

# 天然反义转录物生物学功能及其意义

蹇爱荣\* 李迪杰 商 澎

(西北工业大学生命学院, 西北工业大学特殊环境生物物理学研究所,  
空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072)

**摘要** 天然反义转录物(natural antisense transcripts, NATs)是在自然情况下生物体内产生的内源性RNA, 它们与其对应的互补RNA通过碱基配对, 形成自然正义-反义转录物配对的双链RNA, 对器官形成、细胞分化和疾病发生等各种生理和病理过程都有重要的调控作用。该文综述了近年来NATs的研究进展, 从正反馈调节和负反馈调节两个方面介绍了NATs对正义转录物的影响, 从RNA编辑、RNA干扰、RNA封闭、转录干扰、DNA甲基化和组蛋白修饰等方面详细阐述了NATs的作用机制, 并介绍了NATs与疾病的关系。NATs是一种丰富的生物分子资源, 可用于表观遗传学, 未来有潜在的诊断和治疗价值。

**关键词** 天然反义转录物(NATs); 正反馈调节; 负反馈调节; 组蛋白修饰DNA; 甲基化

## Biological Function and Significance of Natural Antisense Transcripts

Qian Airong\*, Li Dijie, Shang Peng

(Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

**Abstract** Natural antisense transcripts (NATs) can represent coding or, more commonly, noncoding RNA, which are generated inside the organism under natural condition and widely expressed in various species. NATs play important roles in the regulation of organ development, cell differentiation and disease occurrence. By reviewing the latest advance about NATs in recent years, this article described the effects of NATs on sense transcription by discordant regulation and concordant regulation. The related mechanism of NATs was also introduced from RNA editing, RNA interference, RNA blocking, transcriptional interference, DNA methylation and histone modification, and the relationship between NATs and disease was also described. NATs may represent a potentially abundant source of biomolecules for use in epigenetics and have great potential diagnostic and therapeutic value in future.

**Key words** natural antisense transcripts(NATs); concordant regulation; discordant regulation; DNA histone modifications; methylation

## 引言

随着小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)和微小RNA(microRNA, miRNA)等具有划时代意义的RNA分子相继被发现, 越来越多的研究者认为, 很

多非编码蛋白的DNA也有转录产物(RNA), 而且这些转录产物并不是所谓的“转录噪声”或“垃圾RNA”, 而在基因转录后调控、剪切和修饰等方面具有十分重要的功能, 并与疾病的发生、发展、诊断和治疗有密切的关系。目前, 对哺乳动物基因组中非编码转录物(non-coding RNAs, ncRNAs)还没有统一的分类, 基于ncRNAs长度可以粗略地分为短ncRNAs(长度小于200 nt)和长ncRNAs(long noncoding RNAs, lncRNAs)<sup>[1]</sup>。ncRNAs包括miRNAs、piRNAs(piwi-interacting RNAs)、内源性的siRNAs和snoRNAs(small nucleolar RNAs)。

收稿日期: 2012-12-21 接受日期: 2013-01-15

国家自然科学基金(批准号: 30970706)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 029-88491840, E-mail: qianair@nwpu.edu.cn

Received: December 21, 2012 Accepted: January 15, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30970706)

\*Corresponding author. Tel: +86-29-88491840, E-mail: qianair@nwpu.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-28 17:26

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130328.1726.008.html>

近年来,关于非编码RNA的研究取得了突飞猛进的发展,但大部分研究都集中在小RNA。关于lncRNAs的研究相对来说还比较少,属于目前研究最不清楚的转录产物之一。据统计,哺乳动物基因组序列中4%~9%的序列产生的转录本是lncRNAs,相应的蛋白编码RNA的比例是1%。LncRNAs是一组长度在200 nt到100 000 nt之间的由基因间区域<sup>[2]</sup>或内含子<sup>[3]</sup>转录而来的异质RNAs分子。LncRNAs从表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等多层面上调控基因的表达。

天然反义转录物(natural antisense transcripts, NATs)是一类重要的lncRNAs分子,可以与其互补的RNAs通过碱基配对,形成正义-反义RNAs双链(dsRNAs),引起靶mRNA的降解或翻译抑制<sup>[4]</sup>。研究发现NATs在生物中普遍存在,是动物和植物中的一种重要siRNA源,也是一种重要的基因表达调节方式。本文就NATs的生物学功能、作用机制及其与疾病的关系作一概述。

## 1 NATs简介

NATs指在自然情况下生物体内产生的,在多个物种广泛表达的一类非编码蛋白质的RNA分子<sup>[4-7]</sup>,对器官形成、细胞分化和疾病发生等各种生理和病理过程都有重要的调控作用<sup>[8-9]</sup>。体外合成的反义转录物已经被广泛应用于特定基因的调节。NATs最初在原核生物中发现,是一种内源性的转录物,而且与正义转录物部分序列互补<sup>[10-11]</sup>。随着基因表达加帽分析技术(cap analysis of gene expression, CAGE)、基因表达序列分析技术(serial analysis of gene expression, SAGE)以及cDNA的大规模平行测

序等高通量技术的发展,证实NATs在原核和真核基因组中是普遍存在的。在植物和动物基因组中,7%~30%的基因中存在NATs<sup>[12]</sup>(表1)。在人和小鼠转录基因组中高达72%的转录本有反义RNA<sup>[10,13]</sup>。而且,很多NAT的数据库也已经建立起来了<sup>[4]</sup>。

NATs长度通常在100到几千个碱基对。根据来源, NATs通常可以分为两类:顺式NATs(cis-NATs)和反式NATs(trans-NATs)<sup>[14]</sup>。cis-NATs与trans-NATs的主要区别在于转录来源。cis-NATs转录自靶基因的基因座的反链DNA,而trans-NATs转录自不同的基因座。因此, cis-NAT与靶基因序列完全互补(二者基因重叠),而trans-NAT由于不完全互补可以作用于许多不同的正义转录物,形成复杂的调控网络<sup>[15]</sup>。cis-NATs最早是在病毒中检测到的<sup>[16]</sup>,接着在原核生物<sup>[17]</sup>以及真核生物<sup>[18]</sup>中相继发现。根据基因相对方位和重叠程度, cis-NATs分为头对头(5'到5')、尾对尾(3'到3')、完全重叠以及非重叠NATs<sup>[13,19]</sup>(图1)。绝大多数基因组层次上的研究表明:尾对尾是最普遍的方式<sup>[4]</sup>。根据互补区域的编码潜能, NATs可以分为编码-编码、编码-非编码和非编码-非编码三类<sup>[11,14]</sup>。

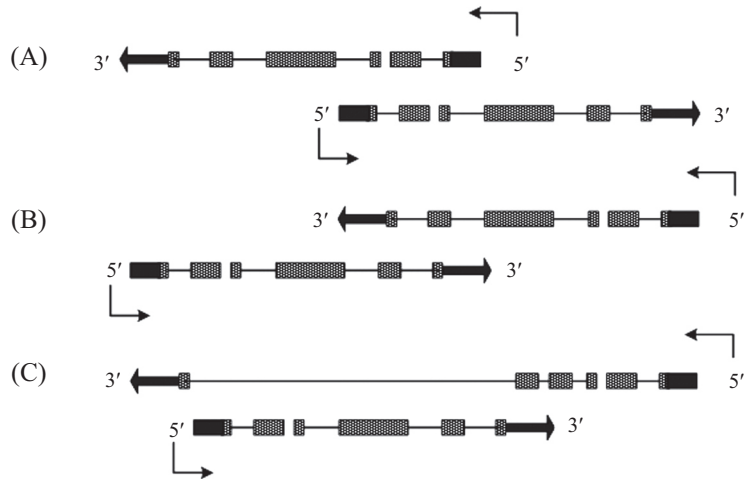
## 2 NATs作用方式

NATs在生理以及病理过程中起重要作用,作用机理包括:基因组印记(genomic imprinting)、选择性剪切、X染色体失活、mRNA稳定性维持、翻译调节、RNA输出、DNA甲基化以及组蛋白修饰等<sup>[20]</sup>。基因组印记是一种由亲本来源不同而导致等位基因表达差异的一种表观遗传现象。这类印记基因约占基因组基因的1%,是哺乳动物和显花植物的独特现象。大部分印记基因都分布在印记基因簇内,其中包含

表1 一些真核生物中的天然反义转录物

Table 1 Genome-wide natural antisense transcripts in several eukaryotic species

种属 Species	天然反义转录物数目 Transcripts involved in overlap	总转录物数目 Total transcripts	百分比(%) Percentage(%)
Human	5 880	26 741	20
Mouse	12 519	43 553	29
Rat	548	11 332	5
Chicken	356	7 390	5
<i>Drosophila</i>	2 054	13 379	15
Rice	1 374	20 477	7
<i>Arabidopsis</i>	2 680	29 993	9
Nematode	76	14 406	0.5
Yeast	610	7 598	8



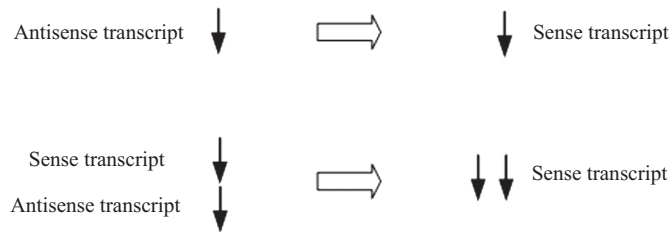
A: 头对头(5'到5')重叠, 包含5'非翻译区和编码外显子; B: 尾对尾(3'到3')重叠; C: 全部重叠。条纹框代表外显子, 黑色框代表非翻译区。

A: head-to-head (5' to 5') overlap involving 5'-untranslated regions and coding exons; B: tail-to-tail (3' to 3') overlap; C: fully overlapping. Stripe boxes represent exons and black boxes represent untranslated regions.

图1 cis-NATs的相对方位

Fig.1 Relative orientation of cis-natural antisense transcript pairs

### 1. Concordant regulation



### 2. Discordant regulation



图2 NATs的正反馈调节和负反馈调节

Fig.2 Discordant and concordant regulation of NATs

大量的非编码RNA基因<sup>[21]</sup>。NATs还参与发育过程调控, 对各种应激的适应和对病毒感染的响应<sup>[22]</sup>。

NATs通过直接的反义-正义RNA相互作用, 或通过编码与正义RNAs共表达的蛋白来调节正义转录物, 从而调控正义RNAs的编码潜能<sup>[23]</sup>。反义转录物对正义转录物的影响表现在以下两个方面<sup>[24]</sup>: (1) 不一致调节或反馈调节, 反义转录物通过负性调节方式沉默或抑制同源正义RNAs或蛋白质; (2) 一致调节或正反馈调节, 正义和反义转录物共表达, 反义转录物增加了正义RNAs水平或相应的蛋白质水平<sup>[25]</sup>。

#### 2.1 负反馈调节

负反馈调节指反义转录物浓度下降导致正义

转录浓度增加(图2)。例如在某些情况下为了刺激新生血管形成<sup>[26]</sup>, 通过G蛋白偶联受体CD97靶向其编码的反义配基DDX39最终获得增强的信号<sup>[4]</sup>。P15(cyclin-dependent kinase inhibitor 2B, CDKN2B)是一个肿瘤抑制因子, 与正常淋巴细胞相比, 白血病淋巴细胞含有较高浓度的p15反义转录物, 但是p15本身浓度却很低, 提示在白血病中p15与其反义转录物水平呈负相关<sup>[25]</sup>。这些结果提示, NATs的上调也许与肿瘤抑制基因非正常沉默密切相关, NATs可能通过相似方式又影响了其他基因。

#### 2.2 正反馈调节

正反馈调节方式是指: ①单独靶向反义RNA

导致正义mRNA下调; 或②反义RNA和正义RNA同时下调, 从而使常规的正义基因表达被附带或协同下调(图2)。转录因子Nkx2.2在神经干细胞分化成寡树突胶质细胞系中起重要定向作用。研究表明, Nkx2.2的NAT过表达促进Nkx2.2 mRNA水平适度增加, 并增强了神经干细胞向寡树突胶质细胞系的分化的潜能<sup>[27]</sup>。参与对低氧分压的适应的缺氧诱导因子-1(HIF-1)是一个异二聚体转录因子, 其亚基HIF-1a在非乳头状透明细胞肾肿瘤中高表达, 同时HIF-1a的NAT表达也上调<sup>[28]</sup>。Wrap53是p53的反义转录RNA, 它可以靶向5'非翻译区, 从mRNA和蛋白水平上增加内源性p53表达<sup>[29]</sup>。Liu等<sup>[30]</sup>发现了几个在早期成骨细胞分化中的NATs, 这些NATs增强了干扰素诱导跨膜蛋白5(interferon induced transmembrane protein 5, IFITM5)的表达和成骨细胞分化。鉴于这些正反馈调节, NATs被认为可能是一个潜在的治疗多种疾病的药物靶点。

### 3 NATs作用机制

NATs可能通过直接与正义转录物相互作用, 或通过对mRNA转录、突变、运输和翻译等靶点的影响来调节基因表达<sup>[20,27]</sup>。NATs的调节作用以双链RNAs为基础, 其作用机制包括RNA编辑<sup>[31]</sup>、RNA干扰<sup>[32]</sup>、RNA封闭<sup>[33]</sup>和转录干扰<sup>[34]</sup>等。在某种生理刺激下, NAT的启动子也有一些转录因子结合位点<sup>[35]</sup>, 一些NATs和他们相应的正义转录物有可能互相竞争结合相同的转录因子, 提示NATs和他们的正义转录物能共表达或成反比表达<sup>[36]</sup>。此外, DNA甲基化和/或组蛋白修饰也参与了基因表达调节<sup>[37]</sup>。因此, NATs与DNA甲基化和组蛋白修饰之间可能存在直接的联系。

#### 3.1 RNA编辑

靶向核编码RNA和病毒RNA双链区域的腺嘌呤脱氨酶(ADARs)是一类RNA编辑酶。这些酶在神经系统中含量丰富, 可通过改变mRNA中的密码子, 使基因组中编码信息多样化。ADARs在已知底物中的功能提示这些酶通过多种方式微调和优化很多生物通路。

#### 3.2 RNA干扰

反义RNA能够影响mRNA生物转化的最早期过程, 包括调控染色体结构、转录起始和剪切等。在血管平滑肌细胞中, RNA干扰介导的一氧化氮合

酶反义mRNA(sONE)的下调增加了内源性一氧化氮合酶(eNOS)的表达。内皮细胞中, 过表达的sONE削弱了eNOS表达。结果提示, sONE参与了转录后eNOS的调节<sup>[27]</sup>。

#### 3.3 RNA封闭

RNA封闭就是由于反义RNA与正义RNA配对形成双链, 封闭了正义转录物(pre-mRNA)的剪切位点, 使pre-mRNA发生选择性剪接改变, 或抑制了反式作用因子与pre-mRNA结合, 最终导致靶mRNA运输、翻译抑制或降解。

#### 3.4 转录干扰

转录干扰是由于NATs在转录时, 正义-反义RNAs双链(dsRNAs)上的两个RNA聚合酶II发生聚集碰撞而引起的。在简单的真核生物中, 例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 在基因及其调控元件之间由于相互挤压碰撞而产生的转录干扰是不可避免的<sup>[34]</sup>。

#### 3.5 DNA甲基化

DNA甲基化发生在CpG岛, 并且通过头甲基化酶(DNMTs), 例如DNMT3A和DNMT3B来甲基化<sup>[38]</sup>。Dnmt1以半甲基化DNA为底物来维持DNA甲基化。肿瘤的表观遗传标志物在总体基因组DNA中低甲基化, 而在肿瘤抑癌基因中超甲基化<sup>[39]</sup>。但是, 起始和协助DNA甲基化的机制还很不清楚。Imamura等<sup>[40]</sup>报道鞘氨醇激酶1(Sphk1)的NAT过表达诱导CpG岛去甲基化, 而在正义链3'非CpG位点重新甲基化。在遗传性地中海贫血中血红蛋白a2(HBA2)能指导CpG岛甲基化<sup>[41]</sup>。NAT介导的CG去甲基化和非CG甲基化提示这可能是表观遗传的一个新机制<sup>[10]</sup>。

#### 3.6 组蛋白修饰

组蛋白修饰包括甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、小泛素相关修饰和糖基化。不同修饰方式相结合导致基因活化或基因抑制<sup>[42-43]</sup>。组蛋白乙酰化和甲基化也许对DNA修复和基因转录有直接的影响。通常, 组蛋白乙酰基转移酶(HACs)和组蛋白去乙酰基转移酶(HDACs)介导的组蛋白乙酰化是一个基因活化的标志<sup>[39,44]</sup>。组蛋白甲基化由组蛋白甲基化转移酶和去甲基化转移酶调节。组蛋白H3第4位赖氨酸(H3K4)的单、双和三甲基化与转录活化密切相关, 然而组蛋白H3第9位赖氨酸(H3K9)的双和三甲基化与转录抑制密切相关<sup>[45]</sup>。而且, 组蛋白H3第20位赖氨酸甲基化与转录也密切相关<sup>[46]</sup>。Xist基因

与X染色体失活有着密切关系,在启动子区域,*Xist*基因反义转录物*Tsix*通过募集组蛋白修饰蛋白复合物可以使*Xist*失活<sup>[47]</sup>。在H3K4细胞中p15的反义转录物通过增加H3K9的二甲基化和减少H3K4二甲基化来下调p15。在启动子区,正义和反义转录物之间的双向结构的形成可能直接或间接的促进或抑制组蛋白-修饰蛋白复合物的结合。因此,NATs和组蛋白修饰之间的相互作用也为表观遗传学提供了新的机制。

NATs和DNA甲基化、NATs和组蛋白修饰以及DNA甲基化与组蛋白修饰之间的密切关系均已被发现。在基因启动子区CpG岛的超甲基化引起了局部组蛋白的去乙酰化。H3K4的去甲基化与启动子甲基化相关,然而低乙酰化诱导了DNA甲基化<sup>[48]</sup>。因此,在基因调节过程中,不同种类的表观遗传修饰紧密联系而且协同作用。

## 4 NATs与疾病

### 4.1 NATs与肿瘤

据报道在肿瘤中,大部分基因组发生了去甲基化,转录噪音增加可能引起反义转录物产生,反义转录物进而影响关键抑癌基因功能,最终导致肿瘤恶性转化。Orfanelli等<sup>[49]</sup>在黑素瘤TRPM2位点发现一种新型的正义TRPM2-TE和反义转录物TRPM2-AS。在黑素瘤中TRPM2-TE和TRPM2-AS表达上调,而且他们的活化与CpG岛甲基化状态有关。TRPM2-TE敲除和野生型TRPM2一样增加了黑素瘤对凋亡和坏死的易感性。

缺氧诱导因子-1(HIF-1)的一个反义转录物aHIF已经被证明在正常人组织中广泛表达<sup>[50]</sup>,在肾癌中由于*vhl*基因突变引起aHIF永久性地过表达<sup>[28]</sup>。此外,在乳腺癌中aHIF过表达,且aHIF表达水平与肿瘤预后呈负相关<sup>[28,51]</sup>。在永生化的淋巴细胞系中低氧可以诱导aHIF产生<sup>[28]</sup>,表明HIF-1的反义转录物aHIF与HIF-1 $\alpha$ 共同参与了代谢调控通路。

Survivin是一个新型的凋亡抑制剂,在肿瘤细胞中表达,而在正常成熟组织中不表达,被认为是一种很有潜力的抗肿瘤治疗的靶点。在一种人来源的结肠癌细胞系中,诱导survivin的一个NATs效应细胞蛋白酶受体(EPR-1),导致survivin表达下调,同时引起细胞增殖减慢,凋亡增加,对抗肿瘤制剂敏感性也增加。此外,EPR-1可使皮下肿瘤尺寸显著减小,

如果与抗肿瘤药物联合使用这种效应会增强。这些结果提示,通过诱导*EPR-1* cDNA来调节survivin也许是一种非常有潜力的治疗结肠癌的方法<sup>[52]</sup>。Cappaccioli等<sup>[53]</sup>发现了一个*bcl-2*/IgH的反义转录物下调了人滤泡淋巴瘤细胞系t(14;18) DOHH2中*bcl-2*基因的表达。

### 4.2 NATs与人类其他疾病

与目前广泛应用的沉默基因或改造在mRNA剪接方式等方法相比,体内特异性基因的上调是基因治疗的可望而不可及的目标。Modarresi及其同事<sup>[54]</sup>成功上调了脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)表达。他们通过抑制BDNF的一个NAT来阻断寡核苷酸向小鼠中枢神经系统的运输,从而抑制了BDNF水平,这将是大量神经退行性疾病治疗的一个重要靶点,如果采用小分子或microRNA抑制剂,有可能导致不相干的基因活化。亨丁顿舞蹈症(Huntington's disease, HD)是一种渐进性的神经退化性疾病,是由亨丁顿(HTT)基因外显子的一个CAG重复扩增而引起。Chung等<sup>[55]</sup>鉴定出HTT反义RNA(HTTAS),即一个在HD重复序列位点的NAT,HTTAS从4个选择性位点起始转录,在HD大脑组织中发现2个HTTAS剪切异构体。

几乎所有的人类遗传疾病均是由于个别几个相关基因或调控序列的突变而引起的。Tufarelli等<sup>[56]</sup>研究发现,在转基因模型小鼠以及分化的干细胞中,RNA反义转录物介导相关CpG岛的沉默和甲基化。这些发现提出了一个人类遗传性疾病发生的新机制。

## 5 总结与展望

综上所述,哺乳动物NATs的主要特点如下<sup>[24]</sup>:(1)NATs比以前假设的种类更多;(2)NATs代表了一种基因调节现象;(3)NATs更普遍的是代表非编码RNA;(4)NATs以顺式(与相应正义转录物在相同位点)或反式(与相应正义转录物相隔一段距离)形式出现;(5)只有极少数NATs功能被注释;(6)有一些NAT参与生理或病理功能调节;(7)NAT可能是一类潜在的新兴药物靶点,可以使正义基因和/或转录物上调或下调。

NATs是一类调节RNAs,在mRNA和/或蛋白水平上,对正义转录物起重要调节作用<sup>[8]</sup>。通过正义-反义双向结构的形成,NAT以正反馈或负反馈方式

调节正义转录物。在正反馈调节中, 通过上调肿瘤抑制基因NATs来再活化异常沉默的肿瘤抑制基因。相反, 在正反馈调节中, 过度表达的原癌基因可以被下调的NATs沉默。对不能耐受化疗药物毒性的患者来说, NATs可能是另一种新型的治疗方法。而且, 在肿瘤组织中NATs的表达水平与正常组织中不同。因此, NATs可以作为监测肿瘤发展的分子标志物。

表观遗传的改变是可逆的, 并且在疾病的发生和发展中逐渐引起了重视。表观遗传治疗也被认为是最有前景的治疗方法之一<sup>[57]</sup>。最近, 两类抑制DNA甲基化或组蛋白乙酰化的表观遗传药物已经被研制, 包括DNMT抑制剂(例如5-氮杂胞苷和地西他滨)、HDACs抑制剂(曲古菌素A、异羟肟酸), 部分药物已经应用与临床<sup>[58-59]</sup>。但最近研究表明, 一些患者不能耐受药物毒性。因此, 探寻其他有前景的药物是必须的。调节RNAs在表观遗传过程中起重要作用, 这为药物设计策略提供了新的未来。很多调节RNAs对蛋白编码基因敏感<sup>[60]</sup>。

自从最初直接将反义转录物作为新兴药物候选靶点迄今已20余年了, 很多研究相继采用小分子、反义寡核苷酸、核酶或寡核苷酸适配子等, 重点瞄准mRNAs。在欧洲一些反义药物已经进入临床试验阶段。福米韦生(Vitracene)是第一个被美国FDA批准的反义药物, 用于艾滋病病毒视网膜炎的治疗<sup>[61]</sup>。G3139是Bcl-2的反义寡核苷酸, 能从mRNA和蛋白水平上下调Bcl-2表达。G3139已经应用于人类疾病临床三期试验<sup>[62]</sup>。NATs是细胞中内源性的转录物, 且广泛存在, 不仅以有效的和特异的方式调节其相应正义转录物而且副作用小, 在体内几乎没有毒性。NATs可能是一种丰富的生物分子资源, 可用于表观遗传学, 在未来有潜在的诊断和治疗价值<sup>[60]</sup>。

### 参考文献 (References)

- 1 Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, Willingham AT, *et al.* RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 2007; 316(5830): 1484-8.
- 2 Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, *et al.* Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 2009; 458(7235): 223-7.
- 3 Nakaya HI, Amaral PP, Louro R, Lopes A, Fachel AA, Moreira YB, *et al.* Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. *Genome Biology* 2007; 8(3): R43.
- 4 Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, *et al.* Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 2005; 309(5740): 1564-6.
- 5 Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, *et al.* The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; 309(5740): 1559-63.
- 6 Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, *et al.* Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007; 447(7146): 799-816.
- 7 Clark MB, Amaral PP, Schlesinger FJ, Dinger ME, Taft RJ, Rinn JL, *et al.* The reality of pervasive transcription. *PLoS Biol* 2011; 9(7): e1000625.
- 8 Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, *et al.* Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med* 2008; 14(7): 723-30.
- 9 Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464(7291): 1071-6.
- 10 Werner A, Sayer JA. Naturally occurring antisense RNA: Function and mechanisms of action. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; 18(4): 343-9.
- 11 Lapidot M, Pilpel Y. Genome-wide natural antisense transcription: Coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *Embo Reports* 2006; 7(12): 1216-22.
- 12 Jin H, Vacic V, Girke T, Lonardi S, Zhu JK. Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis*. *BMC Mol Biol* 2008; 9: 6.
- 13 Beiter T, Reich E, Williams RW, Simon P. Antisense transcription: A critical look in both directions. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(1): 94-112.
- 14 Yin Y, Zhao Y, Wang J, Liu C, Chen S, Chen R, *et al.* antiCODE: A natural sense-antisense transcripts database. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 319.
- 15 Li YY, Qin L, Guo ZM, Liu L, Xu H, Hao P, *et al.* In silico discovery of human natural antisense transcripts. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 18.
- 16 Barrell BG, Air GM, Hutchison CA. Overlapping genes in bacteriophage-Psix174. *Nature* 1976; 264(5581): 34-41.
- 17 Tomizawa J, Itoh T, Selzer G, Som T. Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(3): 1421-5.
- 18 Williams T, Fried M. A mouse locus at which transcription from both DNA strands produces messenger-rnas complementary at their 3' ends. *Nature* 1986; 322(6076): 275-9.
- 19 Werner A, Carlile M, Swan D. What do natural antisense transcripts regulate? *RNA Biol* 2009; 6(1): 43-8.
- 20 Vanhee-Brossollet C, Vaquero C. Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes? *Gene* 1998; 211(1): 1-9.
- 21 Kaneda M. Genomic imprinting in mammals-epigenetic parental memories. *Differentiation* 2011; 82(2): 51-6.
- 22 Wang XJ, Gaasterland T, Chua NH. Genome-wide prediction and identification of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* 2005; 6(4): R30.
- 23 Dolnick BJ. Naturally occurring antisense RNA. *Pharmacol Ther*

- 1997; 75(3): 179-84.
- 24 Wahlestedt C. Natural antisense and noncoding RNA transcripts as potential drug targets. *Drug Discov Today* 2006; 11(11/12): 503-8.
  - 25 Yu WQ, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, *et al.* Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature* 2008; 451(7175): 202-7.
  - 26 Wang T, Ward Y, Tian LH, Lake R, Guedez L, Stetler-Stevenson WG, *et al.* CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counterreceptors on endothelial cells. *Blood* 2005; 105(7): 2836-44.
  - 27 Tochitani S, Hayashizaki Y. Nkx2.2 antisense RNA overexpression enhanced oligodendrocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372(4): 691-6.
  - 28 Thrash-Bingham CA, Tartof KD. aHIF: A natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(2): 143-51.
  - 29 Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M, Méndez-Vidal C, Wiman KG, Farnebo M. Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Mol Cell* 2009; 33(4): 462-71.
  - 30 Liu YS, Liu H, Titus L, Boden SD. Natural antisense transcripts enhance bone formation by increasing sense IFITM5 transcription. *Bone* 2012; 51(5): 933-8.
  - 31 Bass BL. RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 817-46.
  - 32 Robb GB, Carson AR, Tai SC, Fish JE, Singh S, Yamada T, *et al.* Post-transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by an overlapping antisense mRNA transcript. *J Biol Chem* 2004; 279(36): 37982-96.
  - 33 Beltran M, Puig I, Pena C, Garcia JM, Alvarez AB, Pena R, *et al.* A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev* 2008; 22(6): 756-69.
  - 34 Prescott EM, Proudfoot NJ. Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(13): 8796-801.
  - 35 Werner A. Natural antisense transcripts. *RNA Biol* 2005; 2(2): 53-62.
  - 36 Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA, Kampha D, *et al.* Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 2004; 116(4): 499-509.
  - 37 Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(2): 143-53.
  - 38 Moss TJ, Wallrath LL. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat Res* 2007; 618(1/2): 163-74.
  - 39 Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(11): 1148-59.
  - 40 Imamura T, Yamamoto S, Ohgane J, Hattori N, Tanaka S, Shiota K. Non-coding RNA directed DNA demethylation of Sphk1 CpG island. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322(2): 593-600.
  - 41 Werner A, Berdal A. Natural antisense transcripts: Sound or silence? *Physiol Genomics* 2005; 23(2): 125-31.
  - 42 Fouse SD, Costello JF. Epigenetics of neurological cancers. *Future Oncol* 2009; 5(10): 1615-29.
  - 43 Tian X, Fang J. Current perspectives on histone demethylases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007; 39(2): 81-8.
  - 44 Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007; 128(4): 669-81.
  - 45 Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 2007; 447(7143): 407-12.
  - 46 Karpf AR, Matsui S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65(19): 8635-9.
  - 47 Ohhata T, Hoki Y, Sasaki H, Sado T. Crucial role of antisense transcription across the Xist promoter in Tsix-mediated Xist chromatin modification. *Development* 2008; 135(2): 227-35.
  - 48 Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3(6): 415-28.
  - 49 Orfanelli U, Wenke AK, Doglioni C, Russo V, Bosserhoff AK, Lavorgna G. Identification of novel sense and antisense transcription at the TRPM2 locus in cancer. *Cell Res* 2008; 18(11): 1128-40.
  - 50 Rossignol F, Vache C, Clottes E. Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor 1alpha are detected in different normal and tumour human tissues. *Gene* 2002; 299(1/2): 135-40.
  - 51 Cayre A, Rossignol F, Clottes E, Penault-Llorca F. aHIF but not HIF-1alpha transcript is a poor prognostic marker in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003; 5(6): R223-30.
  - 52 Yamamoto T, Manome Y, Nakamura M, Tanigawa N. Downregulation of survivin expression by induction of the effector cell protease receptor-1 reduces tumor growth potential and results in an increased sensitivity to anticancer agents in human colon cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38(17): 2316-24.
  - 53 Capaccioli S, Quattrone A, Schiavone N, Calastretti A, Copreni E, Bevilacqua A, *et al.* A bcl-2/IgH antisense transcript deregulates bcl-2 gene expression in human follicular lymphoma t(14;18) cell lines. *Oncogene* 1996; 13(1): 105-15.
  - 54 Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, Fatemi RP, Magistri M, Brothers SP, *et al.* Inhibition of natural antisense transcripts *in vivo* results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nat Biotechnol* 2012; 30(5): 453-9.
  - 55 Chung DW, Rudnicki DD, Yu L, Margolis RL. A natural antisense transcript at the Huntington's disease repeat locus regulates HTT expression. *Hum Mol Genet* 2011; 20(17): 3467-77.
  - 56 Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG, *et al.* Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet* 2003; 34(2): 157-65.
  - 57 Gronbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007; 115(10): 1039-59.
  - 58 Brown R, Strathdee G. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends Mol Med* 2002; 8(4 Suppl): S43-8.
  - 59 Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: A model for epigenetic tumorigenesis. *Gut* 2007; 56(1): 140-8.
  - 60 Morris KV. Long antisense non-coding RNAs function to direct epigenetic complexes that regulate transcription in human cells. *Epigenetics* 2009; 4(5): 296-301.
  - 61 Geary RS, Henry SP, Grillone LR. Fomivirsen: Clinical pharmacology and potential drug interactions. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41(4): 255-60.
  - 62 Joyner DE, Albritton KH, Bastar JD, Randall RL. G3139 antisense oligonucleotide directed against antiapoptotic Bcl-2 enhances doxorubicin cytotoxicity in the FU-SY-1 synovial sarcoma cell line. *J Orthop Res* 2006; 24(3): 474-80.