

MicroRNA – Information about myocardial damage or biomarker of heart failure?

MikroRNA – informácia o poškodení myokardu, alebo biomarker zlyhávania srdca?

Valášková Z¹, Mladosičová B¹, Maruščáková L², Hulín I¹

¹Ústav patologickej fyziológie LF UK v Bratislave, Slovenská republika

Valaskova Z, Mladosičova B, Marusackova L, Hulin I. **MicroRNA – Information about myocardial damage or biomarker of heart failure?** CardiologyLett. 2017;26(5):299–302

Abstract. Heart failure (HF) is a complex syndrome. An adaptive process for the maintenance of cardiac output is associated with the cardiomyocytes hypertrophy, cardiomyocytes apoptosis and myocardial fibrosis. The main problem is the decrease of contractile function and the cardiac remodeling. The high heterogeneity of risk factors is probably the cause of that, at this time, it is not possible to clinically exactly define the signalization profile of the failing heart. It is not clear which changes are the cause and which are the consequence of HF. The subcellular changes raised mainly in the progression of HF. Molecular and cellular mechanisms are accompanied with the activation of embryo-fetal gene program.

In heart, there have been detected more than 200 types of microRNA (miRNA), that are important gene expression regulators throughout the cardiac development and they are directly involved in the initiation and the progress of pathological states. MiRNA are expressed by cardiomyocytes, fibroblasts, endothelial cells and vascular smooth muscle cells. These molecules control nearly all aspects of the cardiovascular biology. They have characteristics of an ideal biomarkers that give information about cardiac damage. Up to now many studies have found the changes at the level of miRNA in relation to the specific processes of cardiac remodeling. The review is devoted to the facts from the research area of miRNA in the pathogenesis of HF and to the evaluation of miRNA as a biomarker of HF. Ref. 19, online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: myocardial fibrosis – microRNA – myocardial remodeling – heart failure

Valášková Z, Mladosičová B, Maruščáková L, Hulín I. **MikroRNA – informácia o poškodení myokardu, alebo biomarker zlyhávania srdca?** CardiologyLett. 2017;26(5):299–302

Abstrakt. Zlyhávanie srdca (SZ) je komplexný syndróm. Adaptačný proces na udržanie srdcového výdaja je spojený s hypertrofiou kardiomyocytov, apoptózou kardiomyocytov a fibrózou myokardu. Hlavným problémom je pokles kontraktilnej funkcie a prestavba myokardu. Vysoká heterogenita rizikových faktorov je pravdepodobne príčinou toho, že nateraz nie je možné klinicky presne definovať „signalizačný profil“ zlyhávajúceho srdca. Nie je celkom zrejmé, ktoré zmeny sú príčinou a ktoré sú následkom SZ. Subcelulárne zmeny vznikajú najmä pri progresii SZ. Molekulové a bunkové mechanizmy sú sprevádzané aktiváciou embryo-fetálneho génového programu. V srdci bolo detegovaných viac ako 200 typov mikroRNA (miRNA), ktoré sú významnými regulátormi génovej expresie v priebehu srdcového vývinu a sú priamo zapojené do nástupu a progresu patologických stavov. MiRNA exprimujú kardiomyocyty, fibroblasty, endotelové bunky a bunky hladkého svalstva ciev. Tieto molekuly kontrolujú všetky aspekty kardiovaskulárnej biológie. Majú vlastnosti ideálnych biomarkerov informujúcich o kardiackej poškodení. Doteraz bolo realizovaných veľa štúdií s cieľom objasniť zmeny na úrovni miRNA vo vzťahu k špecifickým procesom remodelácie srdca. V prehľade sa venujeme skutočnostiam z oblasti výskumu miRNA v patogeneze SZ a zhodnoteniu miRNA ako biomarkera SZ. Lit. 19, online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: fibróza myokardu – mikroRNA – remodelácia myokardu – zlyhávanie srdca

Z¹Ústavu patologickej fyziológie LFUK v Bratislave a ²Imunologického ústavu LF UK v Bratislave, Slovenská republika
Do redakcie došlo dňa 19. septembra 2017; prijaté dňa 21. septembra 2017

Adresa pre korešpondenciu: RNDr. Zuzana Valášková, PhD., Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika, email: zuzana.valaskova@fmed.uniba.sk

Mechanizmy remodelácie prebiehajú ako komplexné kaskády molekulových signalizácií. Konečným výsledkom každej patologickej remodelácie myokardu je zníženie srdcového výdaja a neschopnosť zabezpečiť metabolické požiadavky jednotlivých tkanív. V remodelácii majú miRNA „kontrolnú funkciu“ všetkých procesov kardiovaskulárnej biológie, vrátane fibrózy myokardu, dynamiky extracelulárnej matrix (ECM), apoptózy, zápalu, proliferácie, angiogenézy, metabolizmu, homeostázy vápnika a elektrofyziológie. MiRNA v srdci exprimujú kardiomyocyty, fibroblasty, endotelové bunky a bunky hladkého svalstva ciev.

Hlavným cieľom pri výskume miRNA v patogeneze SZ je presná identifikácia kľúčových miRNA z veľkého množstva údajov generovaných rôznymi spôsobmi profilovania. Cieľom je využitie miRNA ako diagnostických a prognostických biomarkerov SZ. Viaceré štúdie naznačujú, že miRNA sú významnou informáciou v prípade poškodenia a remodelácie myokardu.

V tomto prehľade sa venujeme skutočnostiam z oblasti výskumu miRNA v patogeneze SZ a zhodnoteniu významu miRNA ako biomarkerov SZ.

Základné informácie o miRNA

MiRNA je skupina malých, prirodzene sa vyskytujúcich a nekódujúcich RNA (21–25 nukleotidov), ktoré zväčša negatívne modulujú expresiu génu na post-transkripčnej úrovni – inhibíciou procesu translácie alebo exprese mediátorovej RNA (mRNA), indukciou degradácie mRNA. Niekoľko miRNA podporuje transkripciu mRNA. Regulácia exprese génu prebieha prostredníctvom neúplnej alebo úplnej komplementárnej väzby miRNA na cieľové sekvencie v 3' neprekladanej oblasti génu (UTR) mRNA. Jedna mRNA môže obsahovať viac väzbových miest pre rôzne miRNA a vzniká tak komplikovaná sieť miRNA-mRNA interakcií. Odhaduje sa, že miRNA sú schopné regulovať expresiu približne 60 % ľudských génov (1). Na rozdiel od iných typov RNA molekúl sú miRNA veľmi stabilné v extracelulárnom prostredí. Na ochranu proti degradácii sú extracelulárne miRNA balené do rôznych druhov lipidových vezikúl (apoptotické telieska, mikročastice, exozómy), viazané na proteíny (ako sú argonát 2, nukleofosmín 1) alebo s lipoproteínmi, vrátane lipoproteínov s vysokou a nízkou hustotou. Tieto interakcie miRNA s lipidovými alebo proteínovými zložkami im zabezpečujú odolnosť proti rôznym nepriaznivým podmienkam, ako je degradácia spôsobená ribonukleázovou aktivitou, extrémne hodnoty pH, vysoké teploty, opakované cykly zmrazovania a rozmrazovania alebo dlhodobé skladovanie.

miRNA ako terapeutické ciele

Vyvíjajú sa terapeutické postupy pre cieleňú moduláciu exprese a aktivity miRNA. Sú založené na dvoch prístupoch:

- zníženie aktivity miRNA (anti-miRNA = antagomiR alebo inhibitory),
- zvýšenie koncentrácie miRNA (pro-miRs alebo napodobeniny miRNA).

AntagomiRs sú sekvencie nukleotidov, ktoré môžu spustiť downreguláciu intracelulárnych hladín konkrétnych miRNA. Spôsobujú zvýšenie intracelulárnej koncentrácie cieľových mRNA a tým zvýšenú tvorbu „žiadaných“ proteínov v bunke. Naopak, miRNA „mimikry“ sú syntetické RNA, ktoré napodobňujú funkciu endogénnych miRNA a usilujú sa o zníženie koncentrácie vybraných cieľových mRNA (proteínov).

miRNA pri srdcovom zlyhávaní

Viaceré miRNA pôsobia na všetkých úrovniach funkčnej regulácie myokardu a majú pod kontrolou gény zapojené do štrukturálnej remodelácie. Hoci cirkulujúce miRNA pochádzajú prevažne z endotelových a hematopoetických buniek, niektoré typy cirkulujúcich miRNA majú potvrdený myokardiálny pôvod a sú obrazom zmien na úrovni myokardu. Expresia miRNA sa mení v hypertrofovanom a v zlyhávajúcom myokarde, čo naznačuje, že regulácia miRNA indukovaná stresom prispieva k preprogramovaniu génovej exprese v myokarde pri patologickej hypertrofii a SZ.

Klinické štúdie o zlyhávaní srdca a miRNA

U pacientov po infarkte myokardu sa stanovovali 377 miRNA v sére. Zistili sa zvýšené hladiny troch cirkulujúcich miRNA – 34, 192 a 194, ktoré možno považovať za prediktívne pre rozvoj SZ v rámci jedného roka u pacientov po akútnom infarkte myokardu (2).

V srdci je miRNA-1 exprimovaná vo vysokej miere a delécia tejto miRNA spôsobuje závažné kardiálne chyby. Zvýšené plazmatické hladiny miRNA-1 boli potvrdené u pacientov s akútnym infarktomyokardu (3). Naopak, vzorky myokardu od pacientov s hypertrofickou kardiomyopatiou alebo mitrálnou stenózou mali zníženú expresiu miRNA-1 (4).

Úbytok kardiomyocytov je kľúčovým prvkom fatálnej progresie SZ. Strata kardiomyocytov môže byť následkom programovanej apoptózy, autofágie alebo nonelektívnej, konvenčnej nekrózy. MiRNA regulujú aj signálne dráhy apoptózy. Majú pro-apoptotické alebo anti-apoptotické účinky. MiRNA-133, -21, -30, -138, -499 a -181c indukovali apoptózu v bunkách myokardu. MiRNA-28 pôsobila výrazne anti-apoptoticky v kardiomyocytoch (5).

Niekoľko miRNA významne reguluje funkcie fibroblastov v srdci. Fibroblasty sú primárne zodpovedné za dynamické procesy syntézy, depozície a remodeláciu ECM. Intersticiálna fibróza sa vyskytuje prakticky pri všetkých formách SZ.

Niekoľko štúdií potvrdilo asociáciu miRNA-29a s hypertrofiou a fibrózou myokardu. Táto miRNA je potencionálnym biomarkerom na hodnotenie remodelácie myokardu pri hypertrofickkej kardiomyopatii (5). Difúzna myokardiálna fibróza môže byť v rozpore s diastolickou relaxáciou a môže narušiť difúziu kyslíka a živín. To môže tiež viesť k remodelácii elektrických kondukčných dráh v srdci a k patogeneze fibrilácie predsieni a ku komorovej tachykardii. Rozsiahla fibróza myokardu spôsobuje zvýšenie tuhosti a poskytuje štrukturálny substrát pre potenciálne smrteľné arytmie. Oneskorené intraventrikulárne vedenie sa pozoruje u 25 % až 30 % pacientov s SZ (5). Asi tretina pacientov so SZ zomrie náhle v dôsledku závažných arytmií.

Preto ovplyvnenie fibrózy myokardu predstavuje perspektívny terapeutický postup pri SZ. Medzi významné anti-fibrotické miRNA patria miRNA-29, -133, -26a, -24, -19a-3p / 19b-3p a -101a. Do metabolizmu kolagénu zasahujú a pro-fibrogenne pôsobia miRNA-1, -15 a -21. Konkrétne, miRNA-21 je špecifická pre oblasť infarktu myokardu s vysokou expresiou kolagénu a prítomnosťou prevažne fibroblastov (6). Reguluje aktivitu matrix metaloproteinázy 2 (MMP-2), ktorá je dobre známa svojou úlohou pri prestavbe ECM a zvýšenom ukladaní kolagénu. Niektoré štúdie preukázali zvýšenie MMP-2 a MMP-9 v zlyhávajúcom myokarde. Myokardiálna a plazmatická hladina miRNA-21 je významne vyššia u pacientov s aortálnou stenózou. Existujú však kontroverzné zistenia o dôležitosti miRNA-21 pri SZ. Niektoré štúdie nepotvrdili, žeby inhibícia miR-21 znížila patologickú remodeláciu alebo zlepšila funkčnosť myokardu (7).

Pri prechode kompenzovanej hypertrofie k dekompenzovanému SZ sa potvrdil pokles kapilárnej hustoty, angiogenézy v myokarde a dysfunkčný endotel. Tieto patofyziologické stavy spolu s remodeláciou tkaniva a fibrózou podporujú hypoxiu/ischémiu myokardu. Preto je podpora myokardiálnej angiogenézy alebo udržiavanie vhodného lokálneho prietoku krvi cieľom pre vývoj nových terapeutických agensov. Veľa miRNA je zapojených do štúdií, ktorých cieľom je podrobne opísať angiogénne mechanizmy v srdci. Tieto miRNA majú potenciál regulovať pro- alebo antiangiogénne faktory a správnu funkciu endotelových buniek (8). Antiangiogénna funkcia bola preukázaná pri miRNA-17-92, -126, -24, -214 a -34. Za významnú miRNA, ktorá podporuje angiogénu je považovaná miRNA-210 (5). Pre zlyhávajúce srdce je typická redukovaná aktivita pumpy SERCA2a. Pacienti so SZ majú zvýšené miRNA-25 v srdci. Bolo potvrdené, že miRNA25 je supresorom SERCA2a a že inhibícia miRNA25 zlepšila kontraktilitu myokardu v zlyhávajúcom srdci (9). Patologickú hypertrofiu a SZ charakterizuje prepnutie izoformy α -MHC na β -MHC. Do exprese β -MHC je priamo zapojená miRNA-208a (10).

Ovchinnikova et al. pozorovali, že cirkulujúce miRNA-18a-5p, -26b-5p, -27a-3p, -30e-5p, -106a-5p, -199a-3p, -652-3p a -199a-3p boli významne znížené u pacientov s akútnym SZ

v porovnaní so zdravými kontrolami alebo u pacientov postihnutých chronickým SZ. Dôležitým zistením bolo, že ďalšie zníženie hladín týchto miRNA do 48 hodín po hospitalizácii pre akútne SZ sa spájalo so zvýšeným rizikom šesťmesačnej úmrtnosti (11). Qiang et al. zistili, že miRNA-126 a -508-5p môžu predpovedať kardiovaskulárnu úmrtnosť u pacientov so SZ (12). V rámci štúdie realizovanej u pacientov s ischemickou a neischemickou dilatačnou kardiomyopatiou sa zistilo, že cirkulujúce hladiny miRNA-125b a -497 boli signifikantne znížené u ischemických pacientov, kým miRNA-142-3b a -29b boli zvýšené u neischemických pacientov (13). Iná štúdia opísala úlohu cirkulujúcich miRNA pri diferenciálnej diagnostike dyspnoe u pacientov so symptomatickým SZ a u pacientov s dyspnoeou bez SZ (14). Aktuálne významnú asociáciu s diagnózou SZ vykazuje miRNA-423. Niekoľko štúdií potvrdilo pozitívnu koreláciu medzi hladinami miR-423-5p a BNP u pacientov so SZ (15).

Záver

Celulárne a subcelulárne zmeny prebiehajúce v zlyhávajúcom srdci sú komplikovanou sieťou dejov, ktoré nie sú detailne opísané a pochopené. Možno predpokladať, že sú nielen všeobecné, ale aj individuálne a odvíjajú sa od podstaty primárneho poškodenia myokardu, ale aj od genetickej výbavy jednotlivca.

Autori viacerých štúdií sú presvedčení, že miRNA môžu nadobudnúť postavenie biomarkerov SZ s normálnou ejekčnou frakciou (16), diastolickou dysfunkciou (17) a akútnym SZ (11, 18). Zatiaľ sa však nepotvrdilo, že miRNA možno použiť ako nezávislý biomarker pri diagnostiku SZ. Ale kombinácia miRNA a BNP by mohla fungovať ako lepšia metóda detekcie (15).

Postavenie mikroRNA ako biomarkerov v patogeneze SZ je podľa nás otáznе. Hlavnou nevýhodou použitia miRNA ako biomarkerov v klinickej diagnostike je ich pracná izolácia a detekčné postupy. V rámci kardiológie cirkulujúce miRNA nemusia pochádzať iba z myokardu, ale aj z erytrocytov a iných krvných buniek. Kvantifikácia teda môže byť značne ovplyvnená pôvodom aj stavom miRNA (napríklad mikrovezikuly, exozómy) čo môže spôsobovať problémy s interpretáciou detegovaných koncentrácií. Navyše stále viac autorov nepodporuje hypotézu, že cirkulujúce koncentrácie miRNA odrážajú špecifické zmeny prebiehajúce v myokarde. Ďalším obmedzením je nedostatok špecifickosti miRNA navrhnutých pre biomarkery. Napríklad miR-126 sa dáva do súvislosti s koronárnou chorobou. Táto miRNA je však úzko spätá aj so SZ a diabetom (19). Jednoznačne však miRNA sú významnou informáciou v prípade poškodenia a remodelácie myokardu. Zmeny v expresii miRNA, a to vzhľadom na úroveň exprese a lokalizácie exprese, v kombinácii so zmenami v ich cieľových génoch, respektíve v mRNA, poskytujú vysoko

dynamickú formu regulácie, ktorá nemôže byť jednoducho interpretovaná analýzou jednotlivých interakcií.

Cieľom terapeutických stratégií, ktoré využívajú miRNA je obnoviť fyziologickú úroveň expresie miRNA v tkanivách. V patogenéze SZ sa však uplatňujú viaceré miRNA a je otázne či budeme niekedy schopní „umlčať“ expresiu kľúčových nadmerne sa exprimujúcich miRNA alebo zabezpečiť tvorbu nedostatočne sa exprimujúcich miRNA. Zložitosť vyplýva aj z toho, že miRNA nie je jedna molekula s informáciami o jednom deji, ale ani ich produkcia nie je „zabezpečená“ jednou cestou a ich účasť v zložitých procesoch môže byť protektívna ale aj deterioračná. Avšak presná deskripcia pri definovanej poruche môže mať v budúcnosti neoceniteľný význam.

Literatúra

1. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92-105.
2. Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani, Suma S, Usami M, Hara M, Kitamura T, Hamasaki T, Nanto S, Kawahara Y, Komuro I. Circulating p53-responsive microRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction. *Circ Res* 2013;113(3):322-326.
3. Zhang R, Niu H, Ban T, Xu L, Li Y, Wang N, Sun L, Ai J, Yang B. Elevated plasma microRNA-1 predicts heart failure after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2013;166(1):259-260.
4. Melman YF, Shah R, Das S. microRNAs in heart failure: is the picture becoming less miRky? *Circ Heart Fail* 2014;7(1):203-214.
5. Wang H, Cai J. The role of microRNAs in heart failure. *Biochim Biophys Acta* 2017;1863(8):2019-2030.
6. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Gallippo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008;456(7224):980-984.
7. Patrick DM, Montgomery RL, Qi X, Obad S, Kauppinen S, Hill JA, van Rooij E, Olson EN. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest* 2010;120(11):3912-3916.
8. Wang S, Olson EN. AngiomiRs--key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2009;19(3):205-211.
9. Wahlquist C, Jeong D, Rojas-Munoz A, Kho C, Lee A, Mitsuyama S, van Mil A, Park WJ, Sluijter JP, Doevendans PA, Hajjar RJ, Mercola M. Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature* 2014;508(7497):531-535.
10. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH, Wang DZ. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 2009;119(9):2772-2786.
11. Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, Ter Maaten JM, Valente MA, Liu LC, et al. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 2016;18(4):414-423.
12. Qiang L, Hong L, Ningfu W, Huaihong C, Jing W. Expression of miR-126 and miR-508-5p in endothelial progenitor cells is associated with the prognosis of chronic heart failure patients. *Int J Cardiol* 2013;168(3):2082-2088.
13. Voellenkle C, van Rooij J, Cappuzzello C, Greco S, Arcelli D, Di Vito L, et al. microRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiol Genomics* 2010;42(3):420-426.
14. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 2010;106:1035-1039.
15. Yan H, Ma F, Zhang Y, Wang C, Qiu D, Zhou K, Hua Y, Li Y. miRNAs as biomarkers for diagnosis of heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017;96(22):e6825.
16. Watson CJ, Gupta SK, O'Connell E, Thum S, Glezeva N, Fendrich J, Gallagher J, Ledwidge M, Grote-Levi L, McDonald K, Thum T. MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure. *Eur J Heart Fail* 2015;17:405-415.
17. Nair N, Kumar S, Gongora E, Gupta S. Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. *Mol Cell Biochem* 2013;376:33-40.
18. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:499-506.
19. de Gonzalo-Calvo D, Iglesias-Gutiérrez E, Llorente-Cortés V. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2017;70(9):763-769.