

RNA und vaskuläre Biologie

Lange nicht-codierende RNAs in der Angiogenese

RALF P. BRANDES, MATTHIAS S. LEISEGANG
 INSTITUT FÜR KARDIOVASKULÄRE PHYSIOLOGIE, FACHBEREICH MEDIZIN,
 UNIVERSITÄT FRANKFURT A. M.

More than 97 percent of the transcribed RNA in mammalian cells is not coding for proteins. Among these are micro RNAs (miRs), transfer RNAs (tRNA) as well as ribosomal RNAs (rRNA) but also long non-coding RNAs (lncRNAs). This RNA class is only defined by its sequence length of more than 200 nucleotides and its lack of protein coding potential. The human genome encodes for more than 18.000 lncRNAs which contribute to gene expression control. Here, we discuss the function of these lncRNAs and how they modulate the angiogenic process of vessel growth.

DOI: 10.1007/s12268-021-1546-z
 © Die Autoren 2021

■ Spätestens seit der Corona-Pandemie ist der Begriff Ribonukleinsäure (RNA) wohl fast jedem geläufig, wobei die Komplexität des RNA-Kosmos immer wieder überrascht. Die wohl bekannteste Funktion besitzt RNA in der Proteinbiosynthese. Messenger RNA enthält die genetische Information proteincodierender Gene und wird mithilfe von rRNAs und tRNAs in Proteine übersetzt. Deutlich größer als die Zahl der unterschiedlichen RNAs, die an diesem Prozess beteiligt sind,

ist die Gruppe der nicht-codierenden RNAs mit anderen, größtenteils unklaren Funktionen.

Mehr als evolutionärer Müll: nicht-codierende RNAs

Seit langem ist es bekannt, dass nur ca. drei Prozent der menschlichen transkribierten DNA für Proteine codieren. Der Großteil der DNA galt daher als evolutionärer Müll („Junk-DNA“) – besonders, da mit zunehmendem

evolutionären Alter die Menge an „Junk-DNA“ zunimmt. Heute ist bekannt, dass diese Bereiche der DNA jedoch vielfältige biologische Funktionen besitzen und u. a. der Ursprung vieler unterschiedlicher RNA-Moleküle sind, die nicht direkt an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. So erzeugen *architectural* RNAs (arcRNAs) nukleäre Körperchen wie nukleare Paraspeckles.

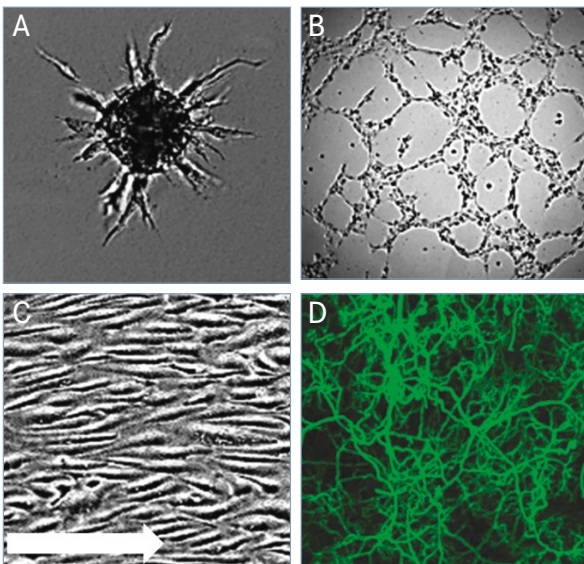
Kurze RNAs werden therapeutisch eingesetzt

Die Gruppe der micro RNAs (miRs) kann proteincodierende RNAs destabilisieren und so die Proteinexpression hemmen. Dieser Befund, auch bekannt als RNA-Interferenz, ist so bedeutsam, dass er 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie gewürdigt wurde. Die große Bedeutung von miRs leitet sich auch von der Tatsache ab, dass die geringe Länge dieser RNA-Moleküle (gewöhnlich bis 22 Nucleotide) bioinformatische Bindungsvorhersagen ermöglicht. Somit ist es möglich, komplexe genregulatorische Netzwerke in Zellen vorherzusagen und siRNA-Moleküle zu synthetisieren, um explorativ, diagnostisch oder sogar therapeutisch in die Genexpression einzugreifen [1].

Die Funktion von lncRNA ist weitgehend unklar

Den miRs steht die Gruppe der langen nicht-codierenden RNAs (lncRNAs) gegenüber, die im Wesentlichen über ihre Länge von mehr als 200 Nucleotiden definiert sind. Auch wenn das humane Genom für mehr als 18.000 lncRNAs codiert, steht die Forschung bei deren funktioneller Aufklärung erst in den Anfängen. Dieses ist mehreren Tatsachen geschuldet:

- Anders als bei miRs erlaubt die große Länge der lncRNAs keine einfache Sequenz-Wirkungszuordnung; erschwerend kommt hier die vielfältige Strukturkomplexität hinzu.
- Ebenfalls anders als bei miRs ist die weit überwiegende Zahl der lncRNAs nicht evolutionär konserviert, was tierexperimentelle Arbeiten erschwert [2];



◀ **Abb. 1:** Angiogene Funktion von Endothelzellen. **A,** Auswachsen von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) aus einem Spheroid in eine Gelmatrix. **B,** Bildung eines Netzwerks von HUVEC, nachdem sie auf Matrixgel ausgesät wurden. **C,** Ausrichtung von kultivierten HUVEC entlang der Medienflussrichtung in einem Schubspannungsversuch. **D,** Lichtblattmikroskopie: Angiogenese in der Maus in ein Gelpräparat. Vor Entnahme wurde FITC-Lectin injiziert, um das Endothel zu markieren.

- Die große Zahl an lncRNAs behindert eine konzertierte Erforschung;
- Wahrscheinlich werden viele lncRNAs nur schwache modulatorische Funktionen haben, sodass diese schwer zu identifizieren sind;
- Viele lncRNAs sind deutlich geringer exprimiert als andere (nicht-codierende) RNAs.

XIST ist eine lncRNA, die die X-Chromosom-Inaktivierung vermittelt

In der Tat gibt es nur wenige lncRNAs deren funktionelle Bedeutung zweifelsfrei geklärt ist. Das Paradebeispiel ist hier die lncRNA XIST, die die X-Chromosom-Inaktivierung vermittelt. XIST stellt sicher, dass pro Zelle nur ein X-Chromosom aktiv ist, um die höhere Menge an X-chromosomalen Genen zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht auszugleichen. XIST erreicht dies, indem es repressive Chromatin-Remodelling-Komplexe an das zu inaktivierende X-Chromosom rekrutiert. Die folgende Heterochromatinbildung ist auch lichtmikroskopisch in Form des Barr-Körperchens zu erkennen. Ausgehend von diesem Beispiel kann postuliert werden, dass lncRNAs epigenetische Aspekte der Genexpressionskontrolle vermitteln.

Die Erforschung von lncRNAs macht technisch große Probleme

Die große Anzahl an möglichen Kontrollmechanismen, die große Diversität der lncRNAs und deren große Länge stellen jedoch die gegenwärtige Forschung vor enorme Herausforderungen. So ist es derzeit nicht möglich, zuverlässig die Sekundärstrukturen von lncRNAs vorherzusagen – die große Länge bietet zu viele Möglichkeiten. Die Computeralgorithmen, die eine Proteininteraktion und sogar die Interaktion von lncRNAs mit anderen

RNAs oder DNA-Sequenzen vorhersagen, besitzen allesamt einen geringen prädiktiven Wert und so müssen alle Vorhersagen im „Wetlab“ validiert werden. Was lncRNA für die medizinische Forschung attraktiv macht, ist ihre gewebespezifische Expression, die mit der Hoffnung verknüpft werden kann, hier neue pharmakologische Zielstrukturen zu identifizieren, deren Beeinflussung zu einer hohen Wirksamkeit bei geringen Nebenwirkungen führt.

Angiogenese: Ein physiologischer Prozess mit medizinischer Bedeutung

Als Angiogenese wird die Aussprossung von neuen aus bestehenden Blutgefäßen bezeichnet (**Abb. 1**). Der Prozess ist u. a. wichtig für die Wundheilung, für die Gefäßbildung in der Gebärmutter-schleimhaut aber auch bei einer Vielzahl von Erkrankungen. So kommt es bei der feuchten Makuladegeneration zu Angiogenese in der Netzhaut, die zu Sehstörungen führt. Auch sind Tumoren von Angiogenese abhängig: Sie können nur wachsen, wenn sie ausreichend mit Blut versorgt werden und somit ist eine „anti-angiogene Therapie“ heute ein Grundpfeiler vieler Krebstherapien. Nicht nur ein „zu viel“, sondern auch ein „zu wenig“ an Angiogenese ist klinisch bedeutsam. Im Rahmen von Alterung und auch bei der Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus) kommt es zum Verlust von kleinen Blutgefäßen. Folge sind Durchblutungsstörungen in der Mikrozirkulation. Klinisch kann sich dieses in Funktionsstörungen des Herzens und des vegetativen Nervensystems sowie einigen Formen der Demenz äußern [3].

Epigenetische Aspekte der Angiogenese

Die epigenetische Regulation der Genexpression, d. h. die Regulie-

rung der Genaktivität durch Veränderungen des Chromatins, der DNA oder regulierender Transkriptionsfaktoren, hat im Wesentlichen eine stabilisierende Funktion. Zellen in Gewebeverbänden müssen koordiniert reagieren und dürfen nicht zwischen Aktivitätszuständen, wie z. B. Proliferation und Differenzierung, hin und her springen. Epigenetische Prozesse schärfen die Genexpression und koordinieren die Antwort komplexer Gewebe auf sich ändernde Einflüsse ohne die DNA-Sequenz an sich zu verändern. Für die Angiogenese bedeutet dies, dass z. B. bei Sauerstoffmangel ein bis dahin ruhendes Gefäßsystem „reprogrammiert“ werden muss, um die Endothelzellen (die Zellen der Gefäßinnenhaut) zu Wachstum und Aussprossung zu befähigen, damit neue Blutgefä-

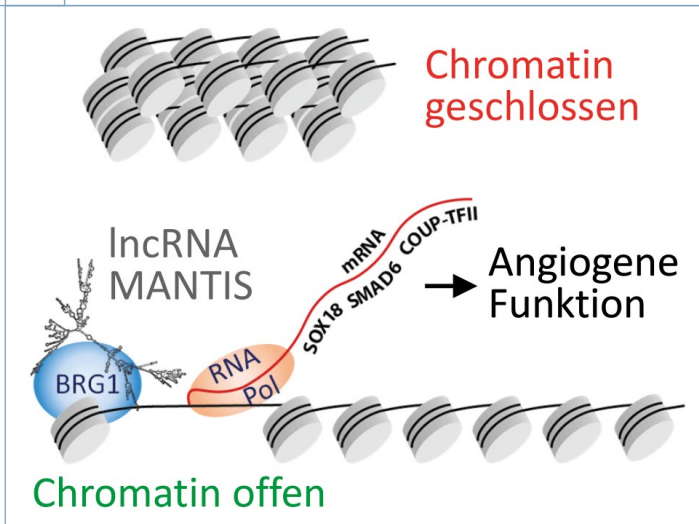
ße entstehen können. Epigenetische Reprogrammierung bedeutet in diesem Zusammenhang u. a. eine Änderung des lokalen Chromatinstatus, d. h. wie dicht die DNA um Histone gewickelt ist, da eine lokale dichte Packung die Genexpression hemmt. Die DNA-Histon-Interaktion wird dabei vornehmlich durch chemische Modifikation von Histaminosäuren reguliert.

lncRNAs regulieren die Angiogenese

Da der Prozess der Angiogenese mit einer erheblichen Funktionsänderung im Blutgefäß einhergeht, ist es nicht überraschend, dass epigenetische Aspekte eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der Angiogenese spielen [3]. Dazu kommt noch, dass Epigenetik Umweltfaktoren in das zelluläre Antwortprogramm integ-

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



◀ **Abb. 2:** IncRNA MANTIS ermöglicht die angiogene Funktion von Endothelzellen. Ohne MANTIS liegt das Chromatin von angiogenen Genen im geschlossenen Zustand vor (oben). Genexpression findet nicht statt. In Anwesenheit von MANTIS wird der BRG1-Chromatin-Remodellierung-Komplex rekrutiert, das Chromatin wird geöffnet (unten). Die Folge ist, dass die RNA-Polymerase II rekrutiert werden kann und angiogene Gene transkribiert.

Schubspannung heraufreguliert wird. Über eine Aktivierung des BRG1-Chromatin-Remodellierungskomplex schaltet MANTIS in Endothelzellen das Programm an,

Literatur

- [1] Wang F, Zuroski T, Watts JK (2020) RNA therapeutics on the rise. *Nat Rev Drug Discov* 19: 441–442
- [2] Lucas T, Bonauer A, Dimmeler S (2018) RNA therapeutics in cardiovascular disease. *Circ Res* 123: 205–220
- [3] Hernández-Romero IA, Guerra-Calderas L, Salgado-Albarrán M et al. (2019) The regulatory roles of non-coding RNAs in angiogenesis and neovascularization from an epigenetic perspective. *Front Oncol* 9: 1091
- [4] Thomas AA, Feng B, Chakrabarti S (2017) ANRIL: a regulator of VEGF in diabetic retinopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 58: 470–480
- [5] Neumann P, Jaé N, Knau A et al. (2018) The lncRNA GATA6-AS epigenetically regulates endothelial gene expression via interaction with LOXL2. *Nat Commun* 9: 237
- [6] Leisegang MS, Fork C, Jospovic I et al. (2017) Long non-coding RNA MANTIS facilitates endothelial angiogenic function. *Circulation* 136: 65–79
- [7] Leisegang MS, Bibli SI, Günther S et al. (2019) Pleiotropic effects of laminar flow and statins depend on the Krüppel-like factor-induced lncRNA MANTIS. *Eur Heart J* 4: 2523–2533

riert. Hypoxie, Nährstoffmangel und Entzündung sind Aspekte, die nicht nur die Angiogenese stimulieren, sondern auch ganz erhebliche epigenetische Zustandsänderungen induzieren. Während für eine relativ große Zahl an miRs eine Funktion in der Angiogenese gezeigt wurde, sind bisher nur wenige funktionell-bedeutsame lncRNAs beschrieben. In Hinblick auf einen direkten epigenetischen Effekt sind vor allem die folgenden Beispiele interessant:

- Die lncRNA ANRIL fördert dabei Angiogenese u. a. in Diabetesmodellen, indem sie die epigenetischen Modifikatoren EZH2 und p300 an den Promoter des Gens *vascular endothelial growth factor* (VEGF) rekrutiert [4]. Da VEGF der wichtigste endotheliale Wachstumsfaktor ist, hat eine Verstärkung der VEGF-Produktion starke pro-angiogene Effekte.
- Ein anderes Beispiel ist GATA6-AS. Diese lncRNA hemmt in Endothelzellen den epigenetischen Regulator LOXL2, der die Dreifachmethylierung an Lysin 4 von Histon 3 reduziert, die ihrerseits die Genexpression fördert. Herabregulation von GATA6-AS reduzierte die Expression von Genen der mesenchymalen Transdifferenzierung und förderte die Gefäßneubildung. Somit wirkt GATA6-AS als eine Art Schalter zwischen dem fibroblastenähnlichen Zustand proliferierender Endothelzellen und dem angiogenen Phänotyp [5].

lncRNA MANTIS stabilisiert den endothelialen Phänotyp

Der Blutfluss ist ein wichtiger physiologischer Stimulus für Endothelzellen, der einen starken Einfluss auf die Genexpression besitzt. Somit wird auch die Expression von endothelialen lncRNAs durch Schubspannung, die Kraft, die der Blutfluss erzeugt, reguliert. Besonders interessant scheint dabei die lncRNA MANTIS zu sein, die durch

das zur endothelialen Phänotypausprägung führt (Abb. 2, [6]). Somit erzeugt der Verlust von MANTIS eine Reduktion der Angiogenese und einen eher pro-entzündlichen Phänotyp [7]. Interessanterweise führen Cholesterinsenker, die einen protektiven Effekt im Herz-Kreislauf-System besitzen, ebenfalls zur Heraufregulation von MANTIS, was sogar an Patientenproben nachweisbar war. Somit gibt es hier einen ersten Hinweis, dass eine lncRNA therapeutisch genutzt werden kann, um pro-angiogene Effekte zu vermitteln.

lncRNA: Wir stehen erst am Anfang

Es ist mittlerweile klar, dass lncRNAs eine große Gruppe von Molekülen mit erheblichem therapeutischen Potenzial sind. Die Erforschung und die medizinische Nutzung werden jedoch durch die Tatsache erschwert, dass die spezifische Beeinflussung der lncRNA-Expression *in vivo* bisher nur schlecht gelingt. Ein großes therapeutisches Potenzial steckt in der zellspezifischen Expression der lncRNA, da hierdurch Nebenwirkungen reduziert werden können. ■

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. med. Ralf P. Brandes
 Universität Frankfurt a.M.
 Institut für Kardiovaskuläre Physiologie
 Fachbereich Medizin der Goethe-Universität
 Theodor-Stern Kai 7
 D-60590 Frankfurt a. M.
brandes@vrc.uni-frankfurt.de

AUTOREN



Ralf P. Brandes

Medizinstudium an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) und der Emory University in Atlanta, GA, USA. Promotion und Arzt im Praktikum in der Kardiologie der MHH. 1997 Stipendium der Adumed-Stiftung, Universität Frankfurt a. M. Seit 2008 Leiter des Instituts für Kardiovaskuläre Physiologie an der Universität Frankfurt a. M.



Matthias S. Leisegang

Biologiestudium an der Universität Frankfurt a. M. mit anschließender Promotion zu Ribonukleinkomplexen am Fachbereich Biologie. Seit 2012 Postdoc am Institut für Kardiovaskuläre Physiologie des Fachbereich Medizin der Universität Frankfurt a. M. Leiter der Arbeitsgruppe Epigenetik und lncRNAs.