

Cardiovascular diseases and miRNA

Kardiovaskulárne ochorenia a miRNA

Rabajdová M¹, Urban P¹, Špaková I¹, Sabol F², Mareková M¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta, Košice, Slovenská republika

Rabajdová M, Urban P, Špaková I, Sabol F, Mareková M. **Cardiovascular diseases and miRNA.** Cardiology Lett. 2016;25(3):185–189

Abstract. Micro RNA (miRNA) plays an important role in the pathogenesis of many cardiovascular diseases e.g. cardiac fibrosis, hypertrophy, remodeling and reparation of post-ischemic injury, or myocardial infarction (MI). Several studies associate regulation of the expression of specific miRNAs, or disruption of the functional components of the RNA interference mechanism, with occurrence of diseases of the cardiovascular and circulatory system. This review article summarizes the basic understanding of miRNA biogenesis during organogenesis and physiological expression of specific miRNAs in comparison to their expression in a variety of cardiovascular diseases such as e.g. coronary atherosclerosis and dilated cardiomyopathy. Results of miRNA analyses contribute to the improvement of knowledge about the pathogenesis of cardiovascular diseases at various levels, bring remarkable optimism not only as to the possibility of their usage as diagnostic molecules, but also as therapeutic targets. Fig. 2, Ref. 23, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: micro RNA – cardiovascular diseases – myocardium

Rabajdová M, Urban P, Špaková I, Sabol F, Mareková M. **Kardiovaskulárne ochorenia a miRNA.** Cardiology Lett. 2016;25(3):185–189

Abstrakt. Mikro RNA (miRNA) zohráva dôležitú úlohu pri patogenéze mnohých kardiovaskulárnych ochorení, napríklad srdcovej fibróze, hypertrofii, prestavbe a oprave post-ischemických poškodení, či pri infarkte myokardu (MI). Viaceré štúdie asociojú dereguláciu expresie konkrétnych miRNA, alebo narušenie mechanizmu interferencie RNA so vznikom ochorení kardiovaskulárneho a obehového systému. Táto prehľadová práca sumarizuje základné poznatky o biogenéze miRNA počas organogenézy a fyziologickej expresie špecifických miRNA v porovnaní s ich expresiou pri rôznych srdcovocievnych ochoreniach, ako napríklad koronárna ateroskleróza a dilatčná kardiomyopatia. Výsledky analýz miRNA prispievajú na rôznych úrovniach k rozšíreniu poznatkov o patogenéze kardiovaskulárnych ochorení a prinášajú nové možnosti ich využitia tak v diagnostike, ako aj terapii. Obr. 2, Lit. 23, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: mikro RNA – kardiovaskulárne ochorenia – myokard

Vysoká morbidita a mortalita kardiovaskulárnych ochorení je v ostatnom čase hnacím motorom výskumu nových markerov a signálnych molekúl zapojených do regulácie bunkového cyklu, diferenciácie, ontogenézy a apoptózy. Do popredia sa dostali najmä špecifické molekuly, ako napríklad malé interferujúce RNA (siRNA) a mikroRNA (miRNA). Zistilo sa, že expresia genetickej informácie je pod prísnou kontrolou post-transkripč-

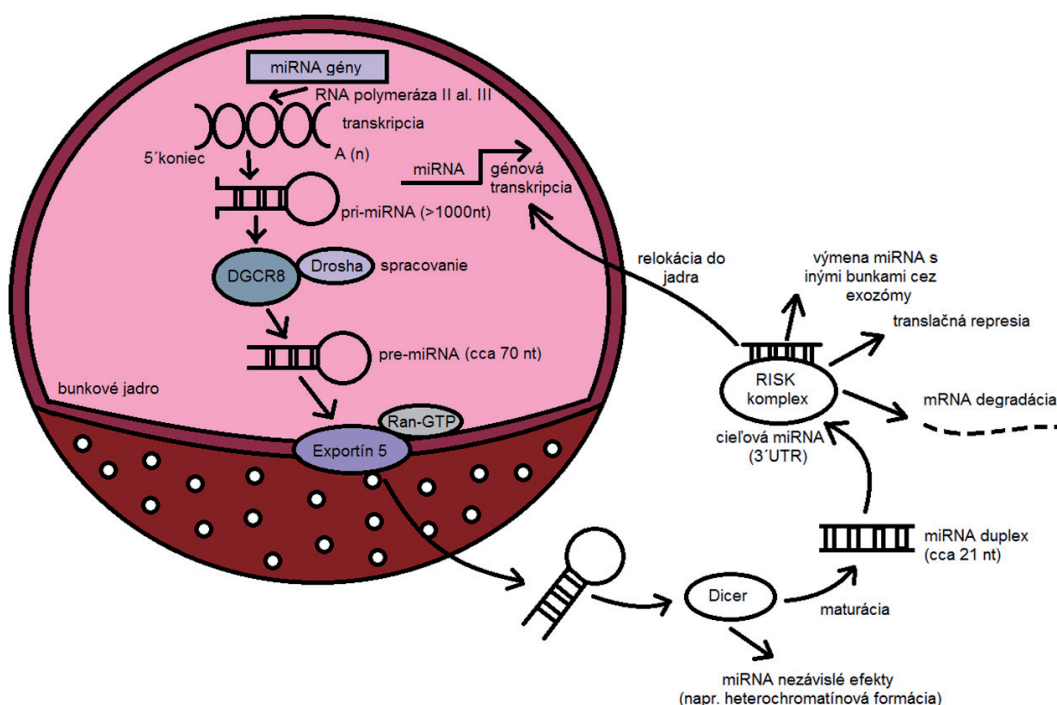
ných regulačných mechanizmov, ktoré zabezpečujú špecifickú aktiváciu, respektíve inhibíciu expresie určitých génov. Viaceré štúdie asociojú dereguláciu expresie konkrétnych miRNA, alebo narušenie mechanizmu interferencie RNA so vznikom ochorení kardiovaskulárneho a obehového systému (1).

Úlohy špecifických miRNA exprimovaných počas organogenézy sú do značnej miery stále neznáme. Použitím *in*

Z ¹Ústavu lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta, Košice a ²Kliniky srdcovej chirurgie UPJŠ LF a VÚSCH, a. s., Košice, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 26. novembra 2015; prijaté dňa 9. marca 2016

Adresa pre korešpondenciu: MUDr. Mária Mareková, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Tr. SNP 1, 040 11 Košice, Slovenská republika, e-mail: maria.marekova@upjs.sk



Obrázok 1 Biogenéza miRNA

Figure 1 Biogenesis of miRNA

vitro a *in vivo* modelov sa dokázalo, že špecifické typy miRNA plnia konkrétne úlohy počas fyziologických procesov kardiovaskulárneho vývoja, ale aj pri patologických stavoch (2 – 5). Táto prehľadová práca sumarizuje základné poznatky o biogenéze miRNA počas organogenézy a fyziologickej exprese špecifických miRNA v porovnaní s ich expresiou pri vybraných srdcovocievnych ochoreniach (napríklad koronárna ateroskleróza a dilatčná kardiomyopatia). Štúdium mechanizmu interferencie nekódujúcich RNA môže prispieť k vývoju nových diagnostických postupov, založených na cílení utlmovaní génovej exprese.

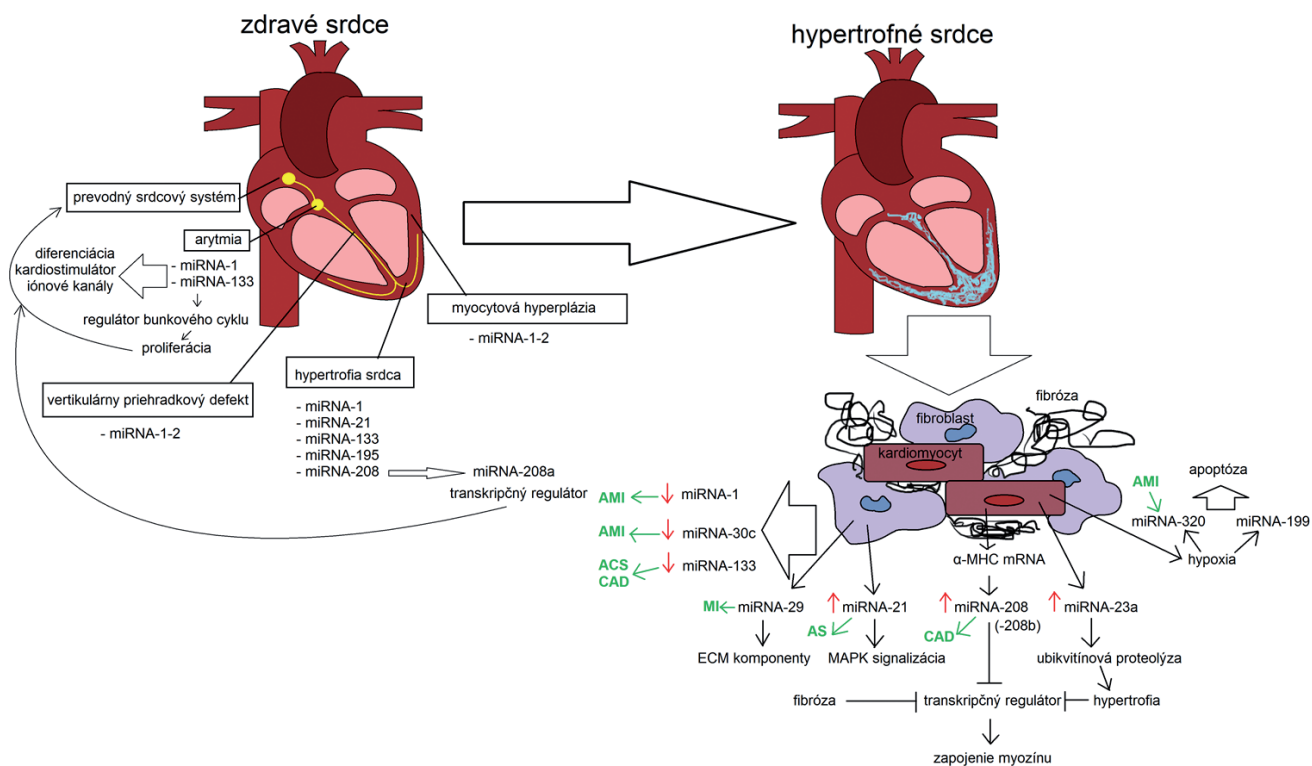
Biogenéza špecifických miRNA počas organogenézy a fyziologickej exprese

Veľkosť malých, endogénnych, jednovláknových RNA molekúl (miRNA) sa pohybuje v rozmedzí 21 –23 nukleotidov. Vznikajú v jadre a cytoplazme pôsobením ribonukleáz III (DROSHA a DICER) z primárneho transkriptu (pri-miRNA) cez vlásenkovú prekurzorovú štruktúru (pre-miRNA) (obrázok 1). Patria do skupiny nekódujúcich molekúl RNA, ktoré môžeme všeobecne rozdeliť do troch hlavných skupín: miRNA, siRNA a PIWI interagujúce RNA (piRNA) (6).

Molekuly siRNA sú odvodené z dlhých, dvojvláknových RNA molekúl, alebo dlhých štruktúr stem-loop. Ich základ-

nou úlohou je posttranskripčná supresia transkriptu, a tým regulácia génovej exprese. Prostredníctvom miRNA teda dochádza k regulácii diferenciácie, proliferácie a apoptózy (7, 8).

Početné štúdie poukazujú na nezanedbateľnú úlohu miRNA-1 a miRNA-133 pri fyziologických a funkčných procesoch fetálneho myokardu počas organogenézy. Zo spoločných bicistrónových transkriptov, respektíve na separovaných chromozómoch u stavovcov boli generované miRNA-1, miRNA-1s, miRNA-1-1, miRNA-1-2, miRNA133a1, miRNA-133a2 (9). Významným regulátorom srdcového rytmu a proliferácie fetálnych skeletálnych svalov je miRNA-1, ktorá pôsobí cielene na Delta-Like proteín 1 (DLL-1), čím podporuje diferenciáciu embryonálnych kmeňových buniek (ESC, Embryonic Stem Cells) v srdci. Prostredníctvom modulácie exprese nervových iónových kanálov v srdcovej svalovine ovplyvňuje miRNA-1 srdcový rytmus a remodeláciu (10). V adultnom tkanive však miRNA-1 znižuje diferenciáciu prostredníctvom regulácie exprese Kruppel-Like faktora 4 (KLF4) (11). Naopak, špecifické formy miRNA-133 tento proces inhibujú. Delécia izoforiem miRNA-133a1 a miRNA-133a2 vedie počas zlyhania srdca k supresii mnohých sarkomérovo-asociovaných génov, špecifických pre hladkú svalovinu. Uvedené protichodné účinky miRNA-1 a miRNA-133 na diferenciáciu a proliferáciu hladkej svaloviny sa potvrdili aj na kardiomyocytových bunkových líniiach (12, 13).



Obrázok 2 Prehľad miRNA zúčastňujúcich sa fyziologických a patologických procesov srdca

Figure 2 Overview of miRNA participating during the physiological and pathological processes of the heart

Kardiomyocytová proliferácia vplyvom miRNA-1 v procese organogenézy môže byť zabezpečená aj alternatívnou reguláciou prostredníctvom estrogénového receptora β (Err β , Estrogen Related Receptor β), čo vedie k deregulácii expisie mnohých sarkomérovo-asociovaných génov, ako sú tropomyozín 2 (Tpm2), myozín ťažkého reťazca 7 (Myh7, Myosin, Heavy Chain 7), myozín ľahkého reťazca 7 (Myl7, Myosin, Light Chain 7), a aktínu alfa 2 (Acta2, Actin, alpha 2), expímácia ktorých v adultnom tkanive srdca klesá. Uvedená väzba miRNA-1 - Err β reguluje glykolýzu, glukoneogénu, glykogenolýzu a plodové sarkomérovo-asociované proteíny (14). Zvýšená postnatálna expresia Tpm2 negatívne ovplyvňuje srdcovú kontrakciu a relaxáciu. Zvýšená expresia fetálnych sarkomérovo-protéínov vyvolaná stratou miRNA-1 v postnatálnom srdci ovplyvňuje štruktúru sarkomérov. Dochádza k zníženiu myokardiálnej efektivity a následne k progresii kardiálnej-myopatie. Molekuly miRNA majú multifaktoriálnu úlohu nielen v represii fetálneho genetického programu, ale aj počas postnatálnej periódy života. Prehľad jednotlivých miRNA a ich úloh pri fyziologických a patologických procesoch srdca je uvedený na **obrázku 2**.

Jednou z ďalších miRNA, ktoré sa zapájajú do organogenézy srdca, je miRNA-138, ktorá je tkanivovo špecificky exprimovaná a plní kľúčovú úlohu v regulácii remodelácie

srdcového svalu (15). Medzi miRNA transkribované z dvojgénových oblastí zaradujeme aj miRNA-143/145, ktoré sú charakteristické vzájomne odlišnou sekvenciou. Tieto miRNA majú kľúčovú úlohu v modulácii fenotypov cievnych buniek hladkého svalstva (VSMC, Vascular Smooth Muscle Cells) a v diferenciácii, proliferácii alebo migrácii endotelových buniek ciev. Obe uvedené formy miRNA-143/145 ovplyvňujú expresiu mnohých regulačných génov, ktoré sa podieľajú napríklad na regulácii aktivity sérových reakčných faktorov (SRF, Serum Response Factors) a aktínovej dynamiky na podporu diferenciácie, ale aj na inhibícii proliferácie VSMC a modulácii syntézy cytoskeletárnych proteínov (16).

Expresia špecifických miRNA pri vzniku a progresii koronárnej aterosklerózy

Zmeny energetického metabolizmu kardiomyocytov majú zásadný vplyv na vznik a priebeh patologických stavov srdca. Expresné profily miRNA boli opísané pri mnohých srdcovocievnych ochoreniach, ako napríklad hypertrofia, zlyhanie srdca, ischemická kardiomyopatia, alebo infarkt myokardu.

Multifaktoriálna podmienenosť srdcovocievnych ochorení determinuje úlohu mnohých miRNA, ktoré majú dôležitú

úlohu pri regulácii metabolických rizikových faktorov (napríklad cholesterol, hormóny), pri kontrole reakčnej odpovede na akútne kardiovaskulárne príhody (napríklad zápal, hypoxia) a pri progresii ochorenia. Na začiatku miRNA regulujú metabolizmus pro- alebo antiaterogénnych efektov v rôznych orgánoch. Vysoká hladina LDL a nízka hladina HDL cholesterolu sú nezávislé rizikové faktory vzniku aterosklerózy a pridružených komplikácií. Najafi-Shoushtari et al. (17) na knock-down líniiach myocytov zistili, že miRNA-33 pôsobí na reguláciu hladiny sterolov prostredníctvom expresie sterolového regulačného elementu viažuceho proteíny (SREBP, Sterol Regulatory Element Binding Proteins). Práca Ramíreza et al. (18) naznačuje, že miRNA-144 reguluje hladinu cholesterolu potlačením aktivity ATP viažuceho transportéra (ABCA, ATP-Binding Cassette Transporter) a moduláciou miRNA, čo naznačuje terapeutický potenciál pri liečbe dyslipidémie, aterosklerózy, ale aj iných vaskulárnych ochorení. V pečeni je vo veľkom množstve exprimovaná miRNA-122, kontrolujúca hladinu lipoproteínov LDL a HDL, predovšetkým nepriamou moduláciou syntézy cholesterolu.

V ostatných rokoch rôzne štúdie identifikovali viacero rizikových faktorov koronárnej aterosklerózy, ako sú napríklad hypertenzia, dyslipidémia, obezita, hyperglykémia, diabetes, nezdravý životný štýl, fajčenie, nezmyselné diéty, nadmerné pitie. Zápal cievnej steny indukovaný uvedenými vplyvmi je regulovaný početnými miRNA, vrátane miRNA-126, miRNA-143/145, miRNA-155 a miRNA-342-5p. Napríklad miRNA-126 v endotelových bunkách (EC, Endothelial Cells) sa priamo zameriava na 3' antisence oblasť cievnej bunkovej adhézne molekuly 1 (VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecule 1). Inhibícia miRNA-126 zvyšuje reguláciu expresie VCAM-1 udržiavaním prítomnosti leukocytov a stimuláciou ich migrácie v EC. Okrem toho, EC apoptické telieska obsahujú miRNA-126, ktorá potláča regulátor G proteínovej signalizácie 16 (RGS16, Regulator of G-Protein Signaling) a inhibuje v artériách expresiu zápalového chemokínu 12 s motívom CXC (CXCL12, C-X-C Motif Chemokine 12). Bola pozorovaná inhibícia, čiastočná reparácia zápalových procesov a stabilizácia aterosklerotických plakov, ako dôsledok zníženia počtu zápalových buniek (19).

Expresia špecifických miRNA pri vzniku a progresii dilatlačnej kardiomyopatie

Dilatačná kardiomyopatia (DCM) predstavuje hlavnú príčinu úmrtia u pacientov s muskulárnou dystrofiou (MD). Toto ochorenie je charakterizované dilatáciou všetkých štyroch oddielov srdca, najmä však ľavej komory a zníženou kontraktilitou srdcovej svaloviny. Medzi najdiskutovanejšie príčiny jej vzniku patria abnormality v štruktúre sarkomér, znížená produkcia energie bunkami srdcového svalu, abnor-

málna funkcia cytoskeletu, alebo genetická predispozícia. Medzi príznaky tohto ochorenia patria srdcové zlyhanie, arytmia a hypoxia. Vznik DCM väčšinou nie je asociovaný s výraznými patologickými prejavmi. Prvé príznaky pokročilého patologického procesu sa často prejavujú napríklad cievnu mozgovou príhodou, pľúcnou embóliou alebo infarktom myokardu.

U pacientov s dilatačnou kardiomyopatiou boli identifikované viaceré metabolické abnormality, napríklad mitochondriálne syndrómy, alebo genetické defekty, napríklad mutácie v regulácii srdcového ATP-senzitívneho K^+ kanálu (K_{ATP}). Deregulácia K_{ATP} zvyšuje intenzitu glykolýzy, ktorá negatívne ovplyvňuje schopnosť K_{ATP} regulovať energetický potenciál a membránové podráždenie kardiomyocytov, čo môže viesť k zmene expresie miRNA-1. Medzi ďalšie negatívne faktory ovplyvňujúce funkciu srdcových miRNA-1 patrí aj akumulácia glykogénu. Vysoké koncentrácie glykogénu sú často asociované s klinickými manifestáciami kardiomyopatií, čo sa preukázalo u pacientov trpiacich familiárnou hypertrofickou kardiomyopatiou tzv. Pompeho syndrómom.

V skorých štádiách DCM bola detegovaná zvýšená expresia špecifických miRNA (20). Významne zvýšené hladiny expresie, ktoré môžu mať rozhodujúcu úlohu v patofyziológii srdcového zlyhania, vykazovali miRNA-19b, miRNA-302D a miRNA-340. Predchádzajúce štúdie ukázali, že miRNA-19a a 19b sú členmi klastra miRNA17-92, ktorý reguluje expresiu proteínov extracelulárnej hmoty (ECM, Extracellular Matrix), ako napríklad rastového faktora spojivového tkaniva (CTGF, Connective Tissue Growth Factor) a trombospondínu 1 (TSP-1), ktorých zvýšená expresia bola detegovaná pri infarkte myokardu (21). Do regulácie signalizačných dráh transformujúceho rastového faktora β (TGF β , Transforming Growth Factor- β), sa zapája miRNA-302, ktorá inhibuje expresiu fibronektínu a trombospondínu (22). Androulidaki et al (23, 24) zistili vo vzorkách pacientov s DCM zvýšenú expresiu miRNA-181c, ktorá sa podieľa na aktivácii zápalovej odpovede prostredníctvom regulácie expresie serín/treonínovej proteín kinázy 1 (Akt1, RAC-Alpha serine/Threonine-protein Kinase1). Z uvedených miRNA mala najväčšiu detegovanú hladinu expresia miRNA-340, ktorá význačne ovplyvňovala štruktúru a tvar kardiomyocytov.

Záver

Napriek súčasnému pokroku v poznaní mnohých úloh miRNA vo vývoji srdca a ciev sa pri štúdiu molekulových mechanizmov procesu interferencie nekódujúcich RNA stále vynárajú mnohé nezodpovedané otázky. Doteraz bola funkčne opísaná len veľmi malá časť molekúl miRNA, ktoré sú exprimované v kardiovaskulárnom systéme. Identifikácia ďalších miRNA a následná analýza ich cieľových funkcií by mohla poskytnúť inovatívny pohľad nielen na mechanizmus

kardiovaskulárneho vývoja, ale aj na jeho funkcie/dysfunkcie. Poznanie, že miRNA má dôležitú úlohu v modulácii tak dedičných, ako aj získaných kardiovaskulárnych ochorení, poskytuje nový pohľad na kardiovaskulárne príhody a nabáda k ich ďalšiemu, detailnejšiemu štúdiu. Molekuly miRNA možno vnímať ako novú, inovatívnu možnosť štúdia mechanizmov bunkového metabolismu s veľkým potenciálom tak v diagnostike, ako aj terapii.

Práca vznikla pri riešení projektu VEGA 1/0115/14.

Literatúra

1. Kusenda B, Pospíšilová Š. RNA interferencia – nový nástroj génovej terapie. *Neurol. pro praxi* 2006;2:69-71.
2. Srivastava D, Masaki I. Critical factors for cardiac reprogramming. *Circ Res* 2012;111:5-8.
3. Kataoka M, Wang DZ. Non-coding RNAs including miRNAs and lncRNAs in cardiovascular biology and disease. *Cells* 2014;3:883-898.
4. Boon RA, Dimmler S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol* 2015;12:135-142.
5. Schulte Ch, Zeller T. MicroRNA-based diagnostics and therapy in cardiovascular disease – Summing up the facts. *Cardiovasc Diagn Ther* 2015;5(1):17-36.
6. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:509-524.
7. Wei Y, Peng S, Wu L M, Sachidanandam R, Tu Z, Zhang S, Falce C, Sobie EA, Lebeche D, Zhao Y. Multifaceted roles of miR-1s in repressing the fetal gene program in the heart. *Cell Res* 2014;24:278-292.
8. Ross A. Breckenridge. Molecular control of CardiacFetal/Neonatal Remodeling. *J. Cardiovascular. Dev. Dis.* 2014;1:29-36.
9. Wystub K, Besser J, Bachmann A, et al. miR-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development. *PLoS Genet* 2013;9(9):e1003793.
10. Heidersbach A, Saxby C, Carver-Moore K, et al. microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. *Elife* 2013;2:e01323.
11. Xie C, Huang H, Sun X, Guo Y, Hamblin M, Ritchie RP. MicroRNA-1 regulates smooth muscle cell differentiation by repressing KLF4. *Stem Cells Dev* 2010;20(2):205-210.
12. Zampetaki A, Attia R, Mayr U, et al. Role of miR-195 in Aortic Aneurysmal Disease. *Circ Res* 2014;115(10):857-866.
13. Dong L, Chen Ch, Huo R, Wang N, Li Z, Tu Y-J, Hu J-T, Chu X, Huang W, Yang B-F. Reciprocal repression between MicroRNA-133 and calcineurin regulates cardiac hypertrophy. A novel mechanism for progressive cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2010;55:946-952.
14. Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor. Implications for a role of MicroRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res* 2009;104:170-178.
15. Wu G, Huang ZP, Wang DZ. MicroRNAs in cardiac regeneration and cardiovascular disease. *Sci China Life Sci* 2013;56:907-913.
16. Kazu Kikuschi, Advances in understanding the mechanism of zebrafish heart regeneration. *Stem Cell Research.* 2014;3:542-555.
17. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, Naar AM. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010;328:1566-1569.
18. Ramirez CM, Rotllan N, Vlassov AV, et al. Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. *Cir Res* 2013;112(12):1592-1601.
19. Bronze-da-Rocha E. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases. *BioMed Res Int* 2014;2014:1-23.
20. Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation* 2009;119:1263-1271.
21. van Almen GC, Verheesen W, van Leeuwen RE. MicroRNA-18 and microRNA-19 regulate CTGF and TSP-1 expression in age-related heart failure. *Aging Cell* 2011;10:769-779.
22. Faherty N, Curran SP, O'Donovan H. CCN2/CTGF increases expression of miR302 microRNAs, which target the TGFbeta type II receptor with implications for nephropathic cell phenotypes. *J Cell Sci.* 2012;125:5621-5629.
23. Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* 2009;31:220-231.
24. Goncalvesová E.: Zlyhávanie srdca. Bratislava, ProLitera 2015, 606 s.