

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

**ELUCIDATING MOLECULAR MECHANISMS OF AAPTAMINE ON  
ATTENUATION OF STATIN-INDUCED PCSK9 EXPRESSION AND  
CHOLESTEROL UPTAKE IN LIVER**

**ABDUL MATIN**

**MAY 2025**

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

**Co-Supervisor: Dr. Gul-E-Saba Chaudhry, Ph.D**

**School/Institute: Institute of Climate Adaptation and Marine  
Biotechnology**

A persistently elevated level of LDL-cholesterol (LDL-C) contributes to atherosclerosis, a key driver of cardiovascular diseases, which remain the leading cause of death worldwide. Statins, the primary treatment for lowering LDL-C, also upregulate proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), which in turn, degrades LDL receptors (LDLR), thereby limiting statin efficacy. Aaptamine, a marine-derived alkaloid, has been shown to downregulate PCSK9 gene expression. Targeting PCSK9 may enhance LDL-C clearance and improve statin therapy. This study aimed to investigate the effects of aaptamine on statin-induced PCSK9 upregulation, LDLR expression, and LDL-C uptake in human liver cells, as well as to elucidate the underlying molecular mechanisms. HepG2 cells were treated with simvastatin (10  $\mu$ M), aaptamine (12.5–100  $\mu$ M), or both. PCSK9 mRNA levels were analysed using real-time PCR, and protein expression was assessed via western blot and immunohistochemistry. Promoter-reporter assays and PPAR $\alpha$  knockdown studies were conducted to explore the regulatory mechanisms, while the involvement of signalling pathways was evaluated using real-time PCR and western blot analysis. Results demonstrated that simvastatin significantly increased PCSK9 gene expression,

whereas co-treatment with aaptamine reduced its expression in a dose-dependent manner. Western blot and immunohistochemistry confirmed a corresponding decrease in PCSK9 protein levels. While simvastatin alone slightly increased LDLR expression, co-treatment with aaptamine further enhanced LDLR levels, leading to greater LDL-C uptake. Promoter-reporter assays revealed that simvastatin and aaptamine, respectively, increased and decreased the transcriptional activity of the D1 and D2 fragments of the PCSK9 promoter. Co-treatment suppressed this activity compared to simvastatin alone. Mutational analysis identified a mutated peroxisome proliferator response element (PPRE) in the D2 fragment (designated as PPRE-2) attenuated aaptamine inhibitory effect on statin-induced PCSK9 transcriptional activity, while PPAR $\alpha$  knockdown confirmed PPAR $\alpha$  role in mediating aaptamine suppression of simvastatin-induced PCSK9 transcription. Additionally, co-treatment with aaptamine and simvastatin increased PI3K phosphorylation, whereas simvastatin alone did not, suggesting the involvement of the PI3K pathway in PCSK9 regulation. These findings suggest that aaptamine suppresses simvastatin-induced PCSK9 expression through PPAR $\alpha$  and PI3K signalling, thereby enhancing LDLR levels and LDL-C uptake. Thus, aaptamine emerges as a potential marine-derived compound for improving statin efficacy in hypercholesterolemia treatment.

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

**ELUSIDASI MEKANISME MOLEKUL AAPTAMIN DALAM  
PENGURANGAN EKSPRESI PCSK9 YANG DIHASILKAN OLEH  
STATIN DAN PENGAMBILAN KOLESTEROL DALAM HATI**

**ABDUL MATIN**

**MAY 2025**

**Penyelia Utama: Professor Dr. Tengku Sifzizul Tengku Muhammad, Ph.D**

**Penyelia Bersama: Dr. Gul-E-Saba Chaudhry, Ph.D**

**Pusat Pengajian/Institut: Institut Adaptasi Iklim dan Bioteknologi Marin**

Tahap LDL-kolesterol (LDL-C) yang meningkat secara berterusan menyumbang kepada aterosklerosis, penyebab utama penyakit kardiovaskular, yang kekal sebagai punca utama kematian di seluruh dunia. Statin, rawatan utama untuk menurunkan LDL-C, juga mengawalatur proprotein convertase subtilisin/kexin jenis 9 (PCSK9), yang seterusnya, memusnahkan reseptor LDL (LDLR), dengan itu mengehadkan keberkesanan statin. Aaptamine, alkaloid yang berasal dari laut, telah ditunjukkan untuk menurunkan pengekspresan gen PCSK9. Penyasaran PCSK9 boleh meningkatkan penghapusan LDL-C dan meningkatkan terapi statin. Kajian ini bertujuan untuk menyiasat kesan aaptamin pada peningkatan PCSK9 yang disebabkan oleh statin, pengekspresan LDLR, dan pengambilan LDL-C dalam sel hati manusia, serta menjelaskan mekanisme molekul yang bertanggungjawab. Sel HepG2 dirawat dengan simvastatin (10  $\mu$ M), aaptamine (12.5–100  $\mu$ M), atau kedua-duanya. Tahap mRNA PCSK9 dianalisis menggunakan PCR masa nyata, dan pengekspresan protein dinilai melalui western blot dan imunohistokimia. Ujian promoter-reporter dan kajian *knockdown* PPAR $\alpha$  telah dijalankan untuk meneroka mekanisme pengawalaturan, manakala penglibatan laluan isyarat dinilai menggunakan analisis PCR masa nyata dan western blot. Keputusan menunjukkan bahawa simvastatin meningkatkan

pengekspresan gen PCSK9 dengan ketara, manakala rawatan bersama dengan aaptamin mengurangkan pengekspresannya secara kebergantungan kepada dos. Western blot dan imunohistokimia mengesahkan penurunan yang sama dalam tahap protein PCSK9. Walaupun simvastatin sahaja meningkatkan sedikit pengekspresan LDLR, rawatan bersama dengan aaptamin meningkatkan lagi tahap LDLR, yang membawa kepada pengambilan LDL-C yang lebih tinggi. Asai promoter-reporter mendedahkan bahawa simvastatin dan aaptamin, masing-masing, meningkatkan dan menurunkan aktiviti transkrip fragmen D1 dan D2 promoter PCSK9. Rawatan bersama menindas aktiviti ini berbanding simvastatin sahaja. Analisis mutasi mengenalpasti unsur tindak balas proliferasi peroksisom bermutasi (PPRE) dalam serpihan D2 (dipanggil sebagai PPRE2) yang melemahkan kesan perencatan aaptamin pada aktiviti transkripsi PCSK9 disebabkan oleh statin, manakala *knockdown* PPAR $\alpha$  mengesahkan peranan PPAR $\alpha$  dalam membantu penindasan aaptamin terhadap transkripsi PCSK9 diaruh simvastatin. Tambahan lagi, rawatan bersama aaptamin dan simvastatin meningkatkan fosforilasi PI3K, manakala simvastatin sahaja tidak, mencadangkan penglibatan laluan PI3K dalam pengawalaturan PCSK9. Penemuan ini menunjukkan bahawa aaptamin menindas pengekspresan PCSK9 yang disebabkan oleh simvastatin melalui isyarat PPAR $\alpha$  dan PI3K, oleh itu meningkatkan tahap LDLR dan pengambilan LDL-C. Oleh itu, aaptamin muncul sebagai sebatian yang berasal dari marin yang berpotensi untuk meningkatkan keberkesanan statin dalam rawatan hiperkolesterolemia.