

КОЛЬЦЕВЫЕ РНК: БИОГЕНЕЗ, ФУНКЦИИ И РОЛЬ ПРИ ГИПЕРТРОФИИ МИОКАРДА

©2024 г. Н. М. БАУЛИНА^{1,2*}, И. С. КИСЕЛЕВ^{1,2},
О. С. ЧУМАКОВА¹, О. О. ФАВОРОВА^{1,2}

¹ *Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова, Москва*

² *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва*

I. Введение. II. Биогенез и деградация кРНК. III. Функции кРНК. IV. Методы анализа кРНК. V. кРНК при гипертрофии миокарда. VI. кРНК при ГКМП. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Кольцевые РНК, кРНК (circular RNA, circRNA) представляют собой большой класс одноцепочечных ковалентно замкнутых молекул РНК. Первыми молекулами кРНК, открытыми более 40 лет назад, стали вириды – экзогенные инфекционные агенты растений [1]. Спустя несколько лет в цитоплазматической фракции эукариотической клеточной линии HeLa с помощью электронной микроскопии были обнаружены эндогенные кРНК [2]. На протяжении длительного времени их считали «мусором», образующимся в результате aberrantного (аномального) сплайсинга РНК [3], и отводили роль единственного исключения кРНК гена, кодирующего фактор развития семенников Sry, которая, предположительно, выполняла определенную функцию в семенниках мыши [4]. Однако накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что кРНК, которые традиционно относят к числу некодирующих РНК, служат регуляторами транскрипции и трансляции [5]. Они играют важную роль в клетке как в норме, так и при различных патологиях, и благодаря стабильности замкнутой кольцевой структуры привлекают к себе все

Принятые сокращения: ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, ЛЖ – левый желудочек, ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка, кРНК – кольцевые РНК.

**Адрес для корреспонденции:* tasha.baulina@gmail.com

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00353)

больше внимания в качестве перспективных биомаркеров течения заболеваний и эффективности их лечения [6].

В последние годы высокопроизводительное секвенирование РНК (RNA-seq) и биоинформатические алгоритмы выявили у эукариот, включая грибы, протисты, растения, червей, рыб, насекомых и млекопитающих, тысячи кРНК, которые характеризуются тканеспецифическим паттерном экспрессии генов [7]. По данным базы circAtlas 2.0 (обновлена в марте 2020 года), у человека присутствует более 420 тыс. кРНК [8]. Несмотря на усилия нескольких исследовательских групп по созданию ресурсов, обобщающих информацию о кРНК, современные базы данных пока остаются неполными, не связаны между собой и используют для аннотирования кРНК различные варианты номенклатуры. Тем не менее, обычно идентификационные номера кРНК указывают на её принадлежность к биологическому виду и содержат уникальный для конкретной базы данных числовой код, например, кРНК гена *CAMSAP1* человека, кодируемая локусом chr9:138773478-138799005 (hg19), в первой крупной базе данных, circBase [9] обозначается как hsa_circ_0001900, а в базе CIRCpedia [10] – как HSA_CIRCpedia_63397. Некоторые базы данных, например, circBank [11], используют более удобную номенклатуру, учитывающую еще и наименование гена, с которого транскрибируется кРНК, – hsa_circCAMSAP1_006 для той же кРНК. В целом, проблема стандартизации номенклатуры кРНК по сей день остается нерешенной, что затрудняет сопоставление различных экспериментальных результатов.

Появляется все больше данных о том, что кРНК могут играть важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний человека [6]. Гипертрофия миокарда левого желудочка (ГЛЖ) служит общепризнанным фактором риска развития сердечной недостаточности, аритмий и внезапной сердечной смерти – ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире. В большинстве случаев ГЛЖ возникает как адаптивный ответ на длительные гемодинамические перегрузки левого желудочка (ЛЖ) давлением или объемом крови, как, например, при артериальной гипертензии или пороках сердца, и поэтому называется вторичной. Реже ГЛЖ носит первичный характер и обусловлена внутренним дефектом кардиомиоцитов, а именно, мутацией в одном из генов его сократительного аппарата – саркомера. Наследственное заболевание, в основе патогенеза которого лежит первичная ГЛЖ, называется гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП). Многочисленные исследования показали, что и механизмы развития двух форм ГЛЖ, и их лечение значительно различаются,

хотя обнаружены и общие звенья патогенеза. Изучение роли кРНК как регулятора биологических процессов при ГЛЖ различного генеза представляется важным и перспективным направлением научных исследований.

В этом обзоре описаны современные представления о биогенезе, деградации, основных функциях кРНК и основных методах их анализа. Результаты пока относительно немногочисленных исследований, посвященных роли кРНК в патологическом процессе, подробно рассмотрены применительно к развитию ГЛЖ. Обсуждается потенциал клинического применения кРНК в качестве терапевтических мишеней и диагностических биомаркеров ГКМП.

II. БИОГЕНЕЗ И ДЕГРАДАЦИЯ кРНК

БИОГЕНЕЗ кРНК

Большинство кРНК являются продуктами тысяч различных белок-кодирующих генов [12]. На сегодняшний день наиболее типичными представителями кРНК считают экзонные кРНК (ecicRNA), интронные кРНК (ciRNA) и экзон-интронные кРНК (EiciRNA); реже встречаются кРНК, транскрибируемые с 3'- и 5'-нетранслируемых областей [5]. Экзонные и экзон-интронные кРНК могут включать как один, так и несколько экзонов, что свидетельствует об образовании их различных изоформ за счет альтернативного сплайсинга [13]. В ряде случаев кРНК могут транскрибироваться с антисмысловой цепи ДНК (антисмысловые кРНК) или с межгенных областей генома (межгенные кРНК) [14, 15]. Экзонные кРНК являются наиболее изученными, на их долю приходится > 80% всех известных кРНК. Структурное разнообразие молекул кРНК обуславливается разными механизмами их образования, которые рассмотрены ниже.

Как известно, каноническим механизмом созревания мРНК эукариот является процесс сплайсинга мРНК-предшественника (пре-мРНК) с участием сплайсосомы, в результате которого донорный сайт сплайсинга (5'-конец интрона) пре-мРНК связывается с акцепторным сайтом сплайсинга (3'-конец того же интрона), что приводит к выпетливанию и удалению последнего. Сплайсированная зрелая мРНК может содержать все экзоны пре-мРНК или же меньшее их число в разных сочетаниях (альтернативный сплайсинг), однако во всех случаях сохраняется линейный порядок расположения экзонов. В отличие от канонического сплайсинга, большинство кРНК образуется посредством другого вида сплайсинга, при котором входящие в кРНК экзоны связываются в порядке, обратном по сравнению с каноническим механизмом (обратный сплайсинг, или бэксплайсинг) [16].

Обратный сплайсинг – это вариант сплайсинга пре-мРНК, при котором, в отличие от канонического механизма, донорный сайт сплайсинга, локализованный ближе к 3' концу пре-мРНК (downstream), соединяется с акцепторным сайтом, расположенным ближе к 5' концу (upstream) [12]. Мы будем придерживаться этого, на наш взгляд, наиболее удачного определения бэксплайсинга, хотя в литературе можно встретить самые разнообразные и даже взаимно противоречащие формулировки. При обратном сплайсинге может формироваться замкнутая петля, содержащая или один экзон (ecircRNA), или несколько экзонов, перемежающихся интроном(ами) (EicRNA). Впоследствии экзон-интронные кРНК могут с помощью канонического сплайсинга утрачивать интроны и превращаться в экзонные кРНК. Наличие длинных интронов в транскрипте является фактором, увеличивающим вероятность осуществления обратного сплайсинга, поскольку такие интроны часто содержат комплементарные инвертированные повторы, такие как последовательности Alu, которые способны образовывать антипараллельную двухцепочечную структуру РНК («стебелек») и таким образом сближать сайты обратного сплайсинга [17–19]. Помимо этого, существуют РНК-связывающие белки, такие как Quaking, Muscleblind и Fused-in sarcoma, два мономера которых могут связываться со специфическими мотивами последовательности выше- и нижележащих интронов, димеризоваться и сближать сайты сплайсинга друг с другом, способствуя образованию кРНК [20].

За счет того, что обратный сплайсинг катализируется тем же сплайсосомным механизмом, что и канонический [21], между ними существует прямая конкуренция [22]. Истощение сплайсосомных факторов, таких как SF3a и SF3b, может сдвигать канонический сплайсинг в сторону обратного [23]. Эффективность процессинга большинства кРНК очень низкая, однако их устойчивость к экзонуклеолитической деградации позволяет кРНК накапливаться в клетках до относительно высоких уровней [24]. Стоит отметить, что для некоторых генов кРНК являются преобладающими продуктами транскрипции [22]. Биогенез кРНК может начинаться и со сплайсинга по каноническому механизму. Образующийся при каноническом альтернативном сплайсинге фрагмент РНК, содержащий как экзоны, так и интроны, вырезается и образует лассо – промежуточную петлевую РНК, из которой затем путем обратного сплайсинга формируются зрелые экзонные кРНК и иногда экзон-интронные кРНК [25]. Кроме того, некоторые интроны, вырезанные из предшественника мРНК в ходе классического канонического сплайсинга, не деградируют, а замыкаются в кольцо, образуя интронные кРНК [26]. Схематическое изображение событий

сплайсинга, приводящих к образованию различных типов кРНК, представлено на Рисунке 1. Как показано на этом рисунке, один локус гена может продуцировать несколько разных кольцевых РНК посредством выбора альтернативных сайтов сплайсинга. Продукты, образующиеся в результате сплайсинга линейной РНК, могут входить в состав кРНК; более того, некоторые кРНК содержат экзоны, которые не включаются в линейные транскрипты [27].

В целом, биогенез кРНК – это сложный процесс, регулируемый множеством факторов, в том числе расположением инвертированных повторов и сайтов взаимодействия с белками, которые опосредуют вытеснение или, напротив, делают обратный сплайсинг невозможным.

Большинство образовавшихся экзонных кРНК, несмотря на отсутствие у них поли(А) хвоста и кэпа, транспортируется в цитоплазму, в то время как интронные и экзон-интронные кРНК остаются в ядре [7]. Транспортировка кРНК из ядра в цитоплазму осуществляется в зависимости от их размера с помощью АТФ-зависимой РНК-хеликазы URH49 (для более коротких кРНК) или сплайсосомной РНК-хеликазы UAP56 (для более длинных кРНК) [28].

ДЕГРАДАЦИЯ кРНК

Клетки поддерживают процессы образования и деградации кРНК в сбалансированном состоянии, что необходимо для их нормального функционирования [29, 30]. Однако механизмы деградации кРНК в клетках и необходимые для этого условия пока до конца не ясны. Поскольку кРНК исключительно стабильны из-за отсутствия у них свободных концов и устойчивы к расщеплению экзонуклеазой [5, 18, 31], ведущая роль в расщеплении кРНК принадлежит РНК-эндонуклеазам. Так, эндонуклеаза AGO2 может расщеплять кРНК по регулируемому микроРНК механизму [32]. Описан еще один путь эндонуклеазного расщепления кРНК, зависящий от присутствия в структуре последних модифицированного основания N6-метиладенозина (m6A). Такие m6A-содержащие кРНК подвергаются расщеплению эндонуклеазой Р в составе комплекса с белком, ассоциированным с множественной лекарственной устойчивостью (RNaseP/MRP); этот комплекс, в свою очередь, связывается с m6A-связывающим белком YTHDF2 посредством выполняющего функцию мостика адапторного белка HRSP12 [33]. Описано вовлечение еще нескольких белков со специфическими функциями в деградацию кРНК [23, 34, 35].

Молекулы кРНК часто обнаруживают в экзосомах или внеклеточных везикулах, которые, по-видимому, могут участвовать в их клиренсе или служить посредниками для кРНК-опосредованной межклеточной коммуникации [36–38].

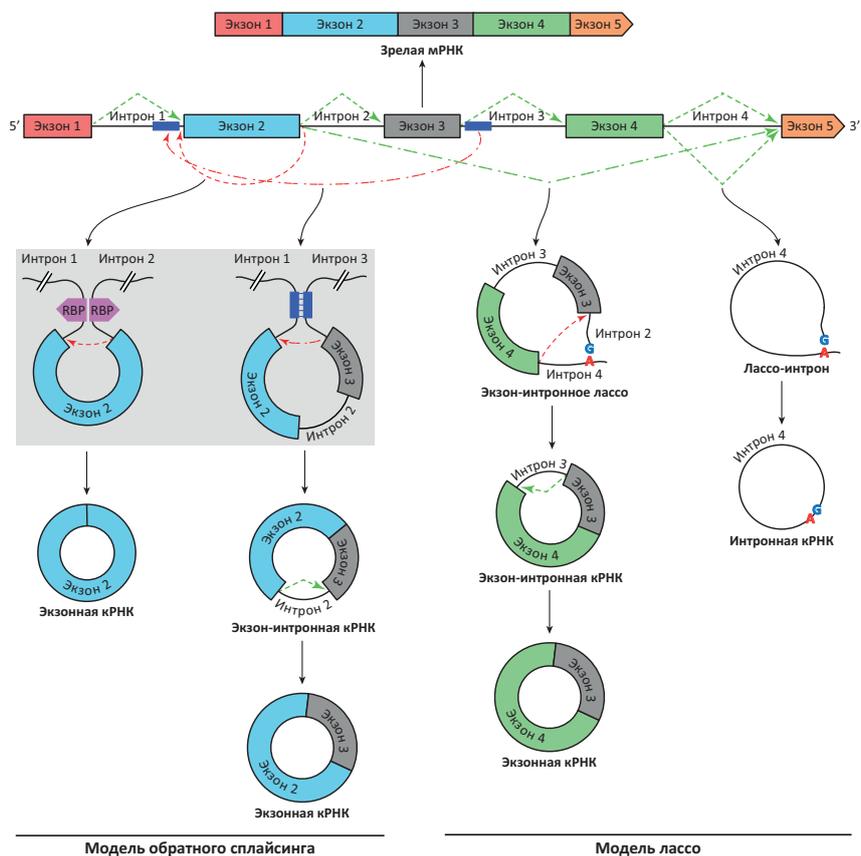


Рис. 1. Формирование зрелой мРНК и различных типов кРНК из мРНК-предшественника.

Обратный сплайсинг приводит за счет соединения «голова к хвосту» 5'-сайта сплайсинга интрона 2 с 3'-сайтом сплайсинга интрона 1 к образованию экзонной кРНК, содержащей единственный экзон 2. Кроме того, обратный альтернативный сплайсинг может привести к вырезанию экзонов 2 и 3 с интроном 2 между ними, а последующее удаление интрона с помощью канонического сплайсинга приводит к образованию экзонной кРНК, состоящей из последовательностей экзонов 2 и 3. Канонический сплайсинг приводит к образованию не только линейной мРНК, но и интронной кРНК (после отрезания «хвоста» у лассо-интрона 4); канонический альтернативный сплайсинг – к образованию экзон-интронного лассо, из которого затем посредством обратного сплайсинга лассо-интрона формируется экзон-интронная кРНК; вырезание из последней интрона 3 по каноническому механизму приводит к образованию экзонной кРНК, состоящей из экзонов 3 и 4.

Разноцветные прямоугольники обозначают экзоны, черные линии между ними – интроны; зеленая штриховая линия – канонический сплайсинг, зеленая штрих-пунктирная линия – канонический альтернативный сплайсинг, красная штриховая линия – неканонический (обратный) сплайсинг, красная штрих-пунктирная линия – обратный альтернативный сплайсинг. На сером фоне показаны схемы сближения фланкирующих интронов друг с другом за счет димеризации РНК-связывающих белков (RBP) (фиолетовые пятиугольники) и взаимодействия инвертированных комплементарных последовательностей (синие прямоугольники).

III. ФУНКЦИИ кРНК

На сегодняшний день установлено, что кРНК выполняют разнообразные биологические функции, действуя как регуляторы транскрипции и белковые матрицы. Кроме того, ряд кРНК может служить белковыми ловушками, каркасами и рекрутерами, распознавая специфические аминокислотные последовательности в структуре белка. Основные функции кРНК схематически изображены на Рисунке 2 и описаны ниже.

Недавние исследования показали, что молекулы кРНК обогащены сайтами связывания микроРНК и обладают так называемым «эффектом губки» (sponge-like). Они способны связываться с молекулами микроРНК, блокируя их ингибирующее действие на гены-мишени [39] и тем самым усиливая экспрессию этих генов (Рисунок 2А). Такая конкуренция с генами-мишенями за связывание с микроРНК позволяет рассматривать кРНК в качестве внутриклеточных конкурентных эндогенных РНК (competitive endogenous RNA, ceRNA), влияющих на функциональную активность как микроРНК, так и их генов-мишеней [40]. Поскольку кРНК активно экспрессируются в клетках, обладают высокой стабильностью и имеют большое количество сайтов связывания микроРНК, они могут быть не менее эффективными губками микроРНК, чем другие известные молекулы с этой функцией – длинные некодирующие молекулы РНК [39, 41].

Показано, что кРНК могут и напрямую модулировать в ядре экспрессию гена, продуктом которого они являются («гена-хозяина») (Рисунок 2Б). Связываясь с такими генами, они могут вызывать паузу или терминацию их транскрипции за счет образования гибрида с комплементарной нитью ДНК (структура R-петли). Формирование гибридной петли может способствовать также активации экспрессии укороченных транскриптов или транскриптов с пропущенными экзонами, что приводит к синтезу фенотипически дефектных продуктов генов [42]. кРНК могут также усиливать экспрессию кодирующих их генов: так, ядерные экзон-интронные кРНК (например, circEIF3J и circPAIP2) рекрутируют для этого сплайсосомный малый ядерный рибонуклеопротеин U1 и РНК-полимеразу II на промоторы своих генов-хозяев [43].

Известно, что кРНК могут также взаимодействовать с белками, выступая в роли белковых ловушек, каркасов и рекрутеров в различных физиологических и патологических условиях (Рисунок 2В). Одна кРНК может связываться исключительно с одним белком или взаимодействовать с несколькими белками при различных обстоятельствах (обобщено в [44]).

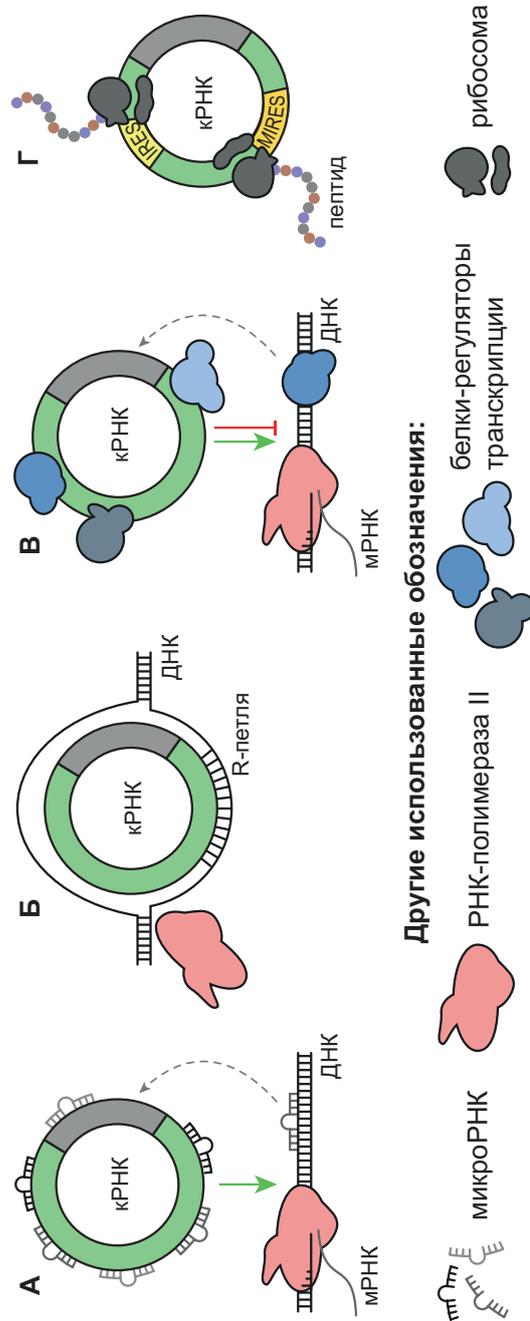


Рис. 2. Основные функции кРНК: связывание молекул микроРНК (А), прямое связывание с «геном-хозяином» и модуляция его экспрессии за счет образования R-петли (Б), связывание белков, участвующих в регуляции транскрипции (В), кэп-независимая трансляция кРНК с образованием пептидов (Г).

Молекулы кРНК изначально классифицировали как некодирующие РНК, однако, в настоящее время установлено, что некоторые кРНК кодируют пептиды, функции которых пока неизвестны [45, 46] (Рисунок 2Г). Некоторые кРНК содержат внутренний сайт посадки рибосомы IRES, обеспечивающий кэп-независимую инициацию трансляции, и имеют открытую рамку считывания; они связываются с полирибосомами и активно транслируются в короткие пептиды или белки [47, 48]. Некоторые кРНК могут также транслироваться с помощью другого кэп-независимого механизма, опосредованного метилированием азота в положении 6 аденозина (N6-метиладенозина, m6A). Наличие одиночного m6A-индуцированного сайта связывания рибосомы в 5'-нетранслируемой области мРНК (m6A-induced ribosome engagement site, MIREs) стимулирует селективную трансляцию кРНК в условиях стресса по механизму, включающему прямое связывание фактора инициации eIF3 [49, 50].

IV. МЕТОДЫ АНАЛИЗА кРНК

Из-за вариабельности размеров и отсутствия свободных концов обнаружение кРНК представляет собой непростую задачу, которая надолго задержала их изучение. Действительно, кРНК нельзя отделить от других РНК в геле и обнаружить с помощью классических методов молекулярной биологии, основанных на обратной транскрипции РНК, обогащенных поли-А, или быстрой амплификации концов кДНК (RACE). Кроме того, последовательности кРНК и мРНК «гена-хозяина» идентичны, что затрудняет их дифференциацию.

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА кРНК

В последнее десятилетие были достигнуты значительные успехи в технологиях секвенирования РНК, включая различные стратегии истощения рибосомной РНК, увеличение длины прочтений, большую глубину секвенирования и новые алгоритмы для сопоставления прочтений с геномом. Эти разработки привели к идентификации сплайс-вариантов мРНК и неполиаденилированных молекул РНК, в том числе кРНК. Тот факт, что концы молекул кРНК соединены «голова к хвосту», предоставляет уникальную возможность для их обнаружения [51]. При подготовке образцов кРНК к секвенированию используют различные методы разрушения линейных молекул РНК, такие как истощение поли-А РНК, обработка 3'->5' экзорибонуклеазой R (РНКазой R) и метод RPAD (обработка РНКазой R с последующим полиаденилированием и истощением поли(А)+ РНК), обеспечивающие

обогащение тотальной РНК молекулами кРНК [52, 53]. Однако, поскольку циркуляризация молекул РНК может происходить не только вследствие обратного сплайсинга, но и за счет других механизмов, таких как транс-сплайсинг, tandemная дупликация или переключение матрицы обратной транскриптазы (обобщено в [13, 52]), полное удаление последовательностей линейных РНК, в том числе в форме их кольцевых продуктов, на сегодняшний день все еще остается серьезной проблемой.

Данные RNA-seq выравнивают на геном с использованием стандартных инструментов, например STAR и BWA [54, 55]. Алгоритмы для дальнейшей идентификации кРНК постоянно совершенствуются, в настоящее время наиболее популярными из них являются ACSF, CIRCexplorer2, CIRI2, DCC, KNIFE и Uroborus [7]. К сожалению, одним из побочных эффектов такой вариативности алгоритмов обработки данных RNA-seq являются трудности в интерпретации и сопоставлении результатов, полученных разными группами исследователей.

Благодаря достижениям в области технологий секвенирования, а также инструментам биоинформатики для аннотации и идентификации кРНК, спектр типов и биологических функций кРНК постоянно расширяется и делает их конкурентными претендентами на роль новых биомаркеров заболеваний.

В дополнение к RNA-seq были разработаны платформы ДНК-микрочипов для идентификации и количественного определения известных кРНК [51]. В отличие от RNA-seq, в микрочипе используются зонды, нацеленные на выявление участков соединения «голова к хвосту» уже известных кРНК. Первые коммерческие микрочипы были изготовлены компанией Arraystar Inc. (<https://www.arraystar.com/circular-gna-array-service/>); они содержат более 10000 кРНК, отображенных на основании литературных данных. Поскольку зонды микрочипов имеют сходство последовательностей с линейными РНК, предварительная обработка тотальной РНК РНКазой R может улучшить специфичность обнаружения кольцевых молекул. В отличие от RNA-seq, ДНК-микрочипы ограничены количеством зондов к известным кРНК, а также не позволяют идентифицировать зрелые последовательности кРНК (после сплайсинга) или определять отношение количества кРНК к линейной РНК того же гена. Однако их данные гораздо более удобны, чем RNA-seq, для последующей обработки.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА кРНК НА ОСНОВЕ ПЦР И НОЗЕРН-БЛОТ

Поскольку оба высокопроизводительных метода могут генерировать ложноположительные результаты, для их подтверждения и более точного количественного определения выявленных молекул кРНК рекомендуется использование других методов, таких как обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР), секвенирование продуктов ПЦР по Сэнгеру и нозерн-блоттинг. Благодаря скорости и удобству, идентификация и количественная оценка кРНК на основе ПЦР получили широкое распространение.

Для ПЦР-амплификации специфических кРНК используются «расходящиеся» праймеры, фланкирующие область соединения «голова к хвосту» [56]. Поскольку такие праймеры не амплифицируют линейные РНК, для обнаружения и количественного определения кРНК с помощью ПЦР не требуется обработка тотальной РНК. Секвенирование по Сэнгеру с расходящимися праймерами продукта ПЦР может подтвердить последовательность области обратного сплайсинга. Однако ПЦР с расходящимися праймерами и секвенирование по Сэнгеру не позволяют выявить полноразмерную последовательность кРНК или различить несколько кРНК, образованных из одной и той же области гена.

Недавно был разработан метод амплификации полноразмерной последовательности кРНК с использованием праймеров, комплементарных области соединения «голова к хвосту», получивший название circRNA-RCA (circRNA-Rolling Circle Amplification) [57]. Произведенное в ходе такой реакции число копий кРНК зависит не только от исходного количества молекул в образце, но и от их длины, что сильно затрудняет нормализацию результатов и их сопоставление для разных кРНК и их сплайс-вариантов. Поэтому с помощью описанного метода варианты сплайсинга кРНК с одинаковой областью соединения «голова к хвосту» могут быть идентифицированы качественно, но не количественно (обобщено в [13, 52]).

Недавно было показано, что цифровая капельная ПЦР может быть успешно использована для количественного определения кРНК. При этом, по сравнению с ОТ-ПЦР, цифровая капельная ПЦР характеризуется большей точностью за счет отсутствия продолжительных инкубаций [58]. Разработаны и другие методы, такие как SplintQuant и NanoString, для точного количественного определения эндогенных кРНК [59, 60].

Золотым стандартом для анализа кРНК считается нозерн-блот-гибридизация, хотя она и требует дополнительной обработки образца РНКазой R и РНКазой H [53]. Однако нозерн-блоттинг не лишен недостатков, таких как потребность в очень большом количестве РНК, а также необходимость использования радиоактивно меченых зондов [7].

ОНЛАЙН БАЗЫ ДАННЫХ ДЛЯ АНАЛИЗА кРНК

Существует несколько специализированных баз данных кРНК для *in silico* анализа, содержащих информацию о тканеспецифической экспрессии, эволюционной консервативности, ассоциации с заболеваниями, взаимодействиях кРНК с РНК-связывающими белками и микроРНК. Большинство таких баз данных содержит информацию о кРНК человека, в некоторых из них отражены также данные о кРНК обезьян, мышей, крыс, кур или дрожжей. Уровни экспрессии различных кРНК в разных клетках или тканях описаны в базах данных TSCD [61], CSCD [62], CIRCpedia [10], circBase [9], circAtlas [8], circMine [63], PanCircBase [64]. Несколько баз данных, таких как CSCD [62], circAtlas [8], circInteractome [65], circNet [66], starBase [67] и circFunBase [68], были разработаны для прогнозирования функции кРНК и их взаимодействия с микроРНК и РНК-связывающими белками. Ряд баз данных, включая circAtlas [8], circInteractome [65], circBank [11] и circRNADb [46], giboCIRC [69], рассматривают трансляционный потенциал кРНК. Все эти базы содержат предсказательные данные о кРНК и нуждаются в экспериментальной проверке.

V. кРНК ПРИ ГИПЕРТРОФИИ МИОКАРДА

В последнее время все больше внимания уделяется изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе ГЛЖ, а также выявлению мишеней для ее лечения. Выявлено несколько перспективных кРНК, которые могут регулировать патологические процессы, связанные с ГЛЖ различного генеза, и претендуют на роль новых диагностических или терапевтических мишеней.

Впервые ассоциацию кРНК с развитием вторичной гипертрофии миокарда показали с помощью RNA-seq в сердце мышей после поперечного сужения аорты при сравнении с контрольными мышами; авторами было выявлено почти 700 deregulированных кРНК [70]. Другие исследователи обнаружили, что кардиоспецифическая кРНК mm9-circ-012559 (circ-HRCR), которая служит эндогенной губкой

для miR-223, подавляет гипертрофию, индуцированную изопротеренолом и поперечным сужением аорты. На модели кардиоспецифических трансгенных мышей было показано, что при сердечной недостаточности miR-223 способствует развитию ГЛЖ, а одна из ее мишеней – репрессор апоптоза с доменом CARD (ARC) – уменьшает степень гипертрофии миокарда. Таким образом, circ-HRCR может ослаблять гипертрофические процессы *in vivo* путем подавления активности miR-223 и усиления действия ARC [71].

Благодаря высокой концентрации в кардиомиоцитах, кРНК circSlc8a1 привлекла внимание исследователей, изучающих гипертрофию миокарда. Известно, что circSlc8a1 служит губкой для miR-133a [72], которая ингибирует гипертрофию миокарда [73]. У мышей нокаун circSlc8a1 уменьшал ГЛЖ, возникающую из-за перегрузки давлением, вызванной поперечным сужением аорты, тогда как экспериментальное увеличение содержания circSlc8a1 в кардиомиоцитах приводило к сердечной недостаточности [72]. Кроме того, в этой работе было показано, что circSlc8a1 регулирует и мишени miR-133a, включая фактор реагирования на сыровотку (Srf), фактор роста соединительной ткани (Ctgf), адренорецептор бета 1 (Adrb1) и аденилатциклазу 6 (Adcy6), а также связанные с ними транскрипционные факторы. Таким образом, в этом исследовании предоставлены убедительные доказательства того, что circSlc8a1 опосредованно ингибирует miR-133a потенциально может быть использовано для лечения гипертрофии миокарда.

Li et al. обнаружили, что кРНК circ-000203 усугубляет ГЛЖ у мышей, получавших ангиотензин-II. Circ-000203, выступая в качестве конкурентной эндогенной РНК, специфически связывает miR-26b-5p и miR-140-3p и, тем самым, блокирует подавление гена-мишени *Gata4* этими двумя микроРНК [74]. Ранее было показано, что повышение экспрессии *GATA4* стимулирует развитие гипертрофии как *in vivo*, так и *in vitro* [75]. Привлекательно предположить, что hsa-circ-0036167 человека, гомолог circ-000203 мыши, играет аналогичную роль у людей, и, следовательно, снижение ее уровня может привести к регрессу гипертрофии миокарда.

Профилирование кРНК в сердце мышей, получавших изопротеренол (одна из моделей гипертрофии миокарда), и контрольных мышей выявило различия в экспрессии 401 кРНК [76]. Анализ путей Gene Ontology и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes показал, что гены-хозяева дифференциально экспрессированных кРНК относятся к путям, вовлеченным в систему кровообращения и сердечно-

сосудистые заболевания. Авторы также показали экспериментально, что одна из кРНК – *wpr1* – может уменьшать гипертрофию миокарда посредством регулирования уровня предсердного натрийуретического фактора ANF и *miR-23a*.

Используя мышинные модели гипертрофии миокарда, вызванной поперечным сужением аорты, а также кардиомиоциты мышей, стимулированные ангиотензином-II для имитации этого патологического процесса, группам исследователей удалось обнаружить, что гипертрофию миокарда регулируют кРНК *circNfix* и *circHIPK3* [77, 78]. В данных моделях гипертрофии отмечали снижение экспрессии *circNfix*; повышение уровня *circNfix* ослабляло вызванную перегрузкой давлением ГЛЖ, регулируя ось *miR-145-5p/ATF3* [77]. Напротив, экспрессия *circHIPK3* была значительно повышена в гипертрофированном сердце [78]. Нокаут *circHIPK3* ингибировал развитие гипертрофии, вызванной поперечным сужением аорты, и улучшал эхокардиографические параметры сердца. Блокирование *circHIPK3* в кардиомиоцитах заметно уменьшало их размер и снижало уровни таких маркеров гипертрофии, как предсердный натрийуретический пептид, мозговой натрийуретический пептид и тяжелая цепь β -миозина. Показано, что в основе механизма *circHIPK3*-опосредованной регуляции гипертрофии лежит связывание кРНК с *miR-185-3p* и последующая модуляция ее мишени, кальций-чувствительного рецептора (CaSR) [78]. Другая кРНК – *circ_0001052*, транскрибируемая с гена *Hipk3*, также оказывала прогипертрофическое действие в стимулированных ангиотензином II кардиомиоцитах [79]. Ее механизм действия заключался в сдерживании подавляющего эффекта *miR-148a-3p* и *miR-124-3p* на *Hipk3*, что способствовало повышению экспрессии гена-хозяина, а также в *circ_0001052*-опосредованном рекрутировании *Srsf1* для стабилизации *Hipk3* [79].

В клеточной модели ангиотензин II-индуцированной ГЛЖ было выявлено повышение экспрессии другой кРНК – *circ-TLR4* – и ее гена-хозяина TLR4 [80], продукт которого, toll-подобный рецептор 4 (TLR4), является важным регулятором воспалительной реакции и сердечной гипертрофии. Нокаут *circ-TLR4* ослаблял ангиотензин II-индуцированную гипертрофию в кардиомиоцитах. Более того, *circ-TLR4* положительно регулировала экспрессию гена TLR4, привлекая ДНК/РНК-связывающий белок FUS для стабилизации мРНК TLR4. В аналогичной клеточной модели ГЛЖ было отмечено повышение экспрессии другой *circ_0018553*, а также ее высокая представленность в экзосомах, полученных из эндотелиальных прогениторных клеток

[81]. Показано, что *circ_0018553* действует как губка для *miR-4731*, которая, в свою очередь, подавляет экспрессию «белка долголетия» сиртуина 2 (*SIRT2*), являющегося одним из основных регуляторов ответа клетки на повреждения ДНК. Таким образом, экзосомальная *circ_0018553*, происходящая из эндотелиальных прогениторных клеток, защищает от вызванной ангиотензином II ГЛЖ путем модуляции сигнального пути *miR-4731/SIRT2*. Другой представитель семейства сиртуинов *SIRT1* также вовлечен в развитие ГЛЖ и также регулируется кРНК. Так, *circ-SIRT1/circ-Sirt1*, транскрибируемая с гена *SIRT1*, ослабляла вызванную ангиотензином II сердечную недостаточность и индуцировала аутофагию в кардиомиоцитах, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, и в кардиомиоцитах H9c2 [82]. Выявлено, что *circ-SIRT1* может повышать экспрессию гена *SIRT1* на посттранскрипционном уровне путем снижения содержания *miR-3681-3p/miR-5195-3p* в клетке и стабилизации белка *SIRT1* путем привлечения убиквитин-специфической пептидазы *USP22* для его деубиквитинирования. Таким образом, установлено, что *circ-SIRT1* сдерживает развитие сердечной недостаточности посредством активации *SIRT1*-зависимой аутофагии.

Одним из актуальных направлений исследований при гипертрофии миокарда стало искусственное создание кРНК, которые можно использовать в терапевтических целях для захвата прогипертрофических микроРНК. Так, была создана *circmiR*, нацеленная на *miR-132* и *miR-212* [83], которая способна стимулировать рост кардиомиоцитов [84]. *CircmiR*, содержащие 12 сайтов связывания микроРНК, оказались наиболее эффективными; при доставке в кардиомиоциты *in vivo* они уменьшали ГЛЖ и сохраняли сердечную функцию в мышинной модели гипертрофии, вызванной поперечным сужением аорты. По сравнению с эндогенными кРНК, *circmiR* имеют преимущества за счет гибкости дизайна, возможности использования в низкой дозировке и длительного периода полураспада. Описанное исследование свидетельствует о потенциале сконструированных кРНК в качестве новых методов лечения гипертрофии миокарда.

VI. кРНК ПРИ ГКМП

ГКМП – самое распространенное наследственное заболевание сердца с частотой встречаемости в общей популяции не менее 1 : 500 [85, 86]. ГКМП определяется как необъяснимая другими гемодинамическими причинами гипертрофия миокарда ЛЖ [87]. У молодых ГКМП преимущественно связана с риском внезапной сердечной смерти, в более позднем возрасте – с прогрессирующей сердечной недостаточностью, фибрилляцией предсердий и эмболическими инсультами. Сложности с ранней диагностикой, связанные с бессимптомным дебютом и наличием сопутствующих заболеваний, способных приводить к развитию вторичной ГЛЖ, а также отсутствовавшее до недавнего времени патогенетическое лечение определяют по-прежнему высокую социальную значимость ГКМП. Заболевание характеризуется плохо предсказуемым клиническим течением: значительная часть больных проживает нормальную или почти нормальную жизнь, тогда как у некоторых, по непонятным пока причинам, развиваются перечисленные выше осложнения. Источником индивидуальных клинических различий при ГКМП очевидно является ее выраженная генетическая гетерогенность. В настоящее время только у половины больных удается обнаружить патогенные варианты (мутации), локализованные в различных генах, кодирующих белки саркомера или другие связанные с ним белки (генотип-положительные больные). Среди генотип-отрицательных больных, тем не менее, встречается значительное количество семейных случаев заболевания, что стимулирует поиск новых генов и новых механизмов наследования. В последние годы складывается представление о том, что часть больных имеет менделевский полигенный тип наследования [88]. Свой вклад в развитие и клиническую картину первичной гипертрофии ЛЖ могут вносить и внешние факторы. Наконец, значительная часть исследований, посвященных раскрытию механизмов клинической гетерогенности ГКМП, лежит в области эпигенетики и оценки роли некодирующих РНК. Сохраняющийся большой пробел в понимании механизмов реализации различных генетических дефектов при формировании фенотипа ГКМП затрудняет своевременную диагностику, прогнозирование течения и разработку персонализированного лечения больных.

Поиск доступных биомаркеров для проведения дифференциального диагноза между первичной и вторичной гипертрофией ЛЖ, а также биомаркеров развития осложнений ГКМП, является актуальной задачей современной медицины. Известные к настоящему моменту

универсальные для всех сердечно-сосудистых заболеваний биохимические маркеры, определяемые в периферической крови, N-концевой фрагмент мозгового натрийуретического пептида и тропонин, хотя и могут иметь прогностическое значение при ГКМП [89], так как свидетельствуют о прогрессирующих структурных изменениях миокарда, но не отражают молекулярные процессы, характерные именно для этого генетически детерминированного заболевания. Молекулы кРНК могут оказаться не только эффективными, но и удобными биомаркерами заболевания, благодаря своей стабильности, а также способности высвобождаться в кровоток и свободно в нем циркулировать. Изменение уровней циркулирующих кРНК при ГКМП, отражающее дифференциальную экспрессию генов и последующий сплайсинг кодируемых ими пре-мРНК в миокарде, может также расширить представления о патологических механизмах заболевания. Однако, это направление только входит в фазу активных исследований.

В одном из первых исследований, посвященных изучению роли кРНК при ГКМП, показано, что уровни *circDNAJC6*, *circMBOAT2* и *circTMEM56* значительно снижены в образцах сыворотки пациентов с ГКМП по сравнению с контрольной группой [90]. Оцениваемые по отдельности или в сочетании, эти кРНК продемонстрировали устойчивую способность отделять пациентов с ГКМП (в том числе в отдельных подгруппах пациентов с обструктивной и необструктивной ГКМП) от здоровых индивидов (AUC от 0,722 до 0,949). Уровни двух кРНК, *circTMEM56* и *circDNAJC6*, характеризовались значимой отрицательной корреляцией с тяжестью обструкции ЛЖ и толщиной межжелудочковой перегородки, и потому могут служить индикаторами тяжести течения заболевания у пациентов с обструктивной ГКМП.

В нескольких работах использовали различные биоинформатические алгоритмы для построения сетей взаимодействий кРНК-микроРНК-мРНК с целью выявления среди кРНК ключевых конкурирующих эндогенных РНК, которые участвуют в развитии первичной ГЛЖ, конкурируя с мРНК за связывание с микроРНК по комплементарным к ней участкам (Таблица 1). Так, в одном из исследований был проведен скрининговый анализ уровней кРНК в плазме больных ГКМП и здоровых индивидов, на основании которого с привлечением открытых наборов данных была построена сеть конкурентных эндогенных РНК, которая включала 3 кРНК: *circ_0036248*, *circ_0043762* и *circ_0071269* [61]. Функциональный анализ показал, что эти кРНК участвуют в модуляции активности канала высвобождения кальция и скольжения мышечных филаментов и потому могут быть ключевыми

Таблица 1. Сети взаимодействий кРНК-микроРНК-мРНК, для которых показано участие в развитии гипертрофии миокарда

Участники сети			Ссылка
кРНК	микроРНК	мРНК	
circ_0036248, circ_0043762, circ_0071269	miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-125a-5p, miR-125b-5p, miR-214-3p, miR-338-3p, miR-512-3p, miR-654-3p, miR-1276	GRID1, NMNAT1, PSMD9, SETDB2	[61]
circ_0079270, circ_0044237	miR-34c-5p, miR-346	HRK, FRMD5, MYH9, SLC9A3R1, KLF4, STK38L, PDGFRB, LDHA, DPYSL4, CSNK1D, RCN1, BCL6, FRMD4A, SEMA4B, OSGIN2, HRASLS, ZNF664, PLA2G15, NFE2L1, EXTL1, PTPRM, PDGFRA, FAM107A, MAP2K1, SLC39A1, SCN2B, CSF1R, KLHL3, PVR, MYADM	[91]

регуляторами, участвующими в патогенезе ГКМП. Еще в одном исследовании были проанализированы открытые наборы данных по уровням кРНК, микроРНК и мРНК при ГКМП, в результате чего была сконструирована аналогичная сеть, ключевыми компонентами которой выступали circ_0079270 и circ_0044237 [91]. Авторам удалось в клеточной модели гипертрофии миокарда валидировать пониженный уровень экспрессии circ_0079270, а также изменения в экспрессии обеих выявленных микроРНК и 18 мРНК. Было также показано, что circ_0079270 образуется в результате обратной

транскрипции и частичного сплайсинга последовательности ДНК гена *ACTB*, соединяющей экзоны 2 и 5 с образованием кольцевой формы. Другой механизм АСТВ-опосредованного развития ГКМП с участием кРНК был предложен в исследовании [92]. Авторами с использованием комплексного биоинформатического анализа было выявлено снижение экспрессии *circFN1* при ГКМП. По данным экспериментов *in vitro*, эта кРНК может конкурентно связываться с *miR-206*, тем самым увеличивая экспрессию ее гена-мишени *ACTB*, что способствует развитию ГКМП.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день молекулы кРНК прочно вошли в число известных РНК-регуляторов транскрипции и трансляции, которые выполняют важные функции в организме. Исследования последних лет свидетельствуют о потенциальной возможности использовать кРНК в качестве диагностических маркеров и терапевтических агентов при различных патологических процессах, в том числе при гипертрофии миокарда, которая лежит в основе распространенного наследственного заболевания сердца – ГКМП. Однако, независимо от метода анализа – экспериментального или биоинформатического, накопленные сведения о роли кРНК при гипертрофии миокарда носят пока несистемный и зачастую противоречивый характер. Это неудивительно, поскольку изучение кРНК при этой патологии находится в своей начальной фазе, а небольшие размеры и гетерогенность выборки, разнородный биологический материал и способы его получения, использование разных алгоритмов и методов обнаружения кРНК создают дополнительные трудности для интерпретации полученных результатов. Однако не вызывает сомнений, что описанные в представленном обзоре исследования закладывают основу для будущих достижений в этой области.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ.

Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sanger, H. L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H. J., & Kleinschmidt, A. K. (1976) Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **73** (11), 3852–3856. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3852>
2. Hsu, M. T., & Coca-Prados, M. (1979). Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells, *Nature*, **280** (5720), 339–340. <https://doi.org/10.1038/280339a0>
3. Cocquerelle, C., Mascrez, B., Héтуin, D., & Bailleul, B. (1993) Mis-splicing yields circular RNA molecules, *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **7** (1), 155–160. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.1.7678559>
4. Capel, B., Swain, A., Nicolis, S., Hacker, A., Walter, M., Koopman, P., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1993) Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis, *Cell*, **73** (5), 1019–1030. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90279-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90279-y)
5. Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S. D., Gregersen, L. H., Munschauer, M., Loewer, A., Ziebold, U., Landthaler, M., Kocks, C., le Noble, F., & Rajewsky, N. (2013) Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency, *Nature*, **495** (7441), 333–338. <https://doi.org/10.1038/nature11928>
6. Verduci, L., Tarcitano, E., Strano, S., Yarden, Y., & Blandino, G. (2021) CircRNAs: Role in human diseases and potential use as biomarkers, *Cell Death & Disease*, **12** (5), 468. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03743-3>
7. Kristensen, L. S., Andersen, M. S., Stagsted, L. V. W., Ebbesen, K. K., Hansen, T. B., & Kjems, J. (2019) The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs, *Nature Reviews. Genetics*, **20** (11), 675–691. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0158-7>
8. Wu, W., Ji, P., & Zhao, F. (2020) CircAtlas: An integrated resource of one million highly accurate circular RNAs from 1070 vertebrate transcriptomes, *Genome Biology*, **21** (1), 101. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02018-y>
9. Glažar, P., Papavasileiou, P., & Rajewsky, N. (2014) circBase: A database for circular RNAs, *RNA (New York, N.Y.)*, **20** (11), 1666–1670. <https://doi.org/10.1261/rna.043687.113>
10. Dong, R., Ma, X.-K., Li, G.-W., & Yang, L. (2018) CIRCpedia v2: An Updated Database for Comprehensive Circular RNA Annotation and Expression Comparison, *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, **16** (4), 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.08.001>
11. Liu, M., Wang, Q., Shen, J., Yang, B. B., & Ding, X. (2019) Circbank: a comprehensive database for circRNA with standard nomenclature, *RNA biology*, **16** (7), 899–905. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1600395>
12. Barrett, S. P., & Salzman, J. (2016) Circular RNAs: Analysis, expression and potential functions, *Development (Cambridge, England)*, **143** (11), 1838–1847. <https://doi.org/10.1242/dev.128074>
13. Szabo, L., & Salzman, J. (2016) Detecting circular RNAs: Bioinformatic and experimental challenges, *Nature Reviews. Genetics*, **17** (11), 679–692. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.114>
14. Ma, J., Du, W. W., Zeng, K., Wu, N., Fang, L., Lyu, J., Yee, A. J., & Yang, B. B. (2021) An antisense circular RNA circSCRIB enhances cancer progression by suppressing parental gene splicing and translation, *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, **29** (9), 2754–2768. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.08.002>

15. Maass, P. G., Glažar, P., Memczak, S., Dittmar, G., Hollfinger, I., Schreyer, L., Sauer, A. V., Toka, O., Aiuti, A., Luft, F. C., & Rajewsky, N. (2017) A map of human circular RNAs in clinically relevant tissues, *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, **95** (11), 1179–1189. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1582-9>
16. Chen, I., Chen, C.-Y., & Chuang, T.-J. (2015) Biogenesis, identification, and function of exonic circular RNAs, *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, **6** (5), 563–579. <https://doi.org/10.1002/wrna.1294>
17. Zhang, X.-O., Wang, H.-B., Zhang, Y., Lu, X., Chen, L.-L., & Yang, L. (2014) Complementary sequence-mediated exon circularization, *Cell*, **159** (1), 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.001>
18. Jeck, W. R., Sorrentino, J. A., Wang, K., Slevin, M. K., Burd, C. E., Liu, J., Marzluff, W. F., & Sharpless, N. E. (2013) Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats, *RNA (New York, N.Y.)*, **19** (2), 141–157. <https://doi.org/10.1261/ma.035667.112>
19. Liang, D., & Wilusz, J. E. (2014) Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production, *Genes & Development*, **28** (20), 2233–2247. <https://doi.org/10.1101/gad.251926.114>
20. Ivanov, A., Memczak, S., Wyler, E., Torti, F., Porath, H. T., Orejuela, M. R., Piechotta, M., Levanon, E. Y., Landthaler, M., Dieterich, C., & Rajewsky, N. (2015) Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals, *Cell Reports*, **10** (2), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.019>
21. Chen, L.-L., & Yang, L. (2015) Regulation of circRNA biogenesis, *RNA Biology*, **12** (4), 381–388. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1020271>
22. Salzman, J., Gawad, C., Wang, P. L., Lacayo, N., & Brown, P. O. (2012) Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types, *PloS One*, **7** (2), e30733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030733>
23. Liang, D., Tatomer, D. C., Luo, Z., Wu, H., Yang, L., Chen, L.-L., Cherry, S., & Wilusz, J. E. (2017) The Output of Protein-Coding Genes Shifts to Circular RNAs When the Pre-mRNA Processing Machinery Is Limiting, *Molecular Cell*, **68** (5), 940–954.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.034>
24. Zhang, Y., Xue, W., Li, X., Zhang, J., Chen, S., Zhang, J.-L., Yang, L., & Chen, L.-L. (2016) The Biogenesis of Nascent Circular RNAs, *Cell Reports*, **15** (3), 611–624. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.058>
25. Barrett, S. P., Wang, P. L., & Salzman, J. (2015) Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor, *ELife*, **4**, e07540. <https://doi.org/10.7554/eLife.07540>
26. Zhang, Y., Zhang, X.-O., Chen, T., Xiang, J.-F., Yin, Q.-F., Xing, Y.-H., Zhu, S., Yang, L., & Chen, L.-L. (2013) Circular intronic long noncoding RNAs, *Molecular Cell*, **51** (6), 792–806. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.017>
27. Zhang, X.-O., Dong, R., Zhang, Y., Zhang, J.-L., Luo, Z., Zhang, J., Chen, L.-L., & Yang, L. (2016) Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs, *Genome Research*, **26** (9), 1277–1287. <https://doi.org/10.1101/gr.202895.115>
28. Huang, C., Liang, D., Tatomer, D. C., & Wilusz, J. E. (2018) A length-dependent evolutionarily conserved pathway controls nuclear export of circular RNAs, *Genes & Development*, **32** (9–10), 639–644. <https://doi.org/10.1101/gad.314856.118>
29. Wang, K., Gao, X.-Q., Wang, T., & Zhou, L.-Y. (2023) The Function and Therapeutic Potential of Circular RNA in Cardiovascular Diseases, *Cardiovascular Drugs and Therapy*, **37** (1), 181–198. <https://doi.org/10.1007/s10557-021-07228-5>

30. Huang, A., Zheng, H., Wu, Z., Chen, M., & Huang, Y. (2020) Circular RNA-protein interactions: Functions, mechanisms, and identification, *Theranostics*, **10** (8), 3503–3517. <https://doi.org/10.7150/thno.42174>
31. Enuka, Y., Lauriola, M., Feldman, M. E., Sas-Chen, A., Ulitsky, I., & Yarden, Y. (2016) Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor, *Nucleic Acids Research*, **44** (3), 1370–1383. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1367>
32. Hansen, T. B., Wiklund, E. D., Bramsen, J. B., Villadsen, S. B., Statham, A. L., Clark, S. J., & Kjems, J. (2011) MiRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA, *The EMBO Journal*, **30** (21), 4414–4422. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.359>
33. Park, O. H., Ha, H., Lee, Y., Boo, S. H., Kwon, D. H., Song, H. K., & Kim, Y. K. (2019) Endoribonucleolytic Cleavage of m6A-Containing RNAs by RNase P/MRP Complex, *Molecular cell*, **74** (3), 494–507.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.034>
34. Jia, R., Xiao, M.-S., Li, Z., Shan, G., & Huang, C. (2019) Defining an evolutionarily conserved role of GW182 in circular RNA degradation, *Cell Discovery*, **5**, 45. <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0113-y>
35. Liu, C.-X., Li, X., Nan, F., Jiang, S., Gao, X., Guo, S.-K., Xue, W., Cui, Y., Dong, K., Ding, H., Qu, B., Zhou, Z., Shen, N., Yang, L., & Chen, L.-L. (2019) Structure and Degradation of Circular RNAs Regulate PKR Activation in Innate Immunity, *Cell*, **177** (4), 865–880.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.046>
36. Dou, Y., Cha, D. J., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Jeppesen, D. K., Weaver, A. M., Prasad, N., Levy, S., Coffey, R. J., Patton, J. G., & Zhang, B. (2016) Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes, *Scientific Reports*, **6**, 37982. <https://doi.org/10.1038/srep37982>
37. Lasda, E., & Parker, R. (2016) Circular RNAs Co-Precipitate with Extracellular Vesicles: A Possible Mechanism for circRNA Clearance, *PLoS One*, **11** (2), e0148407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148407>
38. Preußner, C., Hung, L.-H., Schneider, T., Schreiner, S., Hardt, M., Moebus, A., Santoso, S., & Bindereif, A. (2018) Selective release of circRNAs in platelet-derived extracellular vesicles, *Journal of Extracellular Vesicles*, **7** (1), 1424473. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1424473>
39. Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K., & Kjems, J. (2013) Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges, *Nature*, **495** (7441), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature11993>
40. Thomson, D. W., & Dinger, M. E. (2016) Endogenous microRNA sponges: Evidence and controversy, *Nature Reviews. Genetics*, **17** (5), 272–283. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.20>
41. Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., & Bozzoni, I. (2011) A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA, *Cell*, **147** (2), 358–369. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.028>
42. Conn, V. M., Hugouvieux, V., Nayak, A., Conos, S. A., Capovilla, G., Cildir, G., Jourdain, A., Tergaonkar, V., Schmid, M., Zubieta, C., & Conn, S. J. (2017) A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation, *Nature Plants*, **3**, 17053. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.53>
43. Li, Z., Huang, C., Bao, C., Chen, L., Lin, M., Wang, X., Zhong, G., Yu, B., Hu, W., Dai, L., Zhu, P., Chang, Z., Wu, Q., Zhao, Y., Jia, Y., Xu, P., Liu, H., & Shan, G. (2015) Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus, *Nature Structural & Molecular Biology*, **22** (3), 256–264. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2959>

44. Zhou, W.-Y., Cai, Z.-R., Liu, J., Wang, D.-S., Ju, H.-Q., & Xu, R.-H. (2020) Circular RNA: Metabolism, functions and interactions with proteins, *Molecular Cancer*, **19** (1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01286-3>
45. van Heesch, S., Witte, F., Schneider-Lunitz, V., Schulz, J. F., Adami, E., Faber, A. B., Kirchner, M., Maatz, H., Blachut, S., Sandmann, C.-L., Kanda, M., Worth, C. L., Schafer, S., Calviello, L., Merriott, R., Patone, G., Hummel, O., Wyler, E., Obermayer, B., ... Hubner, N. (2019) The Translational Landscape of the Human Heart, *Cell*, **178** (1), 242–260. e29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.010>
46. Chen, X., Han, P., Zhou, T., Guo, X., Song, X., & Li, Y. (2016) circRNADb: A comprehensive database for human circular RNAs with protein-coding annotations, *Scientific reports*, **6**, 34985. <https://doi.org/10.1038/srep34985>
47. Pamudurti, N. R., Bartok, O., Jens, M., Ashwal-Fluss, R., Stottmeister, C., Ruhe, L., Hanan, M., Wyler, E., Perez-Hernandez, D., Ramberger, E., Shenzis, S., Samson, M., Dittmar, G., Landthaler, M., Chekulaeva, M., Rajewsky, N., & Kadener, S. (2017) Translation of CircRNAs, *Molecular Cell*, **66** (1), 9–21. e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.021>
48. Yang, Y., Fan, X., Mao, M., Song, X., Wu, P., Zhang, Y., Jin, Y., Yang, Y., Chen, L.-L., Wang, Y., Wong, C. C., Xiao, X., & Wang, Z. (2017) Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine, *Cell Research*, **27** (5), 626–641. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.31>
49. Qin, S., Zhang, Q., Xu, Y., Ma, S., Wang, T., Huang, Y., & Ju, S. (2022) m6A-modified circRNAs: Detections, mechanisms, and prospects in cancers, *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, **28** (1), 79. <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00505-5>
50. Prats, A.-C., David, F., Diallo, L. H., Roussel, E., Tatin, F., Garmy-Susini, B., & Lacazette, E. (2020) Circular RNA, the Key for Translation, *International Journal of Molecular Sciences*, **21** (22), 8591. <https://doi.org/10.3390/ijms21228591>
51. Li, S., Teng, S., Xu, J., Su, G., Zhang, Y., Zhao, J., Zhang, S., Wang, H., Qin, W., Lu, Z. J., Guo, Y., Zhu, Q., & Wang, D. (2019) Microarray is an efficient tool for circRNA profiling, *Briefings in Bioinformatics*, **20** (4), 1420–1433. <https://doi.org/10.1093/bib/bby006>
52. Jeck, W. R., & Sharpless, N. E. (2014) Detecting and characterizing circular RNAs, *Nature Biotechnology*, **32** (5), 453–461. <https://doi.org/10.1038/nbt.2890>
53. Pandey, P. R., Rout, P. K., Das, A., Gorospe, M., & Panda, A. C. (2019) RPAD (RNase R treatment, polyadenylation, and poly(A)⁺ RNA depletion) method to isolate highly pure circular RNA, *Methods (San Diego, Calif.)*, **155**, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.10.022>
54. Dobin, A., & Gingeras, T. R. (2015) Mapping RNA-seq Reads with STAR, *Current Protocols in Bioinformatics*, **51**, 11.14.1–11.14.19. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1114s1>
55. Tb, H., Mt, V., Ck, D., & J, K. (2016) Comparison of circular RNA prediction tools, *Nucleic Acids Research*, **44** (6). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1458>
56. Panda, A. C., & Gorospe, M. (2018) Detection and Analysis of Circular RNAs by RT-PCR, *Bio-Protocol*, **8** (6), e2775. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2775>
57. Das, A., Rout, P. K., Gorospe, M., & Panda, A. C. (2019) Rolling Circle cDNA Synthesis Uncovers Circular RNA Splice Variants, *International Journal of Molecular Sciences*, **20** (16), 3988. <https://doi.org/10.3390/ijms20163988>
58. Chen, D.-F., Zhang, L.-J., Tan, K., & Jing, Q. (2018) Application of droplet digital PCR in quantitative detection of the cell-free circulating circRNAs, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **32** (1), 116–123. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1398596>

59. Conn, V., & Conn, S. J. (2019) SplintQuant: A method for accurately quantifying circular RNA transcript abundance without reverse transcription bias, *RNA (New York, N.Y.)*, **25** (9), 1202–1210. <https://doi.org/10.1261/rna.070953.119>
60. Dahl, M., Daugaard, I., Andersen, M. S., Hansen, T. B., Grønbaek, K., Kjems, J., & Kristensen, L. S. (2018) Enzyme-free digital counting of endogenous circular RNA molecules in B-cell malignancies, *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, **98** (12), 1657–1669. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0108-6>
61. Guo, Q., Wang, J., Sun, R., He, Z., Chen, Q., Liu, W., Wu, M., Bao, J., Liu, Z., Wang, J., & Zhang, Y. (2020) Comprehensive Construction of a Circular RNA-Associated Competing Endogenous RNA Network Identified Novel Circular RNAs in Hypertrophic Cardiomyopathy by Integrated Analysis, *Frontiers in Genetics*, **11**, 764. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00764>
62. Xia, S., Feng, J., Chen, K., Ma, Y., Gong, J., Cai, F., Jin, Y., Gao, Y., Xia, L., Chang, H., Wei, L., Han, L., & He, C. (2018) CSCD: a database for cancer-specific circular RNAs, *Nucleic acids research*, **46** (D1), D925–D929. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx863>
63. Zhang, W., Liu, Y., Min, Z., Liang, G., Mo, J., Ju, Z., Zeng, B., Guan, W., Zhang, Y., Chen, J., Zhang, Q., Li, H., Zeng, C., Wei, Y., & Chan, G. C.-F. (2022) circMine: A comprehensive database to integrate, analyze and visualize human disease-related circRNA transcriptome, *Nucleic Acids Research*, **50** (D1), D83–D92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab809>
64. Sinha, T., Mishra, S. S., Singh, S., & Panda, A. C. (2022) PanCircBase: An online resource for the exploration of circular RNAs in pancreatic islets, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**, 942762. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.942762>
65. Dudekula, D. B., Panda, A. C., Grammatikakis, I., De, S., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2016) CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs, *RNA Biology*, **13** (1), 34–42. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1128065>
66. Liu, Y. C., Li, J. R., Sun, C. H., Andrews, E., Chao, R. F., Lin, F. M., Weng, S. L., Hsu, S. D., Huang, C. C., Cheng, C., Liu, C. C., & Huang, H. D. (2016) CircNet: a database of circular RNAs derived from transcriptome sequencing data, *Nucleic acids research*, **44** (D1), D209–D215. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv940>
67. Li, J.-H., Liu, S., Zhou, H., Qu, L.-H., & Yang, J.-H. (2014) starBase v2.0: Decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data, *Nucleic Acids Research*, **42** (Database issue), D92–97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1248>
68. Meng, X., Hu, D., Zhang, P., Chen, Q., & Chen, M. (2019) CircFunBase: A database for functional circular RNAs, *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, **2019**, baz003. <https://doi.org/10.1093/database/baz003>
69. Li, H., Xie, M., Wang, Y., Yang, L., Xie, Z., & Wang, H. (2021) riboCIRC: A comprehensive database of translatable circRNAs, *Genome Biology*, **22** (1), 79. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02300-7>
70. Werfel, S., Nothjunge, S., Schwarzmayr, T., Strom, T.-M., Meitinger, T., & Engelhardt, S. (2016) Characterization of circular RNAs in human, mouse and rat hearts, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **98**, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.07.007>
71. Wang, K., Long, B., Liu, F., Wang, J. X., Liu, C. Y., Zhao, B., Zhou, L. Y., Sun, T., Wang, M., Yu, T., Gong, Y., Liu, J., Dong, Y. H., Li, N., & Li, P. F. (2016) A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-

- 223, *European heart journal*, **37** (33), 2602–2611. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv713>
72. Lim, T. B., Aliwarga, E., Luu, T. D. A., Li, Y. P., Ng, S. L., Annadoray, L., Sian, S., Ackers-Johnson, M. A., & Foo, R. S.-Y. (2019) Targeting the highly abundant circular RNA circSlc8a1 in cardiomyocytes attenuates pressure overload induced hypertrophy, *Cardiovascular Research*, **115** (14), 1998–2007. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz130>
73. Carè, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.-L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N. D., Elia, L., Latronico, M. V. G., Høydal, M., Autore, C., Russo, M. A., Dorn, G. W., Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K. L., ... Condorelli, G. (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy, *Nature Medicine*, **13** (5), 613–618. <https://doi.org/10.1038/nm1582>
74. Li, H., Xu, J.-D., Fang, X.-H., Zhu, J.-N., Yang, J., Pan, R., Yuan, S.-J., Zeng, N., Yang, Z.-Z., Yang, H., Wang, X.-P., Duan, J.-Z., Wang, S., Luo, J.-F., Wu, S.-L., & Shan, Z.-X. (2020) Circular RNA circRNA_000203 aggravates cardiac hypertrophy via suppressing miR-26b-5p and miR-140-3p binding to Gata4, *Cardiovascular Research*, **116** (7), 1323–1334. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz215>
75. Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkelä, R., & Ruskoaho, H. (2004) GATA transcription factors in the developing and adult heart, *Cardiovascular Research*, **63** (2), 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.03.025>
76. Yang, M.-H., Wang, H., Han, S.-N., Jia, X., Zhang, S., Dai, F.-F., Zhou, M.-J., Yin, Z., Wang, T.-Q., Zang, M.-X., & Xue, L.-X. (2020) Circular RNA expression in isoproterenol hydrochloride-induced cardiac hypertrophy, *Aging*, **12** (3), 2530–2544. <https://doi.org/10.18632/aging.102761>
77. Pan, J., Xu, Z., Guo, G., Xu, C., Song, Z., Li, K., Zhong, K., & Wang, D. (2021) Circ_nuclear factor I X (circNfix) attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy via regulating miR-145-5p/ATF3 axis, *Bioengineered*, **12** (1), 5373–5385. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1960462>
78. Xu, X., Wang, J., & Wang, X. (2020) Silencing of circHIPK3 Inhibits Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Dysfunction by Sponging miR-185-3p, *Drug Design, Development and Therapy*, **14**, 5699–5710. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S245199>
79. Yang, M., Wang, W., Wang, L., & Li, Y. (2023) Circ_0001052 promotes cardiac hypertrophy via elevating Hipk3, *Aging*, **15** (4), 1025–1038. <https://doi.org/10.18632/aging.204521>
80. Li, C., Wang, J., Feng, J., Zhou, J., Hou, L., Gao, Y., & Cheng, Z. (2022) Circ-TLR4 promotes cardiac hypertrophy through recruiting FUS to stabilize TLR4 mRNA, *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology: An International Journal of Arrhythmias and Pacing*, **65** (1), 153–163. <https://doi.org/10.1007/s10840-022-01209-w>
81. Zuo, H., Li, L., Wang, X., Chen, S., Liao, Z., Wei, S., Ruan, H., Li, T., & Chen, J. (2023) A novel circ_0018553 protects against angiotensin-induced cardiac hypertrophy in cardiomyocytes by modulating the miR-4731/SIRT2 signaling pathway, *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, **46** (2), 421–436. <https://doi.org/10.1038/s41440-022-01111-y>
82. Wang, W., Wang, L., Yang, M., Wu, C., Lan, R., Wang, W., & Li, Y. (2021) Circ-SIRT1 inhibits cardiac hypertrophy via activating SIRT1 to promote autophagy, *Cell Death & Disease*, **12** (11), 1069. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04059-y>
83. Lavenniah, A., Luu, T. D. A., Li, Y. P., Lim, T. B., Jiang, J., Ackers-Johnson, M., & Foo, R. S. (2020) Engineered Circular RNA Sponges Act as miRNA Inhibitors to Attenuate

- Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **28** (6), 1506–1517. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.04.006>
84. Ucar, A., Gupta, S. K., Fiedler, J., Erikci, E., Kardasinski, M., Batkai, S., Dangwal, S., Kumarswamy, R., Bang, C., Holzmann, A., Remke, J., Caprio, M., Jentzsch, C., Engelhardt, S., Geisendorf, S., Glas, C., Hofmann, T. G., Nessler, M., Richter, K., ... Thum, T. (2012) The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy, *Nature Communications*, **3**, 1078. <https://doi.org/10.1038/ncomms2090>
85. Semsarian, C., Ingles, J., Maron, M. S., & Maron, B. J. (2015) New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy, *Journal of the American College of Cardiology*, **65** (12), 1249–1254. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.01.019>
86. Maron, B. J., Gardin, J. M., Flack, J. M., Gidding, S. S., Kurosaki, T. T., & Bild, D. E. (1995) Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults, *Circulation*, **92** (4), 785–789. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.4.785>
87. Authors/Task Force members, Elliott, P. M., Anastakis, A., Borger, M. A., Borggrefe, M., Cecchi, F., Charon, P., Hagege, A. A., Lafont, A., Limongelli, G., Mahrholdt, H., McKenna, W. J., Mogensen, J., Nihoyannopoulos, P., Nistri, S., Pieper, P. G., Pieske, B., Rapezzi, C., Rutten, F. H., ... Watkins, H. (2014) 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: The Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC), *European Heart Journal*, **35** (39), 2733–2779. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu284>
88. Harper, A. R., Goel, A., Grace, C., Thomson, K. L., Petersen, S. E., Xu, X., Waring, A., Ormondroyd, E., Kramer, C. M., Ho, C. Y., Neubauer, S., HCMR Investigators, Tadros, R., Ware, J. S., Bezzina, C. R., Farrall, M., & Watkins, H. (2021) Common genetic variants and modifiable risk factors underpin hypertrophic cardiomyopathy susceptibility and expressivity, *Nature Genetics*, **53** (2), 135–142. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00764-0>
89. Jansen, M., Algül, S., Bosman, L. P., Michels, M., van der Velden, J., de Boer, R. A., van Tintelen, J. P., Asselbergs, F. W., & Baas, A. F. (2022) Blood-based biomarkers for the prediction of hypertrophic cardiomyopathy prognosis: A systematic review and meta-analysis, *ESC Heart Failure*, **9** (5), 3418–3434. <https://doi.org/10.1002/ehf2.14073>
90. Sonnenschein, K., Wilczek, A. L., de Gonzalo-Calvo, D., Pfanne, A., Derda, A. A., Zwadlo, C., Bavendiek, U., Bauersachs, J., Fiedler, J., & Thum, T. (2019) Serum circular RNAs act as blood-based biomarkers for hypertrophic obstructive cardiomyopathy, *Scientific Reports*, **9** (1), 20350. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56617-2>
91. Gong, K., Yang, K., Xie, T., Luo, Y., Guo, H., Tan, Z., Chen, J., Wu, Q., Gong, Y., Wei, L., Luo, J., Yao, Y., Yang, Y., & Xie, L. (2023) Identification of circRNA-miRNA-mRNA regulatory network and its role in cardiac hypertrophy, *PloS One*, **18** (3), e0279638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279638>
92. Feng, W., & Han, S. (2022) LncRNA ADAMTS9-AS1/circFN1 Competitively Binds to miR-206 to Elevate the Expression of ACTB, Thus Inducing Hypertrophic Cardiomyopathy, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2022**, 1450610. <https://doi.org/10.1155/2022/1450610>