

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy

ELUCIDATING AAPTAMINE MECHANISM OF ACTIONS IN REDUCING PCSK9 EXPRESSION AND INCREASING CHOLESTEROL UPTAKE IN HepG2 CELL LINE

ALLICIA ANAK JACK

2023

Main Supervisor : Professor Dr. Tengku Sifzizul Tengku Muhammad, Ph.D.

Faculty/Institute : Institute of Marine Biotechnology

Atherosclerosis is a pathophysiological condition characterised by chronic inflammation and accumulation of high plasma cholesterol levels in the arterial walls. The discovery of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) has paved a significant new pathway for a better understanding of cholesterol homeostasis regulation. PCSK9 forms a good target to screen for small molecule inhibitors that have the potential in reducing the plasma lipid levels via reducing PCSK9 expression and increasing the levels of low-density lipoprotein receptor (LDLR). Using the HepG2 cell line model, this study investigated the mechanisms of aaptamine, as PCSK9 inhibitor, and its efficacy in up regulating LDLR protein levels and LDL cholesterol (LDL-C) uptake. Aaptamine produced a significant reduction in PCSK9 promoter activity and mRNA expression (0.41-fold and 0.71-fold, respectively) at 50 μ M compared to control. In elucidating *cis*-acting regions that may be responsible in mediating the inhibitory action of aaptamine on PCSK9 gene, aaptamine was found to inhibit D1, D2, D4 and D5 promoter fragments to 0.41-fold, 0.37-fold, 0.24-fold and 0.45-fold of control, respectively. As D2 fragment harbours the highest number of peroxisome proliferator responsive elements (PPRE), the selected *cis*-acting elements were subjected to site-directed mutagenesis. Mutated PPRE at locations -1108/-1105 (PPRE2) and -734/-731 (PPRE3) attenuated the inhibitory effect of aaptamine. Thus, peroxisome proliferator activated receptor

(PPAR), the corresponding transcription factor of PPRE, may play important role in mediating the PCSK9 inhibitory effect of aaptamine. Western blot analysis showed that aaptamine phosphorylated signaling components MEK-MAPK, PKC α , and PI3K, which mediate its inhibitory effect on PCSK9 expression. Inhibitor analysis confirmed the involvement of these components, as all requisite inhibitors increased PCSK9 mRNA levels. Immunohistochemistry study showed that aaptamine decreased PCSK9 protein expression by 41.1% and, inversely increased the level of LDLR protein expression as well as LDL-C uptake by 28% and 28.9% of control, respectively. These data suggest that aaptamine has significant impact on lowering PCSK9 gene expression, which increases both LDLR protein levels and LDL-C uptake. Thus, aaptamine has vast potential to be further developed as a new cholesterol-lowering drug for therapeutic intervention against the progression of atherosclerosis.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk ijazah Doktor Falsafah

**PENGHURAIAN MEKANISME TINDAKAN AAPTAMIN DALAM
MERENCATKAN PENGEKSPRESAN PCSK9 DAN MENINGKATKAN
PENGAMBILAN KOLESTEROL PADA TITISAN SEL HepG2**

ALLICIA ANAK JACK

2023

Penyelia Utama : Profesor Dr. Tengku Sifzizul Tengku Muhammad, Ph.D.

Fakulti/Institut : Institut Bioteknologi Marin

Aterosklerosis adalah keadaan patofisiologi yang dicirikan oleh keradangan kronik dan pengumpulan paras kolesterol plasma yang tinggi di dinding arteri. Penemuan proprotein penukaran subtilisin/kexin jenis 9 (PCSK9) telah membuka laluan baharu yang signifikan untuk pemahaman yang lebih baik tentang pengawalaturan homeostasis kolesterol. PCSK9 membentuk sasaran yang baik untuk menyaring perencat molekul kecil yang berpotensi untuk mengurangkan paras lipid plasma melalui pengurangan ekspresi PCSK9 dan peningkatan paras reseptor lipoprotein berketumpatan rendah (LDLR). Menggunakan model sel turunan HepG2, kajian ini menyiasat mekanisme aaptamin, sebagai perencat PCSK9, dan keberkesanannya dalam meningkatkan tahap protein LDLR dan pengambilan kolesterol LDL (LDL-C). Aaptamin menghasilkan pengurangan signifikan dalam aktiviti promoter PCSK9 dan ekspresi mRNA (masing-masing 0.41 kali ganda dan 0.71 kali ganda) pada 50 μ M berbanding kawalan. Dalam pengenalpastian lokasi unsur tindakan-cis yang mungkin bertanggungjawab dalam membantu tindakan perencatan aaptamin pada gen PCSK9, aaptamin didapati merencat fragmen promoter D1, D2, D4 dan D5 masing-masing, kepada 0.41 kali ganda, 0.37 kali ganda, 0.24 kali ganda dan 0.45 kali ganda kawalan. Oleh kerana fragmen D2 mempunyai bilangan unsur responsif peroksisom proliferasi (PPRE) tertinggi, unsur-unsur tindakan-cis tersebut dipilih untuk menjalani mutagenesis terarah tapak.

PPRE termutasi di lokasi -1108/-1105 (PPRE2) dan -734/-731 (PPRE3) melemahkan kesan perencatan aaptamin. Oleh itu, reseptor diaktifkan proliferasi peroksisom (PPAR), faktor transkripsi kepada PPRE, mungkin memainkan peranan penting dalam mengantarkan kesan perencatan PCSK9 oleh aaptamin. Analisis Western blot menunjukkan bahawa komponen isyarat fosforilasi aaptamin MEK-MAPK, PKC α , dan PI3K, yang mengantara kesan perencatannya pada ekspresi PCSK9. Analisis perencat mengesahkan penglibatan komponen ini, kerana semua perencat berkenaan meningkatkan tahap ekspresi mRNA PCSK9. Kajian imunohistokimia menunjukkan bahawa aaptamin menurunkan ekspresi protein PCSK9 sebanyak 41.1% dan, secara berlawanan meningkatkan paras ekspresi protein LDLR serta pengambilan LDL-C masing-masing sehingga 28% dan 28.9%, berbanding kawalan. Data-data ini menunjukkan bahawa aaptamin mempunyai kesan yang signifikan terhadap penurunan ekspresi gen PCSK9, yang seterusnya meningkatkan paras kedua-dua protein LDLR dan pengambilan LDL-C. Oleh itu, aaptamin mempunyai potensi besar untuk dikembangkan lagi sebagai ubat penurun kolesterol baharu untuk intervensi terapeutik terhadap perkembangan aterosklerosis.