



Kardiyovasküler Hastalıklarda Uzun Kodlamayan RNA'lar ve Sirküler RNA'ların Önemi

The Importance of Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases

Hilal Şentürk¹ , Evrim Kömürcü Bayrak² 

¹Uzm. Bio., ²Doç. Dr., İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: H.Ş. 0000-0001-9743-5817;
E.K.B. 0000-0003-1271-1208

Sorumlu yazar/Corresponding author:

Evrin Kömürcü Bayrak,
İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-posta: ebayrak@istanbul.edu.tr

Başvuru/Submitted: 25.10.2019

Revizyon Talebi/Revision Requested: 06.11.2019

Son Revizyon/Last Revision Received: 07.11.2019

Kabul/Accepted: 29.11.2019

Atıf/Citation: Senturk, H, Komurcu-Bayrak E. (2019): The Importance of Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases, *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 2(3): 115-125.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2019-638138>

Öz

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH'lar), mortalite ve morbiditenin en önemli nedeni olup çoğunlukla yetişkinlerde gözlenmektedir. KVH'ların altında yatan ana mekanizma, fibröz plakların oluşumu, düz kas hücrelerinin çoğalması ve enflamatuvar hücrelerin göçü ile meydana gelen karmaşık bir patoloji olan aterosklerozdur. Son çalışmalar, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) ve dairesel RNA'lar (circRNA) gibi protein kodlamayan RNA'ların, ateroskleroz dahil tüm KVH'ların epigenetiğinde önemli düzenleyici rollere sahip olduğunu göstermektedir. Bu derlemede, lncRNA'ların ve circRNA'ların fonksiyonel aktiviteleri ve bunların ateroskleroz ve KVH'larla olan ilişkileri özetlenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kardiyovasküler hastalıklar, uzun kodlamayan RNA, sirküler RNA

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) are a leading cause of mortality and morbidity and mostly affect adults. The main underlying mechanism of CVDs is atherosclerosis and this complex pathology is caused by the formation of fibrous plaques, the proliferation of smooth muscle cells and the migration of inflammatory cells. Recent studies suggest that noncoding RNAs such as long noncoding RNAs (lncRNAs) and circular RNAs (circRNAs) have critical regulatory roles in the epigenetics of all CVDs including atherosclerosis. This review summarizes the functional roles of lncRNAs and circRNAs and their relationships with atherosclerosis and CVDs.

Keywords: Cardiovascular diseases, long noncoding RNA, circular RNA

GİRİŞ

Son yıllardaki tüm genom ve fonksiyonel analiz çalışmalarında insan genomunun, düzenleyici role sahip protein kodlamayan RNA transkribe eden binlerce gen içerdiği belirlenmiştir.¹ MikroRNA'lar (miRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lar (*ing.* "long noncoding RNA" - lncRNA) dahil olmak üzere önemli sayıda kodlamayan RNA (ncRNA'lar) keşfedilmiştir. Kodlamayan RNA'lar arasında yer alan Sirküler RNA'lar (*ing.* "Circular RNA"-circRNA), 3'- ve 5'-uçları kovalent olarak birleşerek dairesel yapı oluşturan bir RNA tipidir. Çeşitli biyolojik süreçlerde işlev gösteren circRNA'ların ifadelerindeki değişikliklerin, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserler de dahil olmak üzere kompleks hastalıklarla ilişkili oldukları belirlenmiştir. Araştırmalar, ateroskleroz patogeneğinde circRNA'larında rol oynadığını belirtmektedir.² LncRNA'lar, proteine translasyonu yapmayan 200 nükleotidden uzun moleküllerdir. LncRNA'ların hem gelişim hem de farklılaşma süreçlerinde ifade edildiği ve diğer hücrel süreçleri kontrol etmede önemli rollere sahip olduğu bulunmuştur.³ Çeşitli patolojik durumlarda lncRNA ifade düzeylerinde meydana gelen değişimler, lncRNA'ları terapötik hedef ve biyobelirteç adayları haline getirmiştir.⁴

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), dünyada mortalite ve morbiditenin ilk sıradaki nedeni olarak gösterilmektedir. KVH'nin temelinde yer alan ateroskleroz, lipid birikimi ve fibroz plaklar ile karakterize edilen kronik bir patolojidir. Kodlamayan RNA molekülleri ile kardiyovasküler hastalıklar arasında bağlantıyı anlayabilmek ve yeni terapötik hedefler geliştirebilmek için kardiyovasküler hastalıkların başlangıcında, ilerlemesinde ve modülasyonunda rol alan lncRNA'lar⁵ ve circRNA'lar⁶ gibi kodlamayan RNA'ların tanımlanması önem taşımaktadır.

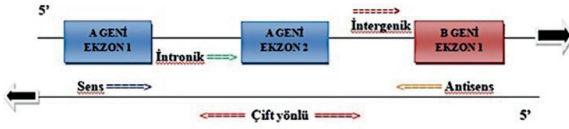
1. Uzun Kodlamayan RNA'ların Özellikleri

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA), 200 nükleotidden daha uzun RNA molekülleridir ve insan genomunda 10.000'den fazla lncRNA kodlayan gen olduğu ve tüm hücrelerde yaklaşık 60.000 lncRNA'nın transkribe edildiği tahmin edilmektedir.⁷ LncRNA

genleri de protein kodlayan genler gibi RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir ve lncRNA'lar mRNA'lar gibi açık okuma çerçevesine (*ing.* "open reading frame"-AOÇ, bazı istisnalar hariç), 3'-translasyona uğramayan bölgeye (*ing.* "untranslated region"-UTR) ve translasyon sonlanma bölgelerine sahip olmasalar da mRNA'lar gibi alternatif kırılma, 3'-poliadenilasyon ve 5'-şapka işlenmesi gibi modifikasyonları olmaktadır. Gen ifade düzeyi ise mRNA'lara göre lncRNA'ların daha azdır ve ayrıca lncRNA genleri protein kodlayan genlere göre türler arasında daha az korunmaktadır.^{7,8}

LncRNA genlerinin genomik lokalizasyonları, intergenik, intronik, güçlendirici (*ing.* "enhancer"), çift yönlü, sens (kodlayan, 5'→3') veya antisens (kalıp, 3'→5') yönelimli olabilmektedir. İntergenik lncRNA'lar (*ing.* "long intergenic non-coding RNA"-lincRNA), protein kodlayan genlerin arasında yer alan genomik DNA segmentlerinden transkribe edilmektedir.⁵ İlk tanımlamalarda lincRNA'ların işlevsel bir önemi olmadığı düşünülerek "junk" genler olarak adlandırılmıştır. Bununla birlikte son çalışmalarda lincRNA'ların, lokalize olduğu bölgelere yakın olan genlerin promotörlerini veya güçlendiricilerini modüle ederek gen ifadesini kontrol edebileceği belirlenmiştir. İntronik lncRNA'ların genleri, protein kodlayan genlerin intronlarında bulunmaktadır. Hem lincRNA'lar hem de intronik lncRNA'lar poli-(A) kuyruğuna sahiptir.⁵ Sens lncRNA'lar, protein kodlayan genlerin kodlayan zincirlerinden transkribe edilmekte olup bunların ekzonik ve intronik bölgeleri ile çakışabilmektedir. Sens lncRNA'ların aksine antisens yönelimde olan lncRNA'lar ise protein kodlayan genlerin kalıp zincirlerinden transkribe olmaktadır. Çift yönlü lncRNA'lar, birbirlerine zıt yönde transkribe olmaktadır ve bunların protein kodlayanlara benzer işlevlere sahip oldukları gösterilmiştir.⁵ "Enhancer" lncRNA'lar, genomda güçlendirici bölgelerden transkribe olmaktadır.^{5,9} Şekil 1'de lncRNA'ların genomik lokalizasyonları ve yönelimleri şematik olarak gösterilmektedir.

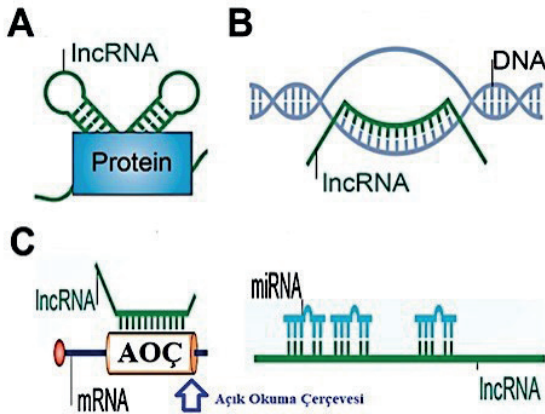
LncRNA'ların hücre içi fonksiyonel lokalizasyonu, nükleus veya sitoplazma iken bazı lncRNA'lar hem sitoplazma hem de nükleusda bulunabilmektedir.



Şekil 1. LncRNA sınıflandırılmasının şematik diyagramı⁵

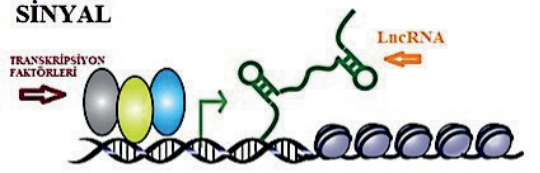
LncRNA'ların genel olarak %85'inin nükleusda, kalan %15'inin de sitoplazmada yer aldığı belirlenmiştir.^{10,11}

LncRNA'lar gen ifadesi, DNA'nın epigenetik modifikasyonu, alternatif kırılma, transkripsiyonel, post-transkripsiyonel gen düzenlemeleri, mRNA stabilitesi, RNA işlenmesi ve translasyonu gibi düzenleyici işlevlere sahiptir.⁹ LncRNA'lar Şekil 2'de gösterildiği gibi DNA, RNA ve proteinlerle etkileşerek gen aktivasyonu ya da baskılamasını sağlamaktadır.^{5,12} LncRNA'lar, transkripsiyon faktörleri veya kromatini modifiye edici komplekslerin bileşenleri gibi proteinlerle etkileşime girerek gen ifadesini düzenlemek için moleküler iskeleler olarak görev almaktadır (Şekil 2A). Ayrıca bazı LncRNA'lar, genomik DNA ile tamamlayıcı etkileşime (Şekil 2B) girerek promotör bölgeleri gibi spesifik genomik bölgelere proteinleri yönlendirebilmekte veya proteinlerin spesifik DNA bölgelerine bağlanmasını önleyebilmektedir. Diğer yandan hedef mRNA'ların açık okuma çerçevelerine komplementer olan lncRNA'larca mRNA'nın translasyonu regüle edilirken, bazı komplementer miRNA'lar için endojen tuzaklar olarak görev alarak miRNA'ların işlevini regüle etmektedir (Şekil 2C).^{5,12}

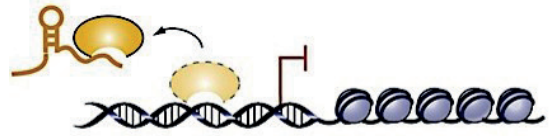


Şekil 2. LncRNA'ların etkileşim mekanizmaları⁵. AOC; Açık okuma çerçevesi

LncRNA'ların sinyal, tuzak, kılavuz ve iskele olmak üzere 4 farklı şekilde işlev gösterdiği belirlenmiştir.¹² Şekil 3'te lncRNA'ların moleküler fonksiyonları şematik olarak gösterilmektedir.



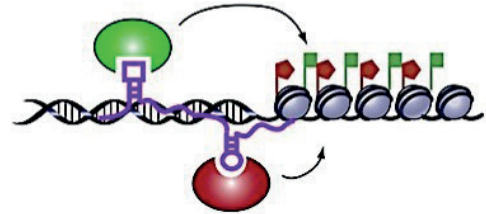
TUZAK



KILAVUZ



İSKELE



Şekil 3. LncRNA'ların moleküler fonksiyonları.¹²

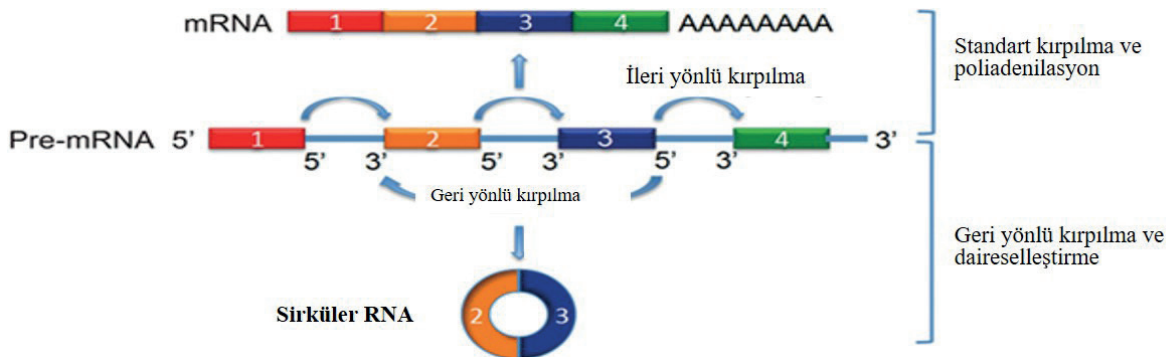
Sinyal lncRNA'lar, gen düzenlenmesinin zamanını ve lokalizasyonunu belirleyen moleküller olarak işlev göstermektedir. Bunlar, gen ve allele özgü ifadenin modülasyonunda görev almaktadır.¹³ Bazı lncRNA'lar hedeflenen proteinlerin ifadelerini azaltarak regüle (*ing.* "downregulation") etmek için negatif düzenleyiciler olarak görev yapmaktadır.¹⁴ Tuzak fonksiyonu gösteren bu lncRNA'lar, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin genomik DNA'dan ayrılmasını sağlayan bir yem gibi hareket ederek hedef genleri dolaylı olarak düzenleyebilmektedir.¹⁵ Kılavuz fonksiyonuna sahip lncRNA'lar, kromatin düzenlenmesinde rol alan enzimleri

hedef genlere yönlendirmektedir ve bu genlerin ifadesini yakınındaki komşu genler için "cis", uzaktaki genler için "trans" düzenleme ile değiştirebilmektedir.¹⁶ Ek olarak bazı lncRNA'lar ise ribonükleoprotein kompleksleri oluşturmak için çoklu proteinleri bir araya getiren iskeleler olarak işlev görmektedir.¹²

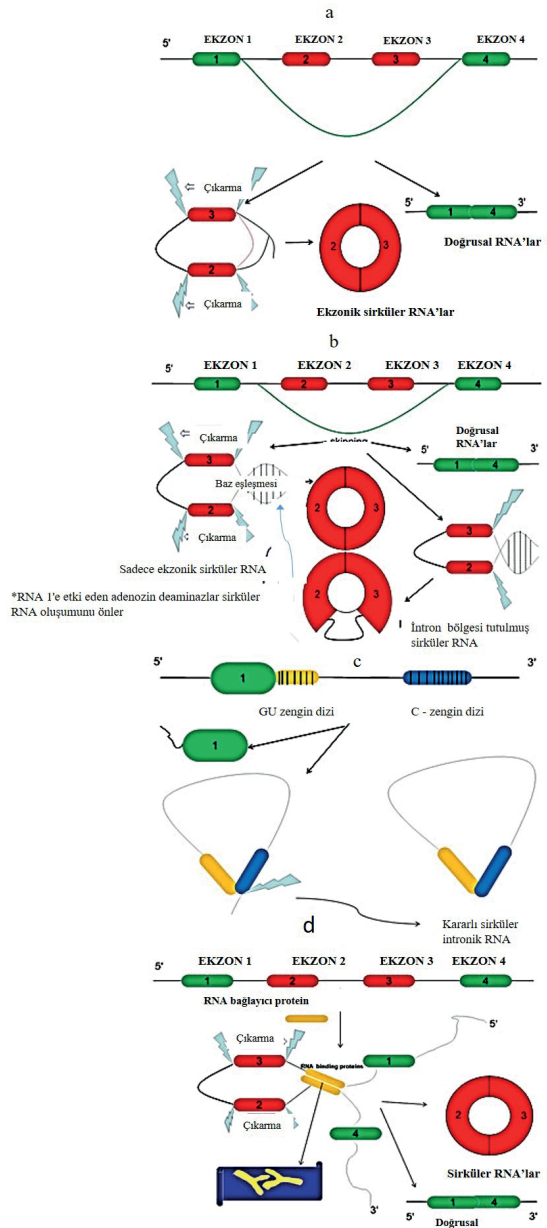
2. Sirküler RNA'ların Özellikleri

Sirküler RNA'lar (circRNA'lar), bir başka genetik düzenleyici olarak işlev gören kodlamayan RNA türüdür. Doğrusal RNA'ların aksine, poliadenilat kuyrukları olmayan kovalent olarak bağlı uçlara sahiptirler. CircRNA'lar, RNazR aktivitesine dirençli olan kovalent bağlarla kapalı sürekli bir döngü oluşturduğundan, doğrusal RNA'lara göre daha stabil bir kodlamayan RNA sınıfıdır. CircRNA'lar, RNA bağlayıcı proteinler, sekestrasyon ajanları, transkripsiyonel düzenleyiciler ve ayrıca miRNA bağlayıcıları olarak görev yapmaktadır. Ek olarak, seçilmiş bazı circRNA'ların fonksiyonel proteinlere dönüştürüldüğü bildirilmiştir. Genellikle miktarı fazladır ve stabildir ayrıca bazı dokularda (karaciğer, akciğer, mide), tükürükte, eksozomların içeriğinde ve kanda bulunabilmekte ve evrimsel olarak korunmaktadır. Genel olarak circRNA'lar sitoplazmada depolanmaktadır, çok küçük bir kısmı ise çekirdekte bulunmaktadır.⁶

Nükleusta sentezlenen pre-mRNA'dan kırılmalar ile mRNA ve dairesel yapıdaki circRNA oluşumu temel olarak Şekil 4'de şematik olarak gösterilmiştir. Küçük nükleer ribonükleoproteinler (snRNP'ler) tarafından pre-mRNA'nın intronları kesilir ve doğrusal mRNA'lardan farklı olarak kesilmiş segmentteki 5'-uç, 3'-uçla birleşerek dairesel hale gelerek circRNA'ları oluşturmaktadır.¹⁷



Şekil 4. Sirküler RNA'ların biyogenezini.¹⁷



Şekil 5. İleri sürülen circRNA oluşum modelleri.⁶

Ancak aslında daha karmaşık mekanizmalar ile circRNA'lar ekzonik, intronik, ve ekzon-intron circRNA'ları olmak üzere üç farklı tipte Şekil 5'de şematik olarak gösterildiği gibi meydana gelmektedir⁶. Buna göre; doğrudan kement odaklı daireselleştirme mekanizmasında, ekzon birleştirilmesi ile bir kement yapısı oluşturulur. Ekzon 1'in 3'-uç kırılma verici bölgesi ile ekzon 4'ün 5'-uç kırılma alıcısı kovalent olarak bağlanır. Sirküler ekzonik RNA, intron diziliminin çıkarılmasından sonra oluşur. Bu circRNA tipi, tüm circRNA'ların % 80'inden fazlasını oluşturmaktadır (Şekil 5A). İntron eşleştirme odaklı daireselleştirmede, ters tekrarlanan dizileri veya ALU elementlerini çevreleyen intronların doğrudan baz eşleşmesi ile sirküler bir yapı oluşur. İntronlar, ekzon-intron circRNA oluşturmak üzere tutulur veya ekzonik circRNA oluşturmak üzere çıkartılır (Şekil 5B). Sirküler intronik RNA'lar, kırılma işleminden kaçabilecek kement intronlarından üretilir; Ekzon 1 (sarı kutu) yakınındaki 7 nükleotid uzunluğundaki GU-zengin dizileri ve ekzon 2 (mavi kutu) yakınındaki 11 nükleotid uzunluğundaki C-zengin dizileri, kırılma işleminden kaçarak sirküler intronik RNA'lar oluşturur ve stabil circRNA haline gelir (Şekil 5C). RNA bağlayıcı protein (RBP) odaklı daireselleştirmede ise circRNA'lar, RBP'ler (Y-şekli) ile intronlar çıkarılarak oluşturulmaktadır (Şekil 5D).⁶

3. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Kodlamayan RNA'lar

3.1. Kardiyovasküler Hastalıklarda lncRNA'lar

Aterosklerotik lezyon progresyonu ve restenozundaki en temel olaylardan birinin, arter duvarındaki vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) proliferasyonu ve göçünün olduğu düşünülmektedir.¹⁸ Motterle ve arkadaşları¹⁹, hücre siklusü düzenleyici proteinlerinden p16^{INK4a} ve p15^{INK4b} ifadelerindeki azalmanın VSMC proliferasyonunu arttırdığını belirlemiştir.¹⁹ p16^{INK4a} ve p15^{INK4b} proteinlerini kodlayan *CDKN2A* (İng. "Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A") ve *CDKN2B* (İng. "Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B") genlerinin kromozom 9p21 lokusunda bulunduğu ve bu bölgedeki tek nükleotid polimorfizme-

rinin (ing. "single nucleotide polymorphism"-SNP) VSMC proliferasyonunu etkilediği ve bu hücrelerde p16^{INK4a} ve p15^{INK4b} ifadelerinin azaldığı belirlenmiştir.¹⁹ 9p21 lokusundaki SNP'lerin aynı zamanda ateroskleroz ve miyokard enfarktüsü riskini arttırdığı bildirilmiştir.^{20, 21} *CDKN2A* geni ile ters yönelimli olarak bulunan *CDKN2B-AS* (*ANRIL*) geninden lncRNA molekülü transkribe olmaktadır^{19,22} *ANRIL* ateroskleroz ciddiyeti ile yakından ilişkili kodlamayan RNA moleküllerindedir ve genindeki çeşitli SNP'lerin, hem aterom plak hem de periferik kanda *ANRIL* transkriptlerinin ifadesindeki değişimler ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.²³ Son dönemdeki çalışmaların derlendiği bir makalede, ateroskleroz patogenezinde rolü olan lncRNA'ların farklı tipteki lezyonların oluşumuna katıldıkları, düz kas hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve matriks sentezini düzenleyebildiği belirtilmiştir.²⁴

Aterosklerozun başlangıcında ve gelişiminde ilk aşama olan endotel hasarı (disfonksiyon), geçirmeliğin artmasına ve adezyon proteinlerinin birikimine neden olarak lökositlerin damar duvarlarına migrasyonunu uyarmaktadır.²⁵ Endotel hücre proliferasyonu, anjiyogenezde ve hücrel migrasyonda lncRNA'larında rol oynadığı gösterilmiştir.²⁴ *MALAT1* adlı lncRNA'nın endotel hücrelerde hipoksi ve hiperlipidemi gibi stresli durumlarda indüklendiğini göstermektedir.²⁶

Aterosklerotik lezyon, arter duvarındaki lipoproteinlerin, makrofajlardan türetilen köpük hücrelerinin birikiminden oluşmaktadır. Makrofajlar aktive olup damar duvarına doğru harekete geçerek kolesterol köpük hücrelerini oluşturmada ve daha sonra enflamatuvar faktörler salgılanarak makrofaj birikiminde daha fazla artışa neden olmaktadır.²⁵ Bu olayda, lipid metabolizması ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtı arasında bir bağlantı olduğu öne sürülmektedir. Dolayısıyla, hücrel lipid taşınmasında ve bağışıklıkta yeni hedeflerin bulunması önem taşımaktadır. Sadece makrofaj ile ilişkili bir kaç lncRNA tanımlanmış olmasına rağmen, daha çok sayıda lncRNA'nın makrofajlarda ve enflamasyonda önemli düzenleyici rollere sahip olduğu belirlenmiştir.²⁴ Hu ve arkadaşları, lncRNA'ların kolesterol metabolizmasında ve

enflamasyonda düzenleyici rollerini belirleyebilmek için mikrodizin analizi ile, makrofaj ve makrofaj türevli köpük hücrelerinin gen ifade profillerini araştırmışlardır.²⁷ Bu çalışmada, lincRNA-DYNLRB2-2 (İng. "Dynein Light Chain Roadblock-Type 2-2") ve lincRNA RP5-833A20.1'nin (diğer adı, NFIA Antisens RNA1) büyük ölçüde hücrel kolesterol metabolizmasının ve enflamasyonun düzenleyicileri olduklarını belirlemişlerdir. LincRNA-DYNLRB2-2'nin hücrel enflamatuvar sitokinleri (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) azalttığı ve hiperlipidemik stres altında makrofajlarda kolesterol akışını tetiklediği bulunmuştur.²⁷ Bir başka lincRNA olan RP5-833A20.1 ise, enflamatuvar sitokinleri (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) arttırdığı ve NFIA yoluğ üzerinden miR-382 aracılığı ile kolesterol akışını azalttığı belirlenmiştir.²⁸ Ateroskleroz patogenezinde farklı hücrel yollarda rol alan lincRNA'lar ve bunların etki mekanizmaları ile ilgili araştırmalar halen yoğun olarak devam etmektedir.

Akut miyokard infarktüsü (MI), dünyada ve ülkemizde mortalite ve morbiditenin önemli sebeplerindedir. Bu hastalığın temel nedenini ateroskleroz oluşturmaktadır. Kan akışını bozacak kadar ciddi darlıklar koroner iskeminin nedeni olsa da MI genellikle çok önemli görülmeyen lezyonların rüptüre olması sonucu meydana gelmektedir.²⁹ Vausort ve arkadaşlarının çalışmasında, lincRNA'lar ile MI arasındaki ilişki araştırılmıştır.³⁰ Bunun için seçtikleri *ANRIL*, *KCNQ1OT1*, *MIAT*, *MALAT1* ve *aHIF* adlı 5 lincRNA ifade düzeyleri, MI geçiren hastalar ve kontrol hastalar ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta *MIAT* için kontroller ve enfarktöslü hastalar arasında anlamlı bir fark bulunamazken, *ANRIL*'in ifade düzeyinin azaldığı, *KCNQ1OT1*, *MALAT1* ve *aHIF* adlı lincRNA'ların ifade düzeyinde arttığı belirlenmiştir.³⁰ Benzer şekilde Lu ve arkadaşları da, akut koroner sendromun iki farklı klinik alt-tipi olan MI ve kararsız anjina pektorisli (UAP) hasta grupları arasında 2.332 adet lincRNA'nın ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.³¹ Bu lincRNA'dan 18'inin artarak regüle (ing. "upregulation") edildiği ve 35 lincRNA'nın azaltarak regüle edildiği tespit edilmiştir. Daha düşük mortaliteye sahip UAP hastalarının, MI hastalarına göre farklı ifade düzeylerine sahip olduğu belirtilmiştir³¹ ancak

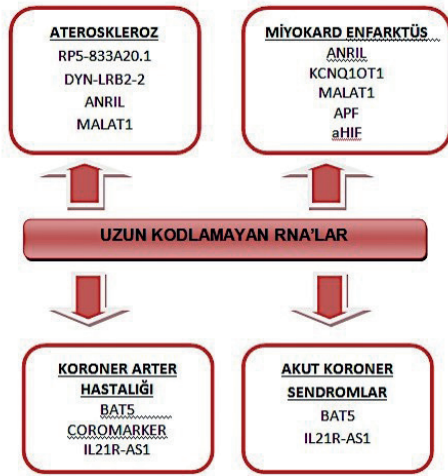
ilişkili bulunan bu lincRNA'ların ifade düzeylerinin daha geniş hasta gruplarında valide edilmesi önem taşımaktadır.

Wang K. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, APF adlı lincRNA'nın (İng. "Autophagy-Promoting Factor") miR-188-3p ile etkileşerek miyokardiyal enfarktüs (MI) hasarını arttırdığı belirlenmiştir. miR-188-3p, MI'da hücre ölümü ve sağkalımı düzenlemesinde çok önemli olduğu bilinen otofajinin kilit bir düzenleyicisi olan *ATG7*'nin ifadesini baskıladığı belirlenmiştir.³² APF'nin miR-188-3p'nin inhibisyonu yoluyla MI hasarını modüle edildiği gösterilmiştir. Buna göre, miR-188-3p varlığında *ATG7* ifadesi belirgin olarak azalmakta ve miR-188-3p'nin deneysel olarak nakavt (ing. "knockout") edildiğinde ise *ATG7* ifade düzeyi artmaktadır. Bununla birlikte, kardiyomiyositlerde APF'nin deneysel olarak nakavt edilmesinin, *ATG7* ifadesini azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, miR-188-3p'nin APF ile etkileşerek MI sırasında *ATG7* seviyelerinin modülasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir.³²

Koroner arter hastalığı (KAH) olan bireyler hastaneye en sık akut koroner sendrom (AKS) bulguları ile başvurmaktadır. AKS klinik alt grupları, ST elevasyonu (yükselmesi) içermeyen miyokardiyal enfarktüs (NSTEMI), ST elevasyonu (yükselmesi) içeren miyokardiyal enfarktüs (STEMI), kararsız anjina pektoris (UAP) gibi tüm iskemik durumları kapsamaktadır.³³ KAH patogenezinde rol alan lincRNA'ları bulmaya yönelik yapılan bir araştırmada, 15 KAH ve 15 kontrole ait plazma ve periferik kan mononükleer hücrelerinde, 33.045 lincRNA ile 30.215 kodlayan transkripti içeren mikrodizin temelli transkriptom analizi yapılmış ve 86 lincRNA transkriptinin istatistiksel olarak anlamlı olarak farklı ifade edildiği bulunmuştur.³⁴ Farklı ifade edilen bu 86 lincRNA'nın 35'inin azaldığı, 51'inin arttığı tespit edilmiş ve ifadesi artanlar arasından 5 lincRNA'nın (*CoroMarker*, *IL21R-AS1*, *BAT5*, *AC107016.1* ve *RP11-203B9.4*) ifade düzeyleri, kantitatif RT-PZR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle 20 KAH ve 20 kontrolü periferik kan mononükleer hücrelerinde valide edilmiştir. Sonuçta, *CoroMarker*, *IL21R-AS1* ve *BAT5* lincRNA'nın ifade

düzeylerinde artış gösterdiği tespit edilmiş ve KAH için anlamlı biyobelirteç adayları olabilecekleri ileri sürülmüştür³⁴

Son yıllarda yeni lncRNA'ları tanımlamaya yönelik araştırma sayısı gittikçe artarken, aday lncRNA'ların valide edilebileceği daha geniş ve farklı popülasyonlarda araştırmaların devam etmesi ve bu lncRNA'ların hastalık patogenezi katkılarının belirlenmesi önem taşımaktadır. Şekil 6'da literatürde kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiş lncRNA'lar özet olarak verilmiştir.



Şekil 6. Kardiyovasküler Hastalıklarda lncRNA'lar

3.2. Kardiyovasküler Hastalıklarda circRNA'lar

Kodlamayan RNA'ların keşfi ile bu moleküllerin kalp ve damar fiziolojisi için gerekli olduğu ve kardiyovasküler hastalıklar için önemli rolleri olduğu ortaya çıkmıştır. miRNA'lar, lncRNA'lar ve circRNA'lar, kodlamayan RNA'ların ana grupları olarak yer almaktadır. Son zamanlarda, circRNA'lar kardiyovasküler hastalıklarda (KVH) araştırılmış ve kalp yetmezliği, koroner arter hastalığı ve miyokard enfarktüsünde önemli roller üstlendikleri bildirilmiştir.⁶

Sirküler RNA'lar (circRNA'lar) ökaryotik hücrelerde geniş bir spektrumda eksprese ediliyor olsa da çoğunun fiziolojik rolleri ve hastalıklardaki moleküler mekanizmaları halen tam olarak bilinmemektedir. Ancak bir kodlamayan sirküler antisens

RNA'nın, ribozomal RNA (rRNA) olgunlaşmasını kontrol ederek ve aterogenez yollarını modüle ederek ateroproteksiyon sağladığı bilinmektedir.³⁵ Bu molekülün, daha önce bahsedilen *CDKN2B-AS1 (ANRIL)* geninden transkribe edilen doğrusal lncRNA'lardan değil, aynı zamanda geri yönlü kırılma (*ing.* "back-splicing") yoluyla meydana gelen bir sirküler RNA olduğu belirlenmiştir.³⁶ Bu sirküler RNA'lar, miRNA bağlayıcı, protein iskelesi ve kromatin düzenlemesi ile ilişkili moleküller olarak işlev göstermektedirler³⁷

Şimdiye kadar, iki çalışma farklı ekzonlardan oluşan bir dizi sirküler *ANRIL (circANRIL)* izoformunun olduğunu göstermiştir (46). *circANRIL*, temel bir 60S-preribozomal montaj faktörü olan PES1'e bağlanmaktadır, böylece vasküler düz kas hücrelerinde ve makrofajlarda ekzonükleaz aracılıklı pre-rRNA işlenmesini ve ribozom biyogenezini bozduğu belirlenmiştir. Böylece, *circANRIL*'in nükleolar stres ve p53 aktivasyonunu indükleyerek ateroskleroz gelişiminin engellenmesinde anahtar hücresel işlev olan apoptozu başlatması ve proliferasyonun inhibisyonunu gerçekleştirmektedir. Bu bulgular, *circANRIL*'in ribozom biyogenezini düzenleyen ve ateroproteksiyon sağlayan bir *circRNA*'nın prototipi olduğunu ortaya koymaktadır.³⁵

Kardiyomiyopati, hipertrofik ve dilate olarak klinik alt tipleri ile miyokarda etki eden kardiyak patolojik durumdur. Hipertrofik kardiyomiyopatide (HKM), sol ventriküler miyokardiyum normale göre kalınlaşır ve yeterli kan pompalayamaz hale gelir. Bunun sonucunda kalp yetmezliğine ve ölüme yol açar. Dilate kardiyomiyopati ise sol ventrikülün veya her iki ventrikülün genişlemesi ve bozulmuş kontraksiyonu ile karakterizedir. Wang ve ark. kalple ilişkili bir circRNA olan *HRCR*'nin miyokardiyal hipertrofi ve kalp yetmezliğine karşı koruyucu etki ettiğini belirlemişlerdir. Deneysel bir çalışmada, farelere izoprotenol enjekte edilerek aort daralmasına maruz kaldığında, *HRCR* ifadesinin azaltarak regüle edildiği gösterilmiştir. Biyoinformatik tahminler ve AGO2 immünopresipitasyon analizi, *HRCR*'nin miR-223 ile etkileşime girdiğini ve miR-223'ün pro-hipertrofik aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir.¹⁷

Pan ve ark. (2017), KAH hastalarında üç örnek ve üç kontrol plazma örneği arasındaki farklı ifade edilen circRNA'ları tespit etmek üzere yaptığı circRNA mikrodizin analizi sonucuna göre hsa_circ_0006323, hsa_circ_0032970, hsa_circ_0051172, hsa_circ_0054537, hsa_circ_0057576, hsa_circ_0068942, hsa_circ_0082824, hsa_circ_0083357 ve hsa_circ_0089378 isimli circRNA'ların en az 1.5 kattan fazla olarak ifade edildiğini göstermişlerdir. Bu dokuz circRNA'nın ve bunların hedef mRNA'larından olan "transient" reseptör potansiyel katyon kanalı alt ailesi melastatin üyesi 3'ü (*TRPM3*) etkilemek için bir hsa-miR-130a-3p bağlayıcısı olarak işlev gördüğü belirlenmiştir. Transient reseptör potansiyel katyon kanalı alt ailesi M üyesi 3, kolesterol ile bağlantılı olarak vasküler düz kas hücrelerinin kasılmasını ve proliferasyonunu düzenleyen bir protein olup KAH ile ilişkili bulunmuştur.⁶

Salgado-Somoza ve ark. (2017), MI hastalarındaki riski tahmin etmek için miyokard enfarktüsüyle ilişkili bir sirküler RNA olan *MICRA*'nın ifade düzeylerini araştırmıştır. Buna göre, 472 Akut MI hastasından elde edilen kan örneklerinde *MICRA* ifade düzeyinin ejeksiyon fraksiyonu (EF) % 41'den fazla olan grupta EF'si ≤% 40 olan gruba göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. *MICRA* ifade düzeyi düşük olan hastalarda EF riskini azaldığı belirlenmiştir.³⁸ Meng ve arkadaşlarının yaptığı bir in vitro çalışmada (2019), yüksek ve normal D-glukoz seviyelerinde kültür edilen hipertrofik kalp hücrelerinde farklı şekilde ifade edilen circRNA'ları belirlemişlerdir. circRNA261, ciRNA26, circRNA1191, circRNA4251 ve circRNA6913 adında normale göre bu hücrelerde 2 kattan fazla ifade edilen beş circRNA tanımlanmıştır. Bu circRNA'ların kalp hipertrofisinde önemli roller oynayabileceği ve potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilebileceği ortaya konmuştur.⁶ Son zamanlarda kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili circRNA'ları belirlemeye yönelik araştırmaların sayısı gittikçe artmaktadır. Tablo 1'de henüz işlevleri tam olarak ortaya konamamış ancak çeşitli kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkilendirilmiş sirküler RNA'lar listelenmiştir.¹⁷ Sirküler RNA'lar, ileride bu hastalıklar için hem potansiyel tedavi adayları ve hem de tanı

ve takipte kullanılacak biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir.

Tablo 1. Kardiyovasküler Hastalıklar ile İlişkili Kodlamayan Sirküler RNA'lar¹⁷

CircRNA	Kardiyovasküler İlişki	Regülasyon
CircSLC8a1	Kalp Gelişimi	Bilinmiyor
CDR1as	Miyokard Enfarktüs	↑
MICRA	Miyokard Enfarktüs	Bilinmiyor
HRCR	Hipertrofik Kardiyomiyopati	↓
CircTitin	Dilate Kardiyomiyopati	Bilinmiyor
CircRNA_000203	Kardiyak Fibrozis	↑
CZNF292	Anjiyogenez	↑
CircANRIL	Ateroskleroz	↓
Circ_0124644	Koroner Arter Hastalığı	Bilinmiyor

SONUÇ

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerindedir.³⁴ Bu hastalıkların tanı ve takibinde kullanılacak daha yüksek duyarlılık ve özgüllükte yeni biyobelirteçlere gereksinim duyulmaktadır.³⁹ Son yıllarda, kodlamayan küçük RNA molekülleri ile kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesi, hastalık patogenezindeki rollerinin tespiti ve yeni terapötik hedeflerin geliştirilebilmesi için çok sayıda çalışma yapılmış olsa da lncRNA ve circRNA'lar ile ilgili literatürde halen kısıtlı sayıda araştırma mevcuttur. Gün geçtikçe bu kodlamayan RNA'ların fonksiyonlarını anlamaya yönelik araştırma sayısı artmaktadır.

Özet olarak, circRNA'lar ve lncRNA'lar esas olarak gen ifadesinin regülasyonuna katkıda bulunan protein kodlamayan RNA'ların birer sınıfıdır. Yapılan çalışmalarda özellikle circRNA'ların tükürük, kan örneğinde serbest veya eksozomların içeriğinde bol miktarda bulunduğu tespit edilmesiyle, bu moleküller hastalık teşhisi için umut verici biyobelirteç adayları olarak gösterilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bazı lncRNA'ların, hastaların vücut sıvılarında stabil bir şekilde tespit edilebileceğini göstermiştir. Standart biyobelirteçlere göre bu kodlamayan RNA'lar, daha stabil ve hassas olarak değerlendirilmektedirler. KVH'larda dolaşımdaki lncRNA'lar, miyokard enfaktüsü, kalp yetmezliği ve atriyal

fibrilasyon dahil olmak üzere çeşitli patolojiler için aday biyobelirteçler olarak değerlendirilmiştir.⁶

LncRNA'lar ve circRNA'lar ile ilgili araştırmalarda, vaka sayılarının istatistiksel analizler için yeterli olmaması veya cinsiyet, yaş ve kardiyovasküler risk faktörlerinin çeşitliliği gibi heterojenite yaratan durumların varlığı halen bu moleküllerin biyobelirteç olarak değerlendirilebilmesi için kısıtlılık yaratmaktadır. Bu nedenle, verileri yorumlamak ve sonuçlandırmak için büyük gruplar ve çok merkezli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte KVH olan hastaların, kan toplanmadan önce aspirin ve klopidoğrel gibi antikoagulan ilaçları kullanmaları ve bunların dolaşımdaki kodlamayan RNA düzeylerini değiştirebilmesi ihtimali de mevcuttur. Bunlar dışında, lncRNA gen ürünleri olarak farklı birçok transkript varyantlarının olması ihtimali ve bunların farklı işlevlerde olması, çok hızlı yıkılmaları, ifade düzeyinin az olması da araştırmalarda sınırlılıklar arasında sayılmaktadır.⁹ Ancak riskli durumların etkin sorgulamaları ve kayıtları ile aşılabilecek ve standardize edilebilecek kısıtlılık yaratan bu durumlara ve literatürde yeterli sayıda araştırma olmamasına rağmen, lncRNA'ların ve circRNA'ların özellikle ateroskleroz ile ilişkili hastalıkların ve miyokard enfaktüsünün tanı ve takibinde kullanılabilecek yeni biyobelirteç adayları arasında değerlendirilebileceği öngörülmektedir.

Finansal Destek: Bu derleme makale, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş tez projesi (Proje No: TYL-2017-27636) kapsamında hazırlanmıştır.

Grant information: This review article was prepared within the scope of thesis project supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: TYL-2017-27636).

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- H.Ş., E.K.B.; Veri Toplama- H.Ş., E.K.B.; Veri Analizi/Yorumlama- H.Ş., E.K.B.; Yazı Taslağı- H.Ş.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- E.K.B.; Son Onay ve Sorumluluk- H.Ş., E.K.B.; Malzeme ve Teknik Destek- E.K.B.; Süpervizyon- E.K.B.

Author Contributions: Conception/Design of Study- H.Ş., E.K.B.; Data Acquisition- H.Ş., E.K.B.; Data Analysis/Interpretation- H.Ş., E.K.B.; Drafting Manuscript- H.Ş.; Critical Revision of Manuscript- E.K.B.; Final Approval and Accountability- H.Ş., E.K.B.; Technical or Material Support- E.K.B.; Supervision-E.K.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

KAYNAKLAR

1. Karaarslan Z.Ö., Serin M.S. (2016): Hastalıkların tanı ve tedavi stratejilerinde miRNA ve diğer non-protein-coding RNA'lar. Mersin Univ Sağlık Bilim Derg.(9)3.
2. Zhang F, Zhang R, Zhang X, Wu Y, Li X, Zhang S, Hou W, Ding Y, Tian J, Sun L, Kong X. (2018): Comprehensive analysis of circRNA expression pattern and circRNA-miRNA-mRNA network in the pathogenesis of atherosclerosis in rabbits. *Aging (Albany NY)*, 10(9):2266-2283.
3. Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, ve ark. (2013): Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, 152(3): 570-583.
4. Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, Maury F, Fetisch J, Holzmann A, ve ark. (2014): Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ Res*, 114(10): 1569-1575.
5. Archer K, Broskova Z, Bayoumi AS, Teoh JP, Davila A, Tang Y, ve ark. (2015): Long Non-Coding RNAs as Master Regulators in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*, 16(10): 23651-23667.
6. Wang W, Wang Y, Piao H, Li B, Huang M, Zhu Z, Li D, Wang T, Xu R, Liu K. (2019): Circular RNAs as potential biomarkers and therapeutics for cardiovascular disease. *PeerJ*, 7:e6831.
7. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, Singhal U, Sahu A, Hosono Y, Barrette TR, et al. (2015): The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet.*, 47:199-208.

8. Scheuermann JC, Boyer LA. (2013): Getting to the heart of the matter: long non-coding RNAs in cardiac development and disease. *EMBO J*, 32(13): 1805-1816.
9. Bayoğlu B, Cengiz M. (2017): Kalp ve Damar Hastalıklarında Uzun Kodlanmayan RNA Transkriptlerinin Rollerini. *Bezmialem Science*, 5: 74-79.
10. Lee JT. (2012): Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science*, 338(6113): 1435-1439.
11. Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, Willingham AT, ve ark. (2007): RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*, 316(5830): 1484-1488.
12. Sana J, Faltejskova P, Svoboda M, Slaby O. (2012) Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J Transl Med.*, 10: 103.
13. Tian D, Sun S, Lee JT. (2010): The long noncoding RNA, *Xpx*, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell*, 143(3): 390-403.
14. Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, ve ark. (2011): Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat Genet*, 43(7): 621-629.
15. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, ve ark. (2010): The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*, 39(6): 925-938.
16. Wang KC, Chang HY. (2011): Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43(6): 904-914.
17. Bayoumi AS, Aonuma T, Teoh JP, Tang YL, Kim IM. (2018): Circular noncoding RNAs as potential therapies and circulating biomarkers for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin.*, 39(7):1100-1109.
18. Schwartz SM. (1997): Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest*, 100(11 Suppl): S87-89.
19. Motterle A, Pu X, Wood H, Xiao Q, Gor S, Ng FL, ve ark. (2012): Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells. *Hum Mol Genet*, 21(18): 4021-4029.
20. Holdt LM, Teupser D. (2012): Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(2): 196-206.
21. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, ve ark. (2007): Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, 357(5): 443-453.
22. Holdt LM, Hoffmann S, Sass K, Langenberger D, Scholz M, Krohn K, ve ark. (2013): Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks. *PLoS Genet*, 9(7): e1003588.
23. Holdt LM, Beutner F, Scholz M, Gielen S, Gabel G, Bergert H, ve ark. (2010): ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(3): 620-627.
24. Li H, Zhu H, Ge J. (2016): Long Noncoding RNA: Recent Updates in Atherosclerosis. *Int J Biol Sci*, 12(7): 898-910.
25. Nabel EG, Braunwald E. (2012): A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med*, 366(1): 54-63.
26. Michalik KM, You X, Manavski Y, Doddaballapur A, Zornig M, Braun T, ve ark. (2014): Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res*, 114(9): 1389-1397.
27. Hu YW, Yang JY, Ma X, Chen ZP, Hu YR, Zhao JY, ve ark. (2014): A lincRNA-DYNLRB2-2/GPR119/GLP-1R/ABCA1-dependent signal transduction pathway is essential for the regulation of cholesterol homeostasis. *J Lipid Res*, 55(4): 681-697.
28. Hu YW, Zhao JY, Li SF, Huang JL, Qiu YR, Ma X, ve ark. (2015): RP5-833A20.1/miR-382-5p/NFIA-dependent signal transduction pathway contributes to the regulation of cholesterol homeostasis and inflammatory reaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(1): 87-101.
29. Şengül C. (2006): Genç Yaşta Miyokard Enfarktüsü Geçiren Hastalarda Klasik Ve Psikososyal Risk Faktörlerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. *Kardiyoloji Uzmanlık Tezi*, İstanbul.
30. Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. (2014): Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Circ Res*, 115(7): 668-677.
31. Lu Y, Meng X, Wang L, Wang X. (2018): Analysis of long non-coding RNA expression profiles identifies functional lncRNAs associated with the progression of acute coronary syndromes. *Exp Ther Med*, 15(2): 1376-1384.

32. Wang K., Liu C.Y., Zhou L.Y., Wang J.X., Wang M. ve ark. (2015): APF lncRNA regulates autophagy and myocardial infarction by targeting miR-188-3p. *Nat Commun*, 10;6:6779.
33. White HD, ed Unstable Angina: Ischemic Syndromes. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. Topol EJ, ed. Textbook of cardiovascular medicine.
34. Cai Y, Yang Y, Chen X, Wu G, Zhang X, Liu Y, ve ark. (2016): Circulating 'lncRNA OTTHUMT00000387022' from monocytes as a novel biomarker for coronary artery disease. *Cardiovasc Res*, 112(3): 714-724.
35. Holdt LM, Stahring A, Sass K, Pichler G, Kulak NA, ve ark. (2016): Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nat Commun.*, 7:12429.
36. Holdt LM, Teupser D. (2018): Long Noncoding RNA ANRIL: Lnc-ing Genetic Variation at the Chromosome 9p21 Locus to Molecular Mechanisms of Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.*, 6;5:145.
37. Rankin CR, Lokhandwala ZA, Huang R, Pekow J, Pothoulakis C, Padua D. (2019): Linear and circular CDKN2B-AS1 expression is associated with Inflammatory Bowel Disease and participates in intestinal barrier formation. *Life Sci.*, 231:116571.
38. Salgado-Somoza A, Zhang L, Vausort M, Devaux Y. (2017): The circular RNA MICRA for risk stratification after myocardial infarction. *International Journal of Cardiology, Heart and Vasculature* 17:33-36.
39. Yang Y, Cai Y, Wu G, Chen X, Liu Y, Wang X, ve ark. (2015): Plasma long non-coding RNA, CoroMarker, a novel biomarker for diagnosis of coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)*, 129(8): 675-685.