

Role microRNA u kardiovaskulárních onemocnění*

Martin Pěnička, Karel Vondrák

III. interní-kardiologická klinika, Kardiocentrum, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta
Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika

Pěnička M, Vondrák K (III. interní-kardiologická klinika, Kardiocentrum, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika). **Role microRNA u kardiovaskulárních onemocnění.** *Cor Vasa* 2008;50(12):460–463.

Nedávné experimentální práce upozornily na enormní význam tzv. mikroRNA v posttranskripční regulaci exprese genů. MikroRNA jsou jednořetězcové molekuly o délce asi 22 nukleotidů patřící do rodiny tzv. nekódujících RNA. MikroRNA navozují snížení „messenger“ RNA, a tak inhibují syntézu proteinů na translační úrovni. Jediný specifický typ mikroRNA reguluje expresi celého řetězce genů kódujících funkčně nebo strukturálně související proteiny. Experimentální práce ukázaly, že mikroRNA jsou klíčové regulátory genů ovlivňujících růst a hypertrofii kardiomyocytů, jejich kontraktální funkci a elektrickou vodivost. Tento přehledový článek shrnuje současné poznatky o významu mikroRNA ve vývoji srdce a patogenezi kardiovaskulárních onemocnění.

Klíčová slova: MikroRNA – Kardiovaskulární onemocnění – Hypertrofie myokardu – Infarkt myokardu – Arytmie

Pěnička M, Vondrák K (Department of Internal Medicine-Cardiology III, Heart Center, Královské Vinohrady University Hospital and Charles University School of Medicine 3, Prague, Czech Republic). **The role of microRNAs in cardiovascular disease.** *Cor Vasa* 2008;50(12):460–463.

Recent experimental work has highlighted the enormous importance of what is referred to as microRNAs in the post-transcriptional regulation of gene expression. MicroRNAs are single-stranded RNA molecules of about 22 nucleotides in length belonging to the family of non-coding RNA. MicroRNAs induce a decrease in “messenger” RNA thereby inhibiting protein synthesis at translation level. The only specific type of microRNAs regulates the expression of a whole chain of genes encoding functionally or structurally related proteins. Experimental work has identified microRNAs as key regulators of genes affecting the growth and hypertrophy of cardiomyocytes, their contractile function, and electrical conductivity. This review article summarizes current concepts regarding the relevance of microRNAs in heart development and pathogenesis of cardiovascular disease.

Key words: MicroRNA – Cardiovascular disease – Myocardial hypertrophy – Myocardial infarction – Arrhythmias

Adresa: doc. MUDr. Martin Pěnička, Ph.D., III. interní-kardiologická klinika, Kardiocentrum, FN Královské Vinohrady a 3. LF UK, Šrobárova 50, 10034 Praha 10, Česká republika, e-mail: penicka@fnkv.cz

ÚVOD

Kódující sekvence zahrnují méně než 1,5% lidského genomu.⁽¹⁾ Nicméně, přibližně 90% genomu je účinně transkribováno.⁽²⁾ Je proto zřejmé, že většina transkripčního produktu se skládá z nekódujících RNA, tj. RNA, které nejsou přeloženy do proteinů. Ukazuje se, že většina z nekódujících RNA není pouze odpad transkripce, ale naopak hraje významnou roli v regulaci exprese genů na pretranskripční a posttranskripční úrovni. Dnes je popsáno několik tříd nekódujících RNA, mezi něž patří i tzv. mikroRNA (miRNA). MiRNA jsou jednořetězcové molekuly o délce asi 22 nukleotidů, které v evoluci představují vysoce konzervativní třídu RNA. Dosud je známo

přibližně 500–1 000 různých typů savčích miRNA, které tvoří více než 3% lidského genomu.^(3,4) Každý typ miRNA reguluje desítky až stovky genů. Odhaduje se, že miRNA celkem kontrolují expresi až 30% všech genů kódujících proteiny. Postupně byla prokázána funkce miRNA v embryonálním vývoji⁽⁵⁾ a v patofyziologii nádorů.⁽⁶⁾ Velmi recentně byla popsána klíčová role miRNA v patogenezi hypertrofie myokardu,^(7–13) srdečního selhání,^(7,12) kardiomyopatie,⁽¹⁴⁾ v arytmiogenezi⁽¹⁵⁾ a angiogenezi.⁽¹⁶⁾ Rovněž jsou testovány možnosti terapeutického ovlivnění těchto procesů inhibicí specifických miRNA. Na ústřední význam miRNA v regulaci exprese genů ukazuje i fakt, že za jejich objev byla v roce 2006 udělena Nobelova cena za fyziologii nebo medicínu.

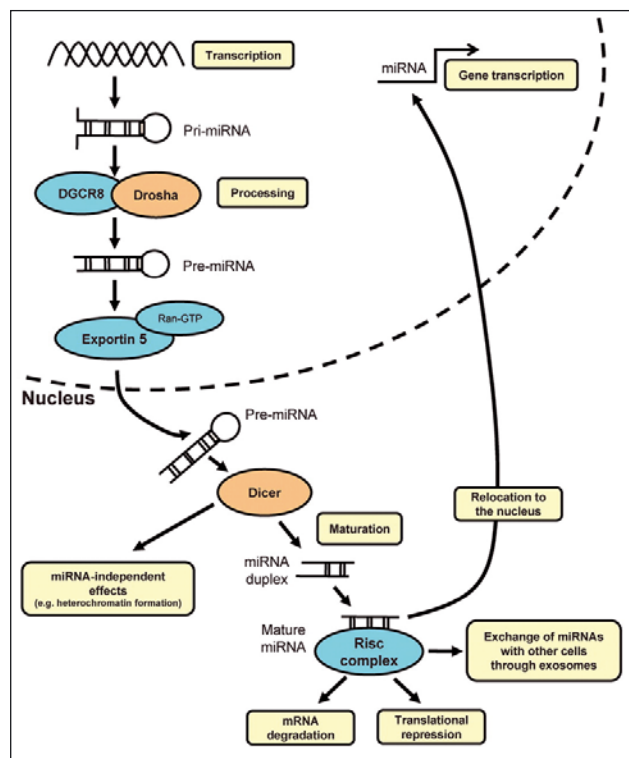
*Tato práce byla podpořena Výzkumným záměrem Univerzity Karlovy v Praze č. MSM 0021620817, uděleným Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

SYNTÉZA MI RNA A MECHANISMUS ÚČINKU

MiRNA je transkribována jako část delší molekuly (přibližně 2 kb; pri-miRNA), která je posléze štěpena enzymem RNázou III Drosha ve spolupráci s RNA vazebným proteinem DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) na pre-miRNA (70 nukleotidů) (obrázek 1). Pre-miRNA je poté transportována exportinem-5 do cytoplazmy, kde je dále štěpena ribonukleázou Dicer do 22 nukleotidových komplexů. Jeden řetězec zralé miRNA je včleněn do komplexu RISC (miRNA-induced silencing complex) pomocí vazby na proteiny Argonaute. Komplex RISC se přes miRNA váže na 3'-UTR (3'untranslated region) – cílové „messenger“ RNA a vede k její degradaci nebo zastavení translace s následnou inhibicí syntézy proteinů. „Messenger“ RNA „umlčená“ navázaným komplexem RISC je poté sekvistrována v tzv. P tělískách, a tím vyřazena z translační mašinerie. Jedna miRNA může inaktivovat mnoho různých messenger RNA a naopak, jedna messenger RNA může být inaktivována různými miRNA. Tímto mechanismem dochází k amplifikaci a k účinné „down“ regulaci exprese genů na posttranskripční úrovni. Část miRNA se dostává zpět do jádra, kde se podílí na „up“ regulaci exprese genů. Odhaduje se, že miRNA kontroluje expresi asi třetiny všech genů lidského genomu.

ROLE MI RNA V EMBRYOGENEZI

V průběhu embryogeneze sehraji miRNA ústřední roli při vzniku specifických buněčných linií a udržení jejich identity.⁽¹⁷⁾ Například u myši vede inaktivace ribonukleázy Dicer (zastavení tvorby veškeré miRNA)



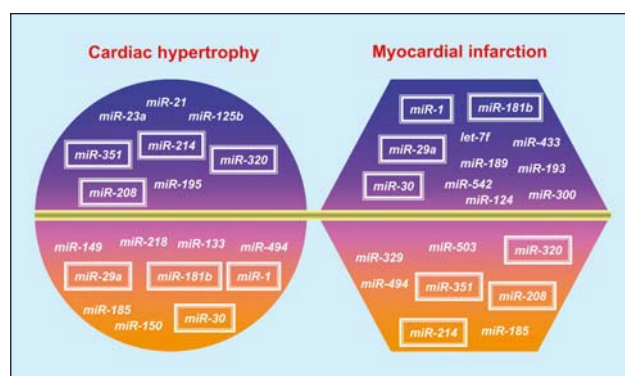
Obr. 1 Syntéza miRNA a její mechanismus účinku; popis v textu

Reprodukováno z citace 21 se souhlasem vydavatele.

k úmrtí embrya před gastrulací. Selektivní eliminace aktivity Dicer v končetinách, svalech, plicích nebo kůži vede k těžkým morfologickým defektům těchto orgánů. Inaktivace Dicer ve vyvíjejícím se srdci vede k rozvoji dilatační kardiomyopatie a srdečního selhání.⁽¹⁸⁾ Vyřazení Dicer v endoteliálních buňkách vede k poruše angiogeneze. Detailní popis podílu jednotlivých typů miRNA na vývoj embrya a plodu přesahuje náplň tohoto článku. Tato problematika je detailně zpracována v přehledových článcích.^(17,19)

PROFIL EXPRESE MI RNA V SRDCI U RŮZNÝCH NEMOCÍ

Expresce miRNA je tkáňově specifická a dynamická v závislosti na metabolickém stavu, stadiu nemoci, léčbě atd. Nejvíce zastoupené miRNA v dospělém srdci jsou miR-1, miR-133, miR-126-3p, miR-30c a miR-26a.⁽²⁰⁾ Profil exprese miRNA je specifický pro určité onemocnění. Odlišné profily se nacházejí u pacientů s dilatační kardiomyopatií, ischemickou kardiomyopatií nebo aortální stenózou.⁽¹⁴⁾ Obrázek 2 ukazuje rozdílnou expresi miRNA u hypertrofie a infarktu myokardu. Například miR-1, miR-181b, miR-29a a miR-30a/e jsou „down“ regulovány u hypertrofie, ale „up“ regulovány u ischemie myokardu. Jiné miRNA (miR-208, miR-214, miR-320 a miR-351) vykazují opačné změny. Během patologické hypertrofie myokardu dochází k reaktivaci genů uplatňujících se ve fetálním vývoji. Proto nepřekvapuje, že vzor miRNA exprese u selhávajícího srdce se velice podobá profilu miRNA v srdcích dvanácti- až čtrnáctitýdenních plodů.⁽⁷⁾ Je zajímavé, že nadměrná tvorba jediného typu miRNA vede k rozvoji patologické hypertrofie. Toto zjištění je velice významné pro potenciální léčbu, zaměřenou na inhibici specifického typu miRNA (viz níže). Expresce miRNA se mění v čase. Je proto pravděpodobné, že se profil exprese miRNA bude měnit během přechodu hypertrofie myokardu do srdečního selhání. V experimentálním modelu hypertrofie se expresce miR-126-5p v čase zvyšovala v závislosti na progresi hypertrofie,



Obr. 2 Odlišná expresce miRNA u srdeční hypertrofie a infarktu myokardu. MiRNA nad příčnou čarou jsou „up“ regulované a miRNA pod čarou jsou „down“ regulované. MiRNA, které jsou nejdále od příčné čáry, jsou miRNA s největší reprodukovatelností mezi různými laboratorními (u hypertrofie) nebo s největšími změnami proti normě (u infarktu). Orámované miRNA označují miRNA, které jsou regulovány v opačných směrech u hypertrofie a infarktu myokardu.

Reprodukováno z citace 23 se souhlasem vydavatele.

zatímco docházelo k postupnému útlumu exprese miR-29b.⁽¹¹⁾

VÝZNAM MIRNA V ARYTMOGENEZI

Elektrická aktivita srdce závisí na mnoha typech iontových kanálů, jejichž interakce udržuje normální srdeční rytmus. Mutace genů kódujících proteiny iontových kanálů nebo jejich aberantní exprese vede k arytmiím. MiRNA regulují expresi řady genů pro iontové kanály v myokardu. Alterace profilu exprese miRNA u různých onemocnění se pak může významně podílet na arytmogenezí. Například při infarktu myokardu dochází k „up“ regulaci miR-1. Bylo prokázáno, že dodání miR-1 do zdravého myokardu pomocí virového vektoru zvyšuje náchylnost srdce ke komorové tachykardii nebo fibrilaci komor.⁽¹⁵⁾ Tyto účinky byly reverzibilní po blokádě miR-1 specifickým antagomirem (viz níže). Arytmogenní účinek miR-1 je pravděpodobně zprostředkován inhibicí genu pro connexin 43 a pro draslíkové kanály (KCNJ2/Kir2.1). Dochází tak ke snížení vodivosti kardiomyocytů, a tak k predispozici ke komorovým arytmiím. Jiným příkladem může být „down“ regulace exprese miR-133 u patologické hypertrofie myokardu, která usnadňuje vznik maligních arytmií; MiR-133 inhibuje geny pro pacemakerové kanály HCN2 a HCN4. HCN2 je přítomen hlavně na membráně kardiomyocytů komor, kde jeho zvýšená aktivita, například v důsledku „down“ regulace miR-133, vede ke vzniku extrasystol a tak arytmií, které jsou extrasystolami spouštěny. Iatrogenní manipulace profilu miRNA u různých onemocnění tak otevírá cestu pro kauzální antiarytmickou terapii.

MIRNA, FUNKCE ENDOTELU A ANGIOGENEZE

Z hlediska angiogeneze lze miRNA rozdělit na stimulační (proangiogenní) a inhibiční (antiangiogenní) angiogenezi. Mezi hlavní proangiogenní miRNA patří miR-130a, miR-17-92, Let-7f, miR-27b, miR-378 a miR-210.⁽²¹⁾ Klíčové antiangiogenní miRNA zahrnují miR-221, miR-222, miR-15, miR-16 a miR-20. Identifikace hlavních miRNA pro angiogenezi je nesmírně důležitá např. pro terapii nádorových onemocnění. Selektivní a cílená inhibice proangiogenních miRNA v kombinaci s cytostatikem je nyní testována v mnoha experimentálních laboratořích. Další pracoviště se zabývají rolí miRNA v klíčových procesech časných stadií aterosklerózy. Zkoumá se zejména účinek miRNA na funkci a fenotyp endotelu, expresi adhezních molekul, zánětlivou odpověď v intimě cév, změnu monocytů v pěnové buňky apod.

INHIBICE MIRNA JAKO NOVÁ KAUZÁLNÍ TERAPIE KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ

Účinek specifického typu miRNA lze blokovat oligonukleotidovým řetězcem, který jednak brání vazbě komplexu RISC na messenger RNA, jednak vede k „down“ regulaci syntézy specifické miRNA účinkem v buněčném jádře. Tyto oligonukleotidy se nazývají antagomiry. Antagomiry se připravují chemickou syntézou a poté se upravují pro intravenózní podání. Antagomiry jsou velice účinné a silné blokátory účin-

ku miRNA. Jednorázová intravenózní infuze antagomiru vede k dlouhodobé inhibici specifické miRNA zřejmě v důsledku dlouhého poločasu endogenní miRNA. V experimentu vedla jednorázová infuze antagomiru miR-133 k trvalé „down“ regulaci exprese a účinku miR-133 s rozvojem srdeční hypertrofie s reaktivací fetálních genů.⁽¹⁰⁾ Zajímavé jsou i modely trvalé exprese antagomiru po vpravení do genomu lentiviru, kterým infikujeme cílovou buňku, např. kardiomyocyt.⁽²²⁾

ZÁVĚR

Současné studie prokázaly, že miRNA moduluje široké spektrum srdečních procesů s významnými klinickými implikacemi. Porozumění regulačním funkcím miRNA zlepší naše znalosti o kardiovaskulárních onemocněních a snad i umožní jejich kauzální léčbu na úrovni exprese genů specifickými blokátory miRNA antagomiry. Je nutné si uvědomit, že miRNA, které jsou modulovány během srdečních onemocnění, se nutně nemusejí podílet na jejich patogenezi. Je proto nezbytné, aby na sérii pokusů, které definovaly profily exprese miRNA u jednotlivých onemocnění, navazovaly práce studující funkci modulovaných miRNA. Odhalení regulačních okruhů miRNA představuje dozajista velkou výzvu, ale také může poskytnout nový cíl pro kauzální léčbu srdečních onemocnění.

LITERATURA

1. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860–921.
2. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007;447:799–816.
3. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15–20.
4. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006;126:1203–17.
5. Blakaj A, Lin H. Piecing together the mosaic of early mammalian development through microRNAs. *J Biol Chem* 2008;283:9505–8.
6. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15524–9.
7. Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007;116:258–67.
8. Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:1137–41.
9. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypow J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007;100:416–24.
10. Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2007;13:613–8.
11. Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol* 2007;170:1831–40.

12. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:18255–60.
 13. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007;316:575–9.
 14. Ikeda S, Kong SW, Lu J, et al. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* 2007;31:367–73.
 15. Yang B, Lin H, Xiao J, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007;13:486–91.
 16. Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 2007;100:1579–88.
 17. Fazi F, Nervi C. MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovasc Res* 2008;79:553–61.
 18. Chen JF, Murchison EP, Tang R, et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2111–6.
 19. Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res* 2008;79:562–70.
 20. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002;12:735–9.
 21. Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008;79:581–8.
 22. Scherr M, Venturini L, Battmer K, et al. Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function. *Nucleic Acids Res* 2007;35:e149.
 23. Yang B, Lu Y, Wang Z. Control of cardiac excitability by microRNAs. *Cardiovasc Res* 2008;79:571–80.
-

Došlo do redakce 4. 11. 2008

Přijato k otištění 18. 11. 2008