

# Seramid metabolizması ile ilişkili CERS5 (LASS5) geninin endotel hücrelerinde ateroskleroz patogenezindeki rolünün araştırılması

## Investigating the role of ceramide metabolism-associated CERS5 (LASS5) gene in atherosclerosis pathogenesis in endothelial cells

Dr. Neslihan Çoban, Dr. Filiz Güçlü Geyik, Uzm. Bio. Özlem Yıldırım, Dr. Nihan Erginel Ünaltuna

İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Turkey

### ÖZET

**Amaç:** Spingoliplerin yapısını oluşturan seramid ikincil haberci olarak ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynamaktadır. AMPK geninin, düzenlediği genler üzerinden ateroskleroz ve hipertansiyon gibi hastalıklarda koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir. De novo seramid sentezinde rol alan LASS5 (CERS5) geninin, AMPK genini dolaylı olarak etkilediği de belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı, aterosklerozda LASS5 geninin rolünü belirlemektir.

**Yöntemler:** HUVEC'de (human umbilical vein endothelial cells) LASS5 genine özgü siRNA aracılığı ile gen sessizleştirilmesi yapıldı. Gen sessizleştirilmesinin ardından kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olan LASS5, AMPK-Alfa ve AMPK-Alfa hedef genlerinin hücresel gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler araştırıldı. LASS5 geninin baskılanması sonucundaki ekspresyon değişikliğinin AMPK aktivitesindeki değişime bağlı olup olmadığını anlamak için, HUVEC kültür ortamına AMPK aktivatörü eklendi.

**Bulgular:** LASS5 geninin yeni bir fizyolojik fonksiyonu belirlendi. LASS5 geninin susturulması, HUVEC hücre hattında AMPK metabolizması ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyonunu değiştirdi.

**Sonuç:** Bu çalışma ile ilk defa LASS5 geninin ateroskleroz ile ilişkili olan AMPK-alfa geninin negatif düzenlemesinde yer alabileceği gösterilmiştir. Bu bulgular, aterosklerozun moleküler mekanizmasının anlaşılmasında bir adım niteliği taşımakta olup ayrıca aterosklerozun tedavisinde kullanılabilecek maddelerin geliştirilmesi için ön çalışma olarak önem taşımaktadır.

### ABSTRACT

**Objective:** Ceramide, the backbone of sphingolipids, is the key component affecting atherosclerotic changes through its important second-messenger role. Previous studies have demonstrated protective role of AMP-activated protein kinase (AMPK) genes in regulating atherosclerosis and hypertension. Ceramide synthase 5 (LASS5 or CERS5) gene has function in de novo synthesis of ceramide, and has indirect effect on AMPK gene. Aim of the present study was to identify role of LASS5 gene in atherosclerosis.

**Methods:** LASS5 gene-specific small interfering RNA (siRNA)-mediated gene silencing was performed in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and differential expression of LASS5, AMPK-alpha and AMPK-alpha target genes were analyzed. HUVEC cells were then treated with AMPK activator in order to examine relationship of change in gene expression levels to AMPK activity.

**Results:** Novel physiological function of LASS5 was identified. Downregulation of LASS5 was found to attenuate ceramide production and increase expression of some AMPK target genes in HUVEC.

**Conclusion:** This is the first study to demonstrate that LASS5 was involved in negative regulation of atherosclerosis-related genes, such as AMPK-alpha. These preliminary findings provide insight into molecular mechanism of atherosclerosis and are important for development of potential therapeutic agents in the treatment of atherosclerosis.

Sfingomiyelin yolu cAMP ve fosfoinositid yolları gibi evrimsel olarak korunmuş, yaygın bir sinyal ileti yoludur. Bu yolda ikincil haberci olarak çalışan seramid, ya sfingomiyelinaz etkisi ile sfingo-

miyelinlerden üretilir, ya da seramid sentaz enzimi tarafından de novo olarak sentezlenir.<sup>[1]</sup> Seramid aracılı sinyal yolunun, iskemi, insülin direnci, diyabet, ateroskleroz, septik şok ve over yetersizliği gibi has-

Geliş tarihi: 30.06.2016 Kabul tarihi: 24.11.2016

Yazışma adresi: Dr. Neslihan Çoban, İstanbul Üniversitesi Deneysel Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, Vakıf Gureba Caddesi, 34280 İstanbul, Turkey.

Tel: +90 212 - 414 20 00 e-posta: neslic@istanbul.edu.tr

© 2017 Türk Kardiyoloji Derneği



talıklarda önemli bir role sahip olduğu biyokimyasal ve klinik araştırmalarla gösterilmiştir.<sup>[2]</sup> Obeziteye ve besin fazlalığına bağlı olarak artan serbest yağ asidi, TNF-alfa ve glukokortikoid düzeylerinin, hücre içi lipid metabolitlerini yükselttiği ve bunun sonucunda insülin direncine yol açtığı bilinmektedir.<sup>[3]</sup> Seramidin ise, TNF-alfa gibi enflamatuvar sitokinlere ve doymuş yağ asitleri gibi besinsel uyaranlara bağlı gelişen insülin direncinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.<sup>[2,4-6]</sup> Kalsiyumdan bağımsız olarak, damar endotel hücrelerinde eNOS aktivitesini uyardığı gösterilen seramidin, hipertansiyon ve ateroskleroz için de önemli bir lipid olduğu anlaşılmaktadır.<sup>[7]</sup>

Hücrede biriken seramidin birçok hücre tipi (örneğin pankreas beta hücreleri ve kardiyomyositler) için toksik olduğu, bu nedenle diyabet, hipertansiyon, kalp yetersizliği ve ateroskleroz gibi hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.<sup>[2,8]</sup> Seramidin apoptoz sürecindeki önemini, yüksek LDL kolesterol düzeyi ile ilişkisini, ateroskleroz, iskemi, hipertansiyon ve koroner kalp hastalığındaki olası etkilerini gösteren birçok biyokimyasal çalışma<sup>[9,10]</sup> yapılmıştır. Seramid metabolizması birçok biyokimyasal araştırmaya konu olmasına rağmen genetik olarak henüz araştırılmamıştır. De novo seramid sentezinden sorumlu olduğu bilinen “LAG1 longevity assurance homolog 5 - LAG1 homologu, seramid sentaz 5” (LASS5) geni, kardiyovasküler hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılmasında uygun bir aday gen olarak düşünülmektedir.

Lag (Longevity assurance gene-uzun yaşam sağlayan gen) ailesinin üyesi olan LASS5 37,5 kb uzunluğunda 10 ekzonlu, 12q13.13 yerleşimli bir gendir. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran lokalizasyonlu, Hox DNA bağlanma bölgesini içeren transmembran yerleşimli bir proteini kodlamaktadır. LASS5 geninin kardiyovasküler hastalıklardaki rolü bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada LASS5 geninin, kardiyovasküler risk faktörleri ile ilişkisi daha önceden bilinen bir gen olan AMP'ye duyarlı Protein Kinaz (AMPK) ile dolaylı olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir.<sup>[11]</sup> Bu çalışmada AMPK inhibitörü Compound C'nin (Dorsomorphine: 6-[4-(2-Piperidin-1-ylethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-ylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine, AMPK inhibitör) seramid sentezinin artmasına neden olduğu, bu artışı da LASS5 geni üzerinden yaptığı gösterilmiştir.<sup>[11]</sup> Bununla birlikte yapılan yeni çalışmalarda, farelerde LASS5 geninin ‘knock-out’ (eksiltildiği) edil-

diği durumda C16 seramid düzeyinin azalması ile obezite ve obezite ilişkili hastalıkların azaldığı belirlenmiştir.<sup>[12]</sup> Farelerde yapılan bir başka çalışmada ise, sortilin geni eksikliğinin seramid sentezinden sorumlu LASS5 gen ekspresyonunun azalmasına yol açtığı, bu azalmanın sonucunda obezite ve insülin direncinde yararlı etkiler sağlandığı gösterilmiştir.<sup>[13]</sup>

LASS5 geninin de novo seramid sentezinde rol alması ve daha önceki çalışmalarda oluşturulan kalbe özgü ‘Subtractive’ hibridizasyon cDNA kütüphanesinden elde edilen klonlardan biri olması, kalp hastalıklarında bu genin önemli bir aday gen olduğunu öngörmektedir.<sup>[14]</sup> Ateroskleroz gelişiminde, kilit rol oynayan hücrelerin başında endotel hücreleri gelmektedir. Bu nedenle çalışmanın, endotel hücreleri üzerinde gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Bu çalışmada, öncelikle endotel hücre kültüründe ‘small interfering RNA’ (siRNA) ile LASS5 geninin baskılanması durumunda kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olan ve seramid sentezi ile baskılandığı belirlenen AMPK'nın aktivatörü AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranoside, Acadesine, N1-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl)-5-aminoimidazole-4-carboxamide) varlığında AMPK-Alfa1 geninin ekspresyonunun etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Ek olarak, LASS5 geninin baskılanması durumunda AMPK'nın ateroskleroz ile ilişkili hedef genlerinin ekspresyon değişimleri incelenmiştir.

Bu çalışma ile LASS5 geninin AMPK üzerinden ateroskleroz ve hipertansiyon gibi hastalıklardaki rolünün hücre kültüründe araştırılması amaçlandı.

## YÖNTEMLER

### Endotel hücre dizisi eldesi

Bu çalışmada, HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) (ATCC No. CRL-1730) hücre dizileri kullanıldı. Bu hücre soylarının genel özellikleri aşağıda verilmektedir.

#### Kısaltmalar:

AICAR	AMPK aktivatörü
AMPK	AMP-activated protein kinase
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
GADPH	Endojen kontrol
GFP	Green fluorescent protein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
KLF2	Krüppel-like Factor 2.
LASS/CerS	Longevity assurance homologue/ ceramide synthase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
siRNA	Small interfering RNA

HUVEC hücre dizisi insanda normal umbilikal venden izole edilmiştir. Işık mikroskobu ile incelendiğinde, petri yüzeyine yapışkan halde görünmektedir. Hücrelerin iki katına çıkma zamanı yaklaşık 24 saattir. Bu hücre soyları hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunda sitokinlerin uyarılmasına yanıt oluşturmaları ve özellikle aterosklerozda etkileri nedeniyle, LASS5 ve AMPK genlerini incelemek için çalışmada kullanılmıştır.

### Endotel hücre kültürü

Endotel (HUVEC) hücrelerin çözülme işlemi 37°C'de su banyosunda yaklaşık 5 dk süre ile beklendikten sonra, çözülen hücrelerin 5 mL kültür ortamı içeren santrifüj tüpü içerisine alınarak 125g'de 5-7 dk santrifüj yapılması ile tamamlandı. Elde edilen hücreler %10 fetal bovine serum (FBS, Sigma, ABD) içeren RPMI (Lonza, ABD) kültür ortamı ile dengelenerek  $1.3 \times 10^5$  canlı hücre/mL olacak şekilde 60x20'lik kültür petrilere ekim yapıldı. Endotel hücrelerinin kültürü toplam 5 mL kültür ortamı içerisinde yapıldı. Flasklara ekimi yapılan hücreler, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> basıncında inkübasyona bırakılarak bir gece bekletildi. Hücreler her gün ışık mikroskobu altında hücre yoğunluğu, hücre morfolojileri ve olası bir enfeksiyon açısından kontrol edildi. Kültür ortamı iki günde bir değiştirildi. Hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı. Hücrelerin sayımı ve canlılık oranının belirlenmesi için Vi-Cell cihazı kullanıldı (Vi-CELL™ XR cell counter (Beckman Coulter Life Sciences)). Hücre yoğunluğuna göre pasajlama 1:2 ya da 1:3 şeklinde yapıldı. 60x20'lik petrilere 1:3 oranında pasajlanacağı zaman 100x20'lik petrilere ekim yapıldı. Bu işlem petri içeriğindeki kültür ortamının (Trypsin uygulamasından sonra) tamamının konik bir santrifüj tüpü içerisine alınarak süspansiyon haline getirilmesi ve taze kültür ortamı ile süspansiyon edilerek yeni petrilere ekilmesi şeklinde yapıldı.

### Endotel hücrelerinde LASS5 geni için uygun siRNA konsantrasyonunun belirlenmesi

LASS5 geninin sessizleştirilmesi amacı ile endotel kültürüne, ticari olarak elde edilen siRNA transfeksiyonu yapıldı. Bu deneyler için ticari olarak elde edilen siRNA kitleri kullanıldı (Ambion, California). Hedef ve kontrol siRNA dizileri: hLASS5, AAA-CCCTGTGCACTCTGTATT; ve non-targeting kontrol, AATTCTCCGAACGTG-TCACGT. Deneyde

siRNA transfeksiyonu, yine ticari olarak temin edilen ve lipit aracılıklı transfeksiyon esasına dayanan yöntem ile gerçekleştirildi (Lipofectamine 2000, Invitrogen, California). Hücre canlılığını azaltmadan en yüksek gen sessizleştirilmesini sağlayan siRNA miktarı (%80'in üzerinde) belirlendikten sonra asıl deneye başlandı. Bu amaçla etkin LASS5 siRNA miktarının belirlenmesi için 5 nM-70 nM konsantrasyon aralığı ile denemeler yapıldıktan sonra daha fazla susturulmanın 70 nM'de olduğuna karar verilerek asıl deney bu konsantrasyonda yapıldı. Deneylerde pozitif kontrol olarak GAPDH genine yönelik siRNA, negatif kontrol olarak bilinen herhangi bir geni sessizleştirmeyen siRNA kontrolü kullanıldı (Ambion, California). Deneyler 24-kuyulu petrilere gerçekleştirildi ve deney içi kontrol amacı ile her siRNA için üç kuyucuk kullanıldı. AICAR (Sigma, ABD) konsantrasyonu literatür bilgisine dayanılarak çeşitli konsantrasyon denemeleri sonucunda uygun konsantrasyon seçildi. Deney 24 ve 48 saat sonra sonlandırılarak petri yüzeyinden kazınan hücreler sıvı azotta şok dondurulma işlemiyle RNA izolasyonu yapılana kadar -80°C'de saklandı.

### RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Pellet halinde dondurularak saklanmış olan endotel hücre örneklerinden RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu için ara yoğunlukta RNA içeren örneklerden kaliteli izolasyon imkanını sağlayan ve temin edilen mini-kitler kullanıldı (Roche, High Pure RNA Isolation Kiti, California). Elde edilen RNA örneklerinin kalitesini belirlemek için Nanodrop (Roche 2000, ABD) cihazı ile spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Endotel hücreleri örneklerinden elde edilen total RNA'lardan cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi (Roche, Transcript First Strand cDNA Sentez Kiti, California).

### Seçilen genler için primer tasarlanması

Çalışma içi kontrol amacı ile kullanılacak olan GAPDH kontrol gen ve ek olarak ekspresyon seviyeleri araştırılacak olan LASS5 ve AMPK-Alfa genleri için primerler tasarlandı. Manuel olarak gerçekleştirilen bu işlemde hairpin loop, primerler için homodimer ve iki primer arasındaki hetero-dimerlerin araştırılması amacı ile NCBI Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) ve UNIGENE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>) bilgi bankaları ve Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Oligo-

analizer 3.1 (IDT Technologies, <http://www.idtdna.com>) ve GeneWalker (Cybergene AB, <http://www.cybergene.se/primerdesign/genewalker/genewalker11.html>) programlarından yararlanıldı. mRNA'nın kodlayan bölge dizisi (CDS) içerisinden ve mümkün olduğu durumlarda ekson-ekson sınır dizilerini de içerecek şekilde yapılan primer tasarlamasında, primerlerin 18–22 bp uzunluğunda olmasına, GC oranının %40–60 olmasına ve 3' ucunda GC oranına dikkat edildi. Ayrıca, dizi özelliğinden kaynaklanan nedenlerden dolayı, primer dimer ve hairpin ilmeği içerecek şekilde tasarlama yapılmak zorunda kalındığında delta G seviyesinin yüksek olmamasına dikkat edildi. Primer dizileri: LASS5 'Forward': 5'-tgggaactctgatcatgttcta-3', 'Reverse': 5'-agccgctgatacttggcata-3'. AMPK-Alfa1 'Forward': 5'-gaatggaaggctggatgaaa-3', 'Reverse': 5'-ttctgtgcagcatagttgg-3'. GAPDH 'Forward': 5'-tcaccatcttcaggagcaga-3', 'Reverse': 5'-tgcaggaggcattgctgatga-3'. eNOS 'Forward': 5'-tggtacatgagcactgagatcg-3', 'Reverse': 5'-ccacgttgattccactgctg-3'. KLF2 'Forward': 5'-agacctacaccaagagttcgatc-3', 'Reverse': 5'-catgtgccgttcatgtgcagc-3'.

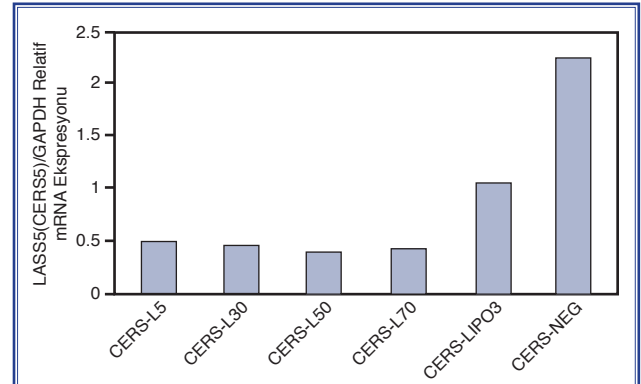
### LASS5 ve AMPK hedef genleri için qRT-PCR

Sentezi yapılan cDNA örnekleri ve tasarlanan gene özgü primerler kullanılarak RT-PCR yapıldı. Ardından qRT-PCR analizleri için en uygun koşullar belirlendi. Çalışılan konsantrasyonlardaki siRNA ile baskılanmayı tespit etmek, LASS5 ve AMPK hedef genlerinin ne derece etkilendiğini saptamak için LASS5, GAPDH, eNOS, KLF2 ve AMPK-Alfa1'e özgü primerleri ile SyberGreen (Roche, California) eş-zamanlı kantitatif PCR tekniği kullanılarak gen ekspresyonu analizleri yapıldı. Kıyaslama sonucundaki değişim, GAPDH (endojen kontrol) transkript seviyelerine göre normalize edildikten sonra hesaplandı.

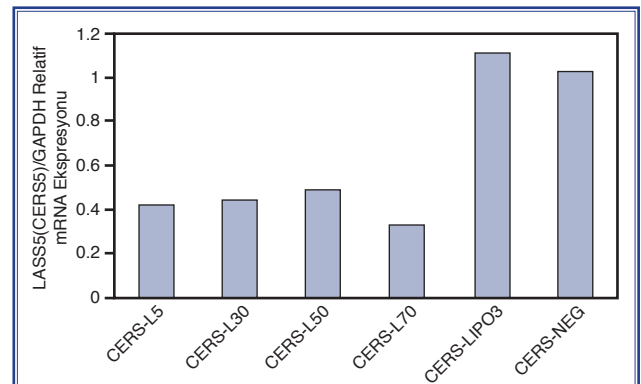
## BULGULAR

Yapılan siRNA konsantrasyon çalışmaları ile elde ettiğimiz bulgular sonucunda, 5 nM, 50 nM ve 70 nM konsantrasyonlarında ekspresyon analizlerinin sonucu GAPDH kontrol geni %95 baskılanırken LASS5 geninin yaklaşık %70 baskılandığını gözlemlendi. Her koşul iki kez çalışıldı ve 24 ile 48 saatlerinde araştırıldı (Şekil 1–3). Bu sonuçlardan yola çıkarak siRNA konsantrasyon aralığını genişleterek yapılan kültür deneyleri ve takibinde yapılan ekspresyon analizleri sonucunda asıl deney için 70 nM'lük konsant-

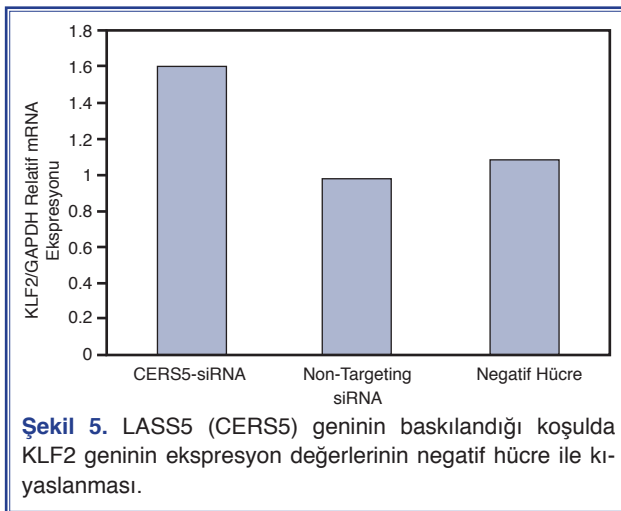
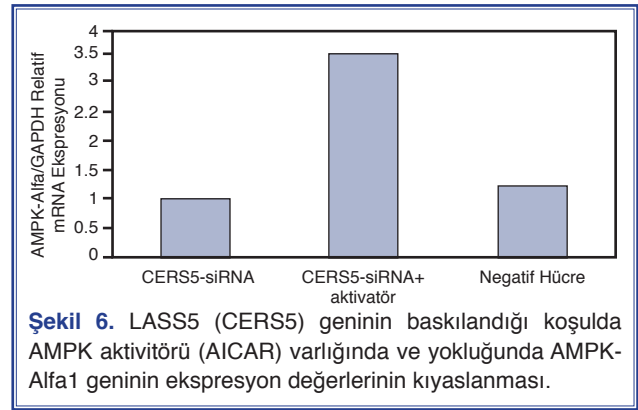
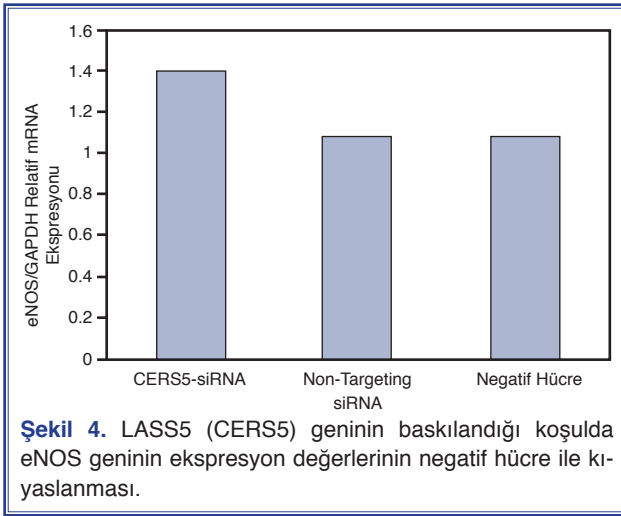
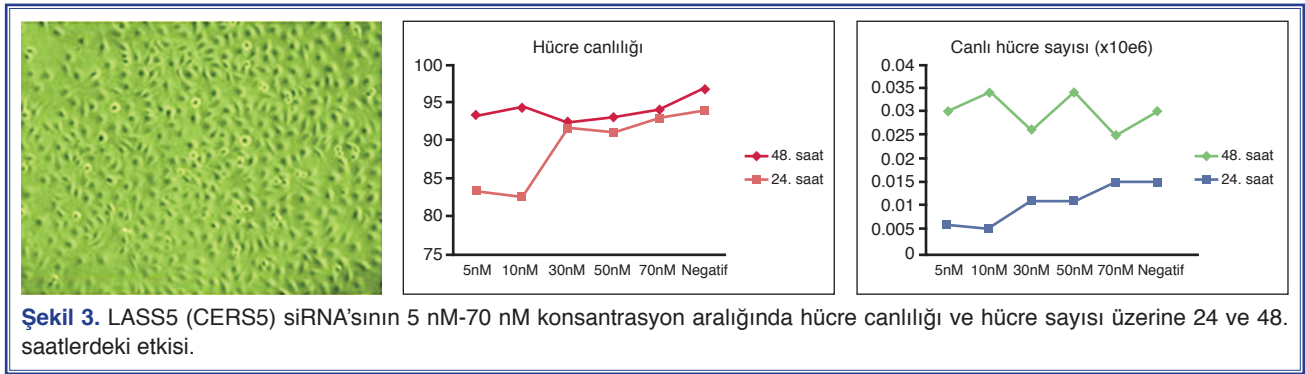
rasyonun kullanılmasına karar verildi (Şekil 1 ve 2). 70 nM konsantrasyon değerinin seçilme nedeni, denenmiş olan diğer konsantrasyonlar ile baskılama oranı karşılaştırıldığında, 48. saatte en çok 70 nM konsantrasyonda baskılanmanın olmasıdır. Ayrıca Şekil 3'de gösterildiği gibi bu konsantrasyonda hücre sayısının ve hücre canlılığının çok değişmediği gözlemlendi. LASS5 ve kontrol gen siRNA çalışması için 70 nM konsantrasyon ile asıl deneye başlanılarak 24. ve 48. inkübasyon saatlerinde susturulma çalışması yapıldı. Bunun sonucunda AMPK aktivatörü için de ayrı koşullar oluşturularak, AMPK-Alfa1 geninin ekspresyonundaki etkilenme oranlarına bakıldı. LASS5 geninin susturulması ile seramid üretiminin azalması eNOS ve KLF2 gen ekspresyon düzeyinde artışa neden olmuştur (Şekil 4 ve 5).



**Şekil 1.** LASS5 (CERS5) ve GAPDH kontrol genlerinin siRNA'larının 5 nM-70 nM konsantrasyon aralığında, 3 µl Lipofectamine 2000 (Mock 3 µl) ile transfeksiyon sonrasında 24. saatte uygun ekspresyon primerleri kullanılarak Real Time PCR'de baskılanma oranlarının gösterimi.



**Şekil 2.** LASS5 (CERS5) ve GAPDH kontrol genlerinin siRNA'larının 5 nM-70 nM konsantrasyon aralığında, 3 µl Lipofectamine 2000 (Mock 3 µl) ile transfeksiyon sonrasında 48. saatte uygun ekspresyon primerleri kullanılarak Real Time PCR'de baskılanma oranlarının gösterimi.



### AMPK aktivatörü ile hücrelerin uyarılması

İlk aşamada AICAR'ın uygun konsantrasyonlarının belirlenmesi için literatürdeki çalışmalar ayrıntılı olarak incelendikten sonra AICAR için HUVEC hücre hattında en uygun konsantrasyonun 1 mM olduğu belirlendi. Bu aktivatör için hücre kültüründeki son-

raki çalışmaları için 1 mM konsantrasyon ile devam edildi.

LASS5 geninin susturulması sonucunda AMPK-Alfa aktivatörü varlığında AMPK-Alfa1 geninin ekspresyon değişimi incelendiğinde hipotezimizi doğrulayan bulgular elde edilmiştir (Şekil 6). LASS5 geninin sessizleştirildiği koşulda AMPK-Alfa1 ekspresyonunun negatif hücre ile kıyaslandığında çok fazla değişmediği görüldü. Diğer taraftan, LASS5 geninin sessizleştirildiği koşula AMPK aktivatörü (AICAR) eklendiğinde ise AMPK-Alfa ekspresyonunun üç kat fazla artış yaptığı gözlemlendi.

### TARTIŞMA

Ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıkların altında yatan temel bir faktördür.<sup>[15-17]</sup> Ateroskleroz, arter intimasında kolesterol birikiminin neden olduğu aterosklerotik plak oluşumu ile sonuçlanan enflamatuvar bir hastalık olarak nitelendirilmektedir.<sup>[19-21]</sup> Aterosklerozun patogeneğinde önemli olduğu klinik ve biyokimyasal çalışmalarda gösterilmiş olan seramid metabolizmasının da genetik düzeyde incelenmesi önem taşımaktadır. Hücrede biriken seramidin birçok hücre

tipi (pankres beta hücreleri ve kardiyomiyositler) için toksik olduğu, bu nedenle de diyabet, hipertansiyon, kalp yetersizliği ve ateroskleroz gibi hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.<sup>[22,23]</sup> Bununla birlikte, aterosklerotik plak içeriğinde seramid oranının yüksek olduğu da bilinmektedir.<sup>[24]</sup> Sfingolipidler ve metabolik ürünleri (seramid) hücre membranının yapısına katılan ve hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alan önemli bileşenlerdir. Çeşitli metabolik yollarda rol alarak çalışan seramid, ya sfingomiyelinaz etkisi ile sfingomiyelinlerden üretilir, ya da seramid sentaz enzimi tarafından de novo olarak sentezi yapılmaktadır.<sup>[25]</sup> De novo seramid sentezinden sorumlu olduğu bilinen LASS5 geni, kardiyovasküler hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılmasında uygun bir aday gen olarak görülmektedir. LASS5 geninin kardiyovasküler hastalıklardaki rolü henüz bilinmemektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada LASS5 geninin, kardiyovasküler risk faktörleri ile ilişkisi daha önceden bilinen bir gen olan AMPK ile dolaylı olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir.<sup>[11]</sup> AMPK, en önemli hücre içi sinyal ileti yollarından görev alan proteinlerden biridir. Hücrede ATP düzeyi azalıp, AMP düzeyi arttığında aktifleşmekte ve genel olarak anabolik yolları baskılayıp ATP üretimini uyarmaktadır.<sup>[26]</sup> AMPK inhibitörü ile ilgili yapılan bir çalışma, compound C bileşiğinin AMPK'yi nasıl baskıladığı incelenmiştir.<sup>[11]</sup> Bu çalışmada compound C, seramid sentezini artırarak AMPK'yi baskıladığı ve seramid sentezindeki artıştan da LASS5 geninin sorumlu olduğu belirlenmiştir.<sup>[11]</sup> Bizim sonuçlarımız da bu çalışmayı desteklemektedir. LASS5 geninin sessizleştirildiği koşulda AMPK hedef genlerinden olan eNOS ve KLF2 ekspresyonunun negatif hücre ile kıyaslandığında artış olduğu gözlemlenmiştir. siRNA koşulunda AMPK aktivatörü eklendiğinde ise, AMPK-Alfa1 ekspresyonunun üç kattan fazla artışa neden olduğu gözlemlendi.

AMPK proteini ile ilgili yapılan çalışmalarda, resveratrolün eNOS aktivitesini uyarma özelliğinin AMPK'ye bağlı olduğu gösterilmiştir.<sup>[27,28]</sup> Diğer bir çalışmada kan akımının endotel hücrelerindeki KLF2 ekspresyonunu uyarmasının AMPK üzerinden olduğu gösterilmiştir.<sup>[29,30]</sup> Tüm bu çalışmaların sonucuna göre AMPK'nin kardiyovasküler hastalık riski ile ilgili etkilerinde, LASS5 düzeyi ve aktivitesinin önemli bir etken olabileceği düşünülmektedir. Çalışma sonuçlarımıza göre seramid sentezinden sorumlu olan LASS5 geninin AMPK üzerinden aterosklerozda ve hipertan-

siyonda çok önemli etkileri olan eNOS ile KLF2 genlerini dolaylı yünden etkilediği düşünülmektedir. Bu sonuçlar, ateroskleroz başlangıcı ve ileriki aşamalarında önemli bir hücre tipi olan endotel hücrelerinde seramid sentezinden sorumlu olan LASS5 gen ekspresyonunun artışının AMPK-Alfa yolağındaki değişim ile sağlanabileceğini düşündürmektedir. LASS5 geni susturulduğunda AMPK hedefindeki genlerin ekspresyon değişimleri olabileceği ve LASS5 geninin ateroskleroz patogenezinde önemli bir rol alabileceği düşünülmektedir.

Kardiyovasküler hastalıklar açısından AMPK ve seramid düzeyi arasındaki ilişki çok sayıda çalışmada incelenmiş olmasına rağmen,<sup>[32,33]</sup> bu ilişkinin genetik nedeni üzerinde yapılmış çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, mikroRNA'lar üzerinden AMPK'nın fosforilasyonu ile seramid düzeyinin değiştirildiği öne sürülmekte olup, miyokardiyal AMPK fosforilasyonu ile obezite ve tip 2 diyabetin azalmasında hangi mekanizmanın rol aldığı henüz tamamen anlaşılammıştır.<sup>[34]</sup>

Bu ön sonuçlarımız, LASS5 geninin aterosklerotik hücre tipi olan endotelde yer alan kontrol mekanizmalarından biri olabileceğini göstermektedir. Ancak, daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için çalışılan hedef genlerin metabolizma yolları ile ilgili geniş kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır. Elde ettiğimiz sonuçların ispatlanması için, öncelikle AMPK ligandlarının varlığında, ligandların aktif oldukları süre ile AMPK gen ekspresyonunun etkilendiği gerçek sürenin tespit edilmesi ve hedef genler çoğaltılarak daha detaylı araştırmaların yapılması mümkündür. Çalışmanın devamında ise gen ekspresyonunun protein seviyesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi için protein analizlerinin yapılması gerekmektedir. Ayrıca, seramid sentaz aktivitesinin ölçümü ve kütle spektrometre çalışmaları gibi daha detaylı analizler ile sonuçların doğrulanması da gerekmektedir. Sonuçların ileride hayvan deneyleri ile de doğrulanması klinik olarak uygulanabilirliğini kolaylaştıracaktır. İnsan aterosklerotik plağındaki hücresel değişimler ile LASS5 ve AMPK aktivitesi arasındaki ilişkinin *in vivo* olarak da doğrulanması, klinik olarak büyük önem taşıyabilir. Doğrudan hasta materyalinin kullanılacağı çalışmalar ile bu konuda daha net bilgiler sağlanabilir.

### Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu tarafından desteklemiştir. Proje

No: 115S139. Ayrıca, bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (No: 33021 ve 52989).

***Yazar(lar) ya da yazı ile ilgili bildirilen herhangi bir ilgi çakışması (conflict of interest) yoktur.***

### KAYNAKLAR

- Mathias S, Peña LA, Kolesnick RN. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 1998;335:465–80.
- Summers SA, Nelson DH. A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome. *Diabetes* 2005;54:591–602.
- Grigsby RJ, Dobrowsky RT. Inhibition of ceramide production reverses TNF-induced insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:1121–4.
- Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 2006;45:42–72.
- Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, et al. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2007;5:167–79.
- Zierath JR. The path to insulin resistance: paved with ceramides? *Cell Metab* 2007;5:161–3.
- Igarashi J, Thatte HS, Prabhakar P, Golan DE, Michel T. Calcium-independent activation of endothelial nitric oxide synthase by ceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12583–8.
- Pickersgill L, Litherland GJ, Greenberg AS, Walker M, Yeaman SJ. Key role for ceramides in mediating insulin resistance in human muscle cells. *J Biol Chem* 2007;282:12583–9.
- Argaud L, Prigent AF, Chalabreysse L, Loufouat J, Lagarde M, Ovize M. Ceramide in the antiapoptotic effect of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:246–51.
- Ichi I, Nakahara K, Miyashita Y, Hidaka A, Kutsukake S, Inoue K, et al. Association of ceramides in human plasma with risk factors of atherosclerosis. *Lipids* 2006;41:859–63.
- Jin J, Mullen TD, Hou Q, Bielawski J, Bielawska A, Zhang X, et al. AMPK inhibitor Compound C stimulates ceramide production and promotes Bax redistribution and apoptosis in MCF7 breast carcinoma cells. *J Lipid Res* 2009;50:2389–97.
- Gosejacob D, Jäger PS, Vom Dorp K, Frejno M, Carstensen AC, Köhnke M, et al. Ceramide Synthase 5 Is Essential to Maintain C16:0-Ceramide Pools and Contributes to the Development of Diet-induced Obesity. *J Biol Chem* 2016;291:6989–7003.
- Rabinowich L, Fishman S, Hubel E, Thurm T, Park WJ, Pewzner-Jung Y, et al. Sortilin deficiency improves the metabolic phenotype and reduces hepatic steatosis of mice subjected to diet-induced obesity. *J Hepatol* 2015;62:175–81.
- Komurcu E. Subtractive hibridizasyon yöntemi ile kalbe özgü cDNA kütüphanesinin oluşturulması. İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Yüksek Lisans Tezi, 2002.
- Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 1996;124 Suppl.: 1–9.
- Falk E, Fuster V. Atherogenesis and its Determinants. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, editors. *Hurst's The Heart*. 10th ed. USA. International Edition: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001. p. 1065–93.
- Fruchart JC, Nierman MC, Stroes E, Kastelein J, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 2004;109:15–9.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135–43.
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006;6:508–19.
- Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:937–54.
- Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(8 Suppl):13–8.
- Aerts JM, Ottenhoff R, Powlson AS, Grefhorst A, van Eijk M, Dubbelhuis PF, et al. Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity. *Diabetes* 2007;56:1341–9.
- Adams JM 2nd, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, et al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 2004;53:25–31.
- Edsfeldt A, Dunér P, Ståhlman M, Mollet IG, Ascianto G, Grufman H, et al. Sphingolipids Contribute to Human Atherosclerotic Plaque Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:1132–40.
- Wegner MS, Schiffmann S, Parnham MJ, Geisslinger G, Grösch S. The enigma of ceramide synthase regulation in mammalian cells. *Prog Lipid Res* 2016;63:93–119.
- López M, Nogueiras R, Tena-Sempere M, Diéguez C. Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat Rev Endocrinol* 2016;12:421–32.
- Xu Q, Hao X, Yang Q, Si L. Resveratrol prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388:389–94.
- Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients* 2016.
- Cui X, Liu X, Feng H, Zhao S, Gao H. Grape seed proanthocyanidin extracts enhance endothelial nitric oxide synthase expression through 5'-AMP activated protein kinase/Sirtuin 1-Krüppel like factor 2 pathway and modulate blood pressure in ouabain induced hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 2012;35:2192–7.
- Young A, Wu W, Sun W, Benjamin Larman H, Wang N, Li

- YS, et al. Flow activation of AMP-activated protein kinase in vascular endothelium leads to Krüppel-like factor 2 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1902–8.
31. Weikel KA, Cacicedo JM, Ruderman NB, Ido Y. Glucose and palmitate uncouple AMPK from autophagy in human aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015;308:249–63.
32. Ishibashi Y, Kohyama-Koganeya A, Hirabayashi Y. New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:1475–85.
33. Erickson KA, Smith ME, Anthonymuthu TS, Evanson MJ, Brassfield ES, Hodson AE, et al. AICAR inhibits ceramide biosynthesis in skeletal muscle. *Diabetol Metab Syndr* 2012;4:45.
34. Lopaschuk GD, Ussher JR. Targeting microRNAs to limit myocardial lipid accumulation. *Circ Res* 2015;116:229–31.
- Anahtar sözcükler:** AMPK; ateroskleroz; LASS5, seramid; siRNA.
- Keywords:** AMPK; atherosclerosis; LASS5; ceramide; siRNA.