

Alzheimer Hastalarının Periferik Kanlarında miR-155 ve miR-758 Anlatım Düzeylerinin İncelenmesi

Investigation of miR-155 and miR-758 Expression Levels in Peripheral Blood of Alzheimer's Disease Patients

Ebru Özer¹, Gamze Güven¹, Ebba Lohmann^{2,3,4}, Çağrı Güleç⁵, Nihan Erginel-Ünaltuna^{*1}

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Ana Bilim Dalı, Davranış Nörolojisi ve Hareket Bozuklukları Dalı, İstanbul, Türkiye

³Tübingen Üniversitesi, Hertie Enstitüsü, Nörodejeneratif Hastalıklar, Tübingen, Almanya

⁴Alman Nörodejeneratif Hastalıklar Merkezi, Tübingen, Almanya

⁵İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Özer E, Güven G, Lohmann E, Güleç Ç, Erginel-Ünaltuna N. Investigation of miR-155 and miR-758 Expression Levels in Peripheral Blood of Alzheimer's Disease Patients. Experimed 2018; 8(2): 58-61.

ÖZ

Amaç: Alzheimer hastalığı (AH), dünya genelinde prevalansı gittikçe artış gösteren, geri dönüşümsüz, nörodejeneratif bir hastalıktır ve patogenezinde genetik yatkınlığın yanında çok sayıda farklı faktör etken rol oynamaktadır. Hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve metabolizma gibi birçok biyolojik süreçte görev alan mikro RNA'ların (miRNA), AH patogenezinde de rol oynadıkları düşünülmektedir. miRNA'ların hedef gen yelpazelerinin çok geniş olması, birbiri ile ilişkisiz görünen farklı hastalıkları moleküler düzeyde ilişkilendirmek ve farklı hastalıkların ortak noktalarını tanımlamak açısından araştırmacılara yeni alanlar sunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, belirli miRNA'ların periferik kandaki anlatım düzeylerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Lipid ve kolesterol transportunun AH patogenezinde oynadığı önemli rol ve miRNA'ların bu transport üzerindeki etkisini göz önünde bulundurarak, Alzheimer hasta grubu ve kontrol grubunda, miR-155 ve miR-758'in periferik kandaki anlatım düzeylerini gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile incelemeyi amaçladık.

Bulgular: Çalışmamızın sonucunda, miR-155 anlatımının Alzheimer hasta grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı, ancak miR-758 anlatımı açısından Alzheimer hasta grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi.

Sonuç: Alzheimer hastalarının periferik kanlarındaki azalmış miR-155 anlatımı, bu miRNA'nın hedef genleri aracılığıyla AH patogenezine etki edebileceğini düşündürmektedir. Ancak miR-155 anlatım düzeyindeki değişim ile AH arasında gösterdiğimiz bir ilişkinin fonksiyonel çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, kolesterol metabolizması, mikro RNA

ABSTRACT

Objectives: Alzheimer's disease (AD) is an irreversible, neurodegenerative disease with an increasing worldwide prevalence. Several different factors are known to play a role in its pathogenesis and genetic predisposition. MicroRNAs (miRNAs), which are involved in several biological processes such as cell proliferation, cell differentiation, and metabolism, are also believed to play a role in the pathogenesis of AD. These miRNAs present new areas of interest to researchers in terms of their broad range of target genes, the association with different diseases that appear to be unrelated to each other at the molecular level, and the identification of commonalities between different diseases. Therefore, we aimed at investigating the expression levels of specific miRNAs related to cholesterol metabolism in peripheral blood.

Material and Method: Considering the important role of lipid and cholesterol transport in the pathogenesis of AD and the effect of miRNAs on this transport, we intended to investigate the expression levels of miR-155 and -758 in patients with AD and controls using the real-time polymerase chain reaction method.

Results: Our results demonstrated that the expression of miR-155 was significantly decreased in patients with AD compared to that in controls. However, there was no significant difference in the expression of miR-758 between patients with AD and controls.

Conclusion: A decreased miR-155 expression in the peripheral blood of patients with AD suggests that this miRNA is involved in the pathogenesis of AD through its target genes. However, this relationship between the changes in miR-155 expression and AD need to be reinforced by functional studies.

Keywords: Alzheimer's disease, cholesterol metabolism, microRNA

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nihan Erginel-Ünaltuna **E-mail:** unaltuna@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 26.09.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 03.10.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH) ise çağımızın hastalığı olarak görülen ve tüm dünyada özellikle gelişmekte ve gelişmiş ülkelerde insidansı ve prevalansı son yıllarda büyük oranda artış gösteren kritik öneme sahip kompleks bir hastalıktır. AH, günlük yaşamsal aktivitelerde azalma ve bilişsel yeteneklerde bozulma ile karakterize geri dönüşümsüz ve ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın semptomları arasında bellek kaybı, yargılamada problemler, kişilik değişiklikleri, oryantasyon bozuklukları ve dil yeteneklerinde kayıplar bulunmaktadır. AH demansın en yaygın formu olup tüm demans vakalarının %50-70'ini oluşturmaktadır. AH'nin dünyada görülme sıklığı 65 yaş üzerinde %6-10, 85 yaşın üzerinde % 30-70 olarak ifade edilmektedir (1). Hastalığın temel patolojik özelliği β -amiloid plak (A β) olarak adlandırılan hücre dışı protein birikimleri ve tau proteininin aşırı fosforilasyonu sonucu oluşan hücre içi nörofibriller yumaklardır. Hastalığın patogenezi çok sayıda farklı faktörün etkilediği ortaya konulmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kolesterolün AH patogenezi içinde rolü olduğunu göstermiştir. Kolesterolün hücre içindeki düzeyi ve dağılımının APP metabolizması üzerine etkisi büyüktür. Kolesterolün hücre membranının akışkan ve katı olma gibi özelliklerini ve sekretaz enzimlerinin aktivitelerini etkileyerek amyloid beta klirensi ve nörofibriller yumak oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir (2).

MiRNA'lar yaklaşık olarak 22 nükleotid uzunluğunda, protein kodlayan genlerin post transkripsiyonel düzenlemelerinde rol olan küçük RNA parçalarıdır. Bu küçük moleküller pek çok biyolojik süreçte önemli rollere sahiptirler. miRNA'lar enflamasyon gibi birçok önemli hücre yolakta düzenleyici rol oynamaktadırlar ve ekspresyon düzeylerindeki değişimler çok sayıda hastalık ile direkt ilişkilidir. Giderek artan sayıda çalışma, AH patogenezi içinde rol oynayan proteinlerin anlatımlarının düzenlenmesine katılan miRNA'ların varlığını ve AH'deki rollerini ortaya koymaktadır (3-5). Diğer önemli bir nokta, miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin sadece hastalık ile ilişkili beyin bölgelerinde değil periferik kan hücrelerinde de görülmüş olmasıdır (6).

Lipid ve kolesterol transportunun AH patogenezi içinde oynadığı önemli rol ve miRNA'ların bu transport üzerindeki etkisini göz önünde bulundurarak çalışmamızda, Alzheimer hasta grubu ve kontrol grubunda, miR-155 ve miR-758'in periferik kandaki anlatım düzeylerini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grubu

Çalışmaya nörolojik muayene, nöropsikolojik testler, görüntüleme yöntemleri, laboratuvar incelemeleri dikkate alınarak belirlenen ve NINCDS-ADRDA ve DSM-IV tanı kriterlerine göre Alzheimer tanısı alan 24 hasta katıldı. Sağlıklı kontrol grubu muayene sırasında herhangi bir nörolojik bulguya rastlanmayan 16 bireyden oluşturuldu. Hastalar ve kontroller çalışma hakkında bilgilendirildikten ve yazılı olarak gönüllü olur onayı alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Çalışma için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul onayı alınmıştır. Kan örnekleri pıhtılaşmayı engellemek için etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere alındı.

Kantitatif Gerçek-Zamanlı PZR (qRT-PZR)

Periferik kandan ayrıştırılan lökositlerden total RNA izolasyonu Trizol yöntemi ile gerçekleştirildi. Lökositlerden elde edilen total RNA'lardan 'stem loop' ters transkriptaz ile cDNA sentezi 'Bioline EPIK miRNA Lo-Rox Kit' ile kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. miRNA'ların anlatım düzeyleri SYBR Green boyası kullanılarak 'Light Cycler 480' cihazında qRT-PZR yöntemi kullanılarak belirlendi. qRT-PZR, 'Bioline EPIK miRNA Select Lo-Rox Kit' kullanılarak gerçekleştirildi. miR-155 ve miR-758'den elde edilen verilerin normalizasyonda referans olarak RNU6 kullanıldı ve her bir cDNA örneği duplike olarak çalışıldı. Ekspresyon düzeyini rölatif olarak hesaplamada Delta Delta Ct metodu kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Kategorik değişkenler Pearson x2 testi ile, sürekli değişkenler ise Student's t-test ile karşılaştırıldı. Alzheimer hastaları ve kontrol grupları arasındaki miRNA anlatım düzeylerinin karşılaştırılmasında non parametrik 'Mann-Whitney' testi kullanıldı. İki değişken arasındaki ilişkinin yönü ve derecesinin belirlenmesinde 'Spearman's korelasyon' analizinden yararlanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ düzeyinde kabul edildi. Tüm istatistiksel hesaplamalar SPSS 21.0 (IBM Corp.; Armonk, NY, ABD) programı kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Çalışma Grubunun Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrollerin karşılaştırmalı tanımlayıcı özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. Hasta ve sağlıklı kontrol seçimlerinde, kolesterol metabolizması üzerinde ve AH riskini arttırmasında önemli rolü bulunan ApoE ϵ 4 allel taşıyıcılığı olan kişiler dışlanmıştır.

miRNA Anlatım Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda Alzheimer hasta grubunda miR-155 anlatım düzeyinin kontrollere göre anlamlı derecede ($p=0,022$) düşük olduğu belirlendi (Şekil 1). Ancak Alzheimer hasta grubu ve kontroller arasında miR-758 anlatım düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,064$) bir farklılık bulunamadı (Şekil 2). Bazı miRNA'ların anlatım düzeylerinin yaşa ve MMSE (*Mini mental state examination*, Mini mental durum değerlendirme testi) skoruna bağlı olarak değişiklik gösterdiği bilindiği için, hasta ve kontrol grubunda yaş, hasta grubunda başlangıç yaşı ve MMSE skoru ile çalışılan miRNA'ların anlatım düzeyleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile incelendi. Ancak çalışılan miRNA'ların anlatım düzeyleri ile yaş, başlangıç yaşı ve MMSE skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Ayrıca miRNA anlatım düzeyleri ve biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde miR-758 ve HDL düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon olduğu görüldü ($r=-0,392$ $p=0,016$).

TARTIŞMA

Çalışmamızda, kolesterol metabolizması ile ilişkili miRNA'ların anlatım düzeylerini Alzheimer hasta grubunda incelemeyi amaçladık ve dikkat çekici olarak miR-155 ve miR-758 anlatım düzeylerinin, kontrol grubuna göre AH grubunda düşük oldu-

ğunu belirledik. miR-155, iltihabi ve allerjik hastalıklar, kanser ve hipertansiyon gibi birçok patolojik durum ile ilişkilendirilmiş bir miRNA'dır. Alzheimer hastalığı ile de ilişkilendirilmiş olan miR-155'in, amiloid beta birikimini nöro-inflamasyon üzerinden etkilediği düşünülmekte, bu nedenle de AH tedavisi için uygun bir hedef olarak kabul edilmektedir (7-9). Bizim çalışmamızda da Alzheimer hastalarının miR-155 düzeyinin düşük bulunması, bu hastalığın patogenezinde kolesterol transportunun önemli rol oynadığı varsayımını desteklemektedir. Ancak, periferik kandaki düşük ekspresyon düzeyinin AH riskini nasıl arttırdığını açıklayabilmek için, miR-155'in ve hedef genlerinin incelenmesi gerekmektedir.

Çalıştığımız diğer miRNA miR-758, hastalıklarla ilişkisi yeterince araştırılmamış olmasına rağmen, kolesterol metabolizmasındaki rolü nedeniyle özellikle kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir miRNA adayı olarak kabul edilmektedir. miR-758'in, tanımlanmış hedef genleri arasında yer alan ABCA1'in ekspresyonunu baskılayarak, makrofajlardan kolesterol uzaklaştırılmasını kontrol ettiği bilinmektedir (10). Bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Alzheimer hastalarının miR-758 düzeyinin düşük bulunması, bu hastalığın patogenezinde kolesterol transportunun önemli rol oynadığı varsayımını destekleyebilir. Bununla birlikte, miR758'in hedef genleri arasında olan TLR3 ve TLR7'nin AH ile de ilişkili olması, bu hastalığın

patogenezinde, kolesterol ile birlikte iltihabi yanıtın da kilit rol oynayabileceğini göstermektedir (11).

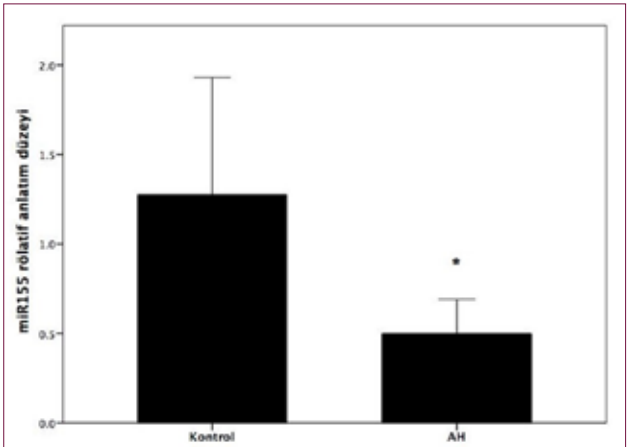
APOE ε4 allel varlığının AH için bir risk faktörü oluşturması (12), beyindeki glia hücrelerindeki kolesterol taşınmasını etkileyen bir bozukluğun AH'ye yol açabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda APOE ε4 allel taşıyıcılarının dışlanmış olmasına rağmen APOE ile birlikte kolesterol transportunda görev alan ABCA1'in düzenleyici miRNA'sının da AH ile ilişkili olabileceğini gösterdik.

Çalışmamızın sonuçları, kolesterol transportu, metabolizması ve bu süreçlerde görev alan miRNA'ların, AH patogenezinde rol oynayabileceğini akla getirmektedir. Ancak, hastalığın patogenezinde etkili olduğu bilinen başka yolların da varlığı gözardı edilmemelidir. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulguların daha geniş hasta gruplarında test edilmesi ve fonksiyonel çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Tablo 1. Alzheimer hastaları ve kontrol grubunun özellikleri

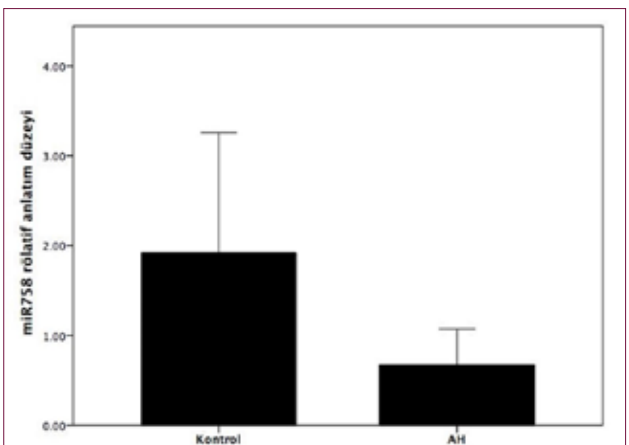
Özellikler	Alzheimer Hastaları (n=24)	Kontrol (n=16)	p
Cinsiyet	13 E, 11 K	8 E, 8 K	0,796
Yaş	77±5,0	75±7	0,306
Başlangıç yaşı	72,2±4,9	-	
MMSE skoru	18,7±6,2	29±1,2	<0,001
Kilo (kg)	73,4±11,7	78±13,8	0,293
Boy (cm)	163,4±7,5	162,3±10,2	0,718
Bel çevresi (cm)	102,1±10,4	100,5±15,7	0,709
Glukoz (mg/dL)	111,5±52,5	99,4±24,6	0,409
Trigliserid (mg/dL)	166,8±63,7	150,9±77	0,484
HDL (mg/dL)	65,3±18	57,5±18,6	0,158
LDL (mg/dL)	117,2±36,8	118±48,8	0,953
Kolesterol (mg/dL)	215,8±56	205,7±51,9	0,472
SKB (mmHg)	120,6±6,8	116,4±7,1	0,099
DKB (mmHg)	77,3±6,8	77,7±6,8	0,861

MMSE: Mini mental state examination, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, SKB. Sistolik kan basıncı, DKB: diyastolik kan basıncı Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 1. Alzheimer hasta grubu ve kontrollerin rölatif miR-155 anlatım düzeyi

* kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.



Şekil 2. Alzheimer hasta grubu ve kontrollerin rölatif miR-758 anlatım düzeyi

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için Etik Kurul onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul'undan alınmıştır.

Hasta Onamı: Çalışmaya katılan tüm hastalardan imzalı onam formu alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – N.U.; Tasarım – N.U.; Denetleme – N.U., G.G.; Kaynaklar – N.U.; Gereçler – N.U., E.O., G.G.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – E.O., N.U.; Analiz ve/veya Yorum – E.O., G.G., Ç.G.; Literatür Taraması – E.O., Ç.G.; Yazıyı Yazan – E.O., G.G.; Eleştirel İnceleme – N.U., G.G., Ç.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve TÜBİTAK (Proje No: 214S340) tarafından desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Ethics Committee of İstanbul University, İstanbul School of Medicine.

Informed Consent: Written informed consent were obtained from all patients included in the study

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – N.U.; Design – N.U.; Supervision – N.U., G.G.; Resource – N.U.; Materials – N.U., E.O., G.G.; Data Collection and/or Processing – E.O., N.U.; Analysis and/or Interpretation – E.O., G.G., Ç.G.; Literature Search – E.O., Ç.G.; Writing – E.O., G.G.; Critical Reviews – N.U., G.G., Ç.G.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This work was supported by the Research Fund of İstanbul University and TÜBİTAK (Project Number 214S340).

KAYNAKLAR

1. Bachman DL, Wolf PA, Linn R, Knoefel JE, Cobb J, Belanger A, et al. Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham study. *Neurology* 1992; 42: 115-9. [\[CrossRef\]](#)
2. Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, et al. Cholesterol dependent gamma- secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* 2002; 9: 11-23. [\[CrossRef\]](#)
3. Patel N, Hoang D, Miller N, Ansaloni S, Huang Q, Rogers JT, et al. MicroRNAs can regulate human APP levels. *Mol Neurodegener* 2008; 3: 10. [\[CrossRef\]](#)
4. Liu W, Liu C, Zhu J, Shu P, Yin B, Gong, et al. MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 522-34. [\[CrossRef\]](#)
5. Long JM, Lahiri DK. MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid-beta precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404: 889-95. [\[CrossRef\]](#)
6. Ren RJ, Zhang YF, Dammer EB, Zhou Y, Wang LL, Liu X, et al. Peripheral Blood MicroRNA Expression Profiles in Alzheimer's Disease: Screening, Validation, Association with Clinical Phenotype and Implications for Molecular Mechanism. *Mol Neurobiol* 2016; 53: 5772-81. [\[CrossRef\]](#)
7. Guedes JR, Custodia CM, Silva RJ, de Almeida LP, Pedrosa de Lima MC, Cardoso AL. Early miR-155 upregulation contributes to neuroinflammation in Alzheimer's disease triple transgenic mouse model. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 6286-301. [\[CrossRef\]](#)
8. Guedes JR, Santana I, Cunha C, Duro D, Almeida MR, Cardoso AM, et al. MicroRNA deregulation and chemotaxis and phagocytosis impairment in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* 2016; 3: 7-17. [\[CrossRef\]](#)
9. Culpan D, Kehoe PG, Love S. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and miRNA expression in frontal and temporal neocortex in Alzheimer's disease and the effect of TNF-alpha on miRNA expression in vitro. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2011; 2: 156-62.
10. Ramirez CM, Davalos A, Goedeke L, Salerno AG, Warriar N, Cirera-Salinas D, et al. MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 2707-14. [\[CrossRef\]](#)
11. Yang Q, Fu S, Wang J. Hepatitis C virus infection decreases the expression of Toll-like receptors 3 and 7 via upregulation of miR-758. *Arch Virol* 2014; 159: 2997-3003. [\[CrossRef\]](#)
12. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 2009; 63: 287-303. [\[CrossRef\]](#)