

BÖLÜM 6

SİRKÜLER RNA (circRNA) BİYOLOJİSİ

Zülfinaz Betül ÇELİK¹

GİRİŞ

MikroRNA'lar (miRNA), küçük nükleolar RNA'lar, PIWI-interacting RNA'lar, uzun-kodlama yapmayan RNA'lar (lncRNA) ve sirküler RNA'lar (circRNA) gibi geniş bir sınıfa sahip olan kodlama yapmayan RNA'ların gen ifadesinin düzenlenmesinde ve çok sayıda hastalığın gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (1). Kodlama yapmayan RNA ailesinin büyük bir kısmını oluşturan sirküler RNA'lar son yıllarda araştırmacıların yoğun ilgisini çekmiştir. Lineer RNA moleküllerinin aksine, circRNA'lar, 5'-3' polaritesi veya poliadenile kuyruğu olmayan kovalent olarak kapalı olan halkasal yapıya RNA molekülleridir (2).

Ökaryotik genlerin çoğu, olgun mRNA'nın oluşması aşamasında splicing (intronların çıkarılarak ekzonların birleştirilmesi) mekanizmasıyla ve lineer sırayla öncül m-RNA'dan (pre-mRNA) çıkarılan intron adı verilen bölgeler içermektedir (3). Standart splicing işleminin ko-transkripsiyonel olarak yapıldığı, bu olgun mRNA oluşturma işleminin kritik şekilde düzenlendiği ve sonuçta olgun mRNA'nın translasyon için sitoplazma kısmına gönderildiği bilinmektedir (4). Ancak, son yıllarda, splicing olayının alternatif veya kanonikal olmayan bir şekilde, 5'- ve 3'- splicing bölgelerinin "back-splicing" olarak tanımlanan mekanizma ile kovalent olarak birleşmesi ve böylece bir sirküler RNA oluşturarak da gerçekleşebileceği gösterilmiştir (5,6).

circRNA'lar ilk olarak 1976'da RNA virüslerinde ve elektron mikroskopuna dayalı bir çalışma ile tanımlanmıştır (7) ve o zamandan beri insan, fare, sıçan, mantarlar ve diğer organizmalarda da bulunmuştur (8). Ancak, güvenilir ve yüksek-çıkıtlı yöntemlerin olmaması nedeniyle, son 30 yılda çok az sayıda circRNA tanımlanmıştır. Bu nedenle, yapısal özgülüklerine, bilinmeyen işlevlerine ve düşük miktarda bulunmasına dayanarak, circRNA'ların başlangıçta korunmuş hatalı splicing yan ürünleri olduğu düşünülmüş ve yeterince önemsenmemiştir. Daha sonra, biyoteknolojideki, özellikle de biyoinformatik ve yüksek-çıkıtlı dizileme

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Samsun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., zbcelik25@gmail.com

teknolojisindeki gelişmelerle çok sayıda circRNA keşfedilmiş ve tanımlanmıştır.

circRNA'lar, genellikle dokuya ve gelişim aşamasına spesifik olarak ifade edilen bol miktarlarda bulunan, çeşitli ve korunmuş moleküllerdir (9). circRNA'lar mRNA translasyonunu engellemek için miRNA süngerleri (miRNA sponge) olarak işlev yapabilir (10). Bunun yanı sıra circRNA'lar splicing veya transkripsiyonu regüle ederek ve RNA'ya bağlanan proteinler (RBP) ile etkileşime girerek gen ekspresyonunu etkileyebilir (11).

circRNA'lar biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar ve hastalıkların ilerlemesine neden olan çoklu süreçlere dahil oldukları bildirilmiştir. Bu nedenle, bu moleküller terapötik hedefler için potansiyel fırsatlar sunmakla birlikte tanınan biyobelirteçler olarak da kullanışlı olabilir. Her organizmada bulunmaları ve çeşitliliği göz önüne alındığında, circRNA'lar normal hücresel fizyolojik veya patolojik süreçlere önemli katkılar sağlayabilir.

circRNA'LARIN KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ

Spesifik olarak back-splicing bağlantılarını araştıran transkriptom dizileme verilerinin analizleri sayesinde, çok sayıda metazoada ve meyve sineklerinden insanlara kadar çeşitli hücre tiplerinde ve organizmalarda circRNA'ların ekspresyonu yaygın olarak tespit edilmiştir (12,13). Aktif olarak transkribe edilen insan genlerinin toplam %5.8 ile %23'ünün circRNA'lar ürettiği bildirilmiştir (14) ve bu circRNA'lar dokular ve hücre tipleri arasında dinamik olarak düzenlenmektedir (11).

RNA eksonükleazlarına veya RNase R'ye karşı dirençleri sayesinde, circRNA'lar lineer RNA'lardan daha stabildir (15), bu da circRNA'ların birikmesine, dolayısıyla nöronlar gibi postmitotik ve bölünmeyen hücrelerde lineer RNA'lardan daha yüksek circRNA konsantrasyonlarına yol açabilir (16). Ayrıca, circRNA'lar nöronal farklılaşma, fetal gelişim ve sinaptik gelişim gibi bazı fizyolojik süreçlerde birikebilir (17) ve bu birikim, circRNA'ların bu süreçlerde işlev görebileceklerini göstermektedir. Ayrıca, kandaki ve diğer vücut sıvılarındaki yüksek stabiliteyi nedeniyle circRNA'lar hastalık teşhisi için uygun biyobelirteçler olabilir.

circRNA ekspresyonu memeliler arasında korunmuştur (18), hatta bazıları evrimsel olarak uzak olan *Drosophila*'da bile korunmaktadır (9). İnsanlar ve fareler gibi nispeten yakın ilişkili türlerde, ortolog genlerin %4'ü circRNA'lar üretebilir (19) ve bu circRNA'ların yaklaşık %5-30'u tamamen korunmuştur (20). Bunun yanı sıra, insan beynindeki circRNA'ların yaklaşık %5-10'u domuz beyninde eksprese edilmektedir (21) ve circRNA'ların %23'ü fare ve sıçan arasında korunmuştur (22). Birlikte ele alındığında, bulgular circRNA'ların işlevsel olmayan yan ürünler olma ihtimalinin düşük olduğunu göstermektedir. Tüm bu bilgiler bir-

likte ele alındığında, bulgular circRNA'ların işlevsel olmayan yan ürünler olma ihtimalinin düşük olduğunu göstermektedir.

circRNA BİYOGENEZİ

Son birkaç yılda, circRNA biyogenezinin mekanizması iyi araştırılmıştır. Öncelikle, "back-splicing" adı verilen bir işlemle pre-mRNA'dan **ekzonik circRNA**'lar (**EcircRNA**) meydana gelir. Back splicing, 5'-3' splice bölgelerinin kovalent olarak birleştirilmesi ile kapalı sirküler bir RNA yapısının oluştuğu geleneksel olmayan bir splicing mekanizmasıdır (23).

Yine back-splicing mekanizmasıyla, hem ekzonik hem de intronik dizileri içeren başka bir circRNA sınıfı ise ekson-intron circRNA (EicircRNA) olarak adlandırılır (24). EicircRNA'nın rolü ve kanonikal lineer splicing yerine back-splicing'in tercih edildiği koşullar hakkında tartışmalar devam etmektedir. Her ne kadar back-splicing kanonikal olmayan bir splicing mekanizması olarak düşünülse de, bu süreç kanonikal splicing sistemine bağlıdır (25).

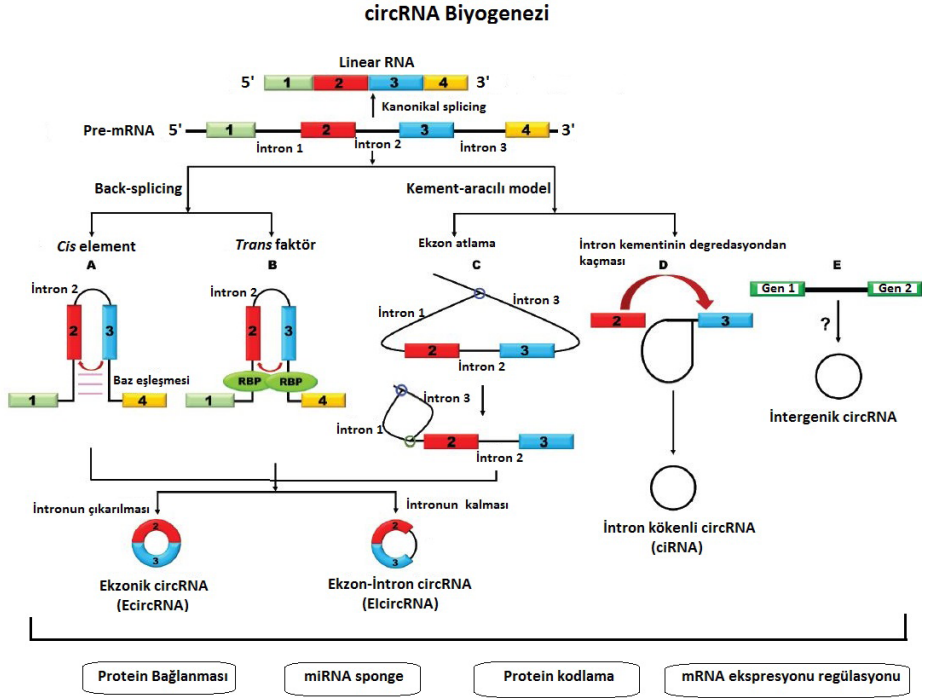
Yapılan çalışmalarda, QK1, NF90/110, ADAR, SRSF3 ve FUS dahil olmak pek çok üzere RBP'nin circRNA'ların biyogenezini düzenlediği ileri sürülmüştür (26). Ayrıca, komşu intronların ters tekrar dizilerinin de circRNA'ların back-splicing işleminde önemli olduğu tespit edilmiştir (27), ancak hala back-splicing işleminin tam mekanizması ve düzenleyici faktörleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Splicing sırasında üretilen bazı intronik kementler, çıkarılan kementleri yıkan enzime karşı dirençlidir ve stabil sirküler **intronik RNA'lar (ciRNA)** veya **kararlı intronik dizili RNA'lar (sisRNA)** üretirler. Şu anda, insanlarda bir milyondan fazla circRNA ve çeşitli türlerde yüzlerce korunmuş circRNA tanımlanmıştır, bu da circRNA'ların ekspresyonunun bir splicing ürününden fazlası olduğunu göstermektedir (28).

Şimdiye kadar tanımlanan sirküler RNA'ların çoğu, protein kodlayan genlerin ekzonlarından üretilir (Şekil 1). Bu nedenle ekzonik sirküler RNA'lar (EcircRNA) adı verilmiştir. Birçok EcircRNA, genellikle iki veya üç olmak üzere birden fazla ekzon içerir, ancak sirküler olmasına izin veren minimum tek bir ekzon uzunluğu vardır (29). İnsan hücrelerinde, tek ekzon back-splicing işlemi için ortalama 353 nt'lik bir ekzon gerekirken, çoklu ekzon back-splicing işlemi için ekzon başına yaklaşık 112-130 nt gereklidir (30). Ekzonik dizilerin sirküler RNA oluşumunda oynadığı rolün yanı sıra, fare *Sry* üzerinde yapılan bir çalışmada, sirküler ekzonu çevreleyen ters komplementer dizinin sirküler bir RNA üretimi için önemli olduğunu ortaya konmuştur (31). Komşu intronlar arasındaki baz eşleşmesi, 5'- ve 3'-splice bölgelerini bir araya getirir, bu da back-splicing reaksiyonlarına

olanak sağlar (Şekil 1A). Bunun yanı sıra, *Schizosaccharomyces pombe*'de bir sirküler RNA'nın oluşumu, dolaylı back-splicing olarak da bilinen ekzon atlama (exon skipping)-aracılı bir mekanizma ile ekzon içeren bir kement prekürsörünün yeniden splicing'i ile de gerçekleşebilir (Şekil 1C) (32). Ekzon içeren sirküler RNA'ların diğer bir kategorisi de **ekzon-intron sirküler RNA (EiCiRNA)**'ları olup hem ekzonları hem de intronları içermektedir (24). Bu durumda, sirküler yapı oluşturan ekzonlar arasındaki intron splicing esnasında çıkarılmamış olur. Ancak, EiCiRNA'ların back-splicing işlemi EcircRNA'larınkine benzerdir. Ekzon içeren sirküler RNA'ların yanı sıra, sirküler intronik RNA (ciRNA) adı verilen, splicing işlemi esnasında uzaklaştırılmayarak nükleusta biriken bir RNA kement tipi de vardır (Şekil 1D) (33). ciRNA'lar farklı türlerde tanımlanmıştır ve çoğunluğu 100–500 nt uzunluğundadır (34). İlginç bir şekilde, ciRNA'ların büyük bir kısmı, intron birleşme noktasında daha yaygın olan görülen adenin yerine bir sitozin içermeye eğilimindedir. Bu sitozin bölgeleri, stabil intronik RNA (ciRNA) kementlerinin splice işleminden sonra yıkılmasını sağlayan enzime karşı dirençli olmasını açıklayabilir (35). Ayrıca, birkaç biyoinformatik çalışmasında, bazı sirküler RNA'ların intergenik genom bölgelerinden oluşan ürünler olduğu ileri sürülmüştür (36). Ancak, bu intergenik sirküler RNA'ların doğruluğunu destekleyecek daha fazla çalışma gerekmektedir.

Aslında ne ters tekrar dizileri ne de kement oluşumu sirküler RNA'ların ortaya çıkması için yeterli değildir. Bu da, sirküler RNA'ların oluşumunu düzenleyen başka parametreler de olduğunu göstermektedir. Bu *cis*-elementlerin ötesinde, çok sayıda RNA'ya bağlanan proteinin (RBP) aktif bir şekilde sirküler RNA biyogenezini düzenlediği tespit edilmiştir (Şekil 1B) (37). Çift sarmallı RNA'ya bağlanan bir protein olan ADAR1 (Adenosine deaminase 1 acting on RNA), adenini (A) inozine (I) dönüştürerek iki komşu intron arasındaki baz eşleşmesini bozar ve ekzonun sirküler form oluşturmalarını engeller (12). Diğer bir örnek olarak, alternatif splicing faktörü Quaking (QKI), insanda epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sırasında yüksek oranda eksprese olan sirküler RNA'ların bir alt kümesinin üretimini arttırır (14).

Ek olarak, hem arkelerde hem de ökaryotlarda görülen başka bir korunmuş circRNA biyogenez mekanizması da keşfedilmiştir. Bu mekanizmada, tRNA splicing endonükleaz kompleksi intron içeren pre-tRNA'yı keser, sonrasında ekzon parçaları birleştirilir ve ayrıca intron terminalleri de birleştirilir, böylece bir tRNA intronik sirküler RNA (tricRNA) yapısı meydana gelir (38).



Şekil 1. Sirküler RNA biyogenezi. Dört ekzonlu bir pre-mRNA'dan farklı circRNA'ların nasıl oluştuğu model olarak gösterilmiştir. A) Ters komplementer dizi içeren iki komşu intron arasındaki baz eşleşmesi ile circRNA oluşumuna neden olan back-splicing. B) İki komşu introna RBP'lerin (RNA binding protein) bağlanması back-splicing ile circRNA oluşumuna neden olur. C) Ekzon atlama ile bir olgun m-RNA ve bir kement RNA oluşur. Kement RNA uzaklaştırılmaz veya degrade olmazsa circRNA oluşturmak için tekrar bir splicing geçirir ve iki adet kement RNA meydana gelir. D) Kanonikal splicing esnasında degradasyona uğramayan kement RNA'lar intronik sirküler RNA'lar (ciRNA) olarak birikir. E) Bazı sirküler RNA'lar ise intergenik genom bölgelerinin ürünü olabilir (39).

circRNA'LARIN NÜKLEAR TAŞINMASI

Farklı tip sirküler RNA'lar hücrede farklı lokalizasyonlarda gözlenebilmektedir. Bu yerleşimler, sirküler yapı oluşturan ekzonlar veya splicing esnasında çıkarılmayan intronlardaki nükleer lokalizasyon sekansları veya nükleer eksport sekansları ile dizaynlanabilir. ciRNA ve EicRNA'ların çoğunlukla nükleusta bulunduğu tespit edilirken, EcircRNA'ların büyük çoğunluğu sitoplazmik kısımda yoğunlaşmıştır (24). Nükleusta yerleşen sirküler RNA'ların transkripsiyonu veya alternatif splicing'i modüle ederek gen ekspresyonunu düzenlediği öne sürülmüştür (40). Sitoplazmik sirküler RNA'ların da mikroRNA süngeri (mRNA sponge) veya translasyon kalıbı olarak hareket etmek gibi çeşitli fonksiyonları vardır (41).

Sperm ve nöronal hücreler gibi bölünmeyen hücrelerde yüksek miktarda sirküler RNA bulunduğu göz önüne alındığında, sirküler RNA'ların hücresel dağılımındaki değişiklikler yalnızca hücre döngüsünün bölünme aşamasında nükleer zarfın parçalanması veya kromozomların ayrılması ile ilgili olmayabilir. Bu nedenle, sitoplazmik sirküler RNA'ların nükleer eksportunun aktif transport sisteminin kontrolü ile gerçekleşmesi daha olasıdır. HepG2 hücrelerinde yapılan kapsamlı bir sirküler RNA profil çalışmasında, sitoplazmada bol bulunan sirküler RNA'ların nükleer eksport RBP'leri tarafından tanınan motifler içerdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, hücrelerin nükleer eksport için linear ve sirküler RNA'ları ayırmasında RBP-aracılı selektif transportun etkili olduğu ileri sürülmüştür (42).

N⁶-metiladenozin RNA'larda en çok görülen internal modifikasyon olup transkripsiyonel, post-transkripsiyonel veya translasyonel seviyede gen ekspresyonunda önemli rol oynar. İlginç olarak, m⁶A sirküler RNA'lar çoğunlukla linear mRNA'da metile olmayan ekzonlardan köken alır ve m⁶A modifikasyonunun da sirküler RNA'nın nükleer eksportunda görev aldığı ileri sürülmüştür (43).

circRNA'LARIN FONKSİYONU

Transkripsiyon ve alternatif splicing regülasyonu

Sitoplazmadaki sirküler RNA'ların neredeyse tamamı ekzonlardan oluşturulmuştur, ancak ciRNA'lar ve ElciRNA'lar genellikle nükleusta lokalizedir ve muhtemelen transkripsiyonel seviyede işlev yapmaktadır. ElciRNA'ların U1 snRNA-bağlanma bölgeleri aracılığıyla U1 snRNP (U1 small nuclear ribonucleoprotein) ve RNA polimeraz II (Pol II) ile etkileşime girerek *cis*-regülasyon fonksiyonuna benzer işlev yaptığı gösterilmiştir (24). Ayrıca, sirküler RNA'lar *cis*- veya *trans*- olarak ana genlerinin transkripsiyonunu düzenler ve nükleusta Pol II kompleksiyle etkileşime girerek ana genlerinin transkripsiyonunu aktive eder (33).

RNA'ya bağlanan proteinlerle (RBP) etkileşimi

Bazı sirküler RNA'lar RBP'leri, belli subselüler lokalizasyonlara bağlayabilir, orada saklayabilir veya oradan uzaklaştırabilir. Örneğin, circ-Amotl1 c-myc, STAT3, PDK1 ve AKT1 ile etkileşime girerek nükleer lokalizasyonlarına imkan sağlar ve dahası hedeflerinin ekspresyonlarını etkiler (44). Ayrıca, sirküler RNA'lar RBP'lerin fonksiyonunu düzenleyen yarışmacı elementler olarak da hareket eder. Örneğin, circPABPN1 ve PABPN1 mRNA'sı yarışmacı olarak HuR'a bağlanır ve nihayetinde circPABPN1 ile HuR'un kombinasyonu PABPN1 translasyonunu baskılar (45).

mikroRNA süngerleri (miRNA sponges)

2014 yılında iki araştırma grubu tarafından yapılan çalışmada, sirküler RNA'ların miRNA hedeflerinin ekspresyonunu düzenlemede miRNA süngerleri veya yarışmacı endojen RNA'lar (ceRNAs) olarak işlev yapabileceği ilk kez gösterilmiştir. miRNA'lar hedef mRNA'ların 3'-translasyona uğramayan bölgelerine (3'-UTR) bağlanabilir ve circRNA'lar da miRNA hedef bölgeleri içermektedir. miRNA'lar ile yarışmacı bağlanarak circRNA'lar dolaylı olarak mRNA translasyonunu regüle eder. Bu çalışmalarda ayrıca, ciRS-7 circRNA'nın 60'dan fazla sayıda korunmuş miR-7 hedef bölgesi içerdiği ve bir miR-7 süngeri olarak işlev yapabileceği, böylece miR-7 hedef mRNA'larının ekspresyonunu regüle edebileceği tespit edilmiştir. Kısa bir süre sonra yapılan çalışmalarda, çoğu circRNA'nın miRNA süngeri olarak hareket etmediği ve bu moleküllerin büyük çoğunluğununko-linear mRNA'lardan daha az miRNA bağlanma bölgesi içerdiği bildirilmiştir (46). Ancak, yapılan çok sayıda çalışmada çoğu circRNA'nın çok sayıda miRNA bağlanma bölgesi olmadan da miRNA süngeri işlevi yapabileceği tespit edilmiştir. Elde edilen çok sayıda kanıt, circRNA'ların bu fonksiyonunun farklı türlerde korunmuş olduğunu ve circRNA'ların miRNA süngeri işlevi görmesinin izole bir olay olmadığını göstermiştir (8).

Translasyon

Sirküler RNA'ların kodlama yapmayan fonksiyonlarının yanı sıra, circRNA'ların translasyon kapasitesi de araştırılmıştır. İlk bulgular, internal ribozoma giriş bölgesi (IRES) veya prokaryotik bağlanma bölgesi içeren sentetik ekzonik circRNA'ların protein kodlama kapasitesinin olduğunu *in vitro* ve *in vivo* olarak göstermiştir (47). Bu durum, bu translasyonel ürünlerin endojen olarak var olup olmadığı sorusunu ortaya çıkarmıştır. Bunun üzerine Legnini ve ark., miyogenezde işlev yapan circ-ZNF609'un splicing-bağımlı ve cap-bağımsız bir mekanizma ile proteine translasyonu olabileceğini göstermiştir (48). Bu da, endojen circRNA'ların aslında protein kodlayabileceğine kanıt sağlamıştır.

circRNA'LARIN İNSAN HASTALIKLARINDAKİ ROLÜ

Sirküler RNA'ların fonksiyonlarından yola çıkarak, araştırmacılar circRNA'ların fizyoloji ve patolojideki rolünü incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar circRNA'ların otofaji, apoptoz, hücre döngüsü ve proliferasyonla ilişkili olduğunu, bu nedenle hastalıklarla ilişkili fonksiyonları olabileceğini göstermiştir (26). Çok sayıda çalışma, circRNA'ların farklı hastalıklarda farklı mekanizmalarla regülatör görevi yaptığını ortaya koymuştur. Ayrıca, circRNA'ların klinik tanı biyobelirteci ve terapötik hedef olma potansiyeli de vardır.

Yapılan bir çalışmada circRNA'ların memeli beyninde diğer analiz edilen dokulara göre daha bol miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir (8). Bu da araştırmacıları sinir sistemi hastalıklarında circRNA'ların rolünü araştırmaya yönlendirmiştir. Özellikle neokortikal ve hipokampal nöronlarda ciRS-7 ve miR-7'nin ko-lokalize olduğu gözlenmiştir. Böylece ciRS-7'nin, Parkinson hastalığında ve pek çok kanser yolağında rol aldığı bilinen miR-7 için miRNA süngeri görevi yaparak fonksiyonunu regüle edebileceği ileri sürülmüştür. Bu araştırmacılar, ciRS-7'nin nöron fonksiyonunda çok önemli rolü olduğunu ve nörolojik hastalıklar ve beyin tümörü gelişiminden sorumlu bir aday olabileceğini öne sürmüştür (49). Bu ön çalışmalar circRNA'ların sinir sistemi hastalıklarındaki rolünün araştırılması çalışmalarını başlatmıştır.

Çok sayıda çalışmada, circRNA'ların kardiyovasküler hastalıkların başlangıcında ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Örneğin, Wu ve ark., hsa_circ-0005870'ın hipertansif hastalarda önemli derecede azaldığını (downregule) tespit etmiştir. Bunun yanı sıra, kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon (CTEPH) hastalarının kanlarında hsa_circ_0002062 ve hsa_circ_0022342'nin azaldığı gösterilmiştir. Daha sonra yapılan biyoinformatik analizlerde de bu circRNA'ların CTEPH gelişiminde önemli rol oynayabileceği tespit edilmiştir (50).

Başka bir çalışmada circRNA'lar ve yaşlanma arasındaki ilişki araştırılmış ve hem fare hemde insanda yaşlanma ile kalpte circ-Foxo3 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. circ-Foxo3 hücreysel yaşlanmanın pozitif bir regülatörü olarak işlev yapmaktadır. Ayrıca, circ-Foxo3'nun ID-1, E2F1, FAK ve H1F2 α ile etkileşime girerek bu proteinlerin sitoplazmada kalmasına neden olup anti-stres ve anti-senesens özelliklerini sınırlayarak kardiyak senesensi hızlandırdığı tespit edilmiştir (11).

Yapılan çalışmalarda circRNA'ların çok sayıda tümörle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar, kanser teşhisi için potansiyel biyobelirteçleri belirlemek için circRNA'ların farklı ekspresyon modellerini araştıranlar ve circRNA'ların kanser gelişimindeki düzenleyici rolünü inceleyenler olarak iki ana kategoriye ayrılabilir. Biyobelirteç olarak, circRNA'ların önemli birkaç özelliği vardır: 1- Yüksek ve seçici bolluk: Birçok insan transkriptinin sirküler RNA izoformları, kanonikal linear transkriptlerle kıyaslanabilir seviyelerde bulunur. Ayrıca, circRNA'ların bolluğu, beyin ve kan gibi düşük oranda çoğalan hücrelerde veya organlarda daha yüksektir. 2- Yüksek stabilite: 5'-3' polaritesi ve poliadenile kuyrukları olmayan kovalent olarak kapalı sirküler yapıları nedeniyle, circRNA'lar RNase R veya RNA ekzonükleaz aktivasyonuna dirençlidir, bu da linear RNA'lara göre daha yüksek stabilite göstermelerine imkan sağlar (8). 3- Korunmuş dizi olma: çoğu circRNA farklı türlerde korunmuş olarak bulunur. 4- Spesifik ekspresyon: circRNA ekspresyonu

doku ve gelişim aşamasına özgüdür. 5- circRNA'lar sadece tümör dokularında değil aynı zamanda kan ve tükürükte de tespit edilebilir.

Tüm bu özellikleri circRNA'ları kanser teşhisinde potansiyel biyobelirteçler olarak kullanım için uygun kılmaktadır ve çok sayıda literatürde çeşitli kanserlerin klinik teşhisinde circRNA'ların rolü araştırılmıştır (8).

circRNA'LARIN TERAPÖTİK AVANTAJLARI

Bahsedilen ve kanıtlanan bütün özellikleri göz önüne alındığında, circRNA'lar terapötik ajanlar olarak kullanışlı olabilir. İnsanda spesifik doku ve hücrelerdeki doğal circRNA'ların ekspresyonunun kontrolü ile modifiye kimyasal ilaçlar veya RNA interferans molekülleri gibi sentetik moleküllere göre yan etkilerin çok daha aza indirilmesi sağlanabilir. Bu da circRNA'ların önemini daha da artırmaktadır. Ayrıca, endojen circRNA'ların ekspresyonunun kontrolü gelecekte gen tedavisi için önemli bir başlangıç noktası olabilir.

Bilindiği üzere, circRNA'ların genel özelliklerinden ve ana işlevlerinden biri miRNA süngerleri olarak hareket etmesidir. Bu nedenle, hastalıklarda miRNA fonksiyonunu düzenlemek için endojen circRNA sünger yapıları araştırılarak potansiyel yapay miRNA süngerleri tasarlanabilir ve geliştirilebilir. Yapay miRNA süngerleri, miRNA'yı hedef alan ilaçların geliştirilmesinde yeni bir bakış açısı oluşturmaktadır.

circRNA'ların tedaviler için bir diğer avantajı da potansiyel olarak hedef dışı etkilerinin düşük olmasıdır. Buna karşın, miRNA'ların ve siRNA'ların kısa uzunlukta dizilere sahip olması nedeniyle hedef dışı etkileri çok yüksektir. Gerçekten de, hedef dışı etkiler, küçük RNA moleküllerinin klinik uygulamasını kısıtlayan önemli bir problemdir. Ancak, circRNA'ların spesifik ve stabil yapısı nedeniyle bu problem circRNA tedavisinin ilerlemesini etkilemeyecektir.

SONUÇ

circRNA'ların RNA etkileşimlerinde kararlı, yüksek oranda korunmuş ve hücre ve dokuya özgü moleküller olması, hatalı veya rastgele yan ürünler olmadıklarını, hatta sıkı bir şekilde kontrol edilen biyolojik süreçlerle üretildiğini göstermektedir. Son zamanlarda circRNA'lar üzerine yapılan araştırmalar, temel olarak kanserdeki ekspresyon paternlerine ve tümörögenezdeki biyolojik rollerine odaklanmıştır. circRNA'lar miRNA süngerleri olarak hareket edebilir ve şu ana kadar en çok çalışılan mekanizması da bu özelliğidir. Ayrıca, circRNA'lar gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede etkileyebilir ve proteince translasyonu yapılabilir. Mekanizma çalışmalarında en çok miRNA sün-

geri özellikleri yaygın olarak çalışılmıştır. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalarda circRNA'ların gen ifadesi regülasyonu ve translasyon mekanizmalarına daha çok odaklanmalıdır.

circRNA'ların transportunda veya degradasyonundaki bozuklukların kanser ve nörolojik hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlara neden olduğu dikkate alındığında, gelecekteki çalışmalarda farklı tip circRNA'ların transport ve degradasyonunun araştırılması, circRNA'ların fonksiyonlarının daha iyi aydınlatılmasına ve insan hastalıkları için yeni teşhis ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

1. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews genetics*. 2011;12(12): 861–874. doi: 10.1038/nrg3074.
2. Chen LL, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis. *RNA biology*. 2015;12(4): 381–388. doi: 10.1080/15476286.2015.1020271.
3. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 2009;136(4): 701–718. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.009.
4. Merkhofer EC, Hu P, Johnson TL. Introduction to cotranscriptional RNA splicing. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1126: 83–96. doi: 10.1007/978-1-62703-980-2_6.
5. Chen L, Huang C, Wang X, et al. Circular RNAs in eukaryotic cells. *Current genomics*. 2015;16(5): 312–318. doi: 10.2174/1389202916666150707161554.
6. Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, et al. Scrambled exons. *Cell*. 1991;64: 607–613. doi: 10.1016/0092-8674(91)90244-S.
7. Sanger HL, Klotz G, Riesner D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976;73(11): 3852–3856. doi: 10.1073/pnas.73.11.3852.
8. Han B, Chao J, Yao H. Circular RNA and its mechanisms in disease: from the bench to the clinic. *Pharmacology & therapeutics*. 2018;187: 31–44. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.01.010.
9. Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. *Molecular cell*. 2015;58(5): 870–885. doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.027.
10. Liu Q, Zhang X, Hu X, et al. Circular RNA related to the chondrocyte ECM regulates MMP13 expression by functioning as a MiR-136 'Sponge' in human cartilage degradation. *Scientific reports*. 2016;6(1): 1–11. doi: 10.1038/srep22572.
11. Du WW, Zhang C, Yang W, et al. Identifying and characterizing circRNA-protein interaction. *Theranostics*. 2017;7(17): 4183. doi: 10.7150/thno.21299.
12. Ivanov A, Memczak S, Wyler E, et al. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell reports*. 2015;10(2): 170–177. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.019.
13. Zhang YG, Yang HL, Long Y, et al. Circular RNA in blood corpuscles combined with plasma protein factor for early prediction of pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2016;123(13): 2113–2118. doi: 10.1111/1471-0528.13897.
14. Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*. 2015;160(6): 1125–1134. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.014.
15. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *Rna*. 2013;19(2): 141–157. doi: 10.1261/rna.035667.112.
16. Chen W, Schuman E. Circular RNAs in brain and other tissues: a functional enigma. *Trends in*

- neurosciences*. 2016;39(9): 597–604. doi: 10.1016/j.tins.2016.06.006.
17. Szabo L, Morey R, Palpant NJ, et al. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome biology*. 2015;16(1): 1–26. doi: 10.1186/s13059-015-0690-5.
 18. Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development*. 2016;143(11): 1838–1847. doi: 10.1242/dev.128074.
 19. Salzman J, Chen RE, Olsen MN, et al. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS genetics*. 2013;9(9): e1003777. doi: 10.1371/journal.pgen.1003777.
 20. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*. 2013;495(7441): 333–338. doi: 10.1038/nature11928.
 21. Venø MT, Hansen TB, Venø ST, et al. Spatio-temporal regulation of circular RNA expression during porcine embryonic brain development. *Genome biology*. 2015;16(1): 1–17. doi: 10.1186/s13059-015-0801-3.
 22. You X, Vlatkovic I, Babic A, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nature neuroscience*. 2015;18(4): 603–610. doi: 10.1038/nn.3975.
 23. Eger N, Schoppe L, Schuster S, et al. Circular RNA splicing. *Circular RNAs*. 2018: 41–52. doi: 10.1007/978-981-13-1426-1_4.
 24. Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature structural & molecular biology*. 2015;22(3): 256–264. doi: 10.1038/nsmb.2959.
 25. Starke S, Jost I, Rossbach O, et al. Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Reports*. 2015;10(1): 103–111. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.002.
 26. Huang A, Zheng H, Wu Z, et al. Circular RNA-protein interactions: Functions, mechanisms, and identification. *Theranostics*. 2020;10(8): 3503–3517. doi: 10.7150/thno.42174.
 27. Liang D, Wilusz JE. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes & Development*. 2014;28(20): 2233–2247. doi: 10.1101/gad.251926.114.
 28. Vromman M, Vandesompele J, Volders PJ. Closing the circle: Current state and perspectives of circular RNA databases. *Briefings in Bioinformatics*. 2021;22(1): 288–297. doi: 10.1093/bib/bbz175.
 29. Li X, Liu S, Zhang L, et al. A unified mechanism for intron and exon definition and back-splicing. *Nature*. 2019;573: 375–380. doi: 10.1038/s41586-019-1523-6.
 30. Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, et al. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*. 2014;159: 134–147. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.001.
 31. Capel B, Swain A, Nicolis S, et al. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell*. 1993;73: 1019–1030. doi: 10.1016/0092-8674(93)90279-Y.
 32. Barrett SP, Wang PL, Circular SJ. RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor. *Elife*. 2015;4: e07540. doi: 10.7554/eLife.07540.
 33. Zhang Y, Zhang XO, Chen T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs. *Molecular Cell*. 2013;51: 792–806. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.017.
 34. Cheng J, Zhang Y, Li Z, et al. A lariat-derived circular RNA is required for plant development in Arabidopsis. *Science China Life Sciences*. 2018;61: 204–213. doi: 10.1007/s11427-017-9182-3.
 35. Talhouarne GJ, Gall JG. Lariat intronic RNAs in the cytoplasm of vertebrate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(34): 7970–7977. doi: 10.1073/pnas.1808816115.
 36. Zhao X, Duan X, Fu J, et al. Genome-wide identification of circular RNAs revealed the dominant intergenic region circularization model in *apostichopus japonicus*. *Frontiers in genetics*. 2019;10: 603. doi: 10.3389/fgene.2019.00603.
 37. Errichelli L, Dini Modigliani S, Laneve P, et al. FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons. *Nature communications*. 2017;8(1): 1–11. doi: 10.1038/ncomms14741.
 38. Noto JJ, Schmidt CA, Matera AG. Engineering and expressing circular RNAs via tRNA splicing. *RNA biology*. 2017;14(8): 978–984. doi: 10.1080/15476286.2017.1317911.

39. Zhou M, Xiao MS, Li Z, et al. New progresses of circular RNA biology: from nuclear export to degradation. *RNA biology*. 2021;18(10): 1365–1373. doi: 10.1080/15476286.2020.1853977.
40. Conn VM, Hugouvieux V, Nayak A, et al. A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. *Nature plants*. 2017;3: 17053. doi: 10.1038/nplants.2017.53.
41. Xiao MS, Ai Y, Wilusz JE. Biogenesis and functions of circular RNAs come into focus. *Trends in cell biology*. 2020;30: 226–240. doi: 10.1016/j.tcb.2019.12.004.
42. Zhang J, Zhang X, Li C, et al. Circular RNA profiling provides insights into their subcellular distribution and molecular characteristics in HepG2 cells. *RNA biology*. 2019;16: 220–232. doi: 10.1080/15476286.2019.1565284.
43. Chen RX, Chen X, Xia LP, et al. N(6)-methyladenosine modification of circNSUN2 facilitates cytoplasmic export and stabilizes HMGA2 to promote colorectal liver metastasis. *Nature communications*. 2019;10: 4695. doi: 10.1038/s41467-019-12651-2.
44. Yang ZG, Awan FM, Du WW, et al. The circular RNA interacts with STAT3, increasing its nuclear translocation and wound repair by modulating Dnmt3a and miR-17 function. *Molecular therapy*. 2017;25(9): 2062–2074. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.05.022.
45. Abdelmohsen K, Panda AC, Munk R, et al. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA biology*. 2017;14(3): 361–369. doi: 10.1080/15476286.2017.1279788.
46. Guo JU, Agarwal V, Guo H, et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome biology*. 2014;15(7): 1–14. doi: 10.1186/s13059-014-0409-z.
47. Wang Y, Wang Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *Rna*. 2015;21(2): 172–179. doi: 10.1261/rna.048272.114.
48. Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Molecular cell*. 2017;66(1): 22–37. doi:10.1016/j.molcel.2017.02.017.
49. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 2013;495(7441): 384–388. doi:10.1038/nature11993.
50. Miao R, Wang Y, Wan J, et al. Microarray expression profile of circular RNAs in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Medicine*. 2017;96(27): e7354. doi: 10.1097/MD.0000000000007354.