

# MICRORNA-625-5P AS A NOVEL CANDIDATE MODULATOR OF AMPK PATHWAY IN STATIN-TREATED INDIVIDUALS WITHOUT CORONARY ARTERY DISEASE

*KORONER ARTER HASTALIĞI OLMAYAN VE STATİN İLE TEDAVİ EDİLEN BİREYLERDE AMPK YOLAĞINDA YENİ BİR ADAY MODÜLATÖR OLARAK MİCRORNA-625-5P*

**Neslihan Çoban<sup>1\*</sup>, Dilek Pirim<sup>2</sup>, Aycan Fahri Erkan<sup>3</sup>, Filiz Güçlü-Geyik<sup>1</sup>, Berkay Ekici<sup>3</sup>, Nihan Erginel-Ünaltuna<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Genetik Anabilim Dalı, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Fakültesi, Muş Arparslan Üniversitesi, Muş, Türkiye

<sup>3</sup> Kardiyoloji Bölümü, Tıp Fakültesi, Ufuk Üniversitesi, Ankara, Türkiye.

**Sorumlu Yazar :** Neslihan Çoban

**Yazışma adresi :** İstanbul Üniversitesi,

Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,

Genetik Anabilim Dalı, Vakıf Gureba Cad,

34080 Şehremini, İstanbul, Türkiye

**E-mail adres :** neslic@istanbul.edu.tr

## ABSTRACT

**Aim:** AMP-activated protein kinase (AMPK) is a signal molecule that phosphorylates and inactivates 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, the key enzyme controlling cholesterol biosynthesis. We aimed to test whether AMPK signaling pathway is effective in human macrophages which play crucial role in atherosclerosis. In addition, to identify novel modulators of AMPK pathway while exploring the effect of statins on plasma microRNA (miRNA) profile of individuals without coronary artery disease (CAD).

**Method:** We measured the expressions of selected genes involved in AMPK pathway in THP-1 macrophages treated with simvastatin to assess dependence of their expression on cholesterol level. The Agilent's miRNA Microarray analyses were performed to compare plasma miRNA profile of individuals ( $\leq 30\%$  coronary stenosis) treated with and without statin. MiRDB target prediction tool was utilized to identify miRNA target genes involved in AMPK pathway for differently expressed miRNAs. Expressions of target genes were analyzed by using real-time PCR.

**Results:** Significantly decreased expression of 5 miRNAs (miR-625-5p, miR-550a-3-5p, miR-550b-2-5p, miR-550a-5p, miR-let-7d-5p) were observed in individuals receiving statins compared to non-statin group (fold change  $> 1.5$ ,  $p < 0.05$ ). In addition, simvastatin increased the expression of *AMPK  $\alpha 1$* , *AMPK  $\alpha 2$* , *AMPK  $\beta 1$* , *AMPK  $\beta 2$*  and *SREBF2* in THP-1 macrophages. Using miRDB target prediction tool, we identified *AMPK  $\alpha 1$*  is a strong candidate (target score=95) for miR-625-5p.

**Conclusion:** Our results suggests that statin may downregulate the expression of miR-625-5p and induce *AMPK $\alpha 1$*  expression which in turn may activates cholesterol syntesis pathway. Apoptosis-associated miR-625 may be used as a novel biomarker for effectiveness of statins therapy in patients with atherosclerosis.

**Key words:** AMPK, miR-625-5p, atherosclerosis, statin, cholesterol.

## ÖZET

**Amaç:** AMP-aktive protein kinaz (AMPK) 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A'yı fosforilleyen ve aynı zamanda kolesterol biyosentezinin kontrolünde rol alan bir redüktazdır. Çalışmamızda, AMPK sinyal yolunun aterosklerozdaki rolünü ve insan makrofaj hücrelerinde etkili olup olmadığını test etmeyi amaçladık. Bu amaçla, koroner arter hastalığı (KAH) olmayan bireylerin plazma microRNA (miRNA) profillerinde statin varlığında ekspresyon değişimlerini göstermek ve AMPK yolunun yeni modülatörlerini tanımlamayı hedefledik.

**Yöntemler:** Kolesterol düzeyine bağlı ekspresyon değişimini değerlendirmek için simvastatin ile uyarılan THP-1 makrofajlarında, AMPK yoluna katılan seçilmiş genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler belirlendi. Agilent'in miRNA Mikroarray platformu, koroner anjiyografi sonucunda koroner damarlarındaki tıkanıklık oranı belirlenen statin kullanan ve kullanmayan bireylerin ( $\leq 30$  koroner darlık) plazma miRNA profiline karşılaştırmak için kullanıldı. MiRDB veritabanı, farklı ekprese olan miRNA'ların AMPK sinyal yolunda rol oynayan hedef genlerini belirlemek için kullanıldı. Hedef genlerin ekspresyon değişimleri real-time PCR kullanılarak analiz edildi.

**Bulgular:** Statin ile tedavi olan bireylerde, 5 miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı saptandı (miR-625-5p, miR-550a-3-5p, miR-550b-2-5p, miR-550a-5p, miR-let-7d-5p) (kat değişikliği  $> 1.5$ ,  $p < 0.05$ ). Buna ek olarak, simvastatinin THP-1 makrofajlarında *AMPK  $\alpha 1$* , *AMPK  $\alpha 2$* , *AMPK  $\beta 1$* , *AMPK  $\beta 2$*  ve *SREBF2* ekspresyonlarının artışına neden olduğu gözlemlendi. MiRDB kullanılarak, *AMPK  $\alpha 1$* , 'nin miR-625-5p için güçlü bir aday hedef olduğu gösterildi (Hedef Skor =95) .

**Sonuç:** Elde ettiğimiz sonuçlar göre, statinin miR-625-5p ekspresyonunu azaltması *AMPK  $\alpha 1$* 'in indüklenmesi yolu ile kolesterol mekanizmalarının sentez yolunu aktive edebilir. Apoptoz ile ilişkili miR-625, ateroskleroz hastalarında statinlerin tedavi etkinliği için yeni bir belirteç olarak da kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** AMPK, miR-625-5p, ateroskleroz, statin, kolesterol.

## 1. Genel Bilgiler:

microRNA (miRNA) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan tek zincirli RNA molekülleridir. Bunlar, protein sentezi esnasında mRNA degradasyonu veya translasyonel inhibisyon ile mRNA'ların 3'-translasyon yapılmayan dizileri üzerinden gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenleyicileridir. İnsanlarda, yaklaşık 700 miRNA klonlanıp dizilenmiştir. Ancak, insan genomundaki genlerin %30'unun düzenleyicisi olarak binlerce miRNA olduğu tahmin edilmektedir (Haver VG, 2010). Pek çok miRNA, çeşitli fizyolojik fonksiyonların ve gelişimin regülasyonunda rol aldıklarından doku-spesifik olarak eksprese olmaktadır. Ayrıca, miRNA'lar kanser, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok patolojik olaylar ile de ilişkilendirilmiştir (Fazi F, 2008).

DeneySEL hayvan çalışmalarında, kalp gelişimi ve miyokard infarktüsün (MI) dahil olduğu bazı kardiyovasküler hastalıklarda kas- ve kalp-spesifik miRNA'lardan miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-208'in rolleri olduğu gösterilmiştir (Yang B, 2007, van Rooij E, 2008, Yin C, 2008, Roy S, 2009). Post-mortem infaktli kalp dokularında miR-208'in up-regüle, miR-1 ve miR-133a'nın down-regüle olduğu belirlenmiştir (Boštjančič E, 2010). Ayrıca aortik, karotid ve femoral arterlerdeki aterosklerotik plaklarda yapılmış bir başka çalışmada 866 miRNA içerisinden miR-21, miR-34a, miR-146a, miR-146b, ve miR-210'un up-regüle oldukları bulunmuştur (Raitoharju E, 2011).

Ateroskleroz, çeşitli tipte hücreleri içeren immün sistemin ve anjiogenetik faktörlerinde dahil olduğu kompleks bir hastalık olduğundan plak formasyonunun gelişiminin her aşamasında regülasyondan sorumlu çeşitli miRNA'ların rol aldığı bilinmektedir (Haver VG, 2010). Gelecekte, miRNA temelli inhibisyon ile tedavilerin mümkün olabileceği öngörülmektedir (Nourae N ve Mowla SJ, 2015)

Yakın zamanda yapılan çalışmalara göre, serumdan izole edilen miRNA'ların ekspresyon analizlerinde pre-aterosklerotik ve aterosklerotik bireylerde farklı eksprese olan miRNA'lar belirlenmiştir. Jiang ve arkadaşları, miR-21, miR-122, miR-130a ve miR-211'de anlamlı derecede

artış olurken, miR-92a, miR-126 ve miR-122'nin azaldığını belirlemişlerdir (Jiang Y, 2014). Ayrıca miR-21'in serumdaki bazı parametreler ile pozitif ve negatif korelasyonunda gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada ise, plazma miR-21-5p ve miR-361-5p'nin akut MI hastalarında anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, miR-519e-5p'nin serumdaki ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. İlginç olarak, miR-519e-5p'nin serumdaki ekspresyon düzeyi ve kardiyak troponin I konsantrasyonu korele bulunmuştur (Wang F, 2014). ApoE<sup>-/-</sup> farelerinde, serumdaki miRNA'lar için microarray analizi yapılmıştır. miR-34a, miR-21, miR-23a, miR-130a ve miR-1066'nin bu farelerde farklı ekspresyonu gözlenmiştir. Daha sonra koroner arter hastalığı (KAH) olan bireylerin ve sağlıklı kontrollerin plazmalarında bahsedilen miRNA'lar kontrol edilmiş ve KAH'larda anlamlı derecede artış olduğu gözlenmiştir (Han H, 2015). Bu sonuçlar, serumdaki miRNA'ların KAH'ın gelişim ve ilerleyişinde ciddi bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Ateroskleroz tedavisinde kullanılan statinler, 3-Hidroksi-3-Metilglutaril Koenzim A (HMG-KoA) redüktaz inhibitörü olarak kolesterol biyosentezi başta olmakla birlikte bundan bağımsız anti-inflamatör etkisi gibi bir çok yolda rol oynamaktadır (Strandberg TE, 1999, Elrod JW ve Lefer DJ, 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, let-7i, miR-221/222, miR-34 ve miR-33 gibi miRNA'ların statin etkisi ile ekspresyonlarındaki değişimlerin ateroskleroz oluşumunda önem teşkil eden genlerin (*TLR4*, *ABCA1*, *NO*, *SIRT1*) regülasyonlarında farklılıklara yol açtığı gözlenmiştir (Satoh M, 2012, Niesor EJ, 2015, Cerda A, 2015, Tabuchi T, 2012, Chen WM., 2012).

AMPK, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan metabolik sensör protein kinaz ailesinden olan bir serine/threonine protein kinazdır (Hardie DG, 1998, Motoshima H, 2006). AMPK aktivasyonu HMG-KoA redüktaz etkinliğini fosforilleyip inhibe ederek kolesterol düzeylerinde düşüşe sebep olması yönünden ateroskleroz için önemli bir teropatik hedef olabileceği düşünülmektedir (Motoshima H, 2006).

Bu çalışmada, anjiografi ile belirlenmiş olan KAH taşımayan ( $\leq 30$  koroner darlık) bireylerin plazma miRNA profillerinde statin varlığında ekspresyon değişimlerini belirlemeyi ve AMPK yolunun yeni

modülatörlerini tanımlamayı hedefledik. Bu amaç doğrultusunda, miRNA array sistemi kullanılarak statin kullanım durumunun hangi miRNA'larda ne derece farklı ekspresyon değişimine neden oldukları belirlenecektir. Kompleks ve uzun bir süreç sonucunda oluşan aterosklerotik KAH'ların tedavisinde kullanılan statinin miRNA'ların anlatım profillerine etkisi ilk defa bu çalışma ile toplumumuz için belirlenmiş olacaktır.

## 2. Materyal-Metod:

### 1.1. KAH ve Kontrol Seçimi:

Çalışmaya dahil edilen, klinik bulgulara ve non-invaziv iskemi testlerinin sonuçlarına göre kardiyo-loji uzmanı klinisyen tarafından konulan endikasyon gereğince yapılan koroner anjiyografiye göre KAH saptanan 50 hasta ve 50 kontrol (anjiyografik olarak normal koroner arterlere sahip bireyler) olmak üzere toplam 100 bireyden RNA eldesi için kan örnekleri alındı. Aterosklerotik KAH vakalarının kan örnekleri ile normal kontrollere ait kan örnekleri T.C. Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır. Aterosklerotik KAH'larının Gensini ve SYNTAX skorları hesaplanarak derecelendirilen anjiyografik yaygınlık ve ciddiyeti belirlendi. Çalışmaya dahil edilen bireylerin seçiminde, koroner damar darlık skorunun yanı sıra koroner arter hastalarında aile hikayesinin varlığı, sigara içiciliği, diyabet ve bazı biyokimyasal parametrelerin düzeyleri de dikkate alındı. Kontrollerde stenoz  $\leq$  %30 olmasının yanında, aile hikayesinin dışlanması, serebrovasküler/periferal arter hastalığına sahip olanların dışlanması ve ileri yaşta olması durumunda seçim yapıldı. Bu hastalardan elde edilen RNA bankasından 24 tane seçilerek (12 hasta ve 12 kontrol olmak üzere) miRNA ekspresyon analizleri yapıldı. miRNA array analizleri sonucunda statin kullanan ve kullanmayan gruplar arasındaki kıyaslama sonucunda farklı ekspresyonu olan miRNA'lar belirlendi.

### 1.2. Kandan miRNA içeren total RNA izolasyonu:

Periferal kan dokusundan miRNA içeren total RNA izole etmek amacı ile "PAXgene blood miRNA" kiti (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Bu kit ile aynı tüpde hem total RNA hemde miRNA elde edilebilmektedir. Bu kit, PAXgene tüplerinde peri-

feral kanın homojenizasyon aşamasından sonra, lizatin spin kolona aktarılarak etanol ile yıkanma aşmalarından sonra miRNA içeren total RNA'nın filtreden elüsyonuna dayanmaktadır.

### 1.3. RNA saflığı ve miktarının ölçümü:

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonunun, protein ve kimyasal kontaminasyonu olup olmadığının belirlenmesinde nanodrop cihazı kullanıldı. RNA kalitesinin ölçümü ve RIN değerleri Agilent Biyo-analizer cihazında RNA Nano kiti (Agilent) kullanılarak belirlendi. miRNA array analizinin anlamlı sonuç vermesi için RIN değeri  $\geq$  7 olan RNA örnekleri seçildi.

### 1.4. Hücre Kültürü:

Hücre kültürü çalışmaları için THP-1 (ATCC No: TIB-202) hücrelerine PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) eklenilerek makrofajlara farklılaşması sağlandı. 200nM PMA (Sigma, ABD) muamelesi sonucunda THP-1 hücre dizisinden elde edilen makrofaj hücreleri %10 FBS içeren RPMI 1640 içerisinde  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde süspansiyon edilerek, 60x20 mm<sup>2</sup> petri tabakalarda çoğaltıldı. Uyarılmamış hücreler petri yüzeyine yapışarak üretildiler. Deneyde çalışılan her örnek için 10  $\mu$ M simvastatin (Sigma, ABD) içeren ve içermeyen bir grup oluşturuldu. Daha sonra hücreler, CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Uyarıcılar eklendikten 24 saat sonra makrofajlar RNA degradasyonu olmayacak şekilde uygun ortamda kazınarak toplandı. Her koşul için çalışılan hücreler RNA izolasyonu için kaldırıldı. Her konsantrasyon ve kontrol için üç örnek çalışıldı. Her bir koşul için üç ayrı deney dizaynı yapılarak deneylerin triplike olarak kontrolü sağlandı. Makrofaj hücrelerinden RNA izolasyonu kit (Roche, High Pure RNA Isolation Kit) kullanılarak yapıldı.

### 1.5. cDNA Sentezi:

Makrofaj hücrelerinden ve paxgene kullanılarak mononükleer hücrelerden izole edilen total RNA'lardan komplementer DNA (cDNA) sentezi kit (Roche, Tanscriptor First Std cDNA Syn. Kit) kullanılarak yapıldı. Tüm işlemlerde RNaz içermeyen malzemeler kullanıldı. PCR'da kullanılacak olan cDNA dilüsyonu, primer konsantrasyonları ve amplifikasyon ısılarının belirlenmesi için ön analizler yapıldı. Elde ettiğimiz sonuçlara

göre en uygun cDNA dilüsyon oranının 1:10 olduğuna karar verildi ve sonraki deneylerde bu oran kullanıldı. En uygun primer konsantrasyonu 5 pM olarak belirlendi.

### 1.6. microRNA Mikroarray Analizi:

MiRNA ekspresyonlarındaki değişiklikleri ölçmek için 1.5 µg total RNA miRNA Microarray System ile miRNA Complete Labeling and hybridization Kit (Agilent Technologies) kullanılarak ve üreticinin protokolüne uygun olarak işaretlendi ve hibridize edildi. MiRNA profillenmesi için Agilent SurePrint G3 miRNA Human 8X60K Microarrays, V21 (Agilent) ve sinyaller Agilent Technologies G4900DA SureScann kullanılarak saptandı. İşlenmemiş ham data (raw data) Agilent Feature Extraction Software (v11.0.1.1) ile elde edildi. Mikroarray sonuçları GeneSpring GX 7.3 software (Agilent) ile analiz edildi. Tüm istatistiksel analizler için "R İstatistik Programı v3.1.2" (www.r-project.org) kullanıldı.

### 1.7. Biyoinformatik Analizler:

Mikroarray analiz sonucuna göre iki çalışma grubumuz arasında istatistiksel anlamlı farklılık gösteren miRNA'lar için hedef gen predikte etmek amaçlı miRDB veritabanı kullanıldı <http://mirdb.org/miRDB/> (Wong N, 2015). MiRDB veritabanında araştırılan miRNA'lar için predikte edilen hedef genlerden skorları 95 ve üzeri olanlar güçlü aday olarak değerlendirildi (Gopalan V. 2014). Ardından, literatür araştırması ile güçlü aday olarak belirlenen hedef genlerin AMPK sinyal yolundaki rolleri incelendi.

### 1.8. Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

THP-1 makrofaj hücre hatlarından total RNA'lar kit kullanılarak izole edildi ve cDNA sentezinin ardından *AMPK α1*, *AMPK β1*, *AMPK β2* ve *SREBF2* transkriptlerine özgü primerler ile SyberGreen eş-zamanlı kantitatif PCR tekniği ile gen ekspresyonu analizleri yapıldı. Kıyaslama sonucundaki değişim, GAPDH (endojen kontrol) transkript seviyelerine göre normalize edildikten sonra hesaplandı.

Hücre kültüründen elde edilen RNA'lar için kullanılan Q-RT-PCR yöntemi nükleik asitlerin mik-

tarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir metottur. Ekspresyon düzeyini rölatif olarak hesaplamak için Delta Delta Ct metodu kullanıldı. Hedef gen anlatım düzeyini ifade eden Ct değerlerinden referans olarak seçilen 'housekeeping' Ct değeri çıkartılarak Delta Ct değeri elde edildi. Delta Ct değerlerinden çalışmada kullanılan ve elde edilen Ct değerlerinin normalizasyonunu sağlamak için bir kalibratör oluşturuldu. Bu kalibratör değeri elde edilen Ct değeri delta Ct değerinden çıkarılarak delta delta Ct değeri elde edildi.

## 3. Bulgular:

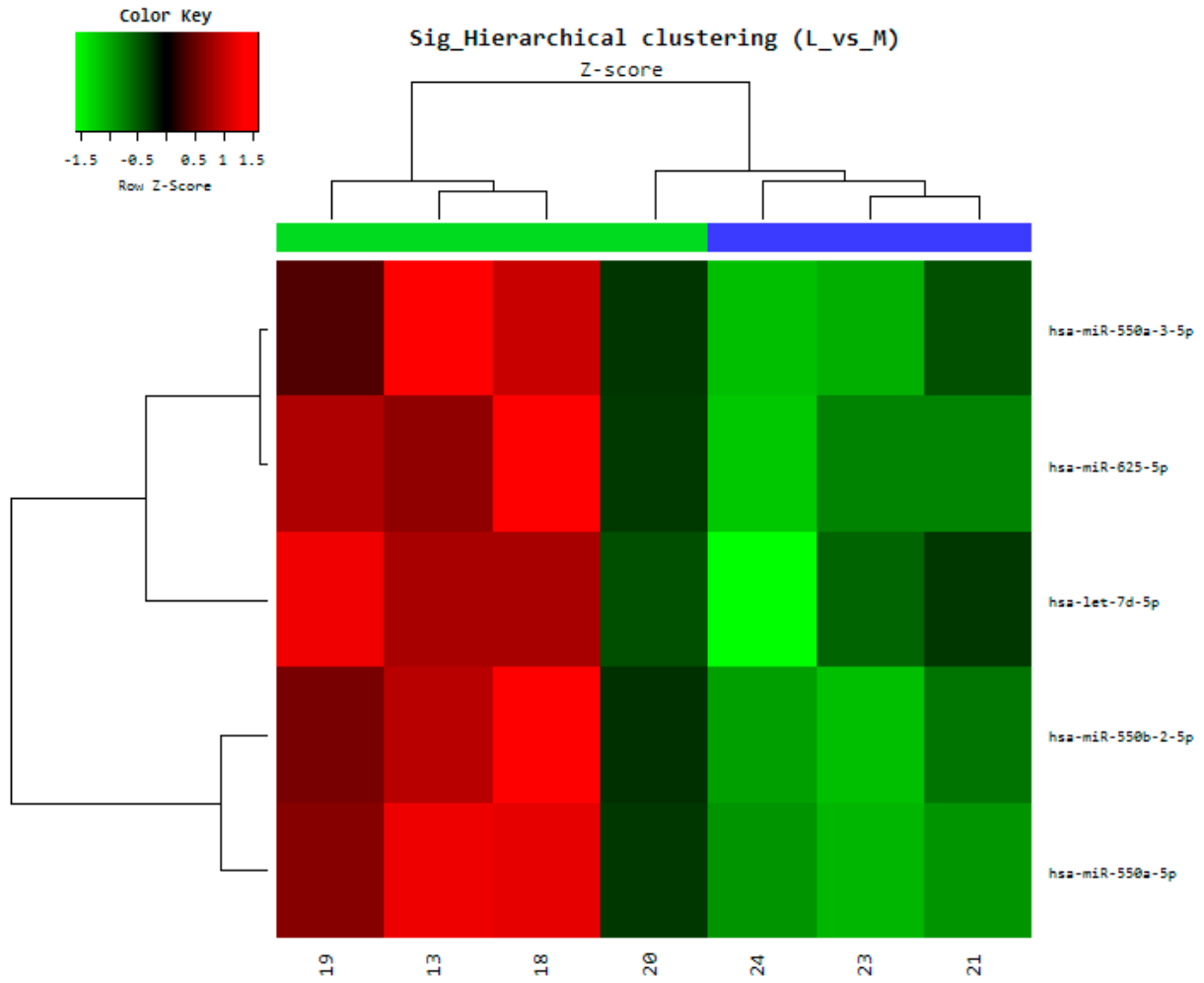
### 3.1. Farklı Eksprese olan miRNA'lar:

Tamamladığımız miRNA array çalışmamızda anjiyografi sonucunda koroner damar darlığı  $\leq$  %30 KAH olmayan statin kullanan (n=3) ve sağlıklı kontrol (n=4) grupları arasındaki anlamlı derece ekspresyon farklılığı gösteren miRNA'lar belirlendi (Şekil 1 ve Tablo 1). miR-625-5p, miR-550a-3-5p, miR-550b-2-5p, miR-550a-5p, miR-let-7d-5p'nin statin kullanan grupta daha az eksprese olduğunu belirledi (Şekil 1 ve Tablo 1). Bu sonuçlardan yola çıkarak belirlenen miRNA'ların hedef skoru  $\geq$ 95 olan hedef genleri miRDB'den güçlü aday olarak belirlendi. Skoru yüksek hedef genlerden, statin metabolizması ile ilişkili olarak sadece miR-625-5p hedefinde olan *AMPK α1* geni belirlendi (Hedef Skoru=95).

### 3.2. THP-1 Makrofajlarda Simvastatinin Hedef Gen Ekspresyon Düzeyi Üzerine Etkisi:

Makrofaj hücreleri için uygun konsantrasyon olan 10 µM simvastatin eklendikten 24 saat sonraki canlılık seviyelerinin, negatif kontrol hücrelerindeki canlılık oranları ile kıyaslanması sonucunda elde edilen bulgular statinin hücre sayısı ve canlılığını azalttığını gösterdi. Daha sonraki analizlerde bu hücrelerden RNA izolasyonu yapılarak hedef genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelendi.

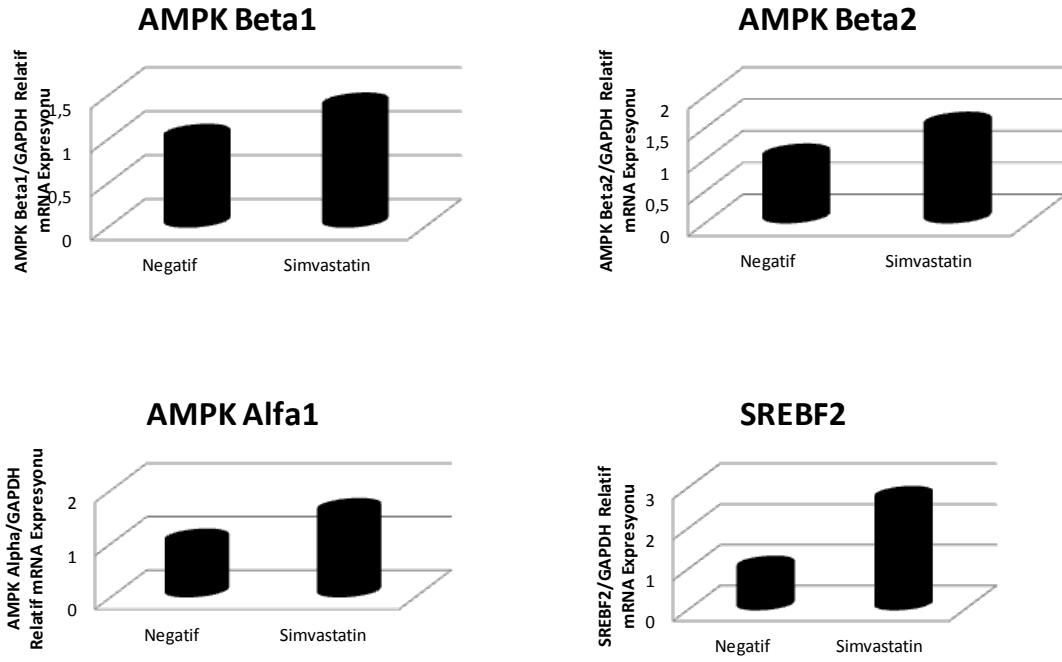
Statin metabolizmasında yer olan *AMPK α1*, *AMPK β1*, *AMPK β2* ve *SREBF2* genlerinin simvastatin varlığındaki etkilenme durumu incelendiğinde *AMPK α1*, *AMPK β1*, *AMPK β2* ve *SREBF2* gen ekspresyonlarında artış olduğu gözlemlendi (Şekil 2).



**Şekil 1. Farklı olarak ifade edilen miRNA'lar için kümeleme analizi.** Yatay eksen örnekleri (mavi çubuk: statin ile tedavi edilen grubu, yeşil çubuk: statin ile tedavi edilmeyen grubu), sol dikey eksen ise miRNA'yı temsil etmektedir. Kırmızı ve yeşil renkler, ekspresyon artışını (up-regulation) ve ekspresyon azalışını (down-regulation) göstermektedir.

miRNA	Kat Değişimi (Fc)	p
hsa-let-7d-5p	1.61	0.04
hsa-miR-550a-3-5p	1.72	0.02
hsa-miR-625-5p	1.76	0.01
hsa-miR-550b-2-5p	1.85	0.01
hsa-miR-550a-5p	2.14	0.01

**Tablo 1:** miRNA array sonucunda farklı eksprese olan miRNA'ların statin tedavisi olmayan grupta statin tedavisi olan gruba göre ekspresyon kat değişimi (Fold change)(p <0.05).



**Şekil 2.** THP-1 Makrofajlarda simvastatin varlığında *SREBF2* ve *AMPK* genlerinin ekspresyon düzeyleri. THP-1 Makrofajlarda simvastatinin hedef gen ekspresyon düzeyi üzerine etkisi. Araştırılan koşullarda *AMPK a1*, *AMPK β1*, *AMPK β2* ve *SREBF2* genlerinin ekspresyon değişimleri gösterilmiştir. Kontrol gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

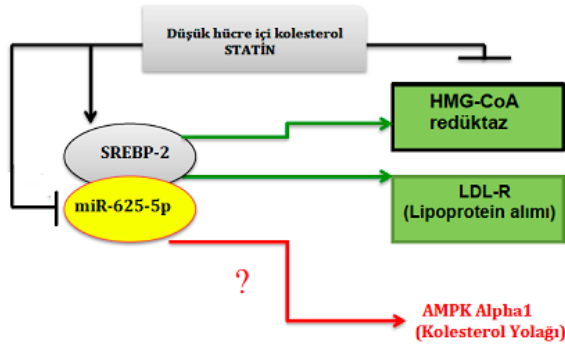
#### 4. Tartışma:

Son yıllarda, genlerin ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde önemli rol oynayan miRNA'lar araştırılarak ateroskleroz patogeneziindeki etkileri incelenmektedir. İnsanlarda, yaklaşık 2000 miRNA klonlanıp dizilenmiştir. Ancak, insan genomundaki genlerin %30'unun düzenleyicisi olarak binlerce miRNA olduğu tahmin edilmektedir (Haver VG, 2010; Scalbert e ve Bril A, 2008). Pek çok miRNA, çeşitli fizyolojik fonksiyonların ve gelişimin regülasyonunda rol aldıklarından dolayı doku-spesifik olarak eksprese olmaktadır ve kan dolaşımında saptanabilmektedirler (Fazi F ve Nervi C, 2008).

miRNA'lar, aterosklerozun gelişiminde hem periferik doku hem de damar dokusunda olmak üzere her aşamada rol almaktadırlar (Haver VG, 2010). Serum ve plazmadan elde edilen miRNA bankası ile yapılan çalışmalarda KAH için biyobelirteç olarak belirlenen veya öngörülen miRNA'lar saptanmıştır (Jiang Y, 2014, Wang F, 2014,).

Bizim çalışmamızda, miRNA array çalışması ile

KAH olmayan ve statin kullanan kişiler (n=3) ve statin kullanmayan sağlıklı kontrol (n=4) grupları arasındaki anlamlı derece ekspresyon farklılığı gösteren miRNA'lardan kolesterol metabolizmasında da ilişkili olabileceğini öngördüğümüz miRNA'lar seçildi. Kolesterol metabolizması ile ilişkili olarak sadece miR-625-5p hedefinde olan *AMPK a1* geni belirlendi (Hedef Skoru=95). Bunun üzerine *AMPK* genleri ve ilişkili olduğu *SREBF2* geninin *in vitro* çalışmalar ile THP-1 hücrelerinde statin varlığında ve yokluğunda ekspresyon düzeyleri incelendi. *in vitro* çalışma sonuçlarına göre, statin *AMPK a1* ve diğer çalışılan genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu sonuçlara göre miR-625-5p'nin statin kullanımı ile ekspresyonunun azalması *AMPK a1* geninin ekspresyonunun artmasına neden olarak koruyucu rol aldığını düşünülebilir. *AMPK a1* geninin aynı hasta ve kontrol grubunda taranarak ekspresyon sonuçlarına göre daha net bilgiler elde edilebilecektir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, statinin miR-625-5p ekspresyonunu azaltması *AMPK a1*'in indüklenmesi ile kolesterol mekanizmasının sentez yolunu aktive edebilir (Şekil 3).



**Şekil 3: Kolesterol metabolizmasında etkili olan genlerin ve miR-625-5p ile olası ilişkilerinin gösterimi.** SREBP-2 (SREBF2), intraselüler kolesterol metabolizmasının pozitif dengelerini düzenlemektedir. Statin ilaçları veya düşük hücre içi kolesterol koşulları, SREBP-2'yi indükleyerek sterollerin sentezini ve alımını azaltmaktadır. Aynı zamanda, statinler miR-625-5p ekspresyonunu inhibe ederek, AMPK *a1* yolundaki artışla sterol kaybını en aza indirebilir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, miR-625-5p'nin içinde bulunduğu bazı miRNA'lar aortik stenoz ile ilişkili bulunmuştur (Coffey S, 2016). Başka bir grup tarafından yapılan çalışmada ise, miR-625-5p'nin hedefinde olan genler aracılığı ile sitokin yollarının düzenlenmesinde etkili olabileceği belirtilmektedir (Dong X, 2016). Bu çalışmalara ek olarak, STS hücre dizisi ile hipoksi koşulunda yapılan ekspresyon çalışmalarında miR-625-5p'nin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Gits CM, 2014).

Araştırmamızda statin ile tedavi edilen bireylerde miR-625-5p'nin down regüle olduğu gözlenmiştir. Bu miRNA daha önceki çalışmalarda da hipertansiyonla ilişkilendirilmiş ve hasta grubunda down regülasyonuna rastlanmıştır (Syed Salman A, 2016). MiRDB veritabanında sorgulandığında miR-625-5p'nin 17 tane kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili aday geni (Hedef Skor  $\geq 60$ ) hedef alabileceği predikte edilebilir. Bunlardan yedi tanesinin prediksyon değerleri yüksektir (Hedef skor  $\geq 80$ ). Bunlar skor iyiliğine göre sırasıyla; PAPP, COL1A1, MFN2, ATP6AP2, SUMO4, APLN, ve FAS genleridir.

**Sonuç:** Bu sonuçlar daha detaylı bir şekilde incelenip başka gruplar tarafından konfirme edildiği takdirde, miR-625-5p'nin ateroskleroz patogenezinde ve statin metabolizmasında önemli rol alan bir miRNA olabileceği ispatlanabilecektir. Böyle-

sine önemli bir oluşuma neden olan bilinmeyen yeni biobelirteçlerin aydınlatılması ülkemizde ve tüm dünyada en önemli ölüm sebeplerinden biri olan kalp-damar bozukluklarına karşı koruyucu tıp yöntemleri ve ilaç geliştirmede büyük umut vaat etmektedir. İleride, aterosklerotik KAH gelişiminin takibinde bu biobelirteçlerin test edilmesi ve bulunacak aday genlere özgü tedavi stratejilerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

### TEŞEKKÜR:

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 54665 ve 51865.

**Çıkar Uyuşmazlığı:** Yok

### KAYNAKLAR:

1. Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, Glavac D. "MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction", *Cardiology*. 2010;115:163-9.
2. Cerda A, Fajardo CM, Basso RG, Hirata MH, Hirata RD. Role of microRNAs 221/222 on statin induced nitric oxide release in human endothelial cells. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104:195-201.
3. Chen WM, Sheu WH, Tseng PC, Lee TS, Lee WJ, Chang PJ, Chiang AN. Modulation of microRNA Expression in Subjects with Metabolic Syndrome and Decrease of Cholesterol Efflux from Macrophages via microRNA-33-Mediated Attenuation of ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression by Statins. *PLoS One*. 2016;11:e0154672.
4. Coffey S, Williams MJ, Phillips LV, Galvin IF, Bunton RW, Jones GT. Integrated microRNA and messenger RNA analysis in aortic stenosis. *Sci Rep*. 2016;6:36904.
5. Dong X, Xu M, Ren Z, Gu J, Lu M, Lu Q, Zhong N. Regulation of CBL and ESR1 expression by microRNA-22-3p, 513a-5p and 625-5p may impact the pathogenesis of dust mite-induced pediatric asthma. *Int J Mol Med*. 2016;38:446-56.
6. Elrod JW & Lefer DJ. The effects of statins



- on endothelium, inflammation and cardioprotection. *Drug News Perspect* 2005;18:229–236.
7. Fazi F, Nervi C. MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory Networks for cell fate determination, *Cardiovasc Res*, 2008;79:553–561.
  8. Gits CM, van Kuijk PF, de Rijck JC, Muskens N, Jonkers MB, van IJcken WF, Mathijssen RH, Verweij J, Sleijfer S, Wiemer EA. MicroRNA response to hypoxic stress in soft tissue sarcoma cells: microRNA mediated regulation of HIF3 $\alpha$ . *BMC Cancer*. 2014;14:429.
  9. Gopalan V, Smith RA, Lam AK. Downregulation of microRNA-498 in colorectal cancers and its cellular effects. *Exp Cell Res*. 2015;330:423-8.
  10. Han H, Qu G, Han C, Wang Y, Sun T, Li F, Wang J, Luo S. MiR-34a, miR-21 and miR-23a as potential biomarkers for coronary artery disease: a pilot microarray study and confirmation in a 32 patient cohort, *Exp Mol Med*, 2015;6:47,e138.
  11. Hardie DG, Carling D & Carlson M. The AMP-activated/ SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 1998;67: 821–855
  12. Haver VG, Slart RH, Zeebregts CJ, Peppenbosch MP, Tio RA. Rupture of vulnerable atherosclerotic plaques: microRNAs conducting the orchestra?, *Trends Cardiovasc Med* 2010;20:65-71.
  13. Jiang Y, Wang HY, Cao HM, Wang CY, Zhang L, Wang H, Liu L, Li Y, Cai JH. Peripheral blood miRNAs as a biomarker for chronic cardiovascular disease, *Sci Rep*, 2014;22:4-5026.
  14. Motoshima H, Goldstein BJ, Igata M, Araki E. AMPK and cell proliferation--AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *J Physiol*. 2006; 574:63-71.
  15. Nathan Wong and Xiaowei Wang miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Research*. 2015;43:46-152.
  16. Niesor EJ, Schwartz GG, Perez A, Stauffer A, Durrwell A, Bucklar-Suchankova G, Benghozi R, Abt M, Kallend D. Statin-induced decrease in ATP-binding cassette transporter A1 expression via microRNA33 induction may counteract cholesterol efflux to high-density lipoprotein. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2015;29:7-14.
  17. Nourae N, Mowla SJ. miRNA therapeutics in cardiovascular diseases: promises and problems. *Front Genet* 2015;30;6:232.
  18. Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, Klopp N, Illig T, Kähönen M, Karhunen PJ, Laaksonen R, Lehtimäki T. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study”, *Atherosclerosis*, 2011;219:211-7
  19. Roy S, Khanna S, Hussain SR, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res*, 2009;82:21–29.
  20. Satoh M, Tabuchi T, Minami Y, Takahashi Y, Itoh T, Nakamura M. Expression of let-7i is associated with Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of statins on let-7i and Toll-like receptor 4 signal. *Immunobiology*. 2012;217:533-9.
  21. Scalbert E, Bril A. Implication of microRNAs in the cardiovascular system. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 ;8:181-8.
  22. Strandberg, T.E., Vanhanen, H., Tikkanen, M.J. Effect of statins on C-reactive protein in patients with coronary artery disease. *Lancet* 1999;353:118–119.
  23. Syed Salman A, Chandra Kala, Mohd Abid1, Nabeel Ahmad, Uma Shankar Sharma, Najam Ali Khan Pathological microRNAs in acute cardiovascular diseases and microRNA therapeutics. *J. Acute Dis*. 2016;5:9–15
  24. Tabuchi T, Satoh M, Itoh T, Nakamura M. MicroRNA-34a regulates the longevity-associated protein SIRT1 in coronary artery disease: effect of statins on SIRT1 and microRNA-34a expression. *Clin Sci (Lond)*. 2012;123:161-71.

25. Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, Di-Maio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008;105:3027–13032.
26. Wang F, Long G, Zhao C, Li H, Chaugai S, Wang Y, Chen C, Wang DW. Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction, *PLoS One*, 2014;3:9-e105734.
27. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2, *Nat Med*, 2007;13:486–491.
28. Yin C, Wang X, Kukreja RC. Endogenous microRNAs induced by heat-shock reduce myocardial infarction following ischemiareperfusion in mice, *FEBS Lett*, 2008;582:4137–4142.