

环状 RNA 的产生、研究方法及功能

刘旭庆¹, 高宇帮^{1,2}, 赵良真¹, 蔡宇晨¹, 王汇源¹, 苗苗¹,
顾连峰¹, 张航晓¹

1. 福建农林大学林学院, 基础林学与蛋白质组学中心, 福州 350002
2. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002

摘要: 随着高通量测序技术的发展, 环状 RNA (circular RNAs, circRNAs) 逐渐成为非编码 RNA 研究领域的热点。本文系统综述了环状 RNA 侧翼内含子自身互补配对驱动、RNA 结合蛋白驱动以及套索驱动这 3 种环状 RNA 形成模型, 并从高通量文库构建、生物信息学鉴别和常用的实验验证等 3 个方面对环状 RNA 的研究方法进行了介绍。同时, 本文详细归纳了环状 RNA 作为 microRNA (miRNA) 或蛋白的海绵体、调控宿主基因的选择性剪接和表达、翻译成多肽等多种功能。最后通过系统综述植物环状 RNA 的特征及最新研究进展, 为环状 RNA 在植物学中的进一步研究提供了新的视野。

关键词: 环状 RNA; 反向剪接; 选择性剪接; 海绵体

Biogenesis, research methods, and functions of circular RNAs

Xuqing Liu¹, Yubang Gao^{1,2}, Liangzhen Zhao¹, Yuchen Cai¹, Huiyuan Wang¹,
Miao Miao¹, Lianfeng Gu¹, Hangxiao Zhang¹

1. Basic Forestry and Proteomics Research Center, College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: The field of circular non-coding RNAs have been gradually attracted wide attention with the developments of high-throughput sequencing. In this review, we systematically summarize three driving models for circRNAs biogenesis: intron-pairing-driven, RNA binding protein-driven and lariat-driven. In addition, we also briefly introduce the current research methods of circRNAs, which include high-throughput library construction methods, identification through

收稿日期: 2019-04-09; 修回日期: 2019-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31800566), 福建省自然科学基金项目(编号: 2018J01608), 国家重点研发计划项目(编号: 2016YFD0600106、2018YFD0600101), 校国际合作(编号: KXGH17016)和福建省科技创新团队项目(编号: 118/KLA18069A)资助
[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31800566), Fujian Provincial Natural Science Foundation (No. 2018J01608), the National Key R&D Program of China (Nos. 2016YFD0600106, 2018YFD0600101), the International Science and Technology Cooperation and Exchange Fund (No. KXGH17016), and Fujian Provincial Science and Technology Innovation Team Project (No. 118/KLA18069A)]

作者简介: 刘旭庆, 硕士研究生, 专业方向: 林木遗传育种。E-mail: 1752501050@qq.com

通讯作者: 顾连峰, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物信息学和林木遗传改良。E-mail: lfgu@fafu.edu.cn

张航晓, 博士, 讲师, 研究方向: 林木遗传改良。E-mail: hxzhang@fafu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.19-061

网络出版时间: 2019/5/8 13:48:21

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190508.1346.004.html>

bioinformatics and common experimental verification. Here, we also systematically summarize the functions of circRNAs, including microRNA (miRNA) or protein sponges, regulating the alternative splicing (AS) and expression of host genes, and extensive translation. Finally, we provide a systematic characterization and the latest research progress of circRNAs, which provide a new perspective for further studies of circRNAs in plants.

Keywords: circular RNAs; back-splicing; alternative splicing; sponge

环状 RNA(circular RNAs, circRNAs)是一类由 mRNA 前体(pre-mRNA)经反向剪接(back-splicing)形成的共价闭环非编码 RNA^[1]。1976 年, Sanger 等^[2]首先在植物类病毒中发现了共价闭合的环状 RNA。Hsu 等^[3]和 Arnberg 等^[4]分别通过电镜在 HeLa 细胞和酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)线粒体中也发现了类似的环状转录本。1981 年, 在四膜虫(*Tetrahymena*)中发现一种核糖体 RNA (rRNA)基因含有一段能在剪接后形成环状 RNA 的内含子序列^[5]。1988 年, 在古细菌(*Desulfurococcus mobilis*)中发现 23S rRNA 的内含子序列在特定位点发生剪接形成稳定的环状 RNA 并发挥类似转座子的功能^[6]。1991 年, Nigro 等^[7]在研究人类(*Homo sapiens*)抑癌基因 *DCC* (deleted in colorectal carcinomas)时发现了由于不同剪接方式形成的几种环状转录本, 随后陆续在人类 *ETS-1* (*E-twenty-six-1*) 基因^[8,9]、小鼠(*Mus musculus*)*Sry* (*sex-determining region Y*)基因^[10]、大鼠(*Rattus norvegicus*)细胞色素 *P450 2C24* 基因^[11]及人类 *P450 2C18* 基因^[12]中都发现环状 RNA 的存在。2010 年, Burd 等^[13]发现环状 RNA(cANRIL)会影响抑癌基因 *INK4/ARF* 的表达, 表明其可能具有生化和表型效应。

虽然早在几十年前就已发现环状 RNA, 但由于环状 RNA 不具有游离的 3'和 5'末端^[14], 无法通过依

赖于富集 poly (A)的分子技术检测到;同时, 可环化外显子是经反向剪接接合的, 异于经典的线性剪接, 早期转录组分析的映射算法无法直接将测序得到的片段联配到基因组, 使得人们一度认为环状 RNA 只是错误剪接的副产物。随着高通量测序和生物信息学分析技术的发展, 2012 年, Salzman 等^[15]首次指出环状 RNA 是由 mRNA 前体经反向剪接产生的环状转录本, 并且发现其大量存在于人类的不同类型细胞中; Hansen 等^[16]发现环状 RNA 可以作为 microRNA (miRNA)的海绵体, 调控生物体的生长发育过程。自此, 环状 RNA 的研究迅速成为研究的焦点(图 1)。本文系统综述了环状 RNA 的形成机制、研究方法及其主要功能, 概述了植物环状 RNA 的主要特征及最新研究进展, 并对环状 RNA 研究有待进一步提高的几个方面进行了展望。

1 环状 RNA 的形成

根据基因结构注释信息, 环状 RNA 的来源主要有: (1)仅外显子来源的环状 RNA (exon circRNA)^[1,15]; (2)上下游外显子反向剪接且内含子保留形成的外显子-内含子环状 RNA (exon-intron circRNA, EIciRNA)^[17]; (3)仅内含子来源的环状 RNA (circular intronic RNA, ciRNA)^[18]; (4)融合基因来源的环状 RNA

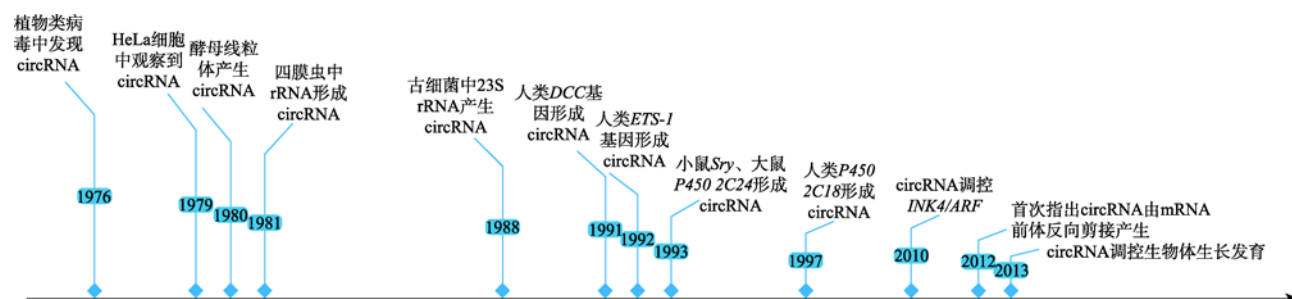


图 1 环状 RNA 研究的关键事件

Fig. 1 Milestones in the history of circRNA researches

(fusion-circRNA, f-circRNA)^[19,20]; (5)聚合酶II (Pol II)的转录通读形成的通读环状 RNA (read-through circRNA, rt-circRNA)^[21]。尽管环状 RNA 的来源不同,但主要是通过头对尾的反向剪接方式产生的,其形成受到顺式和反式作用元件的调控^[22],但对其生物形成机制的研究并不完善。目前报道的驱动环状 RNA 形成的方式主要有:内含子配对驱动、RNA 结合蛋白(RBPs)驱动以及套索驱动环化这3种模型(图2),除此之外,Pol II 的转录、剪接体的活性及 Poly (A)的延伸等因素也会影响环状 RNA 的形成。

1.1 环化驱动模型

1.1.1 内含子配对驱动环化

由于环化外显子两侧的内含子序列互补配对(图2A),使得 mRNA 前体下游 5'剪接供体位点直接与上游 3'剪接受体位点接合形成环状 RNA,所以内

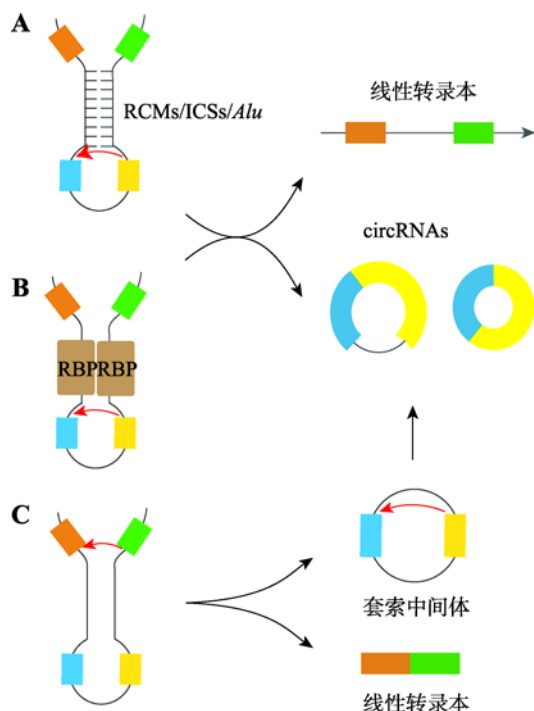


图2 环状 RNA 形成的环化模型

Fig. 2 The main models of circRNA biogenesis

A: 内含子自身互补配对。RCMs/ICSs/Alu 等互补配对元件促进侧翼内含子配对进而环化。B: RNA 结合蛋白驱动。大多数 RNA 结合蛋白通过结合到可环化外显子的侧翼内含子上来促进环化。C: 套索驱动。mRNA 前体剪接时会发生外显子跳接事件,产生包含内含子-外显子的套索中间体,随后该中间体发生反向剪接形成环状 RNA。

含子配对驱动又叫做直接反向剪接模型^[23]。研究发现,含 30~40 nt 的反向互补重复序列的微型内含子(<100 nt)就可促进外显子的环化^[24]。RCMs (reverse complementary matches)、ICSs (intronic complementary sequences)及 Alu 元件等是可环化外显子侧翼内含子上含量丰富的互补配对序列,能有效促进侧翼内含子配对进而环化。例如秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)侧翼内含子上的 RCMs 可促进转录本形成发夹结构,从而促进外显子的环化^[25]。来源于 MLL/AF9 的融合基因 f-circM9,是由于 MLL 和 AF9 基因上存在 ICSs 而有效环化的^[19];在人类 circGCN1L1 的研究中,通过 CRISPR/Cas9 敲除 ICS 序列,则无法检测到 circGCN1L1 的表达^[26],暗示该基序对 circGCN1L1 的生成至关重要。Alu 元件是哺乳动物尤其是人基因中驱动成环的主要方式,已成为分析和预测环状 RNA 形成的重要基础^[1,27,28]。长侧翼内含子有助于外显子环状 RNA 的环化^[17,27],原因可能是 Alu 等互补元件的数量随着内含子长度的增加而增加。

1.1.2 RNA 结合蛋白驱动环化

RNA 结合蛋白伴随 RNA 的生命始终^[29],是促进组织特异性环状 RNA 形成的关键^[30]。RNA 结合蛋白通过结合侧翼内含子序列中的特殊基序参与环状 RNA 的形成(图2B)。在果蝇(*Drosophila melanogaster*)和人基因中,MBL/MBNL1 基因的第2个外显子可形成环状 RNA,其形成依赖于侧翼内含子上 MBL 的特异性结合基序^[31]。NF90/NF110 (nuclear factor 90/110)具有双链 RNA 结合域(double-strand RNA-binding domain, dsRBD),通过结合至 Alu 等互补重复序列而促进环化^[32~34]。HRNPL (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L)通过与可环化外显子的侧翼序列结合来促进环状 RNA 的形成^[35]。相似的,FUS (fused in sarcoma)倾向于结合到环化接合位点两侧的内含子序列来影响环状 RNA 的形成^[36]。QKI (quaking)是一个二聚体,通过与可环化外显子的侧翼内含子结合而促进两翼内含子互相靠近,进而连接成环^[37,38]。RBM20 (RNA-binding motif protein 20)参与小鼠 *Titn* 基因的 I-band 区域的选择性剪接,敲除 RBM20 基因位点后,无法形成与 RBM20 相关的环状 RNA^[39]。

hnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoprotein)和 SR (serine-arginine)蛋白通过与内含子重复序列协作,共同调节环状 RNA 的表达^[40]。上述 RNA 结合蛋白对环状 RNA 的生成起到促进作用,也有 RNA 结合蛋白抑制环化的报道。例如 ADAR1 (adenosine deaminase 1 acting on RNA)通过与双链 RNA 相结合,能将腺嘌呤核苷编辑为次黄嘌呤核苷(即 A-I RNA 编辑)^[41]。Alu 元件是 ADAR 的主要结合靶位点,A-I RNA 编辑可打乱 Alu 等配对元件的稳定性进而抑制环状 RNA 的形成^[25,42,43]。除此之外,DHX9 (DEAH-box helicase 9)是通过与反向互补 Alu 元件相结合,导致 Alu 元件的解旋进而抑制了环状 RNA 的形成^[44]。

1.1.3 套索驱动环化

当 mRNA 前体进行经典的 GU/AG 剪接时,可以发生跨外显子的剪接方式,即外显子跳读(exon skipping),产生包含内含子-外显子的套索中间体,随后该中间体发生反向剪接形成环状 RNA^[23](图 2C)。在人体中普遍存在 GU/AG 经典剪接信号,也存在如 GC/AG 或 AU/AC 等的非经典剪接信号^[21]。然而,这种依赖于 GU/AG 经典剪接信号的驱动模式在水稻(*Oryza sativa*)中却非常少,其普遍存在如 GC/GG、CA/GC 及 GG/AG 等非经典剪接信号^[45]。内含子环状 RNA 是套索驱动模型中的特殊方式,其依赖于 5'剪接位点的 7 nt GU-rich 基序和分支位点(branchpoint site)的 11 nt C-rich 基序,通过聚合酶 II 的转录形成一个套索内含子,最终通过 2', 5'-磷酸二酯键共价连接而环化,接着从内含子 3'端到分支位点的多余序列被降解^[18]。在人和小鼠中发现,内含子环状 RNA 的数量要远远超过外显子环状 RNA 的数量^[46],并且在其他脊椎动物细胞的细胞质中也发现了稳定的内含子环状 RNA^[47]。目前在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、水稻和玉米(*Zea mays*)中的研究表明这种套索结构在植物中也是广泛存在的^[48]。

1.2 其他调控因子

Pol II 的转录伸长率(transcription elongation rates, TER)能影响剪接体的组装和特异性序列的剪

接调控位点,进而影响了剪接事件的发生^[49]。研究发现,环状 RNA 的形成与 Pol II 的转录伸长率成正比^[26],并且抑制 Pol II 的转录终止会促进转录通读进而促进了环状 RNA 的生成^[50],通读环状 RNA 就是由于 Pol II 的通读而产生的^[21]。值得一提的是,另一种常见的聚合酶,即聚合酶 (Pol I),具有催化合成如 tRNA, 5S rRNA 及 snRNA 等小分子 RNA 的特性^[51],于是 Schmidt 等^[52]运用 Pol I 型启动子构建了一种高效的环化体系,该体系的环化效率要明显优于运用 Pol II 型启动子构建的环化体系。最近,Litke 等^[53]基于核酶(ribozyme)自剪切作用将 Pol I 型环化体系的环化效率大大提高,实现了环状 RNA 的适体(apptamer)过表达。研究还发现,抑制核心剪接体如 SF3b/SF3a 复合体的活性,可促进 mRNA 前体反向剪接形成环状 RNA^[50];再者,存在于内含子中的 G-U 摆动配对及 poly (A)的延伸也会抑制环状 RNA 的形成^[24]。在细菌和古细菌中缺少剪接体,其通过特殊的内切酶识别切割 BHB (bulge-helix-bulge)结构,然后通过连接酶形成环状 RNA^[54]。在真核生物如真菌、脊椎动物、植物及人体中,tRNA 前体在成熟过程中通过特异性蛋白也可形成环状 RNA^[55,56]。

2 环状 RNA 的研究方法

2.1 环状 RNA 的鉴别

2.1.1 生物信息学鉴别方法

早期普通 RNA-Seq 文库构建方法无法揭示环状 RNA 的全貌,只能捕捉少量的环状 RNA^[21]。当前采用的环状 RNA 建库方法是:(1)不经过 poly (A)筛选的文库构建方法,去除 rRNA 后进行转录组测序;(2) rRNA 去除并结合 RNase R 处理的文库构建方法^[1,57](图 3A)。然而,一些不含 poly (A)尾且 RNase R 处理后未完全降解的线性转录本通常会干扰环状 RNA 的下游分析^[58]。为解决这一问题,Panda 等^[46]利用 RPAD (RNase R treatment followed by Polyadenylation and poly (A) + RNA Depletion)这一新方法,鉴定到了大量高富集的环状 RNA。另外,研究者根据不同的实验目的,会采用不同的经过优化的 RNA-Seq 文库构建方法。例如 Vo 等^[21]采用的外显子捕获

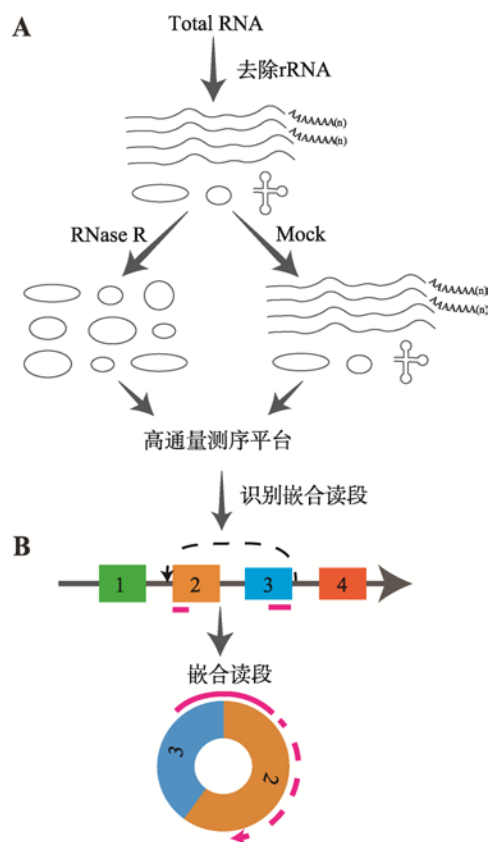


图3 环状 RNA 的文库构建和生物信息学研究方法

Fig. 3 Library construction and bioinformatics methods for circRNA identification

A: RNase R 处理的高通量测序文库构建。B: 基于反向剪接位点测序片段的环状 RNA 识别方法。

技术(exome capture RNA-seq), 利用探针准确捕获到了大量的环状 RNA, 而且保留了线性 mRNA。另外, 超深度非 poly (A) RNA-seq (ultra-deep non-poly- A RNA-seq) 能深层次鉴别到更多的环状 RNA, 包括大量融合环状 RNA^[59]。

环状 RNA 的反向剪接位点(back-splicing junction, BSJ)是鉴别和定量环状 RNA 的关键^[60], 测序后获得的读段(reads)需经过环状 RNA 识别软件进行基因组比对和校正^[61](图 3B)。Hansen 等^[62]对多种环状 RNA 检测工具进行了比较, 发现单个软件往往因为算法的设计问题在某些方面存在着一定的局限性, 建议同时使用 2 个及以上的软件进行环状 RNA 的预测。例如 Ji 等^[30]在识别人、猕猴(*Macaca mulatta*)及小鼠的环状 RNA 时, 同时使用 CIRI2、DCC、MapSplice、CircExplore2 及 CIRI-full 等 5 种软件。值得一提的是, 研究者虽然可以通过二代测序获得大量的反向

剪接位点, 却无法高通量获得环状 RNA 的完整内部信息, 也无法对不同的选择性剪接产物进行精准定量。于是, Zheng 等^[63]提出了基于环状转录本测序中的反向重叠区特征获取全长序列的方法 CIRI-full, 其不仅可以判断双端测序获得的环状序列是否覆盖整个环状 RNA, 而且可以重组每个反向剪接位点产生的多个选择性剪接产物的全长序列, 并精准预测选择性剪接产物的相对丰度。另外, 对于环状 RNA 的选择性剪接事件研究的匮乏, Feng 等^[64]开发的软件 CircSplice, 可以在短时间内特异性地识别环状 RNA 的内部选择性剪接事件, 并发现这些由于选择性剪接产生的环状 RNA 异构体对癌症有一定的调控功能。目前已知的环状 RNA 识别软件超过 20 种, 应用于识别、可视化及组装人、动物、植物等生物体中的环状 RNA^[61,65](表 1)。

随着大量的环状 RNA 被鉴定出来, 急需界面友好的数据库存储并可视化这些环状 RNA 数据, 目前已公布了超过 15 种环状 RNA 的数据库, 包括人、小鼠、拟南芥和水稻等动植物(表 2)。其中与植物环状 RNA 相关的数据库有 5 个, 本实验室建立的 ASmiR 数据库存储了目前常见的几种植物的环状 RNA 数据, 并呈现了 miRNA 靶位点和线性 RNA 及环状 RNA 的选择性剪接之间的相互调控^[80]。

2.1.2 分子生物学鉴别和验证方法

由于环状 RNA 没有游离的 3'和 5'端, 因而无法应用基于 poly (A)的分子生物学技术, 如 RACE (rapid amplification of cDNA end), 也无法通过普通的电泳迁移率和片段大小来区分。目前在实验室中主要有以下几种鉴别方法: (1) RT-PCR 定量法: 针对环状 RNA 的反向剪接位点设计一对发散引物 (divergent primer), 只有环状 RNA 才可得到预期扩增片段。并进一步对该扩增产物进行 Sanger 测序确认环状 RNA 的真实性^[93]。但由于 PCR 方法可能会发生模板的切换或 mRNA 之间的反式剪接 (trans-splicing) 等情况, 一般采用 RNase R 消化线性转录本, 富集环状 RNA 的定量 PCR 方法来鉴别环状转录本^[94]。(2) 探针杂交法: RNase H 是一个可以降解 RNA-DNA 中 RNA 分子的核酸内切酶。当两个短的 DNA 探针杂交至目的 RNA 分子时, 若该 RNA

表 1 环状 RNA 的识别软件

Table 1 The softwares for circRNA identification

工具名称	网址	特点	文献
MapSplice	http://www.netlab.uky.edu/p/bioinfo/MapSplice	标记比对(tag alignment)和剪接推理(splice inference)两步法	[1,66]
find_circ	https://github.com/marvin-jens/find_circ	只需基因组的 fasta 序列, 独立于基因注释信息运行	[68]
CIRCfinder	https://github.com/YangLab/CIRCfinder	识别内含子环状 RNA	[18]
circRNA_finder	https://github.com/orzechoj/circRNA_finder.git	准确性高, 独立于基因注释信息运行	[70]
segemehl	www.bioinf.uni-leipzig.de/Software/segemehl/	能识别环状 RNA, 检测剪接、反式剪接及基因融合事件	[71]
KNIFE	https://github.com/lindaszabo/KNIFE	依赖 Bowtie2 进行多阶段校正, 结合读段映射质量和校正质量进行环状 RNA 的静态建模检测	[73]
DCC	https://github.com/dieterich-lab/DCC	依赖于过滤器和跨重复集合的整合数据, 可以评估环状 RNA 和宿主基因之间的表达量	[75]
Acfs	https://code.google.com/p/acfs/	允许从头测序, 从单端和双端 RNA 数据中准确鉴定环状 RNA 及进行丰度定量	[77]
UROBORUS	http://uroborus.openbioinformatics.org/	基于总 RNA 测序数据, 能精确预测到低表达的环状 RNA, 不能预测内含子环状 RNA 及基因间隔区形成的环状 RNA	[79]
PcircRNA_finder	http://ibi.zju.edu.cn/bioinplant/tools/manual.htm	双末端交叉映射, 精确预测植物中的外显子环状 RNA	[67]
Circseq_cup	http://ibi.zju.edu.cn/bioinplant/	基于反向剪接 RNA-seq 和双末端 RNA-seq 数据, 组装环状 RNA 全长序列	[45]
FUCHS	https://github.com/dieterich-lab/FUCHS	基于长读段测序数据, 分析环状 RNA 内选择性剪接事件, 分析单、双断点事件, 分析环状 RNA 的读取覆盖率	[69]
CIRI-full	https://sourceforge.net/projects/ciri-full/	识别环状 RNA, 全长组装, 定量环状 RNA 的选择性剪接产物	[63]
CircExplorer2	https://github.com/YangLab/CircExplorer2	整合了多种比对算法, 检测环状 RNA 的选择性剪接, 能 de novo 组装环状 RNA 全长转录本	[72]
CIRI2	https://sourceforge.net/projects/ciri/files/CIRI2	基于多种种子匹配策略、最大似然估计模型, 识别反向剪接读段, 能过滤来自重复序列和映射误差的误报	[74]
CircView	http://gb.whu.edu.cn/CircView/ 或 https://github.com/GeneFeng/CircView	根据物种注释信息展现环状 RNA 的结构, 允许用户查看环状 RNA 的调控元件及预测其潜在功能	[76]
PRAPI	http://www.bioinfor.org/bioinfor/tool/PRAPI/	进行环状 RNA 的矢量绘图	[78]
CircSplice	http://gb.whu.edu.cn/CircSplice 或 https://github.com/GeneFeng/CircSplice	特异性识别环状 RNA 内部选择性剪接事件, 可实现环状 RNA 选择性剪接事件的组间差异比较	[64]

分子为线性, 则在 RNase H 消化后电泳出现三条带; 若该 RNA 分子为环状, 则为两条带(一个 DNA 探针时, 同理推测)^[95]。RNA 印迹^[10,95]也是高频率使用的一种方法, 值得注意的是, 探针设计要跨越反向剪接位点(内含子环状 RNA 的探针根据内含子序列设计)。(3)二维变性聚丙烯酰胺凝胶(2D-PAGE)电泳: 环状 RNA 的迁移率比线性 RNA 分子要慢, 在 2D-PAGE 中线性 RNA 沿对角线迁移而环状 RNA 则弧向迁移^[96]。在研究中往往结合以上多种方法来验

证环状 RNA。如 Ghorbani 等^[97]在研究胁迫下玉米的环状 RNA 的表达情况时, 同时使用了 RT-PCR、RNase R、2D-PAGE 及 RNA 印迹等多种方法来鉴别环状 RNA。

2.2 环状 RNA 的功能验证方法

2.2.1 构建环状 RNA 缺陷型突变体

突变体的构建主要有物理诱导、化学诱变及基

表 2 环状 RNA 存放数据库

Table 2 Databases for circRNA deposition

名称	网址	描述	文献
circAtlas	http://circatlas.biols.ac.cn	包括人、猕猴、小鼠、大鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)、野猪(<i>Sus scrofa</i>)、红色原鸡(<i>Gallus gallus</i>)中的环状 RNA 序列信息,查看保守环状 RNA,查询环状 RNA 与 miRNA 或 RBPs 的结合情况等功能	[30]
circBase	http://www.circbase.org/	包含人、小鼠及秀丽隐杆线虫等所有已鉴定的环状 RNA 数据	[82]
CIRCpedia	http://www.picb.ac.cn/rnomics/circpedia	人类环状 RNA 选择性反向剪接和选择性剪接事件	[72]
TSCD	http://gb.whu.edu.cn/TSCD	储存人、小鼠中组织特异性的环状 RNA	[84]
Circ2Traits	http://gyanxet-beta.com/circdb/	环状 RNA 与人类疾病的潜在关联, miRNA-circRNA-mRNA-lncRNA (long non-coding RNA) 互作网络	[86]
CircInteractome	http://circinteractome.nia.nih.gov	在人类环状 RNA 上查询互作蛋白、相关 miRNA 的结合位点	[88]
CircNet	http://circnet.mbc.nctu.edu.tw/	储存人类组织特异性的环状 RNA, circRNA-miRNA-mRNA 互作调控网络	[90]
circRNADb	http://reprod.njmu.edu.cn/circnadb	储存 32 914 种人类外显子环状 RNA, 描述了 46 种具有编码潜力的环状 RNA	[92]
CSCD	http://gb.whu.edu.cn/CSCD	收集了 87 种人类癌症细胞株, 描述了癌症特异性环状 RNA	[81]
CircR2Disease	http://bioinfo.snnu.edu.cn/CircR2Disease/	100 种人类环状 RNA 与 661 种疾病之间的相关性	[83]
MiOncoCirc	https://nguyenjoshvo.github.io/	人类癌症细胞株及肿瘤的环状 RNA, 描述了可作为癌症诊断或治疗的靶点	[21]
AtCircDB	http://genome.sdau.edu.cn/circRNA	储存拟南芥中组织特异性的环状 RNA, 分析 circRNA-miRNA 互作网络	[85]
PlantCircNet	http://bis.zju.edu.cn/plantcircnet/index.php	可视化拟南芥、水稻、大麦(<i>Hordeum vulgare</i> L.)等八种模式植物的 circRNA-miRNA-mRNA 互作网络	[87]
PlantcircBase	http://ibi.zju.edu.cn/plantcircbase/	水稻、拟南芥、玉米、番茄及大麦中的环状 RNA, 预测 circRNA-miRNA-mRNA 互作网络, 环状 RNA 结构可视化	[89]
CircFunBase	http://bis.zju.edu.cn/CircFunBase	收集了超过 7000 种人、小鼠及植物中的功能性环状 RNA, 可视化 circRNA-miRNA 互作网络	[91]
ASmiR	http://forestry.fafu.edu.cn/bioinfor/db/ASmiR	毛竹(<i>Phyllostachys edulis</i>)、水稻、拟南芥等多种植物中 miRNA 靶位点和线性 RNA 之间以及 miRNA 和环状 RNA 的选择性剪接之间的相互调控	[80]

因编辑等, CRISPR/Cas9 就是基因编辑中高效又低成本的一种方法, 已大量运用于人^[98]、动物^[99]、植物^[100]及果蝇^[101]基因的定向精准修饰。Cdr1as 是哺乳动物大脑中高表达的一种环状 RNA, 能吸附 miR-7 和 miR-671。Piwecka 等^[102]利用 CRISPR/Cas9 在小鼠基因组中敲除 *Cdr1as* 基因座, 获得了缺陷型突变体(*Cdr1as*-KO)。研究发现 *Cdr1as* 敲除后, miR-7 的表达量显著降低, 而 miR-671 显著上调。在 *Cdr1as*-KO 小鼠大脑中的进一步研究发现, 由 miR-7 调控的靶基因如 *Fos*、*Nr4as* 及 *Irs2* 等的表达水平升高, 这

暗示了 *Cdr1as* 在行为应激方面的作用。有趣的是, Csy4 是 CRISPR 家族中 Cas9 的同源蛋白, 能切割 RNA 分子且维持 5'端产物的稳定性, Borchardt 等^[103]利用该特性构建了具有 Csy4 识别位点的环状 RNA 过表达体系。目前针对环状 RNA 基因编辑技术在植物中的应用还比较少。

2.2.2 环状 RNA 过表达载体

根据内源外显子环化的原理, 构建环状 RNA 过表达载体, 研究侧翼内含子序列、蛋白因子等对环

化的促进或抑制作用,探索环状 RNA 的功能^[22]。环状 RNA 过表达载体包含可环化外显子和具有反向互补序列的侧翼内含子来促使环化剪接,其转染到细胞中可以主动促进成环。Ashwal-Fluss 等^[31]为了探究环状 RNA 的形成机制,构建了不同长度侧翼内含子序列的 circLuna 和 circMbl 的环状 RNA 过表达载体,发现侧翼内含子对环状 RNA 的形成具有重要作用。Conn 等^[37]通过研究 QKI 对 SMARCA 基因的某一区段形成环状 RNA 的影响时,构建具有荧光蛋白 GFP 和 mCherry 的环状 RNA 过表达载体,探究 QKI 对环状 RNA 形成的影响。

2.2.3 RNA 干扰技术

为验证目的环状 RNA 的功能,可以使用 RNA 干扰技术来有效沉默或抑制环状 RNA 的表达,即由 siRNA/shRNA 与环状 RNA 结合并使之降解^[104,105]。首先在不影响线性 mRNA 的基础上,针对特定的环状 RNA 序列设计跨越反向剪接位点的 siRNA/shRNA,以敲低环状 RNA 的表达,观察其产生的生物效应或表型变化。同时需要针对环状 RNA 的线性宿主基因设计专门的 siRNA/shRNA 进行敲除,确保该生物效应或表型是由所对应的环状 RNA 被干扰后所引起的,经过这两步得到环状 RNA 特有的调控功能的结论。例如,Legnini 等^[106]用 RNA 干扰技术敲低 circ-ZNF609,发现明显抑制了肌细胞的增殖。Zhu 等^[107]通过构建 shRNA 载体敲除与肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)器官形成密切相关的 circPan3,发现 circPan3 在体内参与了免疫细胞介导的肠道干细胞自我更新。

3 环状 RNA 的功能

环状 RNA 在早期被认为是一种剪接副产物,不具有任何功能。随着人们的深入研究,发现环状 RNA 并非只是剪接副产物,其来源广泛、保守、稳定、具有组织特异性,并且在生物体的生长发育过程中扮演着多种功能角色^[1,22,108]。本文从环状 RNA 作为 miRNA 或蛋白的海绵体、调控宿主基因的选择性剪接和表达、翻译成多肽等几个方面描述其功能(图 4)。

3.1 作为 miRNA 或蛋白的海绵体

环状 RNA 上存在 miRNA 的结合位点,可作为 miRNA 的海绵体^[109](图 4A)。例如小鼠 *Sry* 上有 16 个 miR-138 的结合位点;ciRS-7 上含有超过 70 个 miR-7 的结合位点,通过 AGO2 蛋白实现竞争性吸附 miR-7^[110]。在癌症中越来越多的报道表明环状 RNA 充当 miRNA 的海绵体并参与转录调控的功能,如 circRNA-cTFR^[111]、circPSMC3^[112]和 circSETD3^[113]等,其中 circRNA-cTFR 充当 miR-107 的海绵体,促进宿主基因 *TFR* 的表达。研究者分别在水稻^[114]、小麦(*Triticum aestivum* L.)^[115]、番茄^[116]、枸橼(*Poncirus trifoliata* L. Raf.)^[117]及拟南芥^[114]等植物中也发现了一些具有 miRNA 海绵体功能的环状 RNA。但是, Ye 等^[114]发现拟南芥中仅约 5.0% 的环状 RNA 可以预测到 miRNA 的靶位点,而在水稻中该比例也仅为 6.6%。可能原因是,植物中环状 RNA 内部要有足够的 miRNA 结合位点或环状 RNA 的表达量足够高,才能实现对靶基因的调控功能^[114]。另外在水稻中发现 Os08circ16564 存在 OsmiR172 的结合位点,当过表达 Os08circ16564 并保持 OsmiR172 的表达水平不变的情况下,其线性基因的表达水平降低^[93]。

有些环状 RNA 上有一个或者多个 RNA 结合蛋白的结合位点,可作为蛋白分子的海绵体(图 4A)。MBL 能促进 circMbl 的合成,且合成的 circMbl 上存在特异性的 MBL 结合位点^[31]。当 MBL 高表达时,会促进 circMbl 的生成而抑制了线性转录本的表达;并且 circMbl 会与过量的 MBL 结合,使其含量趋于稳定^[31]。circPABPN1 来源于 *PABPN1* 基因, HuR 是调控线性转录本 *PABPN1* 合成的蛋白,对 circPABPN1 的丰度无影响。有趣的是, circPABPN1 能与 HuR 结合,进而显著影响了 HuR 与 *PABPN1* 的结合,使得 *PABPN1* 的表达水平降低^[118]。CircFoxo3 上同时存在 MDM2 (mouse double-minute 2)和 p53 的结合位点, circFoxo3 能促使 MDM2 诱导的 p53 的泛素化,导致 p53 蛋白的整体降解^[119]。最新研究发现, m⁶A (N⁶-methyladenosine)修饰的环状 RNA 能与 m⁶A 识别蛋白 YTHDF2 结合, YTHDF2 通过募集 HRSP12, 介导 RNA 内切核酸酶 RNase P/MRP 复合物降解环状 RNA^[120]。另外,在拟南芥中发现,内含子套索

RNA 能与切割复合物 DCL1/HYL1 结合, 进而抑制了 miRNA 的合成^[121]。

3.2 调控宿主基因的选择性剪接

拟南芥 *SEPALLATA3* (*SEP3*) 基因的第 6 外显子可生成环状 RNA, 该环状 RNA 可强烈结合宿主基因的 DNA 基因座, 形成一个 RNA:DNA 杂合体的 R-loop 结构(图 4B)。该 R-loop 结构可抑制该区段的转录, 于是发生了跨外显子的选择性剪接事件, 促进产生选择性剪接转录本变体 *SEP3.3*, 影响其开花表型^[122]。在毛竹中的数据表明, 在产生环状 RNA 的基因中发生选择性剪接事件的频率显著高于随机选择的基因, 说明环状 RNA 可能调控其线性基因的选择性剪接过程^[123]。

3.3 调控宿主基因的表达

环状 RNA 除了作为 miRNA 或蛋白的海绵体参与调控宿主基因的表达外^[68,110], 还能通过与 RNA

互作参与转录后调控^[17]。Li 等^[17]在人类细胞核中发现 EICiRNA 能与 U1 snRNA 互作形成复合物 EICiRNA-U1 snRNP, 该复合物再与 Pol II 转录复合物相互作用而促进宿主基因的表达(图 4C, 左图)。另外, Zhang 等^[18]通过敲低 *ci-ankrd52*、*ci-mcm5* 和 *ci-sirt7* 这 3 种内含子环状 RNA 的表达, 发现相应的宿主基因表达量都降低了, 说明内含子环状 RNA 能顺式调控宿主基因的表达。环状 RNA 还可以通过线性转录本竞争性剪接, 从而影响宿主基因的表达^[31]。Lu 等^[93]通过构建水稻过表达遗传转化体系, 发现环状 RNA 及它的线性异构体可能抑制宿主基因的转录后表达。环状 RNA 还能通过表观遗传修饰来调控宿主基因的表达。 m^6A 是腺嘌呤重要的甲基化修饰^[124], Zhou 等^[125]在人类细胞中发现了大量 m^6A 修饰的环状 RNA, 该环状 RNA 会影响宿主基因的稳定性(图 4C, 右图)。来源于 *FLII* 基因的环状 RNA(FECR1), 能特异性地与 *FLII* 启动子区域结合, 并招募去甲基酶 TET1 诱导该区域的去甲基化,

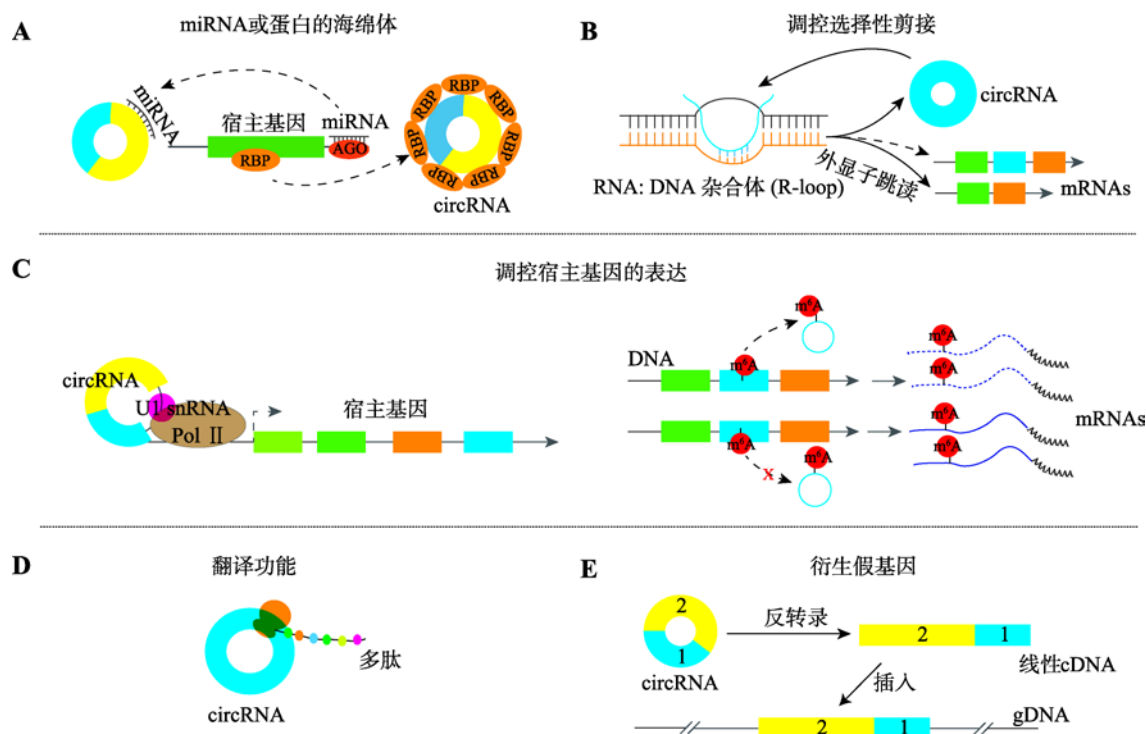


图 4 环状 RNA 的功能

Fig. 4 Main functions of circRNAs

A: 充当 miRNA 或蛋白的海绵体。B: 通过 R-loop 介导调控宿主基因的选择性剪接事件。C: 调控宿主基因的表达。左图为环状 RNA 通过与 U1 snRNA 及 Pol II 转录复合物互作, 进而调控宿主基因的表达; 右图为 m^6A 修饰的环状 RNA 会影响宿主基因的稳定性。D: 翻译功能。环状 RNA 能翻译多肽。E: 衍生假基因。环状 RNA 经反转录衍生假基因, 并整合进基因组。

进而调控靶基因表达^[126]。DNMT1 是哺乳动物 DNA 甲基化维持所必需的关键甲基转移酶, 研究者检测到 DNMT1 参与了 FECR1 诱导 *FLII* 启动子的去甲基化过程, 还发现 FECR1 能与 *DNMT1* 启动子结合, 从而下调 *DNMT1* 的转录^[126]。另外, Wei 等^[127]在拟南芥中鉴定了首个 m⁶A 结合蛋白 ECT2, ECT2 能在细胞核中调节 3' UTR 的修饰, 亦可在细胞质中调节线性 RNA 的稳定性。

3.4 环状 RNA 潜在的翻译功能

环状 RNA 不仅能调控线性转录本的转录, 还能翻译产生蛋白^[106,128](图 4D)。m⁶A 修饰的环状 RNA 可能在转录后调控水平上参与靶基因的转录。Yang 等^[129]发现在人类细胞中的环状 RNA 上存在大量一致性的 m⁶A 基序, 并且在多种蛋白的参与下, 一个 m⁶A 位点便可启动环状 RNA 的翻译。环状 RNA 不仅可以通过 m⁶A 修饰进行翻译, 有研究表明含有 IRES (internal ribosomal entry site) 的环状 RNA 也可以在体内或体外翻译^[130], 在果蝇中还发现一类可利用宿主基因的起始子与核糖体结合而行使翻译功能的环状 RNA^[128]。Zhang 等^[131]发现 p53 诱导转录的长链非编码 RNA (*LINC-PINT*) 的第 2 个外显子可形成环状 RNA (circPINTexon2), circPINTexon2 可翻译 87 个氨基酸的多肽 (PINT87aa), 该多肽能直接与转录伸长因子 PAF1 复合物互作而阻止了 mRNA 的转录伸长。最新研究发现, 高富集的体外环化的环状 RNA 可在小鼠体内稳定地表达蛋白, 说明环状 RNA 可作为一种有效的蛋白表达工具^[132]。

3.5 环状 RNA 的其他功能

线性 mRNA 会经过反转录衍生得到与外显子先后顺序相同的假基因, 稳定的环状 RNA 也可以经过反转录后衍生出倒序的假基因并整合进入基因组^[133](图 4E)。Dong 等^[133]在小鼠参考基因组中通过 CIR-Cpseudo 鉴别到至少 33 个来源于同一环状 RNA (circRWD2) 的假基因, 还鉴别到了来源于 circ-SATB1 和 circDIAP3 的假基因; 还发现来源于人类 circPRKDC 和 circCAMSAP1 的假基因在大猩猩 (*Gorilla*) 和黑猩猩 (*Pan troglodytes*) 的基因组中也存在。更有趣的是, 在来源于小鼠 circSATB1 的假基

因上发现了能影响染色体构型和调控基因表达的 CTCF 结合位点, 而在对应的 *SATB1* 的外显子上却没有该结合位点, 这预示着环状 RNA 可能通过衍生假基因对生物体的生长发育有着一定的生物效应。然而, 这些假基因是如何被反转录并整合到基因组中仍然是未知的。

4 环状 RNA 在植物中的研究

4.1 植物环状 RNA 的特征及形成

目前对环状 RNA 的研究大部分集中在动物上, 植物环状 RNA 的研究还不够广泛。在拟南芥^[134]、水稻^[93]、玉米^[135,136]、番茄^[137]、大麦^[138]、小麦^[115]、猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch)^[139]、沙棘 (*Hippophae rhamnoides* Linn.)^[140] 和毛竹^[123] 等植物中都鉴别到了环状 RNA。与动物中环状 RNA 一样, 植物中的环状 RNA 也会由于选择性反向剪接及选择性剪接而产生多种类型^[141]。并且, 植物中的环状 RNA 也具有保守性^[114]、发育阶段特异性^[114] 和物种特异性^[142]。

在动物中的大多数研究表明环状 RNA 的形成与内含子反向互补序列、RNA 结合蛋白、碱基配对的稳定性和侧翼内含子的长度等密切相关^[17,22,27]。植物中环状 RNA 的形成与动物是有相似之处的。在玉米中发现, 可环化外显子的侧翼内含子上的反向互补序列参与环状 RNA 的形成^[135,136]。在水稻和拟南芥中发现可环化外显子的侧翼内含子序列普遍长于非可环化外显子的侧翼内含子序列^[93,114], 说明长侧翼内含子也是促进植物环状 RNA 形成的因素。然而, 研究发现影响环状 RNA 形成的重复序列及反向互补序列在水稻和拟南芥中都是非常少量的^[93,114,134], 这说明在植物中除了内含子反向互补序列外, 可能还有其他的因素影响植物环状 RNA 的形成。另外, 在水稻中鉴别到将近 2806 个全长环状 RNA, 但仅有 206 个拥有经典的 GU/AG 剪接信号^[45], 说明在水稻中大多数环状 RNA 的形成可能并不依赖于经典的 GU/AG 剪接信号。

4.2 环状 RNA 在植物发育过程中的作用

环状 RNA 对生物体的生长发育研究大多数集中在动物上, 随着环状 RNA 研究的深入, 植物环状

RNA 的研究也越来越多。Chen 等^[135]在玉米中发现, 重复序列 LLEs (LINE1-like element) 与其反向互补配对序列在环状 RNA 侧翼序列中显著富集, 并且发现这些序列与 circ1690 的表达紧密相关, 并且 circ1690 通过与线性 RNA 相互作用可影响玉米的穗高。当玉米和拟南芥在受到不同程度的干旱胁迫时, 环状 RNA 发生了不同程度的变化, 说明环状 RNA 可以作为植物干旱响应的有效分子标记信号^[136]。另外, 研究者在拟南芥中过表达 circGORK, 发现转基因植株的种子萌发对脱落酸(ABA)超敏感, 且植株表现出更加耐旱的表型, 这为环状 RNA 直接调控干旱胁迫应答提供了有力证据^[136]。植物环状 RNA 不仅能在干旱胁迫下起作用, 而且 Ye 等^[114]发现水稻中的环状 RNA 与其宿主基因能协作响应磷胁迫。随着番茄的成熟, 反向剪接位点数量逐渐上升, 并且过表达 circPSY1 使得番茄红素和 β -胡萝卜素降低, 说明环状 RNA 对果实成熟也有潜在的功能^[141]。Zhou 等^[142]在马铃薯细菌性软腐病(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *Brasiliense*, Pcb)研究中发现, 在 mRNA、环状 RNA 及 lincRNA (long intergenic non-coding RNA) 之间存在一定的共表达关系, 说明环状 RNA 在植物体的疾病响应过程中对转录组重编程发挥着一定的作用。相信随着研究的深入化, 更多的植物环状 RNA 及其功能将被揭示。

5 结语与展望

得益于二代高通量测序技术的不断改进(图 3), 环状 RNA 的神秘面纱逐渐被揭开。目前检测环状 RNA 普遍采用二代短片段高通量测序方法, 如需要获得全长的环状 RNA, 研究者需要根据短片段进行 RNA 组装, 然而组装是个易错过程, 并存在线性转录本的污染问题, 所以开发基于 Pacific BioSciences (PacBio) 和 Oxford Nanopore Technologies (ONT) 的环状 RNA 长片段测序方法是未来研究复杂环状 RNA 的关键技术。获得全长环状 RNA 将打开研究其内部复杂选择性剪接类型的大门, 更多环状 RNA 的调控功能将被揭示。

与环状 RNA 形成机制研究相比较, 环状 RNA 如何被降解的相关报道十分匮乏。Hansen 等^[104]发现

Cdr1as 上有 miR-671 的互补序列, Cdr1as 通过吸附 miR-671 而导致了 Ago2 介导的 Cdr1as 的降解, 那么其他的环状 RNA 是否也以相同的机制被降解以维持环状 RNA 在生物体内的表达平衡? 常规的降解组测序只适用于线性转录本, 需要开发针对环状 RNA 的特异降解组文库构建方法来大规模解析环状 RNA 的降解机制。m⁶A 修饰的环状 RNA 会影响相应宿主基因的稳定性^[125], 那么 m⁶A 修饰是否会影响环状 RNA 自身的稳定性? 这些都是环状 RNA 降解需要解决的问题。但目前环状 RNA 的修饰检测仍然处于瓶颈之中, 已有报道用基于 m⁶A 抗体免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)后深度测序的方法来检测环状 RNA 修饰^[129], 通过反向剪接位点来识别环状 RNA 的序列, 但是由于线性转录本很难用 RNase R 去除完全, 所以如何识别环状 RNA 反向剪接位点外的序列修饰依然是一个急需解决的问题。

在环状 RNA 的功能方面, 环状 RNA 在生物体中动态表达, 与 miRNA、mRNA 及 lncRNA 等形成互作网络, 参与调控宿主基因的转录及转录后表达, 环状 RNA 并非错误剪接的副产物, 而是具有重要调控功能的 RNA 分子^[22]。目前大部分研究集中于环状 RNA 的海绵体功能, 而其翻译功能是一个重要的被忽视的方向。现有的大部分研究是基于预测的方法来研究环状 RNA 的翻译功能, 但在准确性上还有待进一步提高。基于蛋白质组学的方法将是未来研究环状 RNA 的高效而准确的技术手段, 通过构建反向剪接位点的特征氨基酸数据库, 重新进行蛋白搜库, 可能会发现非常有价值的环状 RNA 翻译调控问题。

尽管环状 RNA 在生物体的不同组织或细胞中都广泛存在, 但事实上形成环状 RNA 的反向剪接效率是远低于经典线性剪接的^[26,31,95,130], 导致大多数环状 RNA 的表达丰度较线性基因低, 然而细胞是通过何种信号及何种方式调节同一基因座上的环状 RNA 与线性转录本的比例仍需进一步地研究; 并且, 选择性反向剪接会形成不同的环状 RNA 异构体^[72], 但是何种类别的剪接因子通过特异性结合何种类别的基序来进行精准剪接形成环状 RNA 的仍需进一步地研究。随着多组学的结合使用, 相信在将来人们对表观遗传学所涉及的长链环状 RNA 会有全新的认知。

参考文献(References):

- [1] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, 2013, 19(2): 426–426. [DOI]
- [2] Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt AK. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(11): 3852–3856. [DOI]
- [3] Hsu MT, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature*, 1979, 280(5720): 339–340. [DOI]
- [4] Arnberg AC, Van Ommen GJ, Grivell LA, Van Bruggen EF, Borst P. Some yeast mitochondrial RNAs are circular. *Cell*, 1980, 19(2): 313–319. [DOI]
- [5] Grabowski PJ, Zaug AJ, Cech TR. The intervening sequence of the ribosomal RNA precursor is converted to a circular RNA in isolated nuclei of tetrahymena. *Cell*, 1981, 23(2): 467–476. [DOI]
- [6] Kjems J, Garrett RA. Novel splicing mechanism for the ribosomal RNA intron in the archaeobacterium *Desulfurococcus mobilis*. *Cell*, 1988, 54(5): 693–703. [DOI]
- [7] Nigro JM, Cho K, Fearon ER, Kern SE, Ruppert JM, Oliner JD, Kinzler KW, Vogelstein B. Scrambled exons. *Cell*, 1991, 64(3): 607–613. [DOI]
- [8] Cocquerelle C, Daubersies P, Majérus MA, Kerckaert JP, Bailleul B. Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns. *EMBO J*, 1992, 11(3): 1095–1098. [DOI]
- [9] Cocquerelle C, Mascréz B, Hétiuin D, Bailleul B. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J*, 1993, 7(1): 155–160. [DOI]
- [10] Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Circular transcripts of the testis-determining gene *sry* in adult mouse testis. *Cell*, 1993, 73(5): 1019–1030. [DOI]
- [11] Zaphiropoulos PG. Circular RNAs from transcripts of the rat cytochrome *P450 2C24* gene: correlation with exon skipping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(13): 6536–6541. [DOI]
- [12] Zaphiropoulos PG. Exon skipping and circular RNA formation in transcripts of the human cytochrome *P-450 2C18* gene in epidermis and of the rat androgen binding protein gene in testis. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(6): 2985–2993. [DOI]
- [13] Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an *INK4/ARF*-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genet*, 2010, 6(12): e1001233. [DOI]
- [14] Luo J, Wang XL, Sun ZC, Wu D, Zhang W, Wang ZJ. Progress in circular RNAs of plants. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(6): 467–477.
- [15] Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733. [DOI]
- [16] Hansen TB, Venø MT, Damgaard CK, Kjems J. Comparison of circular RNA prediction tools. *Nucleic Acids Res*, 2015, 44(6): e58. [DOI]
- [17] Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, Zhong G, Yu B, Hu W, Dai L, Zhu P, Chang Z, Wu Q, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu H, Shan G. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256–264. [DOI]
- [18] Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, Zhu S, Yang L, Chen LL. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792–806. [DOI]
- [19] Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, Paffenholz SV, Berry K, Naldini MM, Lo-Coco F, Tay Y, Beck AH, Pandolfi PP. Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations. *Cell*, 2016, 165(2): 289–302. [DOI]
- [20] Tan S, Sun D, Pu W, Gou Q, Guo C, Gong Y, Li J, Wei YQ, Liu L, Zhao Y. Circular RNA F-circEA-2a derived from *EML4-ALK* fusion gene promotes cell migration and invasion in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 138. [DOI]
- [21] Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, Shukla S, Xiao L, Zhang Y, Wu YM, Dhanasekaran SM, Engelke CG, Cao X, Robinson DR, Nesvizhskii AI, Chinnaiyan AM. The landscape of circular RNA in cancer. *Cell*, 2019, 176(4): 869–881.e13. [DOI]
- [22] Li X, Yang L, Chen LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs. *Mol Cell*, 2018, 71(3): 428–442. [DOI]
- [23] Chen LL, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis. *RNA Biol*, 2015, 12(4): 381–388. [DOI]
- [24] Liang D, Wilusz JE. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Gene Dev*, 2014, 28(20): 2233–2247. [DOI]
- [25] Ivanov A, Memczak S, Wyler E, Torti F, Porath HT, Orejuela MR, Piechotta M, Levanon EY, Landthaler M, Dieterich C, Rajewsky N. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell Rep*, 2014, 10(2): 170–177. [DOI]

- [26] Zhang Y, Xue W, Li X, Zhang J, Chen S, Zhang JL, Yang L, Chen LL. The biogenesis of nascent circular RNAs. *Cell Rep*, 2016, 15(3): 611–624. [DOI]
- [27] Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, 2014, 159(1): 134–147. [DOI]
- [28] Dong R, Ma XK, Chen LL, Yang L. Increased complexity of circRNA expression during species evolution. *RNA Biol*, 2016, 14(8): 1064–1074. [DOI]
- [29] Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M Jr, Jungkamp A, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, 2010, 141(1): 129–141. [DOI]
- [30] Ji P, Wu W, Chen S, Zheng Y, Zhou L, Zhang J, Cheng H, Yan J, Zhang S, Yang P, Zhao F. Expanded expression landscape and prioritization of circular RNAs in mammals. *Cell Rep*, 2019, 26(12): 3444–3460.e5. [DOI]
- [31] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, Evantal N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S. CircRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55–66. [DOI]
- [32] Duchange N, Pidoux J, Camus E, Sauvaget D. Alternative splicing in the human interleukin enhancer binding factor 3 (ILF3) gene. *Gene*, 2000, 261(2): 345–353. [DOI]
- [33] Urcuqui-Inchima S, Castaño ME, Hernandez-Verdun D, St-Laurent G, Kumar A. Nuclear factor 90, a cellular dsRNA binding protein inhibits the HIV Rev-export function. *Retrovirology*, 2006, 3: 83. [DOI]
- [34] Li X, Liu CX, Xue W, Zhang Y, Jiang S, Yin QF, Wei J, Yao RW, Yang L, Chen LL. Coordinated circRNA biogenesis and function with NF90/NF110 in viral infection. *Mol Cell*, 2017, 67(2): 214–227.e7. [DOI]
- [35] Fei T, Chen Y, Xiao T, Li W, Cato L, Zhang P, Cotter MB, Bowden M, Lis RT, Zhao SG, Wu Q, Feng FY, Loda M, He HH, Liu XS, Brown M. Genome-wide CRISPR screen identifies HNRNPL as a prostate cancer dependency regulating RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(26): E5207–E5215. [DOI]
- [36] Errichelli L, Dini Modigliani S, Laneve P, Colantoni A, Legnini I, Caputo D, Rosa A, De Santis R, Scarfò R, Peruzzi G, Lu L, Caffarelli E, Shneider NA, Morlando M, Bozzoni I. FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons. *Nat Commun*, 2017, 8: 14741. [DOI]
- [37] Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, Conn VM, Salmanidis M, Phillips CA, Roslan S, Schreiber AW, Gregory PA, Goodall GJ. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*, 2015, 160(6): 1125–1134. [DOI]
- [38] Teplova M, Hafner M, Teplov D, Essig K, Tuschl T, Patel DJ. Structure-function studies of STAR family Quaking proteins bound to their *in vivo* RNA target sites. *Gene Dev*, 2013, 27(8): 928–940. [DOI]
- [39] Khan MA, Reckman YJ, Aufiero S, van den Hoogenhof MM, van der Made I, Beqqali A, Koolbergen DR, Rasmussen TB, van der Velden J, Creemers EE, Pinto YM. RBM20 regulates circular RNA production from the titin gene. *Circ Res*, 2016, 119(9): 996–1003. [DOI]
- [40] Kramer MC, Liang D, Tatomer DC, Gold B, March ZM, Cherry S, Wilusz JE. Combinatorial control of *Drosophila* circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins. *Gene Dev*, 2015, 29(20): 2168–2182. [DOI]
- [41] Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 321–349. [DOI]
- [42] Kim DD, Kim TT, Walsh T, Kobayashi Y, Matise TC, Buyske S, Gabriel A. Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome. *Genome Res*, 2004, 14(9): 1719–1725. [DOI]
- [43] Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, Jens M, Pino N, Giusti S, Hanan M, Behm M, Bartok O, Ashwal-Fluss R, Herzog M, Schreyer L, Papavasileiou P, Ivanov A, Öhman M, Refojo D, Kadener S, Rajewsky N. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. *Mol Cell*, 2015, 58(5): 870–885. [DOI]
- [44] Aktaş T, Avşar Ilik İ, Maticzka D, Bhardwaj V, Pessoa Rodrigues C, Mittler G, Manke T, Backofen R, Akhtar A. DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome. *Nature*, 2017, 544(7648): 115–119. [DOI]
- [45] Ye CY, Zhang X, Chu Q, Liu C, Yu Y, Jiang W, Zhu QH, Fan L, Guo L. Full-length sequence assembly reveals circular RNAs with diverse non-GT/AG splicing signals in rice. *RNA Biol*, 2016, 14(8): 1055–1063. [DOI]
- [46] Panda AC, De S, Grammatikakis I, Munk R, Yang X, Piao Y, Dudekula DB, Abdelmohsen K, Gorospe M. High-purity circular RNA isolation method (RPAD) reveals vast collection of intronic circRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(12): e116. [DOI]
- [47] Talhouarne GJS, Gall JG. Lariat intronic RNAs in the cytoplasm of vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(34): E7970–E7977. [DOI]
- [48] Zhang X, Zhang Y, Wang T, Li Z, Cheng J, Ge H, Tang Q, Chen K, Liu L, Lu C, Guo J, Zheng B, Zheng Y. A comprehensive map of intron branchpoints and lariat RNAs in plants. *Plant Cell*, 2019, 31(5): 956–973. [DOI]
- [49] Bentley DL. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat Rev Genet*, 2014,

- 15(3): 163–175. [DOI]
- [50] Liang D, Tatomer DC, Luo Z, Wu H, Yang L, Chen LL, Cherry S, Wilusz JE. The output of protein-coding genes shifts to circular RNAs when the pre-mRNA processing machinery is limiting. *Mol Cell*, 2017, 68(5): 940–954.e3. [DOI]
- [51] Abascal-Palacios G, Ramsay EP, Beuron F, Morris E, Vannini A. Structural basis of RNA polymerase III transcription initiation. *Nature*, 2018, 553(7688): 301–306. [DOI]
- [52] Schmidt CA, Noto JJ, Filonov GS, Matera AG. A method for expressing and imaging abundant, stable, circular RNAs *in vivo* using tRNA splicing. *Method Enzymol*, 2016, 572: 215–236. [DOI]
- [53] Litke JL, Jaffrey SR. Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts. *Nat Biotechnol*, 2019, doi: 10.1038/s41587-019-0090-6. [DOI]
- [54] Salgia SR. Two reactions of *Haloferax volcanii* RNA splicing enzymes: joining of exons and circularization of introns. *RNA*, 2003, 9(3): 319–330. [DOI]
- [55] Englert M, Sheppard K, Gundllapalli S, Beier H Sölla D. Branchiostoma floridae has separate healing and sealing enzymes for 5'-phosphate RNA ligation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(39): 16834–16839. [DOI]
- [56] Noto JJ, Schmidt CA, Matera AG. Engineering and expressing circular RNAs via tRNA splicing. *RNA Biol*, 2017, 14(8): 978–984. [DOI]
- [57] Szabo L, Salzman J. Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(11): 679–692. [DOI]
- [58] Vincent HA, Deutscher MP. Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. *J Biol Chem*, 2006, 281(40): 29769–29775. [DOI]
- [59] Chen S, Huang V, Xu X, Livingstone J, Soares F, Jeon J, Zeng Y, Hua JT, Petricca J, Guo H, Wang M, Yousif F, Zhang Y, Donmez N, Ahmed M, Volik S, Lapuk A, Chua MLK, Heisler LE, Foucal A, Fox NS, Fraser M, Bhandari V, Shiah YJ, Guan J, Li J, Orain M, Picard V, Hovington H, Bergeron A, Lacombe L, Fradet Y, Têtu B, Liu S, Feng F, Wu X, Shao YW, Komor MA, Sahinalp C, Collins C, Hoogstrate Y, de Jong M, Fijneman RJA, Fei T, Jenster G, van der Kwast T, Bristow RG, Boutros PC, He HH. Widespread and functional RNA circularization in localized prostate cancer. *Cell*, 2019, 176(4): 831–843.e22. [DOI]
- [60] Pandey PR, Rout PK, Das A, Gorospe M, Panda AC. RPAD (RNase R treatment, polyadenylation, and poly(A)+RNA depletion) method to isolate highly pure circular RNA. *Methods*, 2018, 155: 41–48. [DOI]
- [61] Jakobi T, Dieterich C. Computational approaches for circular RNA analysis. *Wires RNA*, 2019, 10(3): e1528. [DOI]
- [62] Hansen TB. Improved circRNA identification by combining prediction algorithms. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 20. [DOI]
- [63] Zheng Y, Ji P, Chen S, Hou L, Zhao F. Reconstruction of full-length circular RNAs enables isoform-level quantification. *Genome Med*, 2019, 11(1): 2. [DOI]
- [64] Feng J, Chen K, Dong X, Xu X, Jin Y, Zhang X, Chen W, Han Y, Shao L, Gao Y, He C. Genome-wide identification of cancer-specific alternative splicing in circRNA. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 35. [DOI]
- [65] Sharma D, Sehgal P, Hariprakash J, Sivasubbu S, Scaria V. Methods for annotation and validation of circular RNAs from RNAseq data. *Methods Mol Biol*, 2019, 1912: 55–76. [DOI]
- [66] Wang K, Singh D, Zeng Z, Coleman SJ, Huang Y, Savich GL, He X, Mieczkowski P, Grimm SA, Perou CM, Macleod JN, Chiang DY, Prins JF, Liu J. MapSplice: accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(18): e178. [DOI]
- [67] Chen L, Yu Y, Zhang X, Liu C, Ye C, Fan L. PcircRNA_finder: a software for circRNA prediction in plants. *Bioinformatics*, 2016, 32(22): 3528–3529. [DOI]
- [68] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 2013, 495(7441): 333–338. [DOI]
- [69] Metge F, Czaja-Hasse LF, Reinhardt R, Dieterich C. FUCHS-towards full circular RNA characterization using RNAseq. *PeerJ*, 2017, 5: e2934. [DOI]
- [70] Westholm JO, Miura P, Olson S, Shenker S, Joseph B, Sanfilippo P, Celniker SE, Graveley BR, Lai EC. Genome-wide analysis of drosophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation. *Cell Rep*, 2014, 9(5): 1966–1980. [DOI]
- [71] Hoffmann S, Otto C, Doose G, Tanzer A, Langenberger D, Christ S, Kunz M, Holdt LM, Teupser D, Hackermüller J. A multi-split mapping algorithm for circular RNA, splicing, trans-splicing and fusion detection. *Genome Biol*, 2014, 15(2): R34. [DOI]
- [72] Zhang XO, Dong R, Zhang Y, Zhang JL, Luo Z, Zhang J, Chen LL, Yang L. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Res*, 2016, 26(9): 1277–1287. [DOI]
- [73] Szabo L, Morey R, Palpant NJ, Wang PL, Afari N, Jiang C, Parast MM, Murry CE, Laurent LC, Salzman J.

- Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome Biol*, 2015, 16: 126. [DOI]
- [74] Gao Y, Zhang J, Zhao F. Circular RNA identification based on multiple seed matching. *Brief Bioinform*, 2018, 19(5): 803–810. [DOI]
- [75] Cheng J, Metge F, Dieterich C. Specific identification and quantification of circular RNAs from sequencing data. *Bioinformatics*, 2016, 32(7): 1094–1096. [DOI]
- [76] Feng J, Xiang Y, Xia S, Liu H, Wang J, Ozguc FM, Lei L, Kong R, Diao L, He C, Han L. Circview: a visualization and exploration tool for circular RNAs. *Brief Bioinform*, 2018, 19(6): 1310–1316. [DOI]
- [77] You X, Conrad TO. Acfs: accurate circRNA identification and quantification from RNA-Seq data. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 38820. [DOI]
- [78] Gao Y, Wang H, Zhang H, Wang Y, Chen J, Gu L. PRAP1: post-transcriptional regulation analysis pipeline for Iso-Seq. *Bioinformatics*, 2018, 34(9): 1580–1582. [DOI]
- [79] Song X, Zhang N, Han P, Moon BS, Lai RK, Wang K, Lu W. Circular RNA profile in gliomas revealed by identification tool UROBORUS. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(9): e87. [DOI]
- [80] Wang H, Wang H, Zhang H, Liu S, Wang Y, Gao Y, Xi F, Zhao L, Liu B, Reddy ASN, Lin C, Gu L. The interplay between microRNA and alternative splicing of linear and circular RNAs in eleven plant species. *Bioinformatics*, 2019, doi: 10.1093/bioinformatics/btz038. [DOI]
- [81] Xia S, Feng J, Chen K, Ma Y, Gong J, Cai F, Jin Y, Gao Y, Xia L, Chang H, Wei L, Han L, He C. CSCD: a database for cancer-specific circular RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D925–D929. [DOI]
- [82] Glažar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. CircBase: a database for circular RNAs. *RNA*, 2014, 20(11): 1666–1670. [DOI]
- [83] Fan C, Lei X, Fang Z, Jiang Q, Wu FX. CircR2Disease: a manually curated database for experimentally supported circular RNAs associated with various diseases. *Database (Oxford)*, 2018, 2018: bay044. [DOI]
- [84] Xia S, Feng J, Lei L, Hu J, Xia L, Wang J, Xiang Y, Liu L, Zhong S, Han L, He C. Comprehensive characterization of tissue-specific circular RNAs in the human and mouse genomes. *Brief Bioinform*, 2017, 18(6): 984–992. [DOI]
- [85] Ye J, Wang L, Li S, Zhang Q, Zhang Q, Tang W, Wang K, Song K, Sablok G, Sun X, Zhao H. AtCircDB: a tissue-specific database for arabidopsis circular RNAs. *Brief Bioinform*, 2019, 20(1): 58–65. [DOI]
- [86] Ghosal S, Das S, Sen R, Basak P, Chakrabarti J. Circ2Traits: a comprehensive database for circular RNA potentially associated with disease and traits. *Front Genet*, 2013, 4: 283. [DOI]
- [87] Zhang P, Meng X, Chen H, Liu Y, Xue J, Zhou Y, Chen M. PlantCircNet: a database for plant circRNA–miRNA–mRNA regulatory networks. *Database (Oxford)*, 2017, 2017: bax089. [DOI]
- [88] Dudekula DB, Panda AC, Grammatikakis I, De S, Abdelmohsen K, Gorospe M. CircInteractome: a web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *Rna Biol*, 2016, 13(1): 34–42. [DOI]
- [89] Chu Q, Zhang X, Zhu X, Liu C, Mao L, Ye C, Zhu QH, Fan L. PlantcircBase: a database for plant circular RNAs. *Mol Plant*, 2017, 10(8): 1126–1128. [DOI]
- [90] Liu YC, Li JR, Sun CH, Andrews E, Chao RF, Lin FM, Weng SL, Hsu SD, Huang CC, Cheng C, Liu CC, Huang HD. CircNet: a database of circular RNAs derived from transcriptome sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2015, 44(D1): D209–D215. [DOI]
- [91] Meng X, Hu D, Zhang P, Chen Q, Chen M. CircFunBase: a database for functional circular RNAs. *Database (Oxford)*, 2019, 2019: baz003. [DOI]
- [92] Chen X, Han P, Zhou T, Guo X, Song X, Li Y. CircRNADb: a comprehensive database for human circular RNAs with protein-coding annotations. *Sci Rep*, 2016, 6: 34985. [DOI]
- [93] Lu T, Cui L, Zhou Y, Zhu C, Fan D, Gong H, Zhao Q, Zhou C, Zhao Y, Lu D, Luo J, Wang Y, Tian Q, Feng Q, Huang T, Han B. Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice. *RNA*, 2015, 21(12): 2076–2087. [DOI]
- [94] Suzuki H, Zuo Y, Wang J, Zhang MQ, Malhotra A, Mayeda A. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(8): e63. [DOI]
- [95] Starke S, Jost I, Rossbach O, Schneider T, Schreiner S, Hung LH, Bindereif A. Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Rep*, 2014, 10(1): 103–111. [DOI]
- [96] Awan AR, Manfredo A, Pleiss JA. Lariat sequencing in a unicellular yeast identifies regulated alternative splicing of exons that are evolutionarily conserved with humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(31): 12762–12767. [DOI]
- [97] Ghorbani A, Izadpanah K, Peters JR, Dietzgen RG, Mitter N. Detection and profiling of circular RNAs in uninfected and maize Iranian mosaic virus-infected maize. *Plant Sci*, 2018, 274: 402–409. [DOI]
- [98] Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR–Cas9 system. *Methods Mol Biol*, 2015, 1239: 197–217. [DOI]
- [99] Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng

- AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918. [DOI]
- [100] Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1229–1232. [DOI]
- [101] Wang Y, Huang J, Xu R. Seamless genome editing in *Drosophila* by combining CRISPR/Cas9 and piggyBac technologies. *Hereditas (Beijing)*, 2019, 41 (5): 422–429.
王珏, 黄娟, 许蕊. 利用 CRISPR/Cas9 和 piggyBac 实现果蝇基因组无缝编辑. *遗传*, 2019, 41 (5): 422–429. [DOI]
- [102] Piwecka M, Glažar P, Hernandez-Miranda LR, Memczak S, Wolf SA, Rybak-Wolf A, Filipchuk A, Klironomos F, Cerda Jara CA, Fenske P, Trimbuch T, Zywitza V, Plass M, Schreyer L, Ayoub S, Kocks C, Kühn R, Rosenmund C, Birchmeier C, Rajewsky N. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*, 2017, 357(6357): eaam8526. [DOI]
- [103] Borchardt EK, Meganck RM, Vincent HA, Ball CB, Ramos SBV, Moorman NJ, Marzluff WF, Asokan A. Inducing circular RNA formation using the CRISPR endoribonuclease Csy4. *RNA*, 2017, 23(5): 619–627. [DOI]
- [104] Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, Statham AL, Clark SJ, Kjems J. MiRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J*, 2011, 30(21): 4414–4422. [DOI]
- [105] O'keefe E. SiRNAs and shRNAs: tools for protein knockdown by gene silencing. *Mater Methods*, 2013, 3: 197. [DOI]
- [106] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, Fatica A, Santini T, Andronache A, Wade M, Laneve P, Rajewsky N, Bozzoni I. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22–37.e9. [DOI]
- [107] Zhu P, Zhu X, Wu J, He L, Lu T, Wang Y, Liu B, Ye B, Sun L, Fan D, Wang J, Yang L, Qin X, Du Y, Li C, He L, Ren W, Wu X, Tian Y, Fan Z. IL-13 secreted by ILC2s promotes the self-renewal of intestinal stem cells through circular RNA circPan3. *Nat Immunol*, 2019, 20(2): 183–194. [DOI]
- [108] Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet*, 2013, 9(9): e1003777. [DOI]
- [109] Guo JU, Agarwal V, Guo H, Bartel DP. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol*, 2014, 15(7): 409. [DOI]
- [110] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 2013, 495(7441): 384–388. [DOI]
- [111] Su H, Tao T, Yang Z, Kang X, Zhang X, Kang D, Wu S, Li C. Circular RNA cTFRC acts as the sponge of MicroRNA-107 to promote bladder carcinoma progression. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 27. [DOI]
- [112] Rong D, Lu C, Zhang B, Fu K, Zhao S, Tang W, Cao H. CircPSMC3 suppresses the proliferation and metastasis of gastric cancer by acting as a competitive endogenous RNA through sponging miR-296-5p. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 25. [DOI]
- [113] Xu L, Feng X, Hao X, Wang P, Zhang Y, Zheng X, Li L, Ren S, Zhang M, Xu M. CircSETD3 (Hsa_circ_0000567) acts as a sponge for microRNA-421 inhibiting hepatocellular carcinoma growth. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 98. [DOI]
- [114] Ye CY, Chen L, Liu C, Zhu QH, Fan L. Widespread noncoding circular RNAs in plants. *New Phytol*, 2015, 208(1): 88–95. [DOI]
- [115] Wang Y, Yang M, Wei S, Qin F, Zhao H, Suo B. Identification of circular RNAs and their targets in leaves of *Triticum aestivum* L. under dehydration stress. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 2024. [DOI]
- [116] Yin J, Liu M, Ma D, Wu J, Li S, Zhu Y, Han B. Identification of circular RNAs and their targets during tomato fruit ripening. *Postharvest Biol Tec*, 2018, 136: 90–98. [DOI]
- [117] Zeng RF, Zhou JJ, Hu CG, Zhang JZ. Transcriptome-wide identification and functional prediction of novel and flowering-related circular RNAs from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Planta*, 2018, 247(5): 1191–1202. [DOI]
- [118] Abdelmohsen K, Panda AC, Munk R, Grammatikakis I, Dudekula DB, De S, Kim J, Noh JH, Kim KM, Martindale JL, Gorospe M. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of *PABPN1* translation by circPABPN1. *RNA Biol*, 2017, 14(3): 361–369. [DOI]
- [119] Du WW, Fang L, Yang W, Wu N, Awan FM, Yang Z, Yang BB. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. *Cell Death Differ*, 2016, 24(2): 357. [DOI]
- [120] Park OH, Ha H, Lee Y, Boo SH, Kwon DH, Song HK, Kim YK. Endoribonucleolytic cleavage of m⁶A-containing RNAs by RNase P/MRP complex. *Mol Cell*, 2019, 74(3): 494–507.e8. [DOI]
- [121] Li Z, Wang S, Cheng J, Su C, Zhong S, Liu Q, Fang Y, Yu Y, Lv H, Zheng Y, Zheng B. Intron lariat RNA inhibits microRNA biogenesis by sequestering the dicing

- complex in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2016, 12(11): e1006422. [DOI]
- [122] Conn VM, Hugouvieux V, Nayak A, Conos SA, Capovilla G, Cildir G, Jourdain A, Tergaonkar V, Schmid M, Zubieta C, Conn SJ. A circRNA from *SEPALLATA3* regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. *Nat Plants*, 2017, 3: 17053. [DOI]
- [123] Wang Y, Gao Y, Zhang H, Wang H, Liu X, Xu X, Zhang Z, Markus VK, Kaiqiang H, Wang H, Xi F, Zhao L, Lin C, Gu L. Genome-wide profiling of circular RNAs in the rapidly growing shoots of moso bamboo (*phyllostachys edulis*). *Plant Cell Physiol*, 2019, doi: 10.1093/pcp/pcz043. [DOI]
- [124] Roundtree IA, Evans ME, Pan T, He C. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell*, 2017, 169(7): 1187–1200. [DOI]
- [125] Zhou C, Molinie B, Daneshvar K, Pondick JV, Wang J, Van Wittenbergh N, Xing Y, Giallourakis CC, Mullen AC. Genome-wide maps of m⁶A circRNAs identify widespread and cell-type-specific methylation patterns that are distinct from mRNAs. *Cell Rep*, 2017, 20(9): 2262–2276. [DOI]
- [126] Chen N, Zhao G, Yan X, Lv Z, Yin H, Zhang S, Song W, Li X, Li L, Du Z, Jia L, Zhou L, Li W, Hoffman AR, Hu JF, Cui J. A novel *FLII* exonic circular RNA promotes metastasis in breast cancer by coordinately regulating TET1 and DNMT1. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 218. [DOI]
- [127] Wei LH, Song P, Wang Y, Lu Z, Tang Q, Yu Q, Xiao Y, Zhang X, Duan HC, Jia G. The m⁶A reader ECT2 controls trichome morphology by affecting mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2018, 30(5): 968–985. [DOI]
- [128] Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, Ashwal-Fluss R, Stottmeister C, Ruhe L, Hanan M, Wyler E, Perez-Hernandez D, Ramberger E, Shenzen S, Samson M, Dittmar G, Landthaler M, Chekulaeva M, Rajewsky N, Kadener S. Translation of circRNAs. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 9–21.e7. [DOI]
- [129] Yang Y, Fan X, Mao M, Song X, Wu P, Zhang Y, Jin Y, Yang Y, Chen LL, Wang Y, Wong CC, Xiao X, Wang Z. Extensive translation of circular RNAs driven by N⁶-methyladenosine. *Cell Res*, 2017, 27(5): 626–641. [DOI]
- [130] Wang Y, Wang Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *RNA*, 2014, 21(2): 172–179. [DOI]
- [131] Zhang M, Zhao K, Xu X, Yang Y, Yan S, Wei P, Liu H, Xu J, Xiao F, Zhou H, Yang X, Huang N, Liu J, He K, Xie K, Zhang G, Huang S, Zhang N. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4475. [DOI]
- [132] Wesselhoeft RA, Kowalski PS, Parker-Hale FC, Huang Y, Bisaria N, Anderson DG. RNA circularization diminishes immunogenicity and can extend translation duration *in vivo*. *Mol Cell*, 2019, 74(3): 508–529.e4. [DOI]
- [133] Dong R, Zhang XO, Zhang Y, Ma XK, Chen LL, Yang L. CircRNA-derived pseudogenes. *Cell Res*, 2016, 26(6): 747–750. [DOI]
- [134] Sun X, Wang L, Ding J, Wang Y, Wang J, Zhang X, Che Y, Liu Z, Zhang X, Ye J, Wang J, Sablok G, Deng Z. Integrative analysis of *Arabidopsis thaliana* transcriptomics reveals intuitive splicing mechanism for circular RNA. *Febs Lett*, 2016, 590(20): 3510–3516. [DOI]
- [135] Chen L, Zhang P, Fan Y, Lu Q, Li Q, Yan J, Muehlbauer GJ, Schnable PS, Dai M, Li L. Circular RNAs mediated by transposons are associated with transcriptomic and phenotypic variation in maize. *New Phytol*, 2017, 217(3): 1292–1306. [DOI]
- [136] Zhang P, Fan Y, Sun X, Chen L, Terzaghi W, Bucher E, Li L, Dai M. A large-scale circular RNA profiling reveals universal molecular mechanisms responsive to drought stress in maize and *Arabidopsis*. *Plant J*, 2019, 98(4): 697–713. [DOI]
- [137] Zuo J, Wang Q, Zhu B, Luo Y, Gao L. Deciphering the roles of circRNAs on chilling injury in tomato. *Biochem Bioph Res Co*, 2016, 479(2): 132–138. [DOI]
- [138] Darbani B, Noeparvar S, Borg S. Identification of circular RNAs from the parental genes involved in multiple aspects of cellular metabolism in barley. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 776. [DOI]
- [139] Wang Z, Liu Y, Li D, Li L, Zhang Q, Wang S, Huang H. Identification of circular RNAs in kiwifruit and their species-specific response to bacterial canker pathogen invasion. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 413. [DOI]
- [140] Zhang G, Duan A, Zhang J, He C. Genome-wide analysis of long non-coding RNAs at the mature stage of sea buckthorn (*hippophae rhamnoides linn*) fruit. *Gene*, 2016, 596: 130–136. [DOI]
- [141] Tan J, Zhou Z, Niu Y, Sun X, Deng Z. Identification and functional characterization of tomato circRNAs derived from genes involved in fruit pigment accumulation. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8594. [DOI]
- [142] Zhou R, Zhu Y, Zhao J, Fang Z, Wang S, Yin J, Chu Z, Ma D. Transcriptome-wide identification and characterization of potato circular RNAs in response to *pectobacterium carotovorum* subspecies *brasiliense* infection. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): 71. [DOI]