

# Koroner Kalp Hastalarında PCSK9 E670G ve N425S Gen Varyasyonlarının Etkisinin Türk Toplumunda Değerlendirilmesi

Ayşegül Başak AKADAM TEKER\*, Erhan TEKER\*\*,  
Özlem KURNAZ GÖMLEKSİZ\*\*\*, Hülya YILMAZ AYDOĞAN\*\*\*\*

## Öz

**Amaç:** Aterosklerozdan kaynaklanan Koroner Arter Hastalığı (KAH) çeşitli genetik ve çevresel etmenlerin etkileşiminden kaynaklanan multifaktöriyel bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde en yüksek mortalite ve morbidite nedenlerindedir. Proprotein subtilisin keksin tip-9 (PCSK9), Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü (Low-density lipoprotein-Receptor / LDLR)'nün post-transkripsiyonel degradasyonunu indükleyerek kolesterol hemostazında önemli bir rol oynamaktadır. PCSK9'un ilk keşfedildiği 2003 yılından bu yana çalışmalar hız kesmeden devam etmiş ve artık anti-PCSK9 monoklonal antikorları ateroskleroz tedavisinde yeni bir hedef olarak sunulmuştur. Ancak Türk popülasyonunda PCSK9'un genetik varyasyonları ve LDL-kolesterol (LDL-K) üzerindeki etkisi hakkında çok az bilgi vardır. PCSK9 genindeki mutasyonlar sırasıyla fonksiyon kaybı ve fonksiyon kazanımı mekanizmaları aracılığı ile hem hipokolesterolemi hemde hiperkolesterolemi ile ilişkilidir. Çalışmamızda; PCSK9 fonksiyon kazanımı ile ilişkili N425S (rs28362261) ve E670G (23968A>G) (rs 505151) gen polimorfizmlerinin serum lipoprotein düzeyi ve KAH gelişimindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Özgün Araştırma Makalesi (Original Research Article)

**Geliş / Received:** 13.02.2018 & **Kabul / Accepted:** 06.03.2018

\* Dr. Öğr. Üyesi, Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Giresun, Türkiye, E-posta: [basak.teker@giresun.edu.tr](mailto:basak.teker@giresun.edu.tr) **ORCID ID** <https://orcid.org/0000-0003-3618-0560>

\*\* Dr., İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı - Giresun Üniversitesi, A. İlhan Özdemir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kardiyoloji Kliniği, Giresun, Türkiye, E posta: [erhanteker@hotmail.com](mailto:erhanteker@hotmail.com) **ORCID ID** <https://orcid.org/0000-0002-0234-7548>

\*\*\* Dr. Öğr. Üyesi, İstanbul Gelişim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, İstanbul, Türkiye, E-posta: [okurnaz@gelisim.edu.tr](mailto:okurnaz@gelisim.edu.tr) **ORCID ID** <https://orcid.org/0000-0001-9827-5253>

\*\*\*\* Prof. Dr., İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, E-posta: [yilmazh@istanbul.edu.tr](mailto:yilmazh@istanbul.edu.tr) **ORCID ID** <https://orcid.org/0000-0002-8837-6664>

**Yöntem:** 64 hasta ve 50 kontrol'ün PCSK9 E670G ve N425S varyantının belirlenmesi için PCR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) yöntemi kullanılmıştır.

**Bulgular:** Koroner arter hastalarında PCSK9 E670G mutant T alleli frekansı kontrol grubuna göre daha yüksek gözlenmiştir. Verilerimiz bu varyantın koroner kalp hastalığı gelişiminde bağımsız risk faktörü olabileceğini önermektedir. Koroner arter hastalarında PCSK9 E670G normal A alleli yüksek serum total-kolesterol düzeyi ile ilişkili bulunmuştur. PCSK9 N425S polimorfizmi dağılımlarında hasta ve kontrol gruplarında sadece NN normal homozigot genotipi gözlenmiştir.

**Sonuç:** PCSK9 genindeki E670G varyantının serum lipid profili üzerindeki olumsuz etkileriyle koroner kalp hastalığı gelişiminde risk oluşturabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Proprotein konvertaz subtilisin keksin tip-9 (PCSK9), koroner arter hastalığı, lipoprotein, LDL-K, hiperkolesterolemi.

## **Evaluation of PCSK9 E670G and N425S Gene Variations in Coronary Heart Disease in Turkish Population**

### **Abstract**

**Aim:** Coronary artery disease (CAD) due to atherosclerosis is a multifactorial disease resulting from the interaction of numerous genetic and environmental factors. In developed countries, it is among the diseases with highest rates of mortality and morbidity. Proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9), plays an important role for cholesterol homeostasis via inducing post-transcriptional degradation of Low-density lipoprotein-Receptor (LDLR). Since PCSK9's first discovery in 2003, studies focusing on PCSK9 continue without slowing down and now PCSK9 is a candidate as a new therapeutic target in atherosclerosis. However, little is known about the genetic variants of PCSK9 and its influence on Low Density Lipoprotein – cholesterol (LDL-C) in Turkish population. Mutations in the PCSK9 gene have been associated with both hypocholesterolemia and hypercholesterolemia through 'loss-of-function' and 'gain-of-function' mechanisms, respectively. Our aim was to investigate PCSK9 N425S (rs28362261) and E670G (23968A>G) (rs 505151) gene polymorphisms in regard to their effects on serum lipoprotein level and development of CHD.

**Method:** PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) method is used for determination of PCSK9 variants.

**Findings:** In the patient group, frequency of PCSK9 E670G mutant T allele is higher than controls. Our findings indicate that these variants might be an independent risk factors in

development of CHD. In the patient group, we observed the PCSK9 E670G normal A allele is associated with increased serum total-cholesterol level.

**Conclusion:** In conclusion we suggest that the PCSK9 gene variants might pose a risk in susceptibility to CHD, since PCSK9 has detrimental effects on serum lipids.

**Keywords:** Proprotein convertase subtilisin/kexin-9 (PCSK9), coronary artery disease, lipoprotein, LDL-C, hypercholesterolemia.

## Giriş

Aterosklerotik koroner arter hastalığı için hiperlipidemi oldukça önemli bir risk faktörüdür. Hiperlipidemi LDL-kolesterol (LDL-K)'ün yüksek konsantrasyonu ve HDL-kolesterol (HDL-K)'ün düşük konsantrasyonu ile karakterize edilmiştir<sup>1</sup>. Plazma lipidleri ateroskleroz açısından temel risk faktörü olduğu için LDL-K'nın klinik yönetimi ve altında yatan mekanizmaların araştırılması yüksek kardiyovasküler risk altındaki hastalar açısından büyük önem taşımaktadır. Mevalonat yolunun hız sınırlayıcı basamağını katalizleyen 3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA redüktaz enziminin inhibitörleri olan statinler, aterosklerotik koroner arter hastalarının tedavisinde oldukça önem taşımaktadır. Klinik pratikte, statin tedavisi alan bireyler arasında lipid düşürücü etkiye verilen cevap arasında bireysel farklılıklar bulunmaktadır. Bu bireysel farklılıkların genetik faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir ve bu hastalar için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerekliliği kaçınılmaz bir gerçek olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kexin benzeri prokonvertazların subtilisin ailesinin 9. üyesi olan PCSK9 geninin promotor bölgesi sterol regülatör element içerir ve transkripsiyonu intrasellüler kolesterol seviyeleri tarafından regüle edilir<sup>2-4</sup>.

Orijinal olarak nöral apoptoz düzenleyici konvertaz-1 (NARC-1) olarak isimlendirilen PCSK9, insanda başlıca lipoprotein metabolizmasının iki anahtar bölgesi olan ince barsak ve karaciğerde eksprese edilir<sup>5</sup>. Endoplazmik retikulumda 72 kDa'luk prekürsör protein olarak sentezlenen PCSK9 oto-katalitik kesime uğrayarak 63 kDa'luk işlenmiş proteaza dönüşür. Kolesterol metabolizmasındaki rolü kesinleşmemesine rağmen

PCSK9'un diyetel ve hüresel kolesterol tarafından güçlü bir şekilde aşığı düzenlendiğı<sup>6</sup>, aşığı düzenlenmenin proteozom ve lizozomlardan bağımsız olduğı ve post-ER kompleksinde LDLR degradasyonunu hızlandırdığı bilinmektedir<sup>7</sup>. Endoplazmik retikulumda molekül içi otokatalitik kesime uğrayan PCSK9 çözünebilir bir zimojen olarak sentezlenir. PCSK9 geni LDLR'nin post transkripsiyonel regulasyonunu sağlamaktadır. Karaciğerde, PCSK9 LDLR'üne bağlanır ve bu bağlanma normal LDLR döngüsünü bozarak LDLR'nin tekrar membrana dönmesini engeller<sup>4,8,9</sup>. Bunun sonucunda karaciğer hücresinin hücre membranındaki LDLR sayısı azalır ve böylece hücre içine daha az LDL alındığı için serum LDL-K düzeyinde artış meydana gelir. PCSK9 genindeki fonksiyon kazandıran ve kaybettiren mutasyonlar sırasıyla hiperkolesterolemi/ hipokolesterolemi ile ilişkilidir<sup>2,10-13</sup>. PCSK9 heterozigot fonksiyon-kayı mutasyonuna sahip sağlıklı bir bayanda LDL-K düzeyinin 14mg/dl olduğu bildirilmiştir<sup>14</sup>. Bu bulgu LDLR'yi ve plazma LDL-K düzeylerini modüle etmede PCSK9'un önemli rolü olduğuna ve insanlarda PCSK9 fonksiyon kaybının kötüleştirici etkilerle ilişkili olmadığına kanıt niteliğindedir<sup>15</sup>. Dallas kalp çalışmasında ve daha pek çok çalışmada statin kullanımının PCSK9 mRNA ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir<sup>16</sup>. Bu durum statin tedavisinde ilaç dozunun arttırılmış olmasının hastada kolesterol düzeylerinde buna paralel bir düşüşle sonuçlanmayıp %6 sınırında kalmasının, statin kaynaklı artış gösteren LDLR'nin PCSK9 tarafından degrade edilmesiyle açıklanabilir.

Bu nedenle LDL-K düzeylerini düşürmede farmakolojik hedef olarak PCSK9'un değerli olabileceğı önerilmiştir<sup>6</sup>. 2003 yılında PCSK9'un LDL-K üzerindeki rolünün keşfedilmesinden bu yana çalışmalar hız kesmeden devam etmiş ve PCSK9 inhibisyonuna yönelik pek çok araştırma yapılmıştır. Bugüne geldiğimizde faz 3 çalışmasında olan anti-PCSK9 monoklonal antikorları mevcuttur (evolocumab (AMG 145) ve alirocumab (REGN727/SAR236553)). Anti-PCSK9 monoklonal antikorları henüz araştırma aşamasında olmalarına rağmen LDL-K seviyelerinde yapmış oldukları yaklaşık % 70'lik düşüş özellikle ailesel hiperkolesterolemi gibi çok yüksek kolesterol seviyeleriyle seyreden hastalıkların tedavisinde yeni bir umut olarak karşımıza çıkmaktadır. İşte tamda bu noktada PCSK9 varyantlarının tanımlanması bireysel tedavilerin etkinliği açısından büyük önem oluşturmaktadır.

Biz çalışmamızda Türk toplumunda PCSK9 N425S, E670G varyantlarının dağılımı ve bunun lipid profilleri üzerine olan etkisini araştırmayı hedefledik.

## **Gereç ve Yöntem**

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanıldı. Birinci grupta 50 kişiden oluşan yüksek tansiyon, kalp rahatsızlığı hikayesi olmayan, lipid anomalisi, metabolik rahatsızlık (DM, böbrek yetersizliği, KC yetersizliği vs.), ailede bilinen erken yaş iskemik kalp hastalığı, lipid metabolizma bozukluğu olmayan sağlıklı bireyler kontrol grubuna alındı. İkinci grup İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Bölümü tarafından takip edilen anjiyografik olarak koroner arter hastalığı tanısı konmuş 64 hastadan oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubundaki tüm bireylere proje ile ilgili bilgi verilmiş ve yazılı izinleri alınmıştır. Ayrıca, KAH risk faktörleri ile ilgili olarak beden kütle indeksi ( $\text{kg/m}^2$ ), aile hikayesi, arteriyel hipertansiyon ( $\geq 140$  mmHg sistolik kan basıncı,  $\geq 90$  mmHg diastolik kan basıncı), hiperlipidemi (total kolesterol  $> 240$  mg/dl and trigliserid  $> 250$  mg/dl) değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında genotip ve allel dağılımları istatistiksel analizle incelendi ve hastalık gelişiminde risk oluşturup oluşturmadıkları tespit edilmeye çalışıldı. Çalışmamız İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan 2007/1722 sayılı etik kurul kararınca gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma protokolü, İstanbul Üniversitesi Yerel Etik Komitesinin onayı (2007/1722) ile İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (IU BAP No:1707) tarafından desteklenmiştir.

## **DNA izolasyonu**

Çalışmaya dahil edilen bireylerden Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)'lı tüpe 2 ml kan alındı. Klasik tuzda çöktürme yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve saflık tayinleri yapıldı.

## **PCSK9 E670G gen bölgesi**

PCSK9 E670G gen bölgesi için ileri primer: 5'TACGCCGTAGACAACACG3' Geri primer: 5'TCCCCAGACACCCATCCTGG3'. PCSK9 Geni E670G (23968 A>G) gen bölgesi PCR

protokolü; 94°C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben; 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 63°C'de 45 saniye bağlanma, 72°C'de 45 saniye uzama olmak üzere 35 döngü ve son olarak 72°C'de 5 dakika olarak gerçekleştirilmiştir<sup>17</sup>. PCR ile çoğaltılan bölge MnlI restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve daha sonra %4'lük nusive jel elektroforezine tabi tutulmuştur. DNA fragmanları UV altında görüntülenip genotipleme yapılmıştır.

### **PCSK9 N425S gen bölgesi**

PCSK9 N425S gen bölgesi için;

İleri primer: 5'GCCATCACCATCACCATCTTTTACCATTCA-3'

Geri Primer: 5'-AAGGGAGA GACTGTCAAGGTCACA-3' PCSK9 N425S

Gen bölgenin PCR reaksiyonu; 95°C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben; 95°C'de 45 saniye denatürasyon, 61°C'de 45 saniye bağlanma, 72°C'de 45 saniye uzama olmak üzere 30 döngü ve son olarak 72°C'de 5 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. PCR ile çoğaltılan bölge TspRI restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve daha sonra %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur<sup>18</sup>.

### **İstatiksel Analiz**

Bu çalışmanın istatiksel analizi SPSS 15,0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatiksel anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  olarak alınmıştır.

Beden kütle indekslerinin belirlenmesinde Student's t-testi, genotip ve allellerin görülme sıklığının gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki kare ( $\chi^2$ ) testi kullanılmıştır. Klinik ve klinik olmayan parametrelerin allellerle karşılaştırılmasında Kruskal Wallis metodu, genotip açısından incelenmesinde ise Student's t-testi kullanılmıştır. Gruplar arası risk etkeninin belirlenmesi için Odds oranı (OR) ve % 95 güven aralığı (% 95 CI) verilmiştir. Allel frekansı hesapmalarında gen sayma yöntemi kullanılmıştır.

### **Bulgular**

Çalışmamız İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Ana Bilim Dalında takip edilen 64 erkek koroner arter hastası ve 50 erkek gönüllü sağlıklı kontrolden oluşan çalışma grupları

arasında yapılmıştır. Çalışmamızın gruplarına ait demografik bilgiler ve biyokimyasal parametrelere ait bulgularımız Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1:** Çalışma gruplarının karakteristik özellikleri

	KONTROL	DM ( - ) KAH	P Değeri
Yaş (yıl)	57.43±10.48	59.50±11.77	0.307
BKİ (kg/m <sup>2</sup> )	25.51±3.64	26.24±3.67	0.303
Sistolik Basınç (mmHg)	123.46±19.97	134.42±28.65	0.023
Diastolik Basınç (mmHg)	75.51±14.76	83.18±17.08	0.012
Total-kolesterol (mg/dl)	190.72±70.56	211.03±52.50	0.099
Trigliserid (mg/dl)	139.25±66.26	145.78±101.27	0.727
LDL-kolesterol (mg/dl)	126.54±60.06	132.06±35.82	0.563
HDL-kolesterol (mg/dl)	42.37±18.53	44.24±13.33	0.559
VLDL-kolesterol (mg/dl)	27.77±12.96	30.12±24.47	0.620
Total-kolesterol/HDL-kolesterol	4.88±2.01	4.97±1.45	
SVH (%)	-	16 (%29.1)	
Hipertansiyon (%)	-	33 (%45.8)	
Ailede KAH Hikayesi (%)	%35.0	%33.8	0.92
Hiperkolesterolemi (%)	-	48.0	
Obezite (%)	6 (%12.8)	20 (%31.7)	0.02
Diyabet (%)	-	20 (%24.4)	
Sigara kullanımı (%)	%48.0	%62.9	0.195

DM: Diabetes Mellitus, BKİ: Beden Kütle İndeksi, n: kişi sayısı, KAH: Koroner arter hastalığı, SVH: sol ventrikül hipertrofisi, SAD: sol atriyum dilatasyonu.

- Tabloda  $X \pm SD$  olarak verilen değerlerin Gruplar arasındaki farklılık Anova ve Student t testleri ile incelenmiştir (X: Ortalama, SD: Standart sapma).
- Tablodaki % ve örnek sayısı olarak verilen değerlere ait gruplar arasındaki farklılık ki-kare ( $\chi^2$ ) ve ileri ki-kare ( $\chi^2$ ) testleri ile incelenmiştir.

Kikare istatistik analizi ile sağlıklı kontrol ve Koroner Arter hasta grupları karşılaştırıldığında; koroner arter hastalarında, sistolik ( $p=0.023$ ) ve diastolik kan basınçları ( $p=0.012$ ) ve obezite oranının (%31.7,  $p=0.02$ ) yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Koroner arter hasta grubunda Student t testi ile yapılan istatistiksel analizde Beden Kütle İndeksi (BKİ), serum total-kolesterol, trigliserid, HDL-kolesterol (HDL-K), LDL-kolesterol (LDL-K), VLDL-kolesterol düzeyleri ve sigara kullanım oranı kontrol grubuna göre yüksek gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

PCSK9 E670G polimorfizmi allel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımı incelendiğinde, kontrol grubunda E allel frekansı (%14.0 → %4.1) hasta grubunda ise G allel frekansı (%98.0 → %92.0) yüksek gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). PCSK9 N425S polimorfizmi dağılımlarında hasta ve kontrol gruplarında sadece NN normal homozigot genotipi gözlenmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2:** PCSK9 gen değişimlerine ait genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarında dağılımı

	Çalışma Grupları		Ki kare	P değeri	Görel risk (%95 CI)
<b>PCSK9 E670G Genotipleri</b>	<b>Kontrol (n=50)</b>	<b>Hasta (n=64)</b>			
AA	4 (%8.0)	1 (%1.6)		>0.05	
GG	43 (%86.0)	62 (%96.9)		(FE) 0.041	5.047 (1.0-25.472)
AG	3 (%6.0)	1 (%1.6)		>0.05	
<b>Tablo Kikare: 4.588, P=0.101</b>					
<b>PCSK9E670G Allelleri</b>					
A	11 (%11)	3 (%2.3)		>0.05	
G	89 (%89)	125 (%97.6)		>0.05	
<b>PCSK9 N425S Genotipleri</b>	<b>Kontrol (n=50)</b>	<b>Hasta (n=64)</b>			
NN	50 (%100)	64 (%100)			
SS	0 (%0)	0 (%0)			
NS	0 (%0)	0 (%0)			
<b>PCSK9 N425S Allelleri</b>					
N	100 (%100)	128 (%100)			
S	0 (%0)	0 (%0)			

Hasta ve kontrol grubunda PCSK9 varyantlarına göre BKİ, kan basınçları ve serum lipoprotein değerleri Tablo 3'de gösterilmiştir. PCSK9 E670G mutant G allel taşıyan kontrollerde de PCSK9 E670G normal AA genotipi taşıyan bireylere göre serum



trigliserid ve VLDL-kolesterol konsantrasyonları ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Koroner arter hasta grubunda; PCSK9 E670G normal A alleleline sahip hastalarda serum total kolesterol düzeyi PCSK9 E670G mutant GG genotipi taşıyan hastalara göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Serum LDL-K konsantrasyonu; PCSK9 E670G normal A alleli taşıyan bireylerde ise PCSK9 E670G mutant GG genotipi taşıyan hastalara göre ise anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ( $p<0.05$ ). PCSK9 E670G normal A alleli taşıyan hastalarda ayrıca sistolik kan basıncı değeri mutant GG genotipli hastalara göre istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Serum HDL-K, VLDL-K, VKİ ve diastolik kan basıncı değerleri açısından hasta grubunda PCSK9 gen varyantlarının anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir.

**Tablo 3:** Koroner Arter Hasta ve Kontrol grubunda PCSK9 E670G varyantına göre beden kütle indeksi, kan basınçları ve serum lipoprotein değerleri

		TC	TG	HDL-K	LDL-K	VLDL-K	BKİ	SKB	DKB
Hasta	PCSK9 E670G A allele	244.50 ±6.36**	169.50 ±78.48	53.50 ±13.43	157.00 ±8.48*	34.00 ±15.55	29.00 ±0.0	150.00 ±0.00***	95.00 ±7.07
	PCSK9 E670G G allele	210.87 ±58.28	139.27 ±113.85	45.91 ±12.87	129.02 ±36.56	28.69 ±29.42	26.06 ±3.60	132.71 ±30.72	81.84 ±17.77
Kontrol	PCSK9 E670G A allele	189.17 ±94.84	111.17 ±62.61	49.40 ±7.30	151.20 ±73.95	24.20 ±13.16	24.36 ±1.53	132.85 ±26.90	80.00 ±10.00
	PCSK9 E670G G allele	189.35 ±63.48	144.58 ±67.69**	40.42 ±18.15	121.52 ±55.03	28.44 ±13.36**	25.59 ±3.76	122.38 ±18.48	75.00 ±15.38

TC: Total kolesterol, TG: Triglisericid, HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol, LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol, VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol, BKİ: Beden kütle indeksi, SKB: Sistolik kan basıncı, DKB: Diastolik kan basıncı, \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$ .

## Tartışma

Koroner kalp hastalıkları gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır. Hastalığın en önemli nedenlerinden biri olan hiperlipidemi tedavisi için kullanılan ilaçlar (statin)'e verilen cevaplar bireyler arası farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların nedeni genetik faktörlerdir. PCSK9'un normal fonksiyonu LDLR'yi degrade etmektir. Bu nedenle PCSK9 fonksiyon kaybı mutasyonları düşük kolesterol seviyelerine ve artmış statin cevabına neden olurken, PCSK9 fonksiyon kazanımı mutasyonları otozomal dominant hiperkolesterolemi ve artmış kalp hastalıkları hasarına yol açmaktadır.

Yapılan çalışmalarda fare karaciğerinde WT veya mutant PCSK9'un fazla ekspresyonunun, mRNA düzeylerinde herhangi bir düşüş olmaksızın LDLR'ünün protein seviyelerinde belirgin bir düşüşe neden olduğunun gösterilmesinden sonra PCSK9 KAH tedavisinde büyük bir hedef olarak tanımlanmıştır<sup>4,7</sup>.

PCSK9 N425S mutasyonu, adipokin resistin ile homoloji gösteren ve protein-protein etkileşimlerine aracılık ettiği düşünülen PCSK9 proteininin C-terminal alanındadır<sup>19</sup>. Bu bölge, LDLR'nin epidermal büyüme faktörü benzeri tekrarlaması-A (EGF-A)'sına doğrudan bağlanmaya dahil olmamış gibi görünse de bu alandaki mutasyonlar, salgılanmış PCSK9'un LDLR üzerindeki etkinliğini etkileyebilir. LDLR'ünün EGFA alanı ve PCSK9'un katalitik alanı arasında doğrudan bir etkileşim vardır<sup>20</sup>.

Fasano ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, PCSK9 N425S mutantlarının WT PCSK9'a kıyasla, LDLR'yi azaltma kapasitelerinde küçük fakat önemli bir artış olduğu sonucuna varmışlardır<sup>21</sup>.

Pisciotta ve arkadaşları ailesel hiperkolesterolemili hastada PCSK9 N425S ve Y419X yanlış anlamlı mutasyonları inceledikleri çalışmalarında bu varyantların LDLR mutasyonu varlığı ile birlikte daha yüksek plazma LDL-K seviyelerine katkıda bulduklarını ve bu nadir yanlış anlamlı mutasyonların LDLR mutasyonu taşıyan hastalarda klinik fenotipi kötüleştirebileceklerini öne sürmüşlerdir<sup>18</sup>. PCSK9 N425S polimorfizmi dağılımlarında hasta ve kontrol gruplarında sadece NN normal homozigot genotipi gözlenmiştir. Bu nedenle PCSK9 N425S yanlış anlamlı mutasyonunun serum lipid profili üzerindeki etkisini değerlendiremedik. Pisciotta ve ark N425S

mutasyonunun ailesel hiperkolesterolemili hastalarda 425S varyantının LDLR mutasyonu varlığı ile birlikte daha yüksek plazma LDL-K'üne katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir<sup>18</sup>. Daha büyük örnek sayısından oluşan çalışma grupları oluşturarak varyant alleli gözlemlemeyi ve varyantın bizim toplumumuzda lipid profiline etkisini belirlemeyi hedefliyoruz.

Evans ve ark. Alman toplumunda 506 kişide yaptığı taramada PCSK9 geninde E670G polimorfizmini incelemişlerdir. Çalışmalarında AA, AG ve GG genotiplerinin frekansını sırasıyla 458,45 ve 3 olarak, varyant G allel frekansını ise 0.05 olarak bulmuşlardır. G allel frekansını erkeklerde kadınlara göre daha yüksek gözlemlemişlerdir. E670G G allelinin erkeklerde daha yüksek LDL-K düzeyleri ile ilişkili olduğunu ( $p=0.01$ ), ancak kadınlarda ilişkili olmadığını ve sonuç olarak PCSK9 E670G SNP'nin Avrupalı erkeklerde poligenik hiperkolesteroleminin etkenlerinden biri olduğunu bildirmişlerdir<sup>17</sup>. Chen ve ark. 2005 yılında %90 beyaz, %10 beyaz olmayan 310 kadın, 62 erkek toplam 372 bireyden oluşan Lipoprotein Koroner Ateroskleroz Çalışması (LCAS)'nda PCSK9 geninde 6 polimorfizm ile koroner aterosklerozun biyokimyasal, anjiyografik fenotipleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmalarında LCAS grubunu biraz daha yaşlı ( $p=0.065$ ), %34'ü kadın olan ve %79'u beyaz ırka mensup 319 kişiden oluşan TexGen çalışma grubuyla karşılaştırmışlardır. Haplotip yapı analizi sonrası E670G'nin belirleyici varyant olarak doz etkisi gösterdiğini (GG>EG>EE) ve plazma LDL-K değişiminin %3.5'undan sorumlu olduğunu bildirmişlerdir ( $p<0.001$ ). LCAS popülasyonunda E670G SNP AA, AG ve GG genotiplerinin dağılımını sırasıyla 324, 41 ve 7 olarak, TexGen grubunda ise 291,28 ve 0 olarak bildirmişlerdir. Varyant G allel frekansı LCAS grubunda 0.074, TexGen grubunda ise 0.044'tir. Plazma total kolesterol, apolipoprotein B ve lipoprotein (a) düzeyleri de E670G varyantı ile ilişkili bulunmuştur. Yaş, cinsiyet, etnik köken, ağırlık, boy, beden kütle indeksi, sistolik ve diastolik kan basınçları, diyabet hikayesi ve sigara tüketiminin yer aldığı demografik değişkenler ve PCSK9 SNP'ler arasında ise anlamlı ilişki gözlememişlerdir. Tedavi-genotip etkileşimi gözlenmezken, E670G varyantının plazma LDL-K düzeylerinin ve koroner ateroskleroz ciddiyetinin bağımsız belirleyicisi olduğunu tanımlamışlardır<sup>22</sup>.

PCSK9 proteini bir sinyal peptid, (1-30 aa), pro-segment (31-147 aa), katalitik (148-425 aa) ve sisteinden-zengin C-terminal (526-691 aa) domenden oluşur. İnsan PCSK9 enzimi bir zimojen olarak sentezlenir ve endoplazmik retikulumdan dışarı çıkabilmesi

için gerekli bir aşama olan otokatalitik intramoleküler işlenmeye uğrar. E670G SNP otokatalitik işlenmenin regülasyonunda görevli sisteinden zengin C-terminal domende lokalize olduğundan bu domenin delesyonu işlenmiş PCSK9'un birikimine neden olur. Bu şekilde plazma LDL-K düzeylerinde artışa neden olduğu önerilmektedir<sup>22</sup>.

Abboud ve ark. Belçikalı büyük-damar aterosklerozlu ve küçük-damar oklüzyonlu 237 iskemik inme hastasında PCSK9 E670 SNP'yi incelemişlerdir. Nadir G allel frekansını iskemik inme hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek frekansta gözlemişlerdir (%8.1→%4.3). Özellikle büyük-damar aterosklerozlu hastalarda G allel frekansı daha yüksektir (%10.3). E670G G allelinin küçük-damar oklüzyonu gelişiminde ise risk oluşturmadığını bildirmişlerdir<sup>23</sup>.

Çalışmamızda, ileri kıkare analizi ile yapılan istatistiksel incelemede PCSK9 E670G G allel frekansının, hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığa yakın seviyede yüksek olduğu gözlenmiştir.

PCSK9 E670G polimorfizmi ile koroner arter hastalığı gelişim riskini gösteren bulgularımız ise Chen ve ark.'nın<sup>22</sup> Abboud ve ark.'nın<sup>23</sup> ve Evans ve ark.'nın<sup>17</sup> verileriyle uyumludur. Çalışmamızda PCSK9 E670G mutant G allel taşıyan kontrollerde de E670G normal AA genotipi taşıyan bireylere göre serum trigliserid ve VLDL-K konsantrasyonları yüksek bulunmuştur. PCSK9 E670G normal A alleleline sahip hastalarda serum total kolesterol düzeyi mutant GG genotipi taşıyan hastalara göre yüksektir. PCSK9 E670G normal A alleli taşıyan hastalarda ayrıca sistolik kan basıncı değeri mutant GG genotipli hastalara göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. Serum HDL-K, VLDL-K, BKİ ve diastolik kan basıncı değerleri açısından hasta grubunda PCSK9 gen varyantlarının anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Demografik ve çevresel etmenler ile PCSK9 E670G polimorfizminin ilişkisini değerlendiren bulgularımız Chen ve ark.'nın<sup>22</sup> verileriyle uyumlu iken Evans ve ark.'nın<sup>17</sup> bulgularıyla uyumlu değildir. Bulgularımızın diğer araştırma bulgularından farklılığının çalışma gruplarının etnik ve sayısal farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Koroner arter hastalarında erkek cinsiyetinde olanlarda PCSK9 E670G A allel frekansı kontrol grubundaki erkek hastalara daha yüksek gözlenmiştir. Bulgumuz erkek cinsiyetinde olan ve PCSK9 E670G A alleli taşıyan bireylerde koroner arter hastalığı gelişim riskinin arttığını göstermektedir. Koroner arter hastalarında sigara kullanımı ve PCSK9 E670G

polimorfizminin bireysel ve birlikte KAH gelişim görel riski üzerine etkileri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

## Sonuç

Sonuç olarak, çalışmamız Türk toplumunda PCSK9 gen varyantlarının incelendiği ilk araştırmadır. Koroner kalp hastalarında PCSK9 E670G normal A alleli yüksek serum total-kolesterol düzeyi yüksek hiperkolesterolemi sıklığı ile ilişkili bulunmuştur. PCSK9 varyantlarının serum lipoprotein parametreleri üzerinde etkisi gözlenmiştir. PCSK9 gen varyantları ile hipertansiyon ilişkisinin daha kapsamlı olarak araştırılmaya gereksinimi vardır. Koroner kalp hastalığı gelişiminde gözlenen etkinin de daha büyük örnek gruplu bir araştırmada incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Erkek cinsiyetinin PCSK9 varyantlarının koroner kalp hastalığı riski üzerindeki etkilerini modifiye edebileceği izlenimi elde edilmiştir. Sonuç olarak, PCSK9 varyantlarının KAH'da lipoprotein metabolizmasını olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- 1) Thirumalai T, Tamilselvan N, David E. Hypolipidemic activity of Piper betel in high fat diet induced hyperlipidemic rat. *J Acute Disease*. 2014;(3):131–135. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(14\)60029-9](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(14)60029-9).
- 2) Abifadel M, Varret M, Rabès JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34(2):154–156. doi: 10.1038/ng1161.
- 3) Lalanne F, Lambert G, Amar MJ, et al. Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apo B-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J Lipid Res*. 2005;46(6):1312-1319. doi: 10.1194/jlr.M400396-JLR200.
- 4) Park SW, Moon YA, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low-density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem*. 2004;279(48):50630–50638. doi: 10.1074/jbc.M41007200.

- 5) Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(3):928-933. doi: 10.1073/pnas.0335507100.
- 6) Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(8):1454-1459. doi: 10.1161/01.ATV.0000134621.14315.43.
- 7) Maxwell KN, Fisher EA, Breslow JL. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(6):2069–2074. doi: 10.1073/pnas.0409736102.
- 8) Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: Zymogen cleavage and effects on the low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*. 2004;279(47):48865-48875. doi: 10.1074/jbc.M409699200.
- 9) Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of PCSK9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(18):7100-7115. doi: 10.1073/pnas.0402133101.
- 10) Horton JD, Shah NA, Warrington JA, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(21):12027-12032. doi: 10.1073/pnas.1534923100.
- 11) Leren, TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet*. 2004;65(5):419–422. doi: 10.1111/j.0009-9163.2004.0238.x.
- 12) Sun XM, Eden ER, Tosi I, et al. Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet*. 2005;14(9):1161–1169. doi: 10.1093/hmg/ddi128.
- 13) Timms KM, Wagner S, Samuels ME, et al. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet*. 2004;114(4):349–353. doi: 10.1007/s00439-003-1071-9.

- 14) Zhao ZY, Tuakli-Wosornu TA, Lagace L, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet.* 2006;79(3):514–523. doi: 10.1086/507488.
- 15) Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet.* 2005;37(2):161–165. doi: 10.1038/ng1509.
- 16) Welder G, Zineh I, Pacanowski MA, et al. High-dose atorvastatin causes a rapid sustained increase in human serum PCSK9 and disrupts its correlation with LDL cholesterol. *J Lipid Res.* 2010;51(9):2714-2721. doi: 10.1194/jlr.M008144.
- 17) Evans D, Beil FU. The E670G SNP in the PCSK9 gene is associated with polygenic hypercholesterolemia in men but not in women. *BMC Med Genet.* 2006;(31):7-66. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-7-66>.
- 18) Pisciotta L, Priore Oliva C, Cefalù AB, et al. Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2006;186(2):433-440. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.015.
- 19) Hampton EN, Knuth MW, Li J, et al. The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(37):14604-14609. doi: 10.1073/pnas.0703402104.
- 20) Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem.* 2007;282(25):18602-18612. doi: 10.1074/jbc.M702027200.
- 21) Fasano T, Sun XM, Patel DD, Soutar AK. Degradation of LDLR protein mediated by ‘Gain of function’ PCSK9 mutants in normal and ARH cells. *Atherosclerosis.* 2009;203(1):166–171. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.027.
- 22) Chen SN, Ballantyne CM, Gotto AM Jr, et al. A common PCSK9 haplotype, encompassing the E670G coding single nucleotide polymorphism, is a novel genetic marker for plasma low-density lipoprotein cholesterol levels and severity of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(10):1611-1619. doi: 10.1016/j.jacc.2005.01.051.

- 23) Abboud S, Karhunen PJ, Lütjohann D, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gene is a risk factor of large-vessel atherosclerosis stroke. *PLoS ONE*. 2007;2(10):e1043.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001043>.