

反义 RNA 转录——基因表达调控的一种表观遗传学机制

邓伟 陈琴花 范怡梅* 王亚平

(南京大学医学院医学遗传学研究室, 江苏省医学分子技术重点实验室, 南京 210093)

摘要 反义 RNA(antisense RNA, AS-RNA)是一种存在于细胞内的非编码 RNA, 反义转录在哺乳动物基因组中广泛存在, 可能在基因表达的相关调控机制中起着重要作用。目前研究发现, AS-RNA 主要是通过表观遗传学上的改变, 对基因进行调控。DNA 甲基化水平的改变, 组蛋白修饰引起的染色质构型重塑, 以及其它非编码 RNA 的调控作用均与 AS-RNA 有着密切的关系。

关键词 反义 RNA; 基因表达调控; DNA 甲基化; 异染色质化; siRNA

反义 RNA(antisense RNA, AS-RNA)是指能与特定 DNA 或 RNA 互补结合的 RNA 片段。早在 1967 年就有人预测 AS-RNA 的存在, 直到 1977 年才在体外利用寡核苷酸合成的方法合成了 AS-RNA^[1]。之后, 天然的 AS-RNA 也陆续被报道出来, 首例是在细菌中发现的。哺乳动物内源性的 AS-RNA 首次被鉴定出来约在 20 年前^[2]。随后, 陆续有哺乳动物中 ncNAT (non-coding natural antisense)的报道^[3-7]。生物信息学技术分析显示高达 72% 的转录子有相应的反义序列^[8]。人类细胞株的研究显示, 反义转录在人类细胞中普遍存在, 不同细胞株中 2 900~6 400 个人类基因具有反义转录序列^[9]。进一步研究表明, AS-RNA 具有广泛的作用, 如在基因转录、RNA 稳定性、信使 RNA(mRNA)前体加工、mRNA 运输和翻译等多方面扮演重要角色, AS-RNA 表达紊乱可以改变某些基因的表达^[10,11]。

1 AS-RNA 转录的特征

1.1 顺式作用的 AS-RNA

顺式作用的天然反义转录序列(*cis* natural antisense transcripts, *cis*-NATs)具有相对应的 mRNA, 它们位于相同的基因位点, 不同的是 *cis*-NATs 转录的是异于 mRNA 转录的另一条 DNA 链^[12]。转录干扰、RNA 遮蔽(RNA masking)、双链 RNA 依赖机制以及 AS-RNA 诱导的 DNA 甲基化等对于 AS-RNA 的顺式调控均可能发挥重要作用^[13]。

顺式作用的反义转录序列, 主要有 4 种基因排列方式: “尾对尾(tail to tail)”(3' 末端相互重叠, 图 1A), “头对头(head to head)”(5' 端相互重叠, 图 1B), 一个

转录序列起始于另一个转录序列的内含子区(图 1C), 一个转录序列包含于另一个转录序列中(图 1D)。当考虑基因启动子区的 CpG 岛时, 后面的两种结构(图 1C, 图 1D)较好地解释了 AS-RNA 在 DNA 甲基化和正义基因启动子区沉默中所起的作用。而图 1B 则代表那些共享双向 CpG 岛的基因^[13,14]。

1.2 反式作用的 AS-RNA

相比较顺式作用的反义序列, 反式作用的反义序列的研究就相当少了。顺式作用的正义/反义对(*cis*-sense/antisense, *cis*-SA), 是在相同的基因位点, 相反



Fig.1 Relative organization of *cis* sense/antisense gene pairs^[13]

收稿日期: 2009-04-07 接受日期: 2010-06-25

江苏省自然科学基金(No.BK2008269)和江苏省国际科技合作计划(No.BZ2008055)资助项目

* 通讯作者。Tel: 025-83686495, Fax: 025-83686559, E-mail: ymfan@nju.edu.cn

的DNA链上转录的转录序列对,它们之间具有完善的RNA-RNA互补特性。而反式作用的正义/反义对(*trans-sense/antisense, trans-SA*),则是从不同的基因位点上转录而来,可能具有不完善的互补特性。2008年, Li等^[15]采用生物信息学方法推测包括人类在内的10个物种中含有*trans-SAs*。存在于*trans-SAs*中的转录单位(transcriptional units, TUs)占有所有TUs的比例高达4.13%。人类的2 896个TUs(约占人类所有TUs的2.89%)存在于3 327对*trans-SAs*中(有时一个TU存在于两个或者更多的*trans-SAs*中)。在*trans-SAs*中,组成RNA-RNA杂交链可能的配对形式有4种:“单个型(Single)”,两个转录序列都只含有一个高的分配对区(high-scoring pairs, HSPs);“选择型(Optional)”,一个转录序列含有一个HSP,另一个转录序列中含有不止一个HSP可以与之配对;“并联型(Parallel)”,两个转录序列中都含有不止一个HSP可以互补配对;“混合型(Mixed)”,为以上各种类型(两种或两种以上)的综合。同时还显示,在10个物种中,“单个型”所占的比例相对于其他三个类型具有绝对优势。

2 内源性AS-RNA的生物学作用

2.1 印迹基因中的AS-RNA

大多数的AS-RNA序列存在于印迹基因中,并且所有印迹基因中的反义转录序列均为父源性等位基因转录而来^[13]。

2.1.1 *Igf2r/Air* *Igf2r/Air* 正义-反义基因对(sense-antisense gene pair)是个典型例子。印迹基因*Igf2r*中存在两个差异甲基化区(differentially methylated regions, DMRs), DMR1存在于基因的启动子区, DMR2存在于第二内含子中,与此同时,第二内含子区又是*Air*基因(*Igf2r*的反义序列)的启动子区。DMR1为父源性的甲基化区, DMR2为母源性的甲基化区。去除*Igf2r*内含子区的CpG岛(该区域为反义转录起始点),则AS-RNA不能表达,从而使*Igf2r*基因印迹丢失。此例是反义转录序列在*Igf2r*基因印迹中发挥作用的首个证据^[16,17]。

2.1.2 *Xist/Tsix* 基因对*Xist/Tsix*在启动X染色体失活中起着重要作用。X染色体失活的起始需要非编码RNA*Xist*(*in cis*)的表达,从而向四周扩散并覆盖在失活的X染色体上。在小鼠中,*Xist* RNA表达的调控受到其AS-RNA *Tsix*表达的影响。2005年, Navarro等^[18]研究发现,*Tsix*的转录序列(即*Xist-AS*)可

以诱导*Xist/Tsix*区域H3K4的二甲基化,显示*Tsix*在*Xist*区域染色质构型重塑中起着重要的作用。

2.2 非印迹基因中的AS-RNA

AS-RNA不仅存在于印迹基因中,同样也存在于非印迹基因中,并且可能与遗传性疾病存在一定的关系,例如 α -地中海贫血中的珠蛋白基因簇和白血病相关基因*p15*。

2.2.1 α -^{ZF} AS-RNA可能诱导基因CpG岛区发生甲基化,从而引起基因表达沉默。人类 α -珠蛋白基因呈簇分布在16号染色体短臂临近着丝粒的区域,此区域富含CG,且基因密集。在此区域的所有基因(包括 α -珠蛋白基因)的启动子区都含有去甲基化的CpG岛。2003年, Tufarelli等^[19]报道,在一个 α -地中海贫血的个体中,编码珠蛋白的基因存在单一缺失(称为 α -^{ZF}),即 $\alpha 1$ -珠蛋白(*HBA1*)、 θ -珠蛋白(*HBQ1*)以及其下游基因*LUC7L*末端的缺失(*LUC7L*基因的转录与 α 珠蛋白基因的转录呈逆向进行)。该缺失并不包含邻近的 $\alpha 2$ -珠蛋白(*HBA2*)基因(图2)。然而, α -^{ZF}个体中 α -珠蛋白基因表达全部缺失,同时基因CpG岛出现高度甲基化,并且出现了一段大约2 Kb的核酸内切酶不敏感区。提示*LUC7L*基因的转录由于末端缺失可能不会正常终止(丢失了最后3个外显子),将越过 α -^{ZF}断裂点一直转录至*HBA2* CpG岛,这样就产生了*HBA2*的特异性AS-RNA,从而引起*HBA2*基因表达沉默。

2.2.2 *p15/p15AS* 核小体核心组蛋白的尾部常常发生翻译后修饰,包括甲基化、磷酸化、乙酰化、泛素化和ADP核糖基化等。这些修饰可以影响组蛋白与DNA的亲合性从而改变染色质的状态,也可以影响转录因子与DNA序列的结合,对基因表达调控

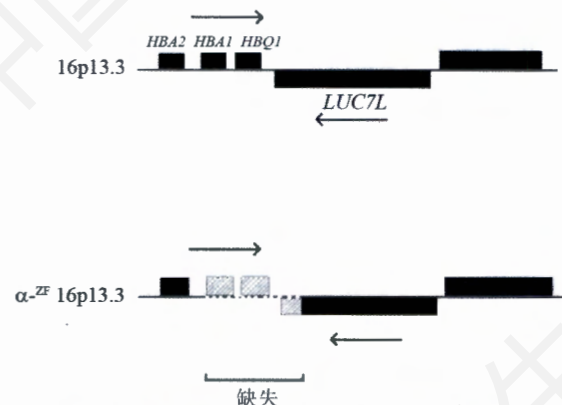


Fig.2 The 16p telomeric region from a normal chromosome (16p13.3) and from the ZF-deleted chromosome (α -^{ZF}16p13.3)^[19]

具有重要作用。研究显示, AS-RNA 可能在异染色质重塑过程中发挥重要作用。2008 年, Cui 等^[20]的工作显示, 多个抑癌基因伴有反义转录序列。他们在白血病细胞中鉴定出抑癌基因 *p15* 的 AS-RNA 转录序列 (*p15AS*)。HCT116 细胞中的离体实验显示, 转入外源性的 *p15AS* 不仅消除了外源性的 *p15* 表达, 而且降低了大部分内源性 *p15* 的表达。同时细胞中外源性 *p15* 启动子区与外显子 1 区检测到组蛋白修饰。表现为 H3K9 的二甲基化显著增加, 而 H3K4 的二甲基化却有所降低。这种组蛋白修饰现象在内源性 *p15* 转录起始点附近区域也有发生。提示 AS-RNA 可能通过诱导异染色质化使正义的 *p15* 转录沉默, 而且 AS-RNA 可能在异染色质重塑过程中同时具有顺式 (*in cis*) 和反式 (*in trans*) 作用, 且顺式作用可能要强于反式作用。

有理论^[21]认为, 在肿瘤的发生过程中, 肿瘤干细胞早期存在表观遗传修饰。AS-RNA 是否与这种干细胞中的表观遗传修饰有关呢? Cui 等^[20]将抑癌基因 *p15* 的反义序列表达质粒导入小鼠的胚胎干细胞中, 发现异染色质化是基因沉默的先决条件, 而不是 DNA 甲基化。然而在分化中的胚胎干细胞中 (一周后测定), *p15* 的启动子区出现了高甲基化的现象。以上结果说明 *p15AS* 首先通过异染色质形成, 随后是 DNA 甲基化, 产生持久的 *p15* 正义基因表达抑制, 这构成了部分白血病发生的分子机制。

2.2.3 *p53/Wrap53* 抑癌基因 *p53*, 是至今发现的与人类肿瘤相关性最高的基因, 几乎所有类型的肿瘤中均可见 *p53* 的体细胞突变。2009 年, Mahmoudi 等^[22]研究发现, *p53* 基因的反义序列 *Wrap53* 可以调控内源性 *p53* mRNA 的水平, 并且靶向作用于 *p53* mRNA 5' 端非翻译区进一步诱导 *p53* 蛋白质的表达。在小干扰 RNA 的作用下, 敲除 *Wrap53* 可以引起 *p53* mRNA 表达量的显著降低, 同时抑制了 DNA 损伤时 *p53* 的诱导。相反, *Wrap53* 过量表达将引起 *p53* mRNA 和 *p53* 蛋白质表达量的显著升高。如果阻断 *Wrap53/p53* RNA 相互杂交, 将大大降低 *p53* 的表达量, 效果几乎等同于 *Wrap53* 被敲除。这提示我们, *Wrap53* 调控 *p53* 是通过 *Wrap53* 与 *p53* 两者之间 RNA 的相互作用实现的。这项研究不仅揭示了一种控制 *p53* 的调节途径, 而且也提出了在人类细胞中, AS-RNA 介导的基因调控的一般机制。可以看出, *Wrap53* 基因的表达不仅没有降低 *p53* 基因的表达, 反而升高了其表达水平, 说明 AS-RNA 可能不仅仅具有诱导基因表达

沉默的作用, 在某些情况下也具有活化基因的作用。

3 AS-RNA 调节基因表达的机制

3.1 顺式作用与反式作用模型

3.1.1 顺式作用模型 迄今为止, 顺式作用的天然反义转录序列 (*cis* natural antisense transcripts, *cis*-NATs) 对基因表达的调控共有三种模型进行解释。

第一个模型: *cis*-NATs 通过与之相对应的 mRNA 形成双链结构, 来抑制 mRNA 的功能, 包括蛋白质的合成。在这个模型中, *cis*-NATs 至少要重叠 6~8 bp 的区域以形成稳定的双链 RNA^[23,24]。

第二个模型引入了表观遗传调节的概念, 如启动子区的甲基化, 染色质的重塑。然后通过现阶段仍未知的机制, 通过 AS-RNA 促使正义 RNA 的启动子区甲基化和染色质重塑, 达到抑制其表达的目的。在这一模型中, *cis*-NATs 在表观遗传调控机制中的作用, 依然不清楚^[16,25]。

第三个模型称之为转录碰撞 (*transcriptional collisions*)^[12]。在转录 *cis*-NATs 的过程中, 两个 RNA 聚合酶分别与正 - 反义基因的启动子区结合, 开始合成 RNA, 并向两者的 3' 端移动, 这样当两个 RNA 聚合酶在两者之间的重叠区域相遇时, 即开始转录碰撞, 从而抑制它们的转录过程^[26~28]。

2007 年, Osato 等^[12]的研究表明, 在人类和小鼠中, *cis*-NATs 的表达量随着重叠区域长度的增加而递减。当重叠区域为 1~200 bp 时, 高表达 (比例大于 1%) 的 *cis*-NATs 占总数的 36%, 而当重叠区域大于 2 000 bp 时, 高表达的 *cis*-NATs 几乎为零。按照转录碰撞模型, 随着重叠区域的增加, RNA 聚合酶碰撞的几率将会增加, 从而抑制作用就会增强, 与实验结果是一致的。不仅如此, *cis*-NATs 的表达量还与顺式 AS-RNA 的排列方式有关。在图 1 中, 介绍了 4 种顺式 AS-RNA 的排列方式。实验结果显示, 不论是人类还是小鼠, “尾对尾” 的排列方式中高表达 (比例大于 1%) *cis*-NATs 所占比例最高, 分别是 “头对头” 排列方式的 1.6 倍, 包含方式的 1.7 倍。这也与转录碰撞模型相一致, 即在 “尾对尾” 的排列方式中, RNA 聚合酶相遇碰撞的机会最少, 故其受到的抑制最小, 表现为 *cis*-NATs 高表达。由于这些现象不仅存在于人类中, 也存在于小鼠中, 可以推测, 转录碰撞模型可能是一种广泛的调控机制, 而其他两种模型目前尚无确切的证据。

3.1.2 反式作用模型 反式作用的反义转录序列

的作用机制研究得比较少。2008年, Li等^[15]将 *trans*-SAs 划分成3类, 即蛋白质编码-蛋白质编码对 (protein-coding-protein-coding pairs, p-p pairs), 非编码-蛋白质编码对 (noncoding-protein-coding pairs, n-p pairs), 非编码-非编码对 (noncoding-noncoding pairs, n-n pairs)。根据他们的研究, 平均每个非编码的转录单位存在于2.5个 *trans*-SAs 中。提示我们, 一些非编码RNAs可能不仅具有反式作用的反义转录活性, 而且可能调控多个靶点。非编码的转录单位可能与正义序列的不同区域重叠, 不同的重叠方式可能具有不同的调控机制。与正义序列编码区重叠的, 可能通过RNA干扰机制破坏正义基因转录, 或干扰正义转录子与其相应的反式作用蛋白之间的相互作用; 与3'端重叠的, 可能会影响正义mRNA在胞浆中的稳定性或者影响其转运出细胞核; 与5'端重叠的, 可能类似于RNA III调控mRNA翻译的起始。

综上所述, 不论是顺式作用还是反式作用, 对于AS-RNA的作用机制才刚刚开始, 很多方面还有待研究。

3.2 AS-RNA对基因表达不同阶段的调节

3.2.1 转录水平的调节

3.2.1.1 转录干扰 AS-RNA可能直接作用于基因启动子区, 或与转录因子结合, 影响转录起始复合物的招募以及转录延伸的进行, 从而调节编码基因表达。

2007年, Martjanov等^[29]在编码二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, *DHFR*) 基因位点中发现, 一个由部分内含子转录的非编码RNA通过与*DHFR*基因启动子的主要区域相互作用, 并形成稳定的复合物, 从而降低了*DHFR* RNA的转录。

2008年, Schwartz等^[30]研究发现, 反义转录序列的剪接体与孕激素受体基因 (progesterone receptor gene, *PGR*) 的启动子区域相互重叠是*PGR*基因表达活化所必需的。进一步研究指出, *antigene* RNA与*PGR*基因启动子区互补的小的双螺旋RNAs, 可能通过与反义转录序列剪接体的键合而活化或抑制*PGR*基因的表达。

3.2.1.2 基因表达的表观遗传调节 AS-RNA可能通过诱导DNA去甲基化进行基因调控。2004年, Imamura等^[31]在大鼠基因组中发现*Sphk1* (鞘氨醇激酶1的基因) 的AS-RNA——*Khps1a*, 该内源性AS-RNA与*Sphk1*基因组织依赖型差异甲基化区 (tissue-dependent differentially methylated region, T-DMR) 重叠。该AS-RNA的过度表达诱导*Sphk1*基因

DMR区CG位点去甲基化, 以及T-DMR中的三个CC (A/T)GG位点的甲基化。进一步在原代培养细胞中等位基因表达分析显示, 单个细胞中, 不会同时表达*Khps1a*与*Sphk1*, 提示这两种基因的表达是相互排斥的。这种RNA介导的CG去甲基化与非CG甲基化, 提出了一种新的表观遗传学调控机制。

染色质重塑也是AS-RNA调节正义基因表达的可能途径。2006年, Kanduri等^[32]的工作表明, *Kcnqlot1*启动子区的反义序列的长度决定着双向基因沉默和异染色质重塑的程度。研究显示, 该基因长的反义序列在沉默周边基因上比短的反义序列更加有效。主要是通过异染色质重塑实现的, 体现在H3K9由单甲基化、二甲基化向三甲基化的转变。他们推测了两种可能的机制: (1)长的AS-RNA需要长时间的合成, 这样就使其处于转录状态的时间变长, 有利于异染色质相关复合物的招募; (2)长的反义序列通过顺式作用 (*in cis*) 与DNA的结合较短的反义序列更加有效。此外他们还发现, 在小鼠中, 虽然反义转录子*Kcnqlot1*只与*Kcnql*基因重叠, 但是却能影响多个非重叠基因 (non-overlapping genes)。不过, AS-RNA对于重叠基因 (overlapping genes) 的沉默作用要远早于非重叠基因。他们推测, 反义序列的转录以及侧翼染色质区的表观修饰可能与RNA聚合酶前体复合物的形成也存在一定关系。进一步, AS-RNA介导的异染色质作用, 不仅限于基因启动子区, 而且也存在于非启动子区, 即表现出表观修饰的线性扩张。

与2.1.1描述的*Igf2r/Air*正义-反义基因对的CpG岛甲基化相关机制不同, *Air*基因在印迹基因*Slc22a3*的沉默机制中所起的作用与染色质重塑有关。2008年, Nagano等^[33]在研究小鼠胎盘时发现, 位于*Air*基因上游远端的基因*Slc22a3*表达沉默可能与*Air*基因所转录的反义RNA与*Slc22a3*基因的启动子区发生特异性的相互作用有关。这种由*Air*基因转录的反义RNA在*Slc22a3*基因启动子区处聚集, 并招募组蛋白甲基化转移G9a, 从而引起H3K9甲基化, *Slc22a3*等位基因表达沉默。

2009年, Jurgi等^[34]在酿酒酵母 (*S.cerevisiae*) 中发现了相关反式作用的AS-RNA沉默编码基因转录的证据。转染*PHO84*基因质粒于酵母细胞, 出现了转染的外源性*PHO84*基因和酵母内源性*PHO84*基因均表达沉默的现象。这种在转录水平上的表达抑制现象, 不依赖于基因的位置, 而是需要反式作用的AS-RNAs。提示AS-RNAs既能以顺式作用, 也能以反

式作用方式诱导转录基因的沉默。进一步,在反式作用中,需要有包含 *PHO84* 3' 末端及上游活化序列 (UAS) 互补序列的全长 AS-RNA。相比顺式作用的 AS-RNA 依赖于组蛋白去乙酰化转移酶复合物 Hda1/2/3, 反式作用的 AS-RNA 所引起的基因表达沉默则独立于 Hda1/2/3。在反式作用中, 组蛋白甲基化转移酶 Set1 可能通过增加 AS-RNA 的表达量从而起到沉默基因转录的作用。

3.2.2 转录后调节

AS-RNA 对于 mRNA 转录后处理的不同阶段(包括剪接、编辑、转运、翻译与降解等)也具有调节作用。

对于 mRNA 前体剪接过程的调节是 AS-RNA 可能的作用靶点。长 1 500 nt 的 *SAF* 基因为人类 *FAS* 基因内含子 1 对应的部分互补链区域, *SAF* 基因的过度表达可以使 *FAS* 基因产生不同的 RNA 剪接产物, 从而产生不同的蛋白产物, 这样就可以增强细胞对 *FAS* 基因相关的细胞凋亡的耐受性^[35]。

对于 mRNA 稳定性的调节也可能是部分 AS-RNA 的作用机制。通常情况下, 哺乳动物的不稳定的编码 RNA 具有富含 AU 的区域, 决定着编码 RNA 的半衰期。在 B- 细胞淋巴瘤中, 14 号染色体与 18 号染色体易位, 一个名为 *bcl-2/IgH* 的反义转录序列可能通过遮蔽位于 *bcl-2* mRNA 的 3' 未翻译区的富含 AU 区域, 提高 *bcl-2* mRNA 的稳定性, 从而上调该基因的表达水平^[36]。

4 siRNA 对 AS-RNA 的调控作用——潜在的药物治疗靶点

在正常人体细胞中, 正义和反义 RNA 的转录水平是一种平衡, 当它们失去平衡时, 就会导致基因表达的紊乱。存在于人体细胞中的 siRNA 对于转录平衡具有重要的调控作用。

Wahlestedt^[37]提出 siRNA 作用机制。在非协调的调控机制(discordant regulation)中, siRNA 可以阻断 AS-RNA 表达, 导致正义链表达的升高, 如 *CD97* 的表达, 通过作用于它的反义序列 *DDX39*, 可以激活和增强 *CD97* 的表达; 在协调的调控机制(concordant regulation)中, siRNA 有两种作用: 作用于 AS-RNA 导致正义链表达的降低; 或同时作用于正义和反义链, 大大的降低正义链的表达。

Morris 等^[38]研究发现 siRNA(*p21-322* 与 *si-Bx332409*), 会引起 *p21AS-RNA Bx332409* 转录后抑

制, 使得 *p21* 正义序列启动子区 Ago-1 与 H3K27 三甲基化丢失, 从而增加 *p21* 正义序列 mRNA 的转录。siRNA 除了可以作用于 AS-RNA 外, 还可以作用于正义的 mRNA。如作用于 *p21* mRNA 的 siRNA (*p21-si52* 和 *p21-si858*), 使 *p21* mRNA 表达降低, 增强了 *p21AS-RNA* 转录, 并招募 Ago-1 和三甲基化 H3K27, 从而进一步增强了 *p21* 基因沉默。

在 2.1.2 所述基因对 *Xist/Tsix* 介导 X 染色体失活过程中, RNA 干扰(RNAi)也有可能扮演重要角色。Ogawa 等^[39]在 *Xist* 沉默 X 染色体的关键区域(A 区)、*Xist* 外显子 7 区以及启动子区相应的 *Xist* 与 *Tsix* 链位置, 均检出小 RNA 转录序列。鼠的在体实验显示, 起始阶段 *Xist* 与 *Tsix* 两基因的转录序列在两条 X 染色体上均形成双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)。在 X 染色体失活过程中, 具有活性的 X 染色体(Xa)中的 *Tsix* 持续表达, 导致该 dsRNA 以 Dicer 依赖方式被处理成小 RNAs (称为 X 染色体失活 RNA, X-inactivation RNA, xiRNA), 该 xiRNA 进而以顺式作用局部抑制 *Xist*。进一步研究提示, Dicer 在 X 染色体失活的过程中除了局部控制 xiRNA 和 *Xist* RNA 的表达, 整体上 Dicer 还可以调节失活的 X 染色体(Xi)上 *Xist* RNA 的聚集和 H3K27 的三甲基化。

在 3.2.1.1 提及的 *PGR* 基因转录研究中, Schwartz 等^[30]发现 *antigene RNA* 可以与 AS-RNA 键合, 并招募 Argonaute 蛋白(Ago 蛋白), 导致不均一核蛋白 k (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-k, hnRNP-k) 从染色质转移到反义转录序列上来。在基因表达激活中, 如在 MCF7 乳腺癌细胞株中, agRNA 招募 RNA 聚合酶 II, 并且异染色质蛋白 1 γ (heterochromatin protein 1 γ , HP1 γ)水平下调; 而在基因表达沉默中, 如在 T47D 乳腺癌细胞株中, RNA 聚合酶 II 从中解离, 并且 HP1 γ 的水平不变。

以上研究显示 siRNA 药物可能为包括肿瘤在内的表观修饰异常的疾病治疗开辟一条新的途径。

5 小结与展望

AS-RNA 可能是触发表观修饰异常的关键因素, 包括顺式和反式调控, 启动异染色质化, DNA 的甲基化等。虽然它的具体分子机制还有待继续探索, 但是 AS-RNA 介导的表观修饰的特异性和精确特定的靶向性, 与肿瘤细胞中管家基因特定沉默的相关性已经逐渐被认识到。研究 AS-RNA 对肿瘤细胞中基因异常表达的作用将有助于我们更加全面真实地阐明

肿瘤的发生机制,为寻找肿瘤治疗的新靶点提供了一个重要突破口。

参考文献(References)

- 1 Timmons JA, Good L. Does everything now make (anti)sense. *Biochem Society Transact* 2006; 34(6): 1148-50.
- 2 Williams T, Fried M. A mouse locus at which transcription from DNA strands produces mRNAs complementary at their 3' ends. *Nature* 1986; 322(17): 275-9.
- 3 Khochbin S, Lawrence JJ. An antisense RNA involved in *p53* mRNA maturation in murine erythroleukemia cell induced to differentiate. *EMBO J* 1989; 8(13): 4107-14.
- 4 Celano P, Berchtold CM, Kizer DL, Weeraratna A, Nelkin BD, Baylin SB, *et al.* Characterization of an endogenous RNA transcript with homology to the antisense strand of the human *c-myc* gene. *J Biol Chem* 1992; 267(21): 15092-6.
- 5 Murphy PR, Knee RS. Identification and characterization of an antisense RNA transcript (gfg) from the human basic fibroblast growth factor gene. *Mol Endocrinol* 1994; 8(7): 852-9.
- 6 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.
- 7 Rosok O, Sioud M. Systematic identification of sense-antisense transcripts in mammalian cells. *Nature Biotech* 2004; 22(1): 104-8.
- 8 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.
- 9 He Y, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Kinzler KW. The antisense transcriptomes of human cells. *Science* 2008; 322(5909): 1855-7.
- 10 Louro R, Smirnova AS, Verjovski-Almeida S. Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? *Genomics* 2009; 93: 291-8.
- 11 Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 155-9.
- 12 Osato N, Suzuki Y, Ikeo K, Gojobori T. Transcriptional interferences in *cis* natural antisense transcripts of humans and mice. *Genetics* 2007; 176: 1299-306.
- 13 Tufarelli C. The silence RNA keeps: *cis* mechanisms of RNA mediated epigenetic silencing in mammals. *Phil Trans R Soc B* 2006; 361: 67-79.
- 14 Lehner B, Williams G, Campbell RD, Sanderson CM. Antisense transcripts in the human genome. *Trends Genet* 2002; 18(2): 63-5.
- 15 Li JT, Zhang Y, Kong L, Liu QR, Wei L. *Trans*-natural antisense transcripts including noncoding RNAs in 10 species: implications for expression regulation. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(15): 4833-44.
- 16 Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP. Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 1997; 389(6652): 745-9.
- 17 Sleutels F, Barlow DP. Investigation of elements sufficient to imprint the mouse *Air* promoter. *Mol Cell Biol* 2001; 21(15): 5008-17.
- 18 Navarro P, Pichard S, Ciaudo C, Avner P, Rougeulle C. *Tsix* transcription across the *Xist* gene alters chromatin conformation without affecting *Xist* transcription: implications for X-chromosome inactivation. *Genes & Dev* 2005; 19: 1474-84.
- 19 Tufarelli C, Stanley JS, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nature* 2003; 34(2): 157-65.
- 20 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(10): 202-6.
- 21 Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Rev Genet* 2006; 7: 21-33.
- 22 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.
- 23 Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 2002; 30(4): 363-4.
- 24 Levine M, Davidson EH. Gene regulatory networks for development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(14): 4936-42.
- 25 Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2(1): 21-32.
- 26 Peterson JA, Myers AM. Functional analysis of mRNA 3' end formation signals in the convergent and overlapping transcription units of the *S. cerevisiae* genes *RHO1* and *MRP2*. *Nucleic Acids Res* 1993; 21(23): 5500-8.
- 27 Puig S, Perez-Ortin JE. Transcriptional and structural study of a region of two convergent overlapping yeast genes. *Curr Microbiol* 1999; 39(6): 369-73.
- 28 Prescott EM, Proudfoot NJ. Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(13): 8796-801.
- 29 Martianov I, Ramadass A, Barros AS, Chow N, Akoulitchev A. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* 2007; 445(8): 666-70.
- 30 Schwartz JC, Younger ST, Nguyen NB, Hardy DB, Monia BP, Corey DR, *et al.* Antisense transcripts are targets for activating small RNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15(8): 842-8.
- 31 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: 593-600.
- 32 Kanduri C, Thakur N, Pandey RR. The length of the transcript encoded from the *Kcnq1ot1* antisense promoter determines the degree of silencing. *EMBO J* 2006; 25(10): 2096-106.
- 33 Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, Pauler FM, Ferguson-Smith AC, Feil R, *et al.* The *Air* noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science* 2008; 322(5908): 1717-20.
- 34 Camblong J, Beyrouthy N, Guffanti E, Schlaepfer G, Steinmetz LM, Stutz F. *Trans*-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in *S.cerevisiae*. *Genes Dev* 2009; 23: 1534-45.
- 35 Yan MD, Hong CC, Lai GM, Cheng AL, Lin YW, Chuang SE. Identification and characterization of a novel gene *Saf* tran-

- scribed from the opposite strand of *Fas*. *Hum Mol Gene* 2005; 14(11): 1465-74.
- 36 Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolin A. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* 2003; 195(3): 356-72.
- 37 Wahlestedt C. Natural antisense and noncoding RNA transcripts as potential drug targets. *Drug Discov Today* 2006; 11(12): 503-8.
- 38 Morris KV, Santoso S, Turner AM, Pastori C, Hawkins PG. Bidirectional transcription directs both transcriptional gene activation and suppression in human cells. *PLOS Genet* 2008; 4(11): 1-9.
- 39 Ogawa Y, Sun BK, Lee JT. Intersection of the RNAi and X-inactivation pathways. *Science* 2008; 320(5881): 1336-41.

Antisense RNA Transcription: An Epigenetic Mechanism for Gene Expressions Regulation

Wei Deng, Qin-Hua Chen, Yi-Mei Fan*, Ya-Ping Wang

(Department of Medical Genetics, Medical School, Nanjing University, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanjing 210093, China)

Abstract Antisense RNA (AS-RNA) is a kind of non-coding RNA. Antisense transcription is a widespread phenomenon in the mammalian genome. It is thought to play a role in regulation of gene expression. Recent study confirmed that antisense RNA mediated gene-expression mainly through epigenetic mechanism. The changes of the level of DNA methylation, heterochromatin formation by the histone modification and other non-coding RNA interferences might be related to antisense RNA.

Key words antisense RNA; gene expressions regulation; DNA methylation; heterochromatin formation; siRNA

Received: April 7, 2009 Accepted: June 25, 2010

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu(No.BK2008269) and the International Science and Technology Cooperation Project of Jiangsu(No.BZ2008055).

*Corresponding author. Tel: 86-25-83686495, Fax: 86-25-83686559, E-mail: ymfan@nju.edu.cn