

AMYLOIDOSIS: INSIGHTS FROM PROTEOMICS

Ahmet Doğan

Departments of Pathology and Laboratory Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York ABD

ABSTRACT

Amyloidoses are a spectrum of disorders caused by abnormal folding and extracellular deposition of proteins. The deposits lead to tissue damage and organ dysfunction, particularly in the heart, kidneys, and nerves. There are at least 30 different proteins that can cause amyloidosis. The clinical management depends entirely on the type of protein deposited, and thus on the underlying pathogenesis, and often requires high-risk therapeutic intervention. Application of mass spectrometry-

based proteomic technologies for analysis of amyloid plaques has transformed the way amyloidosis is diagnosed and classified. Proteomic assays have been extensively used for clinical management of patients with amyloidosis, providing unprecedented diagnostic and biological information. They have shed light on the pathogenesis of different amyloid types and have led to identification of numerous new amyloid types, including ALECT2 amyloidosis, which is now recognized as one of the most common causes of systemic amyloidosis in North America.

GİRİŞ: Amiloidoza neden olabilecek en az 30 farklı protein vardır. Klinik tedavi tamamen biriken proteinin türüne ve dolayısıyla altta yatan patogeneze bağlıdır ve genellikle yüksek riskli terapötik müdahale gerektirir. Amiloid plaklarının analizi için kütle spektrometrisi tabanlı proteomik teknolojilerin uygulanması amiloidozun teşhis ve sınıflandırılma şeklini değiştirmiştir. (Tablo 1)

- Amiloid oluşumu; Tek bir proteinin ilk anormal katlanması ve ardından fibrillojenezi başlatan oligomerlerin oluşmasını içeren çok aşamalı bir işlemdir. Daha sonra bu protofibriller β -pilili tabaka biçiminde dallanmayan ve bükülmeyen fibrillerden oluşan daha kararlı bir amiloid yapı oluşturmak üzere birleşirler.
- İn vitro olarak amiloidogenezin kinetiği başlaması için uzun bir süre gerekiyor gibi gözükse de değişmiş termodinamik gereklilik gösteren bir olay oluştuğunda çarpıcı bir şekilde hızlanır.

Amiloidoz Tanısı

- Sistemik amiloidozdaki kötü klinik sonuç göz önüne alındığında tedavi genellikle sistemik AL amiloidozu için KİT ile yüksek doz kemoterapi içerirken kalıtsal ATTR amiloidozu için karaciğer nakli gibi agresif yaklaşımları içerir. Bu nedenle amiloidoza neden olan proteinin erken ve doğru tanımlanması esastır.
- Amiloidoz tanısında çok yardımcı olabilecek klinik ve laboratuvar bulguları vardır. Halen kesin bir tanı doku biyopsisi ve mikroskopik inceleme gerektirmektedir.
- Genellikle görüntü rehberliğinde küçük biyopsiler kullanarak etkilenen organı hedeflenmektedir. En iyi bilinen tarama prosedürü, ayakta tedavi ortamında yapılabilen ve aynı gün sonuç veren karın cilt altı yağ aspirasyonudur. Bu prosedür spesifik ve nispeten duyarlıdır ve sistemik amiloidozdan muzdarip hastaların% 70-80'inde amiloid

birikiminin varlığını tespit edebilir.

- FFPE dokularının rutin hematoksilin-eozin (H&E) ile kaplanmış bölümlerinde amiloid birikintileri hücre dışı eozinofilik amorf malzeme olarak görünür. Kolajen lifleri, fibrin, diğer Ig birikintileri veya hücre dışı matris malzemeleri gibi diğer birikintiler aynı görünüme sahip olabilir. Bunu ayırt etmek için özellikle amiloidin β -kıvrımlı tabaka yapısına bağlanan ve diğer birikintilere bağlanmayan özel boyamalar tanımlanmıştır. En yaygın kullanılan boya amiloid birikintilerini kırmızı ve pembe ile boyayan Kongo kırmızısıdır. Polarize ışık altında bakıldığında Kongo kırmızısı amiloid birikintilerini polarizörün açısına bağlı olarak bir dizi anormal renk reflesi verir. Bu karakteristik özellik amiloidoz tanısı için temel bir gereksinimdir
- Tarihsel olarak immünohistokimyal yöntem amiloidoza neden olan proteinleri tanımlamak için en yaygın kullanılan yöntemdir.

Bununla birlikte bu yöntem farklı amiloid tiplerinin tümünü tespit edebilmede;

1. Reaktif serum kontaminasyonu
 2. Yüksek arka plan boyaması
 3. Formalin fiksasyonundan sonra protein çapraz bağlanması nedeniyle oluşan protein çaprazlaşmaları
 4. Anormal katlanma ve
 5. Spesifik antikor eksikliği gibi bir takım nedenlerden ötürü yüksek özgüllük ve hassasiyeti yoktur.
- İmmunolojik testlerle bu zorlukların üstesinden gelmek için kütle spektrometresi (MS) bazlı proteomik alanındaki teknolojik gelişmelerden faydalanmış ve amiloidozu büyük duyarlılık ve özgüllükle teşhis ve sınıflandırabilecek klinik sınıf deneyler geliştirmiştir. Bu tür analizler kapsamlı bir şekilde karşılanmayan bir klinik ihtiyacı ele

almakla kalmamış aynı zamanda yeni amiloid tipleri ve biyolojik keşiflerin tanımlanmasına da yol açmıştır. Bu gelişmelerden bazıları aşağıda detaylı olarak ele alınmıştır.

MASS SPECTROMETRY-BASED PROTEOMICS (KİTLE SPEKTROMETRİSİNE DAYALI PROTEOMİ)

- Tandem kütle spektrometresi analizinde ana peptidin kütle-şarj (m/z) oranını ölçer. Daha sonra önceden belirlenmiş kriterler ile seçilen peptitler helyum gibi bir inert gaz ile çarpışarak parçalanmak için bir çarpışma hücresine yönlendirilir. Bu sürece çarpışma kaynaklı ayrışma (CID) denir. CID ile oluşturulan fragmanlar ikinci MS ile ölçülür.
- İnsan proteomunda bulunan her bir triptik peptidi MS / MS ile analiz edilen peptidin amino asit dizisini tahmin etmeyi mümkün kılan benzersiz bir CID düzenine sahiptir. Amino asit dizilerini tahmin etmek için bir dizi karmaşık hesaplama algoritması geliştirilmiştir. Her bir peptidin gözlenen parçalanma modelini referans insan genomu tarafından tahmin edilen tüm insan triptik peptidlerinin teorik parçalanma modeliyle karşılaştırmak için algoritmalar kullanılır. Bu hesaplama işlemi yeni nesil MS enstrümantasyonunun kütle doğruluğu nedeniyle peptitleri tanımlamak için büyük bir duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir.

AMYLOİDOZİS TANISI VE SINIFLANDIRILMASINDA MASS SPECTROMETRY TABANLI PROTEOMİ UYGULAMASI

- Sistemik amiloidoz sıklıkla ince belirti ve semptomlarla sinsiyeortayaçıkırevkliniklebulgularçokçeşitliolduğundan diğer kalp, böbrek ve nörolojik hastalıkları taklit edebilir. Gereksiz yüksek riskli hedef organ biyopsilerini önlemek için sistemik amiloidozu hızlı ve etkili bir şekilde taramak için bir dizi yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin en yaygın kullanılanı Kongo kırmızısı boyalı abdominal FFA örneklerinin mikroskopik incelemesidir. FFA basit ve hızlıdır ayrıca sistemik amiloidoz tanısında yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip bir ayaktan tanı yöntemidir. Bununla birlikte FFA örneğinde amiloidoz teşhisi konulduktan sonra sistemik amiloidozun yönetimi için gerekli olan spesifik amiloid tipinin daha fazla tanımlanması yakın zamana kadar mümkün olmamıştır. MS temelli proteomik yaklaşımlar bu sorunu gidermek için başarıyla kullanılmıştır.
- Ele almak istediğimiz sorulardan biri amiloidden etkilenen dokuları normal yağ dokusundan ayırt edebilecek bir panamiloid fenotipi için evrensel bir imza belirleyebilmemizdi. Üç proteinin en az ikisi;

Apolipoprotein E

Serum amiloid P

Apolipoprotein A-IV

Temsil eden peptit spektrumlarının varlığının amiloid varlığı için mükemmel bir vekil biyokimyasal belirteç olduğunu gözlemledik.

- Tersine aynı zamanda amiloid plaklara da dahil edilen apolipoprotein AI yağ dokusunun normal bir bileşeni olarak mevcuttu ve bu nedenle amiloidoz için bir marker olarak kullanılmadı.
- İlginçtir ki bu imza sistemik amiloidoz olduğu bilinen ancak Kongo kırmızısı boyama ve mikroskopu ile incelenen FFA örneklerinde amiloid bulunmayan hastalara uygulandığında numunelerin önemli bir grubunda mikroskopik amiloidoz kanıtı bulunmasada bir amiloid proteome imzası vardı. Bu imza proteomik analizin FFA örneklerinde sistemik amiloidoz tanısı için mikroskopiden daha duyarlı bir araç olabileceğini ve submikroskopik tortuları tespit edebileceğini göstermektedir. (% 98'e karşı % 70) (**Tablo 2**)

Renal ALECT2 Amiloidoz

ALECT2 proteinüri ile birlikte veya proteinüri olmadan yavaş yavaş ilerleyici böbrek yetmezliği ile başvuran çoğunlukla İspanyol hastaları etkileyen son dönem böbrek hastalığının önemli bir nedeni olarak kabul edilmektedir. Böbrekte LECT2 birikiminin; yaşamın başlarında başlayan ve önemli bir birikim oluşana kadar tespit edilemeyen genetik bir yatkınlığın söz konusu olduğu amiloidoz hastalığıdır. Karaciğer dalak ve hatta kalp gibi diğer organlarda amiloid birikmesine neden olur. Renal ALECT2 amiloidozu olan hastalar için prognoz önemli kardiyak tutulum olmadığından AL ve AA amiloidozu olanlara göre çok daha iyidir. ALECT2 amiloidozu için spesifik bir tedavi yoktur ancak yanlış yönetimi önlemek için MS tabanlı proteomik test ile kesin bir teşhis konulabilmiştir.

B2-microglobulin bağlı amiloidoz normalde uzun süreli diyalize bağlı oluşan bir amiloidoz türüdür ve herediter bir formu yoktur. Ancak bu yöntemle hiç diyalize girmemiş olan fransız bir ailede herediter B2- microglobulin amiloidosis saptamışlar.

Bu yöntemle yapılan başka bir çalışmada insulin kullanımına bağlı oluşan lipodistrofinin amiloidozun bir türü olabileceğini göstermişler. Hatta mass spectrumun yöntemiyle hastanın hangi insulin firmasının ürünü kullandığını bile tespit etmişler.

SONUÇLAR

- Amiloidozlar; hücre dışı dokularda proteinlerin anormal birikmesinden kaynaklanan protein biriktirme bozukluklarıdır. Tortular çeşitli mekanizmalar tarafından doku hasarına yol açar ve özellikle gıç, kalp, böbrekler ve sinirlerde organ fonksiyon bozukluğuna neden olur. Amiloidoza neden olabilen en az 30 farklı protein vardır ve mikroskopik inceleme ile birbirlerinden ayırt

edilemezler. Klinik tedavi tamamen biriken proteinin türüne ve dolayısıyla altta yatan patogeneze bağlıdır. MS bazlı amiloid plaklarının proteomik analizi;amiloidozun teşhis ve sınıflandırılma şeklini değiştirmiştir. Bu klinik yöntem amiloidozlu binlerce hastanın klinik yönetimi için yaygın olarak kullanılmıştır. Tanının spesifik reaktiflerin mevcudiyetine ve olası klinik hedeflerin bilgisine bağlı olduğu önceki immünohistokimyasalların aksine, MS-bazlı proteomik testler önceden bilgi veya hipotez gerektirmez. Sadece amiloid plakının protein içeriğinin bilinmesi yeterlidir. Rutin klinik uygulamaya katkıda bulunmaya ek olarak; MS bazlı analizler farklı amiloid tiplerinin patogeneze ışık tuttu.

- Ayrıca yeni kalıtsal amiloidoz sendromları ve bir peptid ilacının biriktirilmesinin neden olduğu bir iyatrojenik amiloidoz dahil yeni amiloid tiplerinin tanımlanmasına yol açtı. Belki de en önemlisi ALECT2 amiloidozunun Kuzey Amerika popülasyonlarında majör bir sistemik amiloidoz türü olarak tanımlanmasını sağlamış oldu.

Çeviri ve özet Dr. Abdülkadir Fincan tarafından yapılmıştır.

Tablo 1

Table 1: Amyloidosis: nomenclature and classification (excluding primary central nervous system amyloid syndromes)

Nomenclature	Protein	Gene	Systemic (S) or localized (L)	Acquired (A) or hereditary (H)
AL	Immunoglobulin light chain	IGK@ IGL@	S,L	A,H
AH	Immunoglobulin heavy chain	IGH@	S,L	A
AA	Serum a myloid A	SAA1 SAA2	S	A
ATTR	Tranthyretin	TTR	S	A,H
AB2M	B-2 microglobulin	B2IA	S,L	A,H
AApoAI	Apolipo protein A-I	APOA1	S	H
AApoAII	Apolipo protein A-II	APOA2	S	H
AApoAIV	Apolipo protein A-IV	APOA4	S	A
Notassigned	Apolipo protein C-III	APOA3	S	H
AGel	Gekolin	GSN	S	A
Alyc	Lycozyme	LYZ	S	A
ALECT2	Leu kocyte chemotactic factor-2	LECT2	S	A
AFib	Fibrinogen A	RBA	S	A
AOys	Cystatin C	CSTS	S	H
ACal	Calcitonin	CALCA	L	A
AIAPP	k let a myloid polypeptide	IAPP	L	A
AANF	Atrial natriu retic factor	IVPPA	L	A
APro	Prolactin	PRL	L	A
ASPC	Lung surfactant protein	SFTPO	L	A
AGal7	Galectin 7	LGALS7	L	A
Notassigned	Keratin S/14	KRT5, KRT14	L	A
ACor	Corneodesmasin	COSN	L	A
AMed	Lactadherin (Medin)	IAFGE8	L	A
Aker	Kerato-epithelin	TGFBI	L	A,H
Alac	Lactoferrin	LTF	L	A
AOAAP	Odontogenic a meloblast-associated protein	ODAM	L	A

Tablo 2

Bio View: # Identified Proteins (1848)	Probability Legend:																			
	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="background-color: #90EE90; width: 20px; height: 10px; margin-bottom: 2px;"></div> over 95% <div style="background-color: #FFFF00; width: 20px; height: 10px; margin-bottom: 2px;"></div> 80% to 94% <div style="background-color: #FFD700; width: 20px; height: 10px; margin-bottom: 2px;"></div> 50% to 79% <div style="background-color: #FF0000; width: 20px; height: 10px; margin-bottom: 2px;"></div> 20% to 49% <div style="background-color: #FFFFFF; width: 20px; height: 10px; margin-bottom: 2px;"></div> 0% to 19% </div>																			
	A:ApoA4	A:ApoA1	AH	AL-Kappa	AFib	A:ker	ACal	TGFBI	AA	A:Sem1	ATTR	AANF	APro	AL-Lambda	AGel	ALys	Enfuvirbide	A:BM	ALect2	AIns
1 Apolipoprotein E	60	93	48	34	79	41	49	8	50	24	33	6	3	23	36	30	51	9	26	45
2 Serum amyloid P-component	16	51	12	5	34	34	8	12	34	13	49	9	5	9	23	9	33	13	27	15
3 Apolipoprotein A-IV	103	7	17	8	7	17	22	10		2	20			6	4	8	19	14		19
4 Apolipoprotein A-I	3	112		11			3							14			17	4		17
5 Ig gamma-1 chain C region			102																	
6 Ig kappa chain C region				113																
7 Fibrinogen alpha chain					133															
8 Keratin, type II cytoskeletal 5						69														
9 Keratin, type I cytoskeletal 14						71														
10 Calcitonin							102													
11 Transforming growth factor-beta...								86												
12 Serum amyloid A-1 protein								79												
13 Semenogelin-1									88											
14 Transthyretin										78										
15 Natriuretic peptides A											80									
16 Prolactin												59								
17 Ig lambda-2 chain C regions													47							
18 Gelsolin														35						
19 Lysozyme C															28					
20 FuzeonDrug_Human																25				
21 Beta-2-microglobulin																	16			
22 Leukocyte cell-derived chemotax...																		14		
23 Insulin																			14	13

AR Dogan A. 2017.
Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 12:277–304