高密度的基因变异^[31,79,80]。利用全基因组关联分析(genome-wide association studies, GWAS)检测到与疾病相关的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)存在高密度的基因变异^[81]。研究显示,与疾病相关的 SNPs 大于 90% 的机率发生在基因组的非编码部分,说明作为顺式调控元件的增强子也将受其影响^[82]。Consortium 等^[83]分析了成千上万个疾病相关的 SNPs 存在增强子元件。这些现象说明 SNPs 参与的途径可能会扰乱转录因子在增强子的结合位点,改变了 eRNAs 的序列,进而可能影响细胞的重要功能。Heinz 等^[84]运用在体内突变筛选的方法检测了两只品系关系接近的小鼠自然突变现象,结果发现两只小鼠中的增强子自然突变可以影响对谱系测定转录因子的募集和染色质修饰。因此,基因组变异很可能影响增强子的突变和基因表达,进而引起人类特异性疾病的发生。

4.2 基因组不稳定性影响 eRNAs 合成

基因在转录过程中经常会导致 RNA-DNA 二聚体(R-loop)形成,如果它们在基因组中不及时清除,将会影响 DNA 复制叉的移动,引发基因组的不稳定性^[85]。在小鼠干细胞和 B 细胞几个假定的增强子中, RNA 外泌体亚基的损耗使得 eRNAs 生成的水平更高,并且该过程伴随着 R-loop 的形成^[86]。该研究暗示 eRNAs 生成的过程可能引起基因组不稳定。此外,研究者发现活化的增强子区域富集着介导 DNA 损伤应答(DNA damage response, DDR)的数个相关因

子,如 DNA 拓扑异构酶、MRE11 蛋白和 DNA 依赖蛋白激酶^[86,87]。同时,DDR 因子也参与 R-loop 形成^[85],这些研究进一步表明增强子转录活性、DNA 结构与基因组不稳定性之间存在复杂相关性。如在哺乳动物 B 细胞中活化诱导胞苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)异位表达可能会造成 B 细胞恶性肿瘤活化,暗示增强子的转录,特别是超级增强子转录时由于 AID 错误靶向将会引起基因组不稳定并伴随恶性疾病发生^[88]。

4.3 eRNAs 的治疗潜力

在疾病诊断和治疗中,对增强子的分析与编码基因的分析同样重要^[89]。在肿瘤疾病的研究中发现增强子和超级增强子往往是突变的热点区域。如在慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia)中,*PAX5* 基因相关增强子区域发生了突变^[90];在急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia)中,*TALI* 基因相关增强子发生了突变^[91]。

运用相应 siRNAs 技术敲除前列腺特异性抗原 PSA(prostate-specific antigen),使 *KLK3* 基因增强子区域 eRNA 的合成受阻,进而使离增强子最近的 *KLK3* 基因和远端的 *KLK2* 基因表达下调,降低前列腺癌细胞增殖速率^[76]。*p53* 基因是重要的抑癌基因,主要通过调控下游基因的表达而影响细胞增殖速率,大多数肿瘤都存在 *p53* 基因的畸变^[92]。最近研究表明,抑制 *p53* 基因结合的增强子活化及 eRNA 的形成,改善 *p53* 依赖的基因表达和细胞周期,从而缓解肿瘤的病情^[67,93]。因此,未来可通过分析恶性疾病相关 eRNAs 来评价疾病治疗效果。

然而,eRNAs 作为潜在的治疗靶点还存在一些限制因素:(1)人类基因组中有成千上万的增强子^[12],发挥作用的增强子和 eRNAs 只是其中的一部分;(2)由于增强子转录机制的多变,生成的 eRNAs 分子可能很短,并且很不稳定,干扰它们出现一定难度;(3)eRNAs 可以调控近距离或者远端基因的表达,如果抑制 eRNAs 的表达可能会引起其他机制的发生;(4)在某些情况下,没有生成 eRNAs 的增强子可能也会发挥功能。尽管 eRNAs 作为潜在的治疗靶点面临诸多限制因素,但是在一些研究中已经验证了 eRNAs 的处理对疾病的改善。随着生物学技术的迅

猛发展,在肿瘤相关疾病中 eRNAs 作为潜在的治疗靶点有望得到普及。

5 展 望

增强子作为重要的调控元件,其在细胞发育和分化过程中通过调控靶向基因精准的时空表达从而影响细胞的命运。大多数增强子会被活化,并且和启动子互作调控基因的表达,生成 eRNAs 的转录单位一般是那些活化的增强子。eRNAs 对增强子与启动子之间的染色质环的形成和稳定有一定的作用,并且可以近距离和远距离的调控一些靶基因的表达。然而,还需要大量的证据去探讨在增强子研究中所遗留的问题,例如:探知没有转录的增强子作用;增强子可以单向或者双向转录生成 eRNAs,探讨这两种转录的不同机制以及 1d-eRNAs 和 2d-eRNAs 的功能差异。在未来研究中或许通过 RNA 监管通路去减缓 eRNAs 衰减的能力,有利于探索那些稳定性极低的 eRNAs^[94]。在活细胞和单细胞水平上深入研究增强子与启动子形成染色质环的作用,包括形成过程、特异性和动态行为,将会更好地定义 eRNAs 在染色质环形成中的调节作用,以及更深入描绘染色质环、eRNAs 和基因调节之间的关系。此外,基于 eRNAs 在细胞类型和状态下的特异性,其可能成为人类疾病诊断和治疗的靶点。转录后修饰因素一般是控制核酸结构和基因组稳定性^[85],深入研究这些因素的相互作用、DDR 途径和增强子转录是阐明增强子区域疾病相关的基因变异和基因组不稳定性性的关键。对增强子转录和 eRNAs 的功能机制探索不能仅仅局限在调控机体发育的基因表达,在人类疾病治疗中应更应深入研究它们的应用潜力。

参考文献(References):

- [1] Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoutte J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC, Hall GF, Wang QB, Bekiranov S, Sementchenko V, Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, Liu XS, Brown M. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet*, 2006, 38(11): 1289–1297. [DOI]
- [2] Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*, 2005, 435(7042): 637–645. [DOI]
- [3] Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, Patel S, Long J, Stern D, Tammana H, Helt G, Sementchenko V, Piccolboni A, Bekiranov S, Bailey DK, Ganesh M, Ghosh S, Bell I, Gerhard DS, Gingeras TR. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science*, 2005, 308(5725): 1149–1154. [DOI]
- [4] Natoli G, Andrau JC. Noncoding transcription at enhancers: general principles and functional models. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 1–19. [DOI]
- [5] Shlyueva D, Stampfel G, Stark A. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(4): 272–286. [DOI]
- [6] Banerji J, Rusconi S, Schaffner W. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 1981, 27(2 pt 1): 299–308. [DOI]
- [7] Gillies SD, Morrison SL, Oi VT, Tonegawa S. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell*, 1983, 33(3): 717–728. [DOI]
- [8] Banerji J, Olson L, Schaffner W. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell*, 1983, 33(3): 729–740. [DOI]
- [9] Bulger M, Groudine M. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*, 2011, 144(3): 327–339. [DOI]
- [10] Levine M. Transcriptional enhancers in animal development and evolution. *Curr Biol*, 2010, 20(17): R754–R763. [DOI]
- [11] Blackwood EM, Kadonaga JT. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*, 1998, 281(5373): 60–63. [DOI]
- [12] Buecker C, Wysocka J. Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics. *Trends Genet*, 2012, 28(6): 276–284. [DOI]
- [13] Xie W, Ren B. Developmental biology. Enhancing pluripotency and lineage specification. *Science*, 2013, 341(6143): 245–247. [DOI]
- [14] Spitz F, Furlong EEM. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(9): 613–626. [DOI]
- [15] Calo E, Wysocka J. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol Cell*, 2013, 49(5): 825–837. [DOI]
- [16] Rivera CM, Ren B. Mapping Human Epigenomes. *Cell*, 2013, 155(1): 39–55. [DOI]

- [17] Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, Boyer LA, Young RA, Jaenisch R. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50): 21931–21936. [DOI]
- [18] Radaig-lesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature*, 2011, 470(7333): 279–283. [DOI]
- [19] Boyle AP, Davis S, Shulha HP, Meltzer P, Margulies EH, Weng ZP, Furey TS, Crawford GE. High-Resolution Mapping and Characterization of Open Chromatin across the Genome. *Cell*, 2008, 132(2): 311–322. [DOI]
- [20] Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, Lee NE, Ahfeldt T, Sachs KV, Li XY, Li H, Kuperwasser N, Ruda VM, Pirruccello JP, Muchmore B, Prokunina-Olsson L, Hall JL, Schadt EE, Morales CR, Lund-Katz S, Phillips MC, Wong J, Cantley W, Racie T, Ejebe KG, Orholm-Melander M, Melander O, Koteliensky V, Fitzgerald K, Krauss RM, Cowan CA, Kathiresan S, Rader DJ. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p-13 cholesterol locus. *Nature*, 2010, 466(7307): 714–719. [DOI]
- [21] Lam MTY, Li WB, Rosenfeld MG, Glass CK. Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(4): 170–182. [DOI]
- [22] Harismendy O, Notani D, Song XY, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, Ren B, Fu XD, Topol EJ, Rosenfeld MG, Frazer KA. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response. *Nature*, 2011, 470(7333): 264–268. [DOI]
- [23] Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*, 2010, 465(7295): 182–187. [DOI]
- [24] De Santa F, Barozzi I, Mietton F, Ghisletti S, Polletti S, Tusi BK, Muller H, Ragoussis J, Wei CL, Natoli G. A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol*, 2010, 8(5): e1000384. [DOI]
- [25] Kaikkonen MU, Spann NJ, Heinz S, Romanoski CE, Allison KA, Stender JD, Chun HB, Tough DF, Prinjha RK, Benner C, Glass CK. Remodeling of the enhancer landscape during macrophage activation is coupled to enhancer transcription. *Mol Cell*, 2013, 51(3): 310–325. [DOI]
- [26] Hah N, Danko CG, Core L, Waterfall JJ, Siepel A, Lis JT, Kraus WL. A rapid, extensive, and transient transcriptional response to estrogen signaling in breast cancer cells. *Cell*, 2011, 145(4): 622–634. [DOI]
- [27] Young MD, Willson TA, Wakefield MJ, Trounson E, Hilton DJ, Blewitt ME, Oshlack A, Majewski IJ. ChIP-seq analysis reveals distinct H3K27me3 profiles that correlate with transcriptional activity. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(17): 7415–7427. [DOI]
- [28] Kuzmich AI, Tyulkina DV, Vinogradova TV, Sverdlov ED. Pioneer transcription factors in normal development and in carcinogenesis. *Bioorg Khim*, 2015, 41(6): 636–643. [DOI]
- [29] Lai F, Gardini A, Zhang AD, Shiekhata R. Integrator mediates the biogenesis of enhancer RNAs. *Nature*, 2015, 525(7569): 399–403. [DOI]
- [30] Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Tong IL, Young RA. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, 2013, 153(2): 307–319. [DOI]
- [31] Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-André V, Sigova AA, Hoke HA, Young RA. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*, 2013, 155(4): 934–947. [DOI]
- [32] Hah N, Benner C, Chong LW, Yu RT, Downes M, Evans RM. Inflammation-sensitive super enhancers form domains of coordinately regulated enhancer RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(3): E297–E302. [DOI]
- [33] Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, Liu H, Zhang XM, Green RD, Lobanenko VV, Stewart R, Thomson JA, Crawford GE, Kellis M, Ren B. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*, 2009, 459(7243): 108–112. [DOI]
- [34] Ostuni R, Piccolo V, Barozzi I, Polletti S, Termanini A, Bonifacio S, Curina A, Prosperini E, Ghisletti S, Natoli G. Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell*, 2013, 152(1–2): 157–171. [DOI]
- [35] Li WB, Notani D, Ma Q, Tanasa B, Nunez E, Chen AY, Merkurjev D, Zhang J, Ohgi K, Song XY, Oh S, Kim HS, Glass CK, Rosenfeld MG. Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature*, 2013, 498(7455): 516–520. [DOI]

- [36] Lam MT, Cho H, Lesch HP, Gosselin D, Heinz S, Tanaka-Oishi Y, Benner C, Kaikkonen MU, Kim AS, Kosaka M, Lee CY, Watt A, Grossman TR, Rosenfeld MG, Evans RM, Glass CK. Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature*, 2013, 498(7455): 511–515. [DOI]
- [37] Koch F, Fenouil R, Gut M, Cauchy P, Albert TK, Zacarias-Cabeza J, Spicuglia S, de la Chapelle AL, Heidemann M, Hintermair C, Eick D, Gut I, Ferrier P, Andrau JC. Transcription initiation platforms and GTF recruitment at tissue-specific enhancers and promoters. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(8): 956–963. [DOI]
- [38] Kowalczyk MS, Hughes JR, Garrick D, Lynch MD, Sharpe JA, Sloane-Stanley JA, McGowan SJ, De Gobbi M, Hosseini M, Vernimmen D, Brown JM, Gray NE, Collavin L, Gibbons RJ, Flint J, Taylor S, Buckle VJ, Milne TA, Wood WG, Higgs DR. Intragenic enhancers act as alternative promoters. *Mol Cell*, 2012, 45(4): 447–458. [DOI]
- [39] Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd M, Chen Y, Zhao XB, Schmidl C, Suzuki T, Ntini E, Arner E, Valen E, Li K, Schwarzfischer L, Glatz D, Raithel J, Lilje B, Rapin N, Bagger FO, Jørgensen M, Andersen PR, Bertin N, Rackham O, Burroughs AM, Baillie JK, Ishizu Y, Shimizu Y, Furuhashi E, Maeda S, Negishi Y, Mungall CJ, Meehan TF, Lassmann T, Itoh M, Kawaji H, Kondo N, Kawai J, Lennartsson A, Daub CO, Heutink P, Hume DA, Jensen TH, Suzuki H, Hayashizaki Y, Müller F, The FANTOM Consortium, Forrest ARR, Carninci P, Rehli M, Sandelin A. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*, 2014, 507(7493): 455–461. [DOI]
- [40] Vučićević D, Corradin O, Ntini E, Scacheri PC, Ørom UA. Long ncRNA expression associates with tissue-specific enhancers. *Cell Cycle*, 2015, 14(2): 253–260. [DOI]
- [41] Ørom UA, Derrien T, Beringer M, Gumireddy K, Gardini A, Bussotti G, Lai F, Zytnicki M, Notredame C, Huang QH, Guigo R, Shiekhattar R. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell*, 2010, 143(1): 46–58. [DOI]
- [42] Cheng JH, Pan DZC, Tsai ZTY, Tsai HK. Genome-wide analysis of enhancer RNA in gene regulation across 12 mouse tissues. *Sci Rep*, 2015, 5: 12648. [DOI]
- [43] Stormo GD. Modeling the specificity of protein-DNA interactions. *Quantitative Biology*, 2013, 1(2): 115–130. [DOI]
- [44] Tjian R. The binding site on SV40 DNA for a T antigen-related protein. *Cell*, 1978, 13(1): 165–179. [DOI]
- [45] Giniger E, Varnum SM, Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, 1985, 40(4): 767–774. [DOI]
- [46] Pennacchio LA, Ahituv N, Moses AM, Prabhakar S, Nobrega MA, Shoukry M, Minovitsky S, Dubchak I, Holt A, Lewis KD, Plajzer-Frick I, Akiyama J, De Val S, Afzal V, Black BL, Couronne O, Eisen MB, Visel A, Rubin EM. *In vivo* enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature*, 2006, 444(7118): 499–502. [DOI]
- [47] Barski A, Cuddapah S, Cui KR, Roh TY, Schones DE, Wang ZB, Wei G, Chepelev I, Zhao KJ. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 2007, 129(4): 823–837. [DOI]
- [48] Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu YT, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu CX, Ching KA, Wang W, Weng ZP, Green RD, Crawford GE, Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 311–318. [DOI]
- [49] Crawford GE, Holt IE, Whittle J, Webb BD, Tai D, Davis S, Margulies EH, Chen YD, Bernat JA, Ginsburg D, Zhou DX, Luo SJ, Vasicek TJ, Daly MJ, Wolfsberg TG, Collins FS. Genome-wide mapping of DNase hypersensitive sites using massively parallel signature sequencing (MPSS). *Genome Res*, 2006, 16(1): 123–131. [DOI]
- [50] Jin FL, Li Y, Dixon JR, Selvaraj S, Ye Z, Lee AY, Yen CA, Schmitt AD, Espinoza C, Ren B. A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells. *Nature*, 2013, 503(7475): 290–294. [DOI]
- [51] Core LJ, Lis JT. Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science*, 2008, 319(5871): 1791–1792. [DOI]
- [52] Mayer A, di Iulio J, Maleri S, Eser U, Vierstra J, Reynolds A, Sandstrom R, Stamatoyannopoulos JA, Churchman LS. Native elongating transcript sequencing reveals human transcriptional activity at nucleotide resolution. *Cell*, 2015, 161(3): 541–554. [DOI]
- [53] Roux BT, Lindsay MA, Heward JA. Knockdown of nuclear-located enhancer RNAs and long ncRNAs using locked nucleic acid GapmeRs. In: Ørom U, ed. *Enhancer RNAs*. New York, NY: Humana Press, 2017, 1468: 11–18. [DOI]
- [54] Andrey G, Spielmann M. CRISPR/Cas9 genome editing in embryonic stem cells. In: Ørom U, ed. *Enhancer RNAs*. New York, NY: Humana Press, 2017, 1468: 221–234. [DOI]

- [55] Chu C, Qu K, Zhong FL, Artandi SE, Chang YH. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Mol Cell*, 2011, 44(4): 667–678. [DOI]
- [56] Mousavi K, Zare H, Dell’Orso S, Grontved L, Gutierrez-Cruz G, Derfoul A, Hager GL, Sartorelli V. eRNAs promote transcription by establishing chromatin accessibility at defined genomic loci. *Mol Cell*, 2013, 51(5): 606–617. [DOI]
- [57] Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue CH, Marinov GK, Khatun J, Williams BA, Zaleski C, Rozowsky J, Röder M, Kokocinski F, Abdelhamid RF, Alioto T, Antoshechkin I, Baer MT, Bar NS, Batut P, Bell K, Bell I, Chakraborty S, Chen X, Chrast J, Curado J, Derrien T, Drenkow J, Dumais E, Dumais J, Duttagupta R, Falconnet E, Fastuca M, Fejes-Toth K, Ferreira P, Foissac S, Fullwood MJ, Gao H, Gonzalez D, Gordon A, Gunawardena H, Howald C, Jha S, Johnson R, Kapranov P, King B, Kingswood C, Luo OJ, Park E, Persaud K, Preall JB, Ribeca P, Risk B, Robyr D, Sammeth M, Schaffer L, See LH, Shahab A, Skancke J, Suzuki AM, Takahashi H, Tilgner H, Trout D, Walters N, Wang HE, Wrobel J, Yu YB, Ruan XA, Hayashizaki Y, Harrow J, Gerstein M, Hubbard T, Reymond A, Antonarakis SE, Hannon G, Giddings MC, Ruan YJ, Wold B, Carninci P, Guigó R, Gingeras TR. Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 2012, 489(7414): 101–108. [DOI]
- [58] Zhu Y, Sun L, Chen Z, Whitaker JW, Wang T, Wang W. Predicting enhancer transcription and activity from chromatin modifications. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(22): 10032–10043. [DOI]
- [59] Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. Capturing chromosome conformation. *Science*, 2002, 295(5558): 1306–1311. [DOI]
- [60] Struhl K. Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(2): 103–105. [DOI]
- [61] Villar D, Berthelot C, Aldridge S, Rayner TF, Lukk M, Pignatelli M, Park TJ, Deaville R, Erichsen JT, Jasinska AJ, Turner JM, Bertelsen MF, Murchison EP, Flicek P, Odom DT. Enhancer evolution across 20 mammalian species. *Cell*, 2015, 160(3): 554–566. [DOI]
- [62] Wyers F, Rougemaille M, Badis G, Rousselle JC, Dufour ME, Boulay J, Régnault B, Devaux F, Namane A, Séraphin B, Libri D, Jacquier A. Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell*, 2005, 121(5): 725–737. [DOI]
- [63] Hah N, Murakami S, Nagari A, Danko CG, Kraus WL. Enhancer transcripts mark active estrogen receptor binding sites. *Genome Res*, 2013, 23(8): 1210–1223. [DOI]
- [64] Ho YG, Elefant F, Liebhaber SA, Cooke NE. Locus control region transcription plays an active role in long-range gene activation. *Mol Cell*, 2006, 23(3): 365–375. [DOI]
- [65] Ling JH, Ainol L, Zhang L, Yu XP, Pi WH, Tuan D. HS2 enhancer function is blocked by a transcriptional terminator inserted between the enhancer and the promoter. *J Biol Chem*, 2004, 279(49): 51704–51713. [DOI]
- [66] Alvarez-Dominguez JR, Hu WQ, Yuan BB, Shi JH, Park SS, Gromatzky AA, Van Oudenaarden A, Lodish HF. Global discovery of erythroid long noncoding RNAs reveals novel regulators of red cell maturation. *Blood*, 2014, 123(4): 570–581. [DOI]
- [67] Melo CA, Drost J, Wijchers PJ, van de Werken H, de Wit E, Oude Vrielink JAF, Elkon R, Melo SA, Léveillé N, Kalluri R, de Laat W, Agami R. eRNAs are required for p53-dependent enhancer activity and gene transcription. *Mol Cell*, 2013, 49(3): 524–535. [DOI]
- [68] Pnueli L, Rudnizky S, Yosefzon Y, Melamed P. RNA transcribed from a distal enhancer is required for activating the chromatin at the promoter of the gonadotropin α -subunit gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(14): 4369–4374. [DOI]
- [69] Ilott NE, Heward JA, Roux B, Tsitsiou E, Fenwick PS, Lenzi L, Goodhead I, Hertz-Fowler C, Heger A, Hall N, Donnelly LE, Sims D, Lindsay MA. Long non-coding RNAs and enhancer RNAs regulate the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human monocytes. *Nat Commun*, 2014, 5: 3979. [DOI]
- [70] Onodera CS, Underwood JG, Katzman S, Jacobs F, Greenberg D, Salama SR, Haussler D. Gene isoform specificity through enhancer-associated antisense transcription. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43511. [DOI]
- [71] Arner E, Daub CO, Vitting-Seerup K, Andersson R, Lilje B, Drabløs F, Lennartsson A, Rønnerblad M, Hrydziuszko O, Vitezic M, Freeman TC, Alhendi AMN, Arner P, Axton R, Baillie JK, Beckhouse A, Bodega B, Briggs J, Brombacher F, Davis M, Detmar M, Ehrlund A, Endoh M, Eslami A, Fagiolini M, Fairbairn L, Faulkner GJ, Ferrai C, Fisher ME, Forrester L, Goldowitz D, Guler R, Ha T, Hara M, Herlyn M, Ikawa T, Kai C, Kawamoto H, Khachigian LM, Klinken SP, Kojima S, Koseki H, Klein S, Mejhert N, Miyaguchi K, Mizuno Y, Morimoto M, Morris KJ,

- Mummery C, Nakachi Y, Ogishima S, Okada-Hatakeyama M, Okazaki Y, Orlando V, Ovchinnikov D, Passier R, Patrikakis M, Pombo A, Qin XY, Roy S, Sato H, Savvi S, Saxena A, Schwegmann A, Sugiyama D, Swoboda R, Tanaka H, Tomoiu A, Winteringham LN, Wolvetang E, Yanagi-Mizuochi C, Yoneda M, Zabierowski S, Zhang P, Abugessaisa I, Bertin N, Diehl AD, Fukuda S, Furuno M, Harshbarger J, Hasegawa A, Hori F, Ishikawa-Kato S, Ishizu Y, Itoh M, Kawashima T, Kojima M, Kondo N, Lizio M, Meehan TF, Mungall CJ, Murata M, Nishiyori-Sueki H, Sahin S, Nagao-Sato S, Severin J, de Hoon MJ, Kawai J, Kasukawa T, Lassmann T, Suzuki H, Kawaji H, Summers KM, Wells C, FANTOM Consortium, Hume DA, Forrest AR, Sandelin A, Carninci P, Hayashizaki Y. Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. *Science*, 2015, 347(6225): 1010–1014. [DOI]
- [72] Yin CL, Benner C, Mansson R, Heinz S, Miyazaki K, Miyazaki M, Chandra V, Bossen C, Glass CK, Murre C. Global changes in nuclear positioning of genes and intra- and inter-domain genomic interactions that orchestrate B cell fate. *Nat Immunol*, 2012, 13(12): 1196–1204. [DOI]
- [73] Sanyal A, Lajoie BR, Jain G, Dekker J. The long-range interaction landscape of gene promoters. *Nature*, 2012, 489(7414): 109–113. [DOI]
- [74] Wang D, Garcia-Bassets I, Benner C, Li WB, Su X, Zhou YM, Qiu JS, Liu W, Kaikkonen MU, Ohgi KA, Glass CK, Rosenfeld MG, Fu XD. Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature*, 2011, 474(7351): 390–394. [DOI]
- [75] Schaukowitch K, Joo JY, Liu XH, Watts JK, Martinez C, Kim TK. Enhancer RNA facilitates NELF release from immediate early genes. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 29–42. [DOI]
- [76] Hsieh CL, Fei T, Chen YW, Li TT, Gao YF, Wang XD, Sun T, Sweeney CJ, Lee GSM, Chen SY, Balk SP, Liu XS, Brown M, Kantoff PW. Enhancer RNAs participate in androgen receptor-driven looping that selectively enhances gene activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(20): 7319–7324. [DOI]
- [77] Bose DA, Donahue G, Reinberg D, Shiekhata R, Bonasio R, Berger SL. RNA binding to CBP stimulates histone acetylation and transcription. *Cell*, 2017, 168(1–2): 135–149.e22. [DOI]
- [78] Vahedi G, Kanno Y, Furumoto Y, Jiang K, Parker SCJ, Erdos MR, Davis SR, Roychoudhuri R, Restifo NP, Gadina M, Tang ZH, Ruan YJ, Collins FS, Sartorelli V, O'Shea JJ. Super-enhancers delineate disease-associated regulatory nodes in T cells. *Nature*, 2015, 520(7548): 558–562. [DOI]
- [79] Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, Reynolds AP, Sandstrom R, Qu HZ, Brody J, Shafer A, Neri F, Lee K, Kutayavin T, Stehling-Sun S, Johnson AK, Canfield TK, Giste E, Diegel M, Bates D, Hansen RS, Neph S, Sabo PJ, Heimfeld S, Raubitschek A, Ziegler S, Cotsapas C, Sotoodehnia N, Glass I, Sunyaev SR, Kaul R, Stamatoiyannopoulos JA. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*, 2012, 337(6099): 1190–1195. [DOI]
- [80] Parker SCJ, Stitzel ML, Taylor DL, Orozco JM, Erdos MR, Akiyama JA, van Bueren KL, Chines PS, Narisu N, NISC Comparative Sequencing Program, Black BL, Visel A, Pennacchio LA, Collins FS. Chromatin stretch enhancer states drive cell-specific gene regulation and harbor human disease risk variants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(44): 17921–17926. [DOI]
- [81] Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(2): 95–108. [DOI]
- [82] Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TFC, McCarroll SA, Visscher PM. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 2009, 461(7265): 747–753. [DOI]
- [83] The ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 2012, 489(7414): 57–74. [DOI]
- [84] Heinz S, Romanoski CE, Benner C, Allison KA, Kaikkonen MU, Orozco LD, Glass CK. Effect of natural genetic variation on enhancer selection and function. *Nature*, 2013, 503(7477): 487–492. [DOI]
- [85] Santos-Pereira JM, Aguilera A. R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(10): 583–597. [DOI]
- [86] Pefanis E, Wang JG, Rothschild G, Lim J, Kazadi D, Sun JB, Federation A, Chao J, Elliott O, Liu ZP, Economides AN, Bradner JE, Rabadan R, Basu U. RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell*, 2015, 161(4): 774–789. [DOI]

- [87] Liu ZJ, Merkurjev D, Yang F, Li WB, Oh S, Friedman MJ, Song XY, Zhang F, Ma Q, Ohgi KA, Krones A, Rosenfeld MG. Enhancer activation requires trans-recruitment of a mega transcription factor complex. *Cell*, 2014, 159(2): 358–373. [DOI]
- [88] Qian J, Wang Q, Dose M, Pruett N, Kieffer-Kwon KR, Resch W, Liang GQ, Tang ZH, Mathé E, Benner C, Dubois W, Nelson S, Vian L, Oliveira TY, Jankovic M, Hakim O, Gazumyan A, Pavri R, Awasthi P, Song B, Liu G, Chen LY, Zhu SD, Feigenbaum L, Staudt L, Murre C, Ruan YJ, Robbani DF, Pan-Hammarström Q, Nusse-nzweig MC, Casellas R. B cell super-enhancers and regulatory clusters recruit AID tumorigenic activity. *Cell*, 2014, 159(7): 1524–1537. [DOI]
- [89] Léveillé N, Melo CA, Agami R. Enhancer-associated RNAs as therapeutic targets. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(5): 723–734. [DOI]
- [90] Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, Munar M, Rubio-Pérez C, Jares P, Aymerich M, Baumann T, Beekman R, Belver L, Carrio A, Castellano G, Clot G, Colado E, Colomer D, Costa D, Delgado J, Enjuanes A, Estivill X, Ferrando AA, Gelpí JL, Gonzalez B, González S, González M, Gut M, Hernández-Rivas JM, López-Guerra M, Martín-García D, Navarro A, Nicolás P, Orozco M, Payer AR, Pinyol M, Pisano DG, Puente DA, Queirós AC, Quesada V, Romeo-Casabona CM, Royo C, Royo R, Rozman M, Russiñol N, Salaverría I, Stamatopoulos K, Stunnenberg HG, Tamborero D, Terol MJ, Valencia A, López-Bigas N, Torrents D, Gut I, López-Guillermo A, López-Otín C, Campo E. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 2015, 526(7574): 519–524. [DOI]
- [91] Mansour MR, Abraham BJ, Anders L, Berezovskaya A, Gutierrez A, Durbin AD, Etchin J, Lawton L, Sallan SE, Silverman LB, Loh ML, Hunger SP, Sanda T, Young RA, Look AT. Oncogene regulation. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a non-coding intergenic element. *Science*, 2014, 346(6215): 1373–1377. [DOI]
- [92] Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer*, 1994, 69(3): 409–416. [DOI]
- [93] Levéillé N, Melo CA, Rooijers K, Díaz-Lagares A, Melo SA, Korkmaz G, Lopes R, Akbari Moqadam F, Maia AR, Wijchers PJ, Geeven G, den Boer ML, Kalluri R, de Laat W, Esteller M, Agami R. Genome-wide profiling of p53-regulated enhancer RNAs uncovers a subset of enhancers controlled by a lncRNA. *Nat Commun*, 2015, 6: 6520. [DOI]
- [94] Lubas M, Andersen PR, Schein A, Dziembowski A, Kudla G, Jensen TH. The human nuclear exosome targeting complex is loaded onto newly synthesized RNA to direct early ribonucleolysis. *Cell Rep*, 2015, 10(2): 178–192. [DOI]

(责任编辑: 宋旭)