

# Genetické a biochemické aspekty patogenézy transtyretínovej amyloidózy

Ján Chandoga

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, Oddelenie molekulovej a biochemickej genetiky, Nemocnica Staré Mesto, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava

*Transtyretínová amyloidóza (ATTR) je zriedkavé systémové ochorenie, ktoré zaraďujeme do skupiny ochorení spôsobených konformačnou instabilitou proteínov. Hereditárne formy sú autozómovo-dominantné genetické poruchy, ktoré sú zapríčinené patogénnymi variantmi transtyretínového génu (TTRv). Väčšina variantov vyvoláva polyneuropatiu podmienenú agregáciou ATTRv proteínov v periférnych alebo autonómnych nervoch (ATTR-PN). V práci detailne popisujeme štruktúru a funkciu TTR proteínu a patobiochemické mechanizmy vzniku amyloidózy (polymerizáciu, assembláciu, proteolýzu). Článok prináša informácie o výskyte ATTR vo svete, o frekvencovaných mutáciách a ich dopade na klinickú manifestáciu ochorenia. Pokrok v diagnostike ATTR umožnil zachytiť rodiny a pacientov s variantmi Leu12Pro, Val30Met, Val71Ala, Ileu107Val taktiež na Slovensku. V práci sú stručne zhrnuté diagnostické postupy a molekulárno-genetické a biochemické princípy ovplyvnenia ATTR-PN.*

**Kľúčové slová:** amyloidóza, transtyretín, ATTR varianty, diagnostika ATTR, TTR ligandy

## Genetic and biochemical aspects of transthyretin amyloidosis pathogenesis

*Transthyretin amyloidosis (ATTR) is a rare systemic disease that belongs to group of diseases due to conformational instability of proteins. Hereditary forms of ATTR are autosomal dominant genetic disorders determined by pathogenic variants of transthyretin gene (TTRv). Most of variants generate polyneuropathy mediated by aggregation of ATTRv proteins in peripheral or autonomic nerves (ATTR-PN). In this review we deal in detail with the subject of the structure, function of TTR protein and by pathobiochemical mechanisms of amyloidosis arising (polymerisation, assembly, proteolysis). Data concerning frequency of ATTR in the world, frequent mutations and their impact on clinical presentation are included in the paper. Progress in diagnostic of ATTR allowed to identify families and patients with variants Leu12Pro, Val30Met, Val71Ala, Ileu107Val in Slovakia as well. In review we present information about diagnostic flow-chart, molecular-genetic and biochemical principles of ATTR-PN therapy.*

**Keywords:** amyloidosis, transthyretin, ATTR variants, diagnosis ATTR, TTR ligands

Neurológia 2020; 15 (1): 5-14

## Proteíny podmieňujúce vznik amyloidóz

**Amyloidózy** predstavujú skupinu ochorení, pri ktorých štruktúra proteínov a ich nestabilná konformácia spôsobí tvorbu agregátov a fibrilárnych štruktúr (**amyloidov**), ktoré sa následne ukladajú extracelulárne do rôznych tkanív. V tkanivách prítomné amyloidové depozity sa vyznačujú afinitou k histochemickému farbivu Kongo červení a pri mikroskopickom vyšetrení v polarizovanom svetle spôsobujú zelenkavý dvojlom týchto štruktúr. Ide stále o najčastejšie používanú metódu dôkazu prítomnosti amyloidov. Amyloidové proteíny sa dajú taktiež zistiť imunohistochemicky, Western blottingom a hmotnostnou spektrometriou (MS) kombinovanou so sekvenovaním proteínov (proteomická analýza), ktorou sa dá spoľahlivo určiť typ amyloidózy. Iba časť ochorení popisovaných ako amyloidózy je zapríčinená genetickými determinantami. Viacero amyloidóz je spôsobených kombináciou účinku rôznorodých faktorov a mechanizmov, ako sú chronické infekcie, zápal, nádorové ochorenia, a preto sú definované ako sekundárne amyloidózy. **Systémové amyloidózy** sa vyznačujú poškodením viacerých orgánov alebo orgánových systémov, variabilnou klinickou manifestáciou a môžu byť zdedené alebo získané. Prvú skupinu predstavujú **hereditárne amyloidózy**, ktoré sú zapríčinené zdedenými patogénnymi variantmi génov a syntézou amyloidogénnych proteínov, ako sú: transtyretín (ATTR), apolipoproteíny AI (AApoAI), AII (AApoAII),

CII (AApoCII), CIII (AApoCIII), ľahký imunoglobulínový reťazec (AL),  $\beta$ 2-mikroglobulín (A $\beta$ 2M), gelsolín (AGel), lyzozým (ALys) cystatín-C (ACys), fibrinogén- $\alpha$  (AFib). Druhú skupinu predstavujú **nehereditárne amyloidózy** vyvolané ukladaním apolipoproteínu AIV (AApoAIV), sérového amyloidu A (AA) alebo, wild“ variantov proteínov ľahkého reťazca imunoglobulínov, transtyretínu,  $\beta$ 2-mikroglobulínu. Existujú však aj hereditárne amyloidózy, ktoré poškodia spravidla iba jeden orgán (**lokalizované formy amyloidóz**), ako je Alzheimerova choroba podmienená  $\beta$ -amyloidovým prekursorovým proteínom ( $\beta$ -APP), Parkinsonova choroba asociovaná s  $\alpha$ -synukleínom (A $\alpha$ Syn), Creutzfeldtova-Jakobova choroba so zistenými variantmi priónového proteínu (APrP).

Medzinárodná spoločnosť pre amyloidózy (**International Society of Amyloidosis – ISA**) každé dva roky publikuje odporúčania týkajúce sa nomenklatúry amyloidóz a ich klasifikácie. Z počtu 36 identifikovaných amyloidogénnych proteínov, 14 podmieňuje vznik systémovej amyloidózy, 19 lokalizované formy a 3 proteíny sa vyskytujú pri systémovej ako aj pri lokalizovaných formách<sup>(1)</sup>. ISA konštatuje, že medzi amyloidózy sú zaradené hlavne systémové ochorenia, u ktorých sú proteínové agregáty definované ako patogénne. Situácia je komplikovanejšia pri lokalizovaných formách, ako je napríklad Alzheimerova choroba alebo diabetes 2. typu, u ktorých je agregácia proteínov

a tvorba amyloidu v patogenéze síce zrejme, avšak tento fenomén nepredstavuje primárny proces. Je nutné taktiež podoznieť, že aj keď základom amyloidov sú polymérne štruktúry amyloidových fibríl, depozity obsahujú aj iné proteíny, ako je napríklad sérový amyloidový P-komponent (SAP) a proteoglykán heparánsulfát (HSPG), ktoré ovplyvňujú ich vlastnosti. SAP podmieňuje odolnosť amyloidov voči degradácii a HSPG je príčinou kyslého charakteru agregátov. Vo vzťahu k nomenklatúre amyloidových proteínov, spoločnosť odporúča označiť amyloidový proteín písmenom A pred skratku proteínu (pozri vyššie ATTR – amyloidový transtretín, AApoAI – amyloidový apolipoproteín-AI) a podobne. Nakoľko aj proteíny bez zmeny primárnej štruktúry môžu zapríčiniť amyloidózu, ako je to napríklad pri senilnej systémovej amyloidóze, odporúča sa takýto proteín označiť s príponou wt – skratkou pre wild typ (napr. ATTRwt). Ochorenia, ktoré sú zapríčinené variantmi (mutáciami) génu by mali byť označené radšej pojmom **hereditárne** namiesto zaužívaného pojmu familiárne. ISA odporúča miesto skratky pre mutáciu (m) použiť skratku pre variant (v), napríklad ATTRv namiesto ATTRm. V prípade, že sa vyznačuje v proteíne zmena v sekvencii aminokyselín, odporúča sa použiť 1-písmenkový kód aminokyselín a číslovanie sekvencie pre maturovaný proteín. Podľa uvedeného odporúčania by napríklad zápis pre transtretínový proteín s patogénnym variantom spôsobeným zámennou aminokyseliny valín za metionín v pozícii 30 maturovaného proteínu bol označený skratkou ATTRV30M (pre prekursorový transtretín zápis je V50M).

### Transtretínová amyloidóza ako modelové ochorenie systémovej amyloidózy

Ochorenia spôsobené ukladaním amorfných depozitov v tkanivách popísal ako prvý Rokitanský (1842). Neskôr Virchow (1854) zistil, že agregáty v postihnutom tkanive dávajú farebnú reakciu s jódom a kyselinou sírovou, podobne ako celulóza alebo škrob (amylon), preto táto substancia dostala názov amyloid (škrobu podobná látka). Čoskoro nato sa zistilo, že depozity chemicky nie sú sacharidovej, ale bielkovinovej povahy. Celé storočie bola patológia schopná diferencovať amyloidózy nanajvyš ako primárne, ktoré boli sporadické alebo ako sekundárne, ktoré boli pozorované často u pacientov s chronickými zápalovými ochoreniami (tuberkulóza, reumatoidná artritída, osteomyelitída). Familiárnu formu amyloidózy ako prvý popísal Ostertag<sup>(2)</sup> v r. 1950, ale skutočne prvý článok o familiárnej periférnej neuropatii asociovanej s generalizovanou amyloidózou publikoval v r. 1952 Andrade<sup>(3)</sup>. K predpokladu, že ide o hereditárnu formu polyneuropatie ho priviedol fakt, že v portugalskej provincii Pava de Varzim pozoroval vysoký výskyt pacientov s „foot disease“. U pacientov sa vyskytovali parézy, hlavne dolných končatín, poškodenie senzitivity prevažne dolných končatín, gastrointestinálne poruchy, sexuálne a sfinktérové príznaky dysfunkcie vegetatívnych nervov. Trvalo približne 30 rokov, kým sa neobjasnila biochemická a genetická podstata tejto amyloidózy, ktorou bola mutácia v transtretínovom géne zodpovedná za syntézu amyloidogénneho proteínu ATTRV30M spôsobujúceho tvorbu agregátov a familiárnu amyloidovú polyneuropatiu (FAP)<sup>(4)</sup>. **Transtretínová amyloidóza** predstavuje systémové ochorenie, ktoré je podmienené samotnou štruktúrou TTR proteínu ( $\beta$ -skladaný list) ako aj existenciou amyloidogénnych variantov (mutácií) génu **TTR**. Amyloidózu môžu spôsobiť tak mutované formy TTR, ako aj wt forma. **Genetické príčiny - varianty génu**

**(TTRv) spôsobujú ochorenia s autozómovo dominantným typom dedičnosti** s rôznym stupňom postihnutia tkanív a s rôznou mierou penetrancia ochorenia. Mnohé mutácie spôsobujú hereditárnu amyloidovú polyneuropatiu s agregáciou ATTRv proteínov v periférnych alebo autonómnych nervoch (ATTR-PN resp. TTR-FAP). Syndróm karpálneho tunela je popísaný ako skorý, ale nešpecifický príznak TTR-PN a je rezistentný na chirurgickú terapiu. Niektoré mutácie (D18G, A25T) spôsobujú rozvoj okuloleptomeningeálnej formy amyloidózy (TTR-OLM), ktorá vyvolá poškodenie CNS s minimálnym postihnutím iných orgánov. Familiárna amyloidová kardiomyopatia (ATTR-CM, resp. TTR-FAC) je charakteristická forma iba pri niekoľkých mutáciách (V122I, L111M, I68L, T60A)<sup>(5)</sup>. Poškodenie myokardu sa však často zistí pri formách s dominujúcim nálezom polyneuropatie<sup>(6)</sup>. Časté sú príznaky poškodenia očí – opacity sklovca, glaukóm, pupilárne poruchy. Široká škála gastrointestinálnych príznakov (pocit skorej sýtosti, nauzea, vomitus, konstipácia, diarrhea, inkontinencia) je známkou poškodenia črevného traktu a vegetatívnych nervových vlákien, zvlášť pri hereditárnych formách TTR amyloidózy. Pri mutácii TTRV30M až 59 % pacientov má uvedené GIT príznaky už v skorých štádiách ochorenia<sup>(7)</sup>. **Senilná systémovej amyloidóza (SSA)** je získaná sporadická forma transtretínovej amyloidózy, ktorá postihuje väčšinou mužov vo vyššom veku a agregáty obsahujú ATTRwt proteín. Nakoľko sa depozity nachádzajú hlavne v srdci, v literatúre je táto forma popisovaná aj ako senilná kardiálna amyloidóza. Častejší je taktiež výskyt syndrómu karpálneho tunela u pacientov so SSA. Depozity ATTRwt sa však zistili okrem srdca aj v pľúcach, obličkách a v stenách ciev. Prevalencia SSA sa odhaduje na 10 % až 25 % u osôb starších ako 80 rokov. V diferenciálnej diagnostike je nutné odlíšiť túto formu od TTR-FAC, čo je možné sekvenovaním **TTR** génu, alebo od primárnej AL amyloidózy, ktorá má na rozdiel od SSA klinicky rýchlu progresiu srdcového zlyhania<sup>(8)</sup>.

### Transtretínový gén a jeho expresia

Gén pre transtretín (**TTR**, OMIM 176300) sa nachádza na chromozóme 18q12.1 a genómová DNA obsahuje 7258 bp. U cicavcov je gén značne konzervovaný s 80 % medzidruhovou zhodou sekvencií. **TTR** gén vznikol v evolúcii duplikáciou a mutáciami pôvodného génu **TLP** (transtretín - like proteín), ktorého proteínový produkt je u cicavcov lokalizovaný v peroxizómoch. Pôvodný proteín má katalytickú funkciu s enzýmovými aktivitami 5-hydroxyizourát hydrolázy a OHCU-dekarboxylázy, čím sa kompletizuje degradácia purínových báz a kyseliny močovej u väčšiny živočíchov. Mutácie v **TLP** géne u človeka spôsobili substitúciu aminokyselín (pozície 19, 116, 119 maturovaného TTR), v dôsledku čoho došlo k strate enzýmových aktivít, ale súčasne sa získala schopnosť viazať tyroníny v kreovanom centrálnom kanáli<sup>(9)</sup>. V evolúcii sa teda funkcia duplikátu **TLP** modifikovala a génový produkt – transtretín získal vlastnosti transportéra tyronínov a retinolu<sup>(10)</sup>. U primátov vrátane človeka sa stal nefunkčný aj enzým urát oxidáza. Postupné nahromadenie mutácií v evolúcii spôsobilo výrazné zníženie aktivít enzýmu až úplnú stratu syntézy funkčného proteínu, podmienenou mutáciami charakteru stop kodónov. Oba modifikované gény sa však nachádzajú ako pseudogény v genóme človeka. V dôsledkoch táto strata enzýmových aktivít vedie k zániku degradačnej cesty a kyselina močová sa u človeka nemetabolizuje, pričom jej vysoké hladiny majú kauzálny vzťah k patogenéze dny. Na druhej strane, kyselina močová je efektívny antioxidant

a pravdepodobne benefitom jej vysokých hladín je predĺženie života hominidov<sup>(11,12)</sup>. Predpokladá sa, že oba evolučné procesy, ako je modifikácia funkcie TLP a zvýšená hotovosť kyseliny močovej spôsobená nefunkčnou urát oxidázou, sa podieľajú u človeka na vyššej inteligencii a protektívnom efekte voči neurodegeneratívnym ochoreniam.

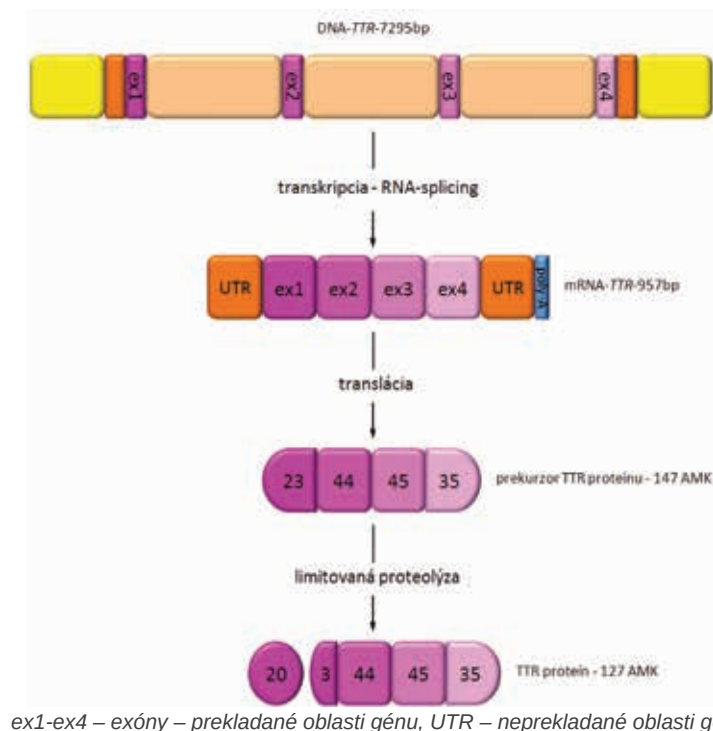
Génová expresia *TTR* je významná iba v pečeni, v pankrease, v pigmentových bunkách sietnice a v plexus chorioideus (PCH) a hoci proteín je prítomný aj v iných tkanivách, zrejme ide o deponovaný pečenný transtyrektín. Treba zdôrazniť, že *TTR* je jediný proteín viažuci tyroníny, ktorý je syntetizovaný taktiež v mozgu. Zostrihom pre-mRNA *TTR* vznikne mRNA s 957 bp obsahujúca 4 exóny, ktoré sa translátujú do proteínu obsahujúceho 147 AMK. Prvých 20 AMK predstavuje signálny peptid, ktorý sa procesom limitovanej proteolýzy odštiepi a vznikne maturovaný proteín so 127 AMK (**obrázok 1**). Varianty v kódujúcich oblastiach exónu 2 až exónu 4 sú zodpovedné za génové patológie.

### Štruktúra a funkcia transtyrektínu

*TTR* je syntetizovaný ako nízko molekulový proteín (M-14 000), ktorý asociuje na homotetramérový komplex s relatívnou molekulovou hmotnosťou M-55 000. Jeho vyššia pohyblivosť pri elektroforetickom delení proteínov plazmy v porovnaní s albumínom podmienila jeho pôvodné pomenovanie ako **prealbumín (PALB)**. Hodnoty *TTR* v sére sú 200 až 400 mg/l a v likvore 10 až 40 mg/l, pričom v tejto tekutine predstavuje *TTR* až 25 % podielu bielkovín. Charakteristickou črtou *TTR* proteínu sú nadmolekulové asociácie, ktoré vedú ku vzniku jeho homodimérov, ďalej homotetramérov a súčasne umožňujú väzbu hormónov štítnej žľazy (hlavne T4) s uplatnením negatívneho kooperačného efektu pri väzbe druhej molekuly hormónu. Následná väzba s dvoma molekulami nízko molekulového proteínu viažuceho retinol (**RBP4 s M-21 000**) podmieni vznik bielkovinového komplexu, ktorý viaže a prenáša do tkanív nielen tyroníny, ale

aj retinol (**transportér tyroxínu a retinolu – transtyrektín**). Proteínové komplexy sa vyznačujú hydrofóbnym charakterom a sú významnými prenášačmi ligandov pre transkripčné faktory (jadrové receptory) ovplyvňujúce génovú expresiu. Pre úlohu *TTR*-RBP pri rýchlom ovplyvňovaní kaskády metabolických a zápalových reakcií ako odozvy na stresové podnety a pre zníženie ich sérových hodnôt, komplex PALB-*TTR* sa zaraďuje medzi **negatívne reaktanty akútnej fázy**. Vzhľadom na nízky polčas obratu PALB (2 dni) sa tento sérový komplex taktiež využíva ako citlivý parameter na posúdenie nutričného stavu pacientov<sup>(13)</sup>. Nakoľko tyroníny sa môžu transportovať nielen prostredníctvom *TTR* (20 %) ale aj prostredníctvom tyroxín viažuceho proteínu (TBP 70 %) a albumínu (10 %), predpokladá sa omnoho významnejšia funkcia komplexu *TTR*-RBP pri transporte retinolu (až 90 %) ako tyronínov. Nadmolekulový komplex súčasne chráni malé molekuly RBP pred ich rýchlou elimináciou, nakoľko monomér sa ľahko dostáva do primárneho moču pri glomerulárnej filtrácii a je eliminovaný digestívnym mechanizmom. Nadbytok *TTR* vo vzťahu k RBP v plazme (4,0 mmol/l, resp. 2,0 mmol/l) favorizuje vytváranie komplexov a predstavuje účinnú ochranu RBP pred elimináciou. U niektorých pacientov s FAP sa pozorujú znížené hodnoty *TTR* avšak bez vplyvu na hodnoty T3, T4 a retinolu v tkanivách. Na druhej strane, sú popísané mutácie *TTR* génu, ktoré ovplyvňujú jeho afinitu k tyronínom a sú asociované s hypertyroxinémiou (Gly6Ser). Okrem transportnej funkcie transtyrektín má ešte kryptogénnu proteolytickú aktivitu a *TTR* je opisovaný ako peptidáza neznámeho typu. Približne 1 % až 2 % proteínu sa nachádza v komplexe s ApoA-I, ktorý je substrátom pre *TTR*. Proteín štiepi taktiež amyloidový  $\beta$ -peptid a neuropeptid Y in vitro. *TTR* vytvára komplexy so  $Zn^{2+}$  kationmi, preto sa predpokladá, že je metalopeptidáza, ktorá by mohla mať význam pri patogenéze iných amyloidóz alebo ateroskleróze<sup>(14)</sup>. Syntéza a funkcia transtyrektínu v mozgu si zaslúži osobitnú pozornosť. Iba malá frakcia *TTR* v likvore pochádza z pečene, väčšina molekúl sa syntetizuje v bunkách PCH, sú secernované

Obrázok 1. Štruktúra *TTR* génu, transkripcia, translácia a posttranslačná úprava proteínu



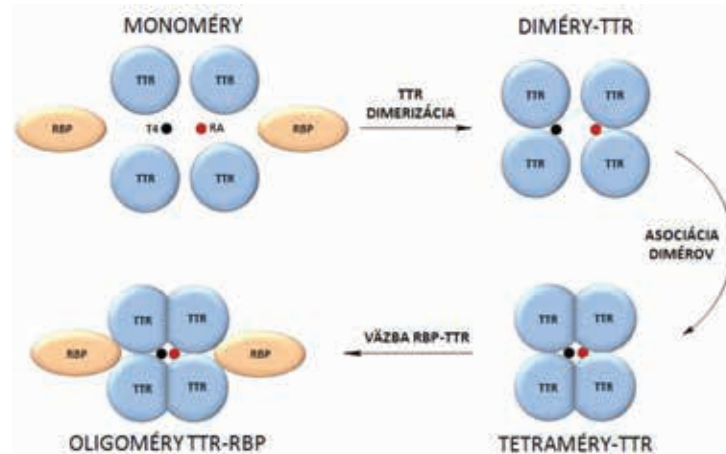
do likvoru, pričom predstavujú najvýznamnejší proteín viažuci tyroníny. Funkcia TTR je úzko spätá s vývojom mozgu a s enormným vzrastom hmotnosti mozgu počas evolúcie stavovcov. Evolučne, syntéza TTR v PCH sa objavila oveľa skôr než jeho syntéza v pečeni<sup>(10)</sup>. Nakoľko hemato-encefalická bariéra obmedzuje dostupnosť ostatných plazmatických proteínov transportujúcich hormóny štítnej žľazy, syntéza TTR v PCH zohráva mimoriadny význam a zabezpečuje efektívnu distribúciu tyronínov do diferencujúcich sa tkanív. Na rozdiel od pečene génová expresia v PCH má konštitutívny charakter a nie je ovplyvnená faktormi, ktoré vyvolávajú represiu niektorých proteínov akútnej fázy, vrátane TTR.

### Patobiochemický mechanizmus vzniku transtyretínovej amyloidózy

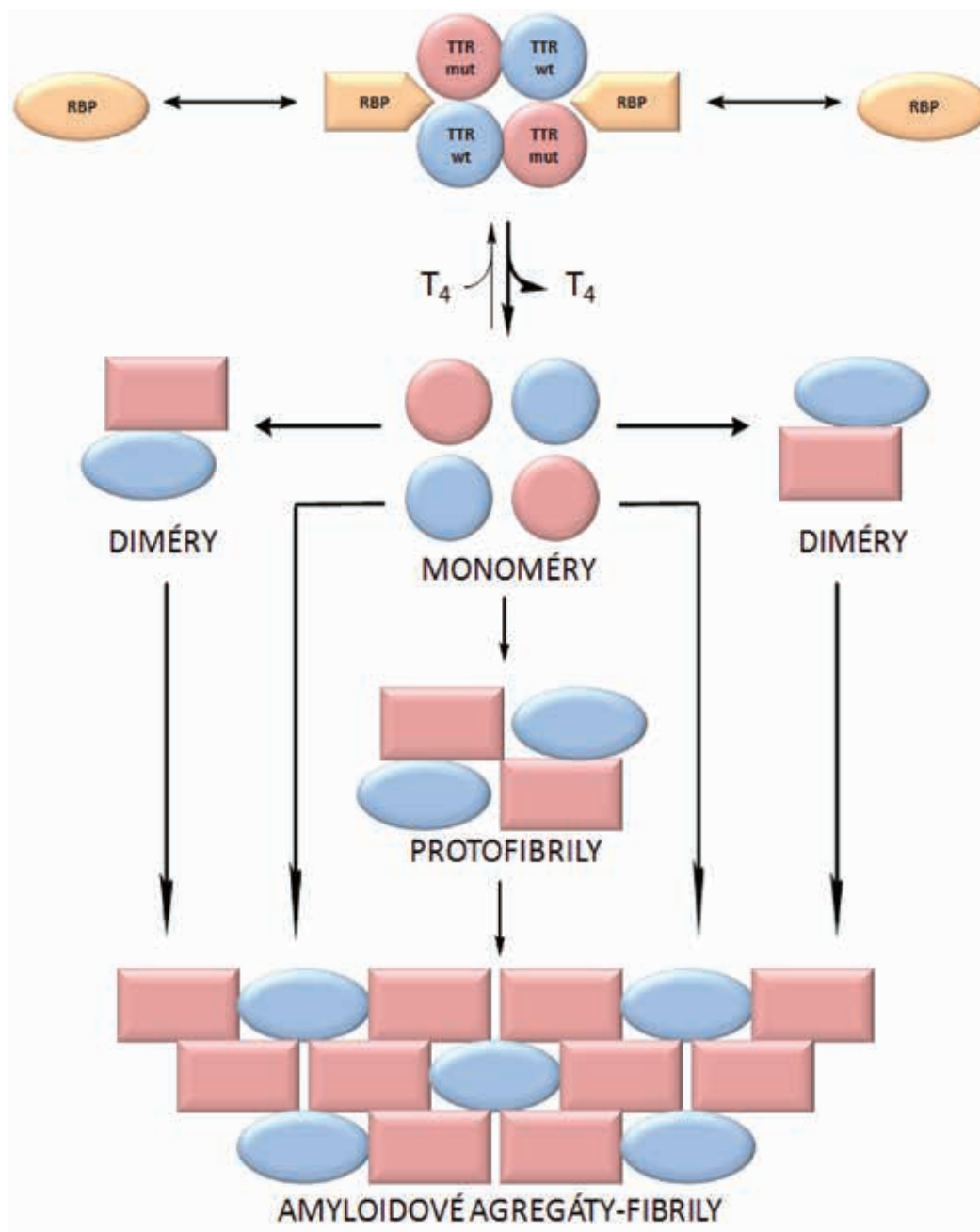
Podstatnou stránkou, ktorá objasňuje mechanizmus patogenezy amyloidózy, je štruktúra proteínov a vplyvy podmieňujúce instabilitu ich vyšších štruktúr. Nakoľko ide o zásadný mechanizmus pri vzniku amyloidózy, vrátane transtyretínovej, tento typ porúch možno zaradiť medzi **ochorenia konformačnej instability proteínov**. Konformácia TTR reťazcov sa spontánne vytvára na základe mnohých relatívne slabých interakcií, ako sú vodíkové mostíky, elektrostatické interakcie, hydrofóbne interakcie (exklúzie vody v dôsledku asociácie hydrofóbnych zvyškov valínu, leucínu, izoleucínu, fenylalanínu, metionínu, alanínu a glycínu). Konformácia proteínov je výsledkom tzv. folding procesu, ktorý je determinovaný princípom dosiahnutia čo najnižšej vnútornej energie proteínového reťazca a taktiež jeho nadmolekulových komplexov. Priestorové usporiadanie proteínov je podrobené kontrole prostredníctvom molekulových chaperónov, metabolitov a folding enzýmov. Zle poskladané proteíny (missfolded proteins) sú odstránené komplexným mechanizmom, ktorý končí proteolytickými procesmi v proteazóme. Proteínový reťazec TTR je zložený zo 127 AMK a formuje sa do ôsmich  $\beta$ -reťazcových blokov (A,B,C,D,E,F,G,H) prerušených krátkym  $\alpha$ -helixom medzi E a F blokom<sup>(15)</sup>. Dimerizáciu monomérov podmieňujú väzby vodíkovými mostíkmi medzi H-H a F-F blokmi, kým za vznik tetramérovej štruktúry sú zodpovedné hlavne hydrofóbne interakcie. Tetraméry vytvárajú centrálny hydrofóbny kanál s väzobnými miestami pre T4 alebo iné ligandy, ktoré stabilizujú štruktúru oligoméru. Väzobné miesta pre RBP sú lokalizované na povrchu komplexu a hoci tetramér má 4 miesta pre väzbu s RBP, naviazanie proteínu negatívne ovplyvňuje väzbu ďalších molekúl, takže prakticky TTR/RBP komplex obsahuje iba dve molekuly RBP (**obrázok 2**). Pre vytváranie fibríl a amyloidových agregátov je potrebné ovplyvnenie rovnováhy v prospech tvorby monomérov namiesto tetramérov. Celý rad endogénnych faktorov, ako sú patogénne varianty TTR, posttranslačné modifikácie, koncentrácie iných proteínov (fibrinogén,  $\alpha$ 1-antitrypsín, haptoglobín,  $\alpha$ -2 makroglobulín), metabolitov a iónov ( $\text{Ca}^{2+}$ ) môže ovplyvniť rovnováhu. Všeobecne sa za rizikové faktory rozvoja ATTR považuje vek a oxidačný stres. V teórii amyloidogenézy sa často zdôrazňujú niektoré stránky komplexného mechanizmu, ktorého princíp spočíva v missfoldingu TTR<sup>(16)</sup>. **Downhill polymerizačný mechanizmus** akcentuje zmenu termodynamickej rovnováhy v prospech zvýšeného zastúpenia monomérov, respektíve zle poskladaných proteínov, ktoré spontánne polymerizujú a vytvárajú amyloidové agregáty. **Oligomérový asemblačný mechanizmus** zdôrazňuje, že stavebné bloky pre tvorbu amyloidov – diméry a tetraméry sú konformačne

stabilné vďaka chemickému cross-linkingu a vytváraniu nových nadmolekulových interakcií, zvlášť pri patogénnych variantoch TTR. **Polymerizácia závislá na tvorbe jadier** prirovnáva proces k rastu kryštálov, pri ktorom sa asociáciou monomérov pri ich zvýšenej koncentrácii vytvárajú jadrá, ktoré pôsobia ako templáty pre ďalšie zgrupovanie monomérov a tvorbu fibrilárnych štruktúr. Biofyzikálnymi metódami sa zistilo (*in vitro*), že monoméry sa zoskupujú do sférických agregátov (15-40 nm) a následne vznikajú angulárne protofibrily (65x13 nm), ktoré vytvoria fibrilárnu sieť<sup>(17)</sup>. Predpokladá sa, že v počiatočných štádiách FAP je transtyretín deponovaný v tkanivách v nefibrilárnej forme a nefarbí sa Kongo červeňou. ATTR depozity sa zistia v každej časti periférneho nervového systému, pričom najskôr sú prítomné v malých myelínových vláknach a až neskôr vo veľkých. Pri geneticky podmienených formách ATTR sa pozoruje, že stavebná jednotka vo forme diméru obsahuje minimálne 1 mutovaný proteín a v prípade tetraméru 2 mutované proteíny. V agregátoch je pritom pomer TTRv: TTRwt spravidla 2:1. Na druhej strane, v plazme je u pacientov s heterozygotnou formou ATTR tento pomer 1:2. Proces tvorby amyloidových agregátov je znázornený na **obrázku 3**. Snaha porozumieť mechanizmu agregácie a amyloidogenézy nastolila otázku, ktoré segmenty transtyretínu zohrávajú v tomto procese kauzálnu úlohu. Kombináciou molekulárno-genetických, biofyzikálnych, biochemických prístupov a transmisnej elektrónovej mikroskopie sa získali údaje, ktoré odhaľujú výrazné rozdiely jednotlivých segmentov TTR v patogeneze. Boli identifikované viaceré segmenty podmieňujúce agregáciu a tvorbu fibríl. Ako podstatné sa ukázali úseky, ktoré sa nachádzajú v F, H-  $\beta$  reťazcoch a v  $\alpha$ -helixovej slučke transtyretínu. Tieto segmenty poháňajú agregáciu tým, že spontánne asociujú a vytvárajú priestorovú zipsovú kostru pre tvorbu fibríl. Pri segmente <sup>91</sup>AEEVET<sup>96</sup> nachádzajúcom sa v F reťazci substitúcia E92P a V94P (glutamátu za prolín, resp. valínu za prolín) výrazne zamedzí agregáciu a tvorbu fibríl, a preto sa predpokladá, že v patogeneze TTR amyloidózy je tento segment kľúčový. Segment <sup>119</sup>TAVVTN<sup>124</sup> lokalizovaný v H reťazci má zrejme úlohu úseku zodpovedného nie za agregáciu, ale za tvorbu fibríl. Z terapeutického hľadiska otvárajú získané poznatky možnosť ovplyvniť agregáciu TTR pomocou syntetických peptidových inhibítorov<sup>(18)</sup>, ktoré posunú rovnováhu v prospech tetramérov.

**Obrázok 2.** Fázy tvorby nadmolekulovej štruktúry TTR-RBP s participáciou ligandov tyroxínu (T4) a retinovej kyseliny (RA)



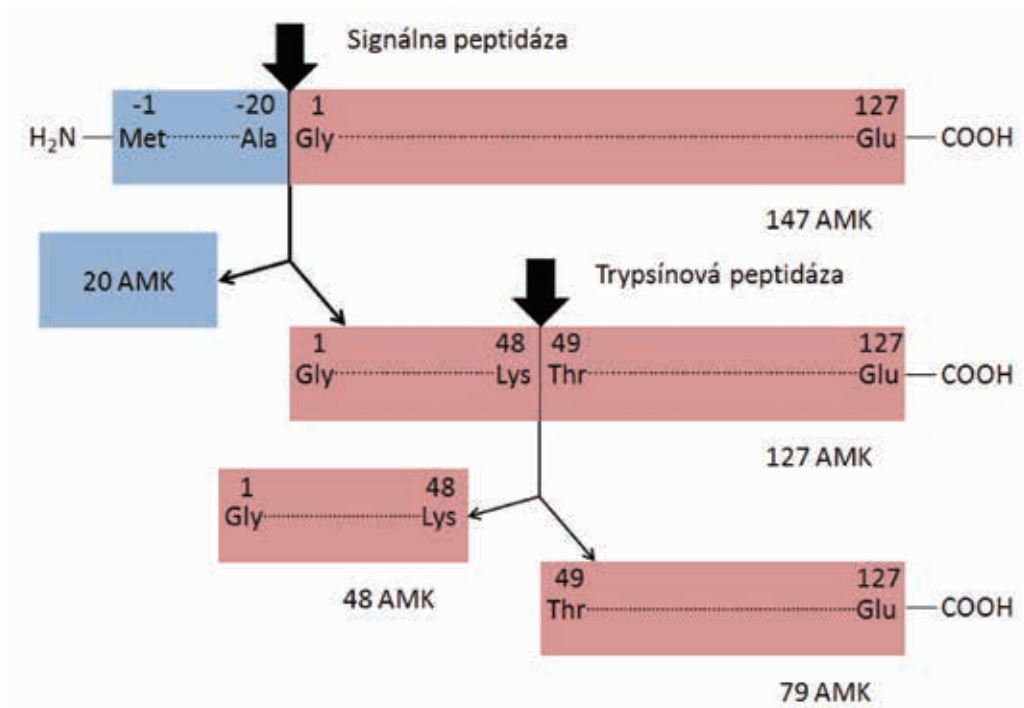
Obrázok 3. Procesy amyloidogenézy s uplatnením downhill polymerizačného mechanizmu



Nové proteomické technológie (MALDI-MS) umožnili detailnú molekulovo-štruktúrnú analýzu amyloidových fibríl a odhaliť v patogenéze transtyreínovej amyloidózy významný mechanizmus – **proteolytické štiepenie**. TTR variant S52P (serín/prolín) podmieňuje vznik agresívnej formy hereditárnej systémovej amyloidózy. Analýzou sa zistilo, že v amyloidoch sú prítomné proteíny ATTRwt, ako aj ATTRS52P s plnou dĺžkou reťazca (127 aminokyselín), avšak tieto sú zastúpené minoritne. Hlavným komponentom fibríl je C-terminálny fragment obsahujúci 49-127 aminokyselínu, ktorý pochádza najmä z mutovaného proteínu. Fragment je produktom limitovanej proteolýzy a má výraznú schopnosť agregovať a vytvárať amyloidové fibrily. Proces štiepenia TTR je znázornený na obrázku 4. Za zvýšené proteolytické štiepenie je zodpovedná konformačná zmena vyvolaná

substitúciou serínu za prolín, ktorá má dopad na vodíkové väzby v oľočke spájajúcej C a D reťazce<sup>(19)</sup>. Zdá sa, že pri viacerých amyloidogénnych variantoch ATTR tento región zohráva významnú úlohu v patogenéze tým, že konformačná zmena obnaží pozíciu Lys<sup>48</sup> – Thr<sup>49</sup> a sprístupní štiepne miesto pre proteolýzu. Úloha enzýmu s vlastnosťami podobnými trypsínu pri štiepení TTR bola overená experimentálne a potvrdila sa jeho funkčná podobnosť s trypsínom, nakoľko enzým je inhibovaný dimetylformamidom. Detailne bol preskúmaný vplyv niektorých substitúcií v oktapeptide Ala<sup>45</sup>-Ser<sup>46</sup>-Gly<sup>47</sup>-Lys<sup>48</sup>-Thr<sup>49</sup>-Ser<sup>50</sup>-Glu<sup>51</sup>-Ser<sup>52</sup> na proteolýzu katalyzovanú trypsínom. Substitúcia Lys<sup>48</sup>/Ala úplne zastavila štiepenie peptidu, kým pri substitúcii Ser<sup>52</sup>/Pro a Thr<sup>49</sup>/Ala k štiepeniu peptidu dochádza. Pri mutácii Ser<sup>52</sup>/Pro, ktorá je známa ako vysoko patogénna vo vzťahu

Obrázok 4. Proteolytické štiepenie TTR proteínu – súčasť mechanizmu amyloidogenézy



k rozvoju amyloidózy<sup>(20)</sup>, štiepenie oktapeptidu s prolínom bolo až 7,5× rýchlejšie ako je to u štandardného polypeptidu<sup>(21)</sup>. Vplyv prolínovej substitúcie na konformačnú zmenu TTR a na nasledovnú proteolýzu je teda evidentný. Pri porovnaní vplyvu niektorých TTR variantov na proteolýzu bol určený nasledovný vzťah. S52P>V122T>L55P>V30M>WT>T119M. Z uvedeného taktiež vyplýva, že mutácia T119M zvyšuje odolnosť voči proteolytickému štiepeniu a zabraňuje amyloidogéze.

Mechanismus transtretínovej patogenézy založený na molekulárno-genetických príčinách a dôsledkoch je všeobecne prijímaný, no napriek tomu existuje viacero faktov, ktoré svedčia o tom, že chýbajú ešte nejaké ďalšie podmienky pre akceleráciu procesu. Je evidentné, že podstata patobiochemického (fyzikálneho) mechanizmu sa skrýva v dynamike foldingu TTR proteínu, v asemblácii podjednotiek a taktiež v proteolýze. Na druhej strane, kryštalografické trojrozmerné štúdie neidentifikovali zmeny vo vyšších štruktúrach TTRwt a TTRv oligomérov. Reziduá 49-127 C-terminálnych fragmentov sú majoritné komponenty amyloidových fibríl bez ohľadu na typ mutácií, z čoho rezultuje, že proteolytické štiepenie je rozhodujúci mechanizmus, ale samotné nestačí. Po digescii v chromatografických záznamoch sú stále prítomné tetramérové štruktúry TTR. Nový **koncept mechano-enzýmového** štiepenia si všíma pôsobenie biomechanických síl, ktoré destabilizujú tetramérové štruktúry a spôsobujú amyloidovú fibrilogenézu<sup>(22)</sup>. Ide o mechanické sily pôsobiace v srdci a aj v cievach. Procesy podieľajúce sa na amyloidogéze znázorňuje **obrázok 5**.

### Genetické varianty – najvýznamnejšie determinanty transtretínovej amyloidózy

Z vnútorných faktorov kauzálny vplyv na tvorbu amyloidov majú tzv. amyloidogénne mutácie *TTR* génu, ktoré destabilizujú vyššie štruktúry a zvyšujú mnohonásobne ich rozpad. Časť miestom amyloidogénnych mutácií sú pozície aminokyselín 45 až 58 – región s vláknami C a D a ich slučkou, ktorý

je náchylný na konformačné zmeny, ktoré následne ovplyvňujú aj hydrofóbne interakcie medzi D a A vláknami<sup>(23)</sup>. Ako sme už spomenuli, variant L55P spôsobuje zánik vodíkových väzieb medzi D a A vláknom, variant V30M spôsobí oslabenie väzby medzi Cys<sup>10</sup> a Gly<sup>57</sup>, čím sa exponuje tiolová skupina, ktorá hrá významnú úlohu v amyloidogéze<sup>(24)</sup>. Mutačné, hot spots“ sú prítomné taktiež v tripletoch pre aminokyseliny v pozícií 6, 30, 119, v miestach kde sa nachádzajú zoskupenia CpG dinukleotidov podliehajúcich metylácii cytozínu, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť zámény 5-metyl-cytozínu za tymín a vzniku variantov Gly6Ser, Val30Met, Thr119Met. V géne *TTR* bolo identifikovaných viac ako 120 zámen, z čoho približne 110 predstavujú amyloidogénne varianty charakteru missense zámény. Prevalencia ATTR sa v Európe, okrem endemických regiónov, odhaduje na 1:100 000. Najčastejšou mutáciou vo svete, ktorá spôsobuje ATTR-PN, je mutácia Val30Met s vysokou prevalenciou v Portugalsku, Švédsku a v Japonsku. Ďalšie frekventované mutácie, ako sú Val122Ile (afroamerická), Leu111Met (dánska), Ileu68Leu, Thr60Ala sa manifestujú vo forme familiárnej kardiomyopatie. Výskyt najfrekventovanejšej formy variantu Val30Met má rôznu evolučnú pôvod – portugalský, ktorý vznikol pred približne 750 rokmi a švédsky s prvým predkom pred 380 rokmi. Tieto dve populácie majú rôzne haplotypy, avšak v Japonsku sú až tri rozdielne haplotypy, teda mutácia nemá jedného spoločného predka. Vo vzťahu k manifestácii existuje rozdielna expresivita TTR-PN v závislosti od geografického pôvodu a od pohlavia, pričom ťažšie formy sa vyskytujú spravidla u mužov. V Portugalsku a Japonsku je vysoká penetrancia ochorenia (do 50 rokov až 80 %), nižší vek nástupu (priemerne 35 rokov) a rýchlejší progres s exitom do 10 rokov. Oproti uvedenému vo Švédsku penetrancia ochorenia je veľmi nízka (do 30 rokov iba 1,7 %, do 60 rokov iba 22 %) a priemerný vek nástupu ochorenia s pomalou progresiou je až 56 rokov. Tieto populačné rozdiely stále nie sú dostatočne vysvetlené, uvažuje sa o participácii iných protektívnych génov alebo nekódujúcich oblastí. Vzhľadom nato,

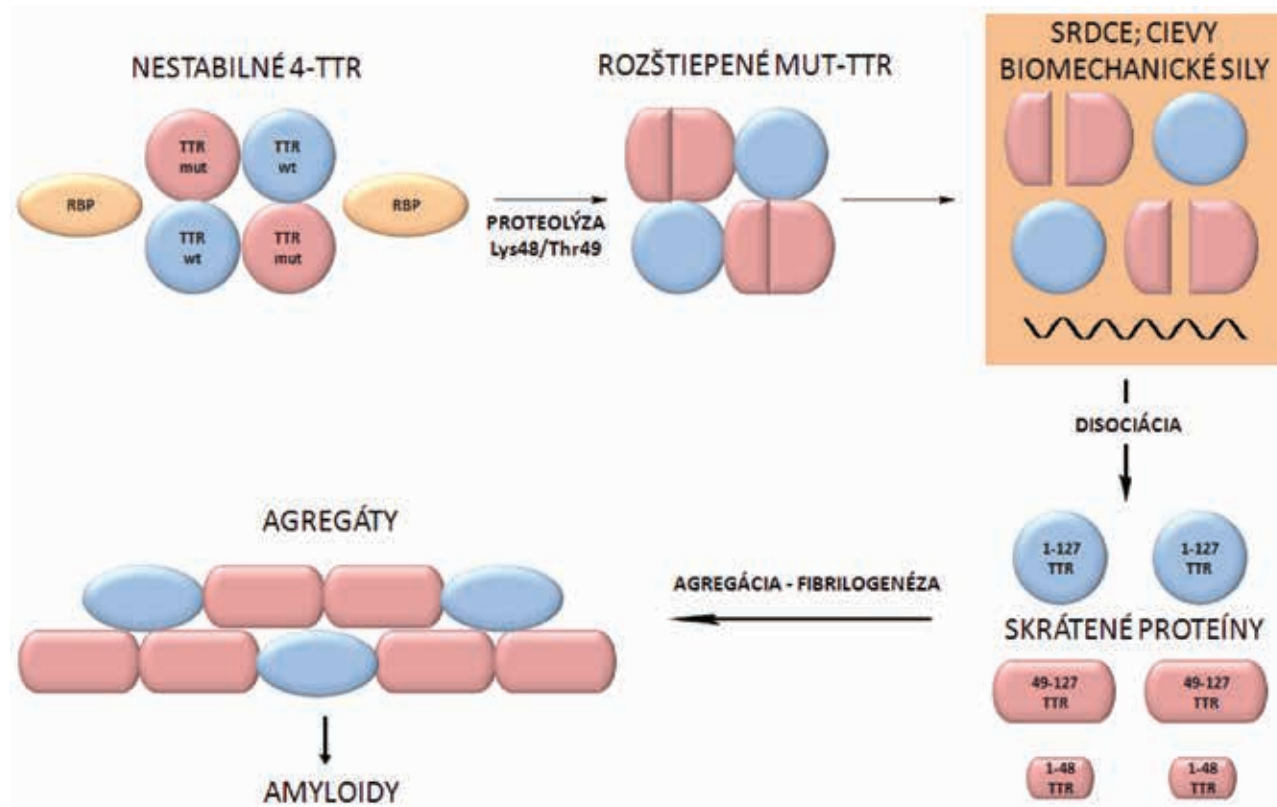
že ATTR je zriedkavé ochorenie, nemôžu byť spoľahlivé údaje o frekvencii variantov v menších populáciách. Register pacientov z Veľkej Británie<sup>(25)</sup> odhalil, že až 42 % pacientov z ATTR má kardiomyopatickú formu zapríčinenú variantom Val122Ile západoafrického pôvodu. Ďalšie dve frekventované mutácie podmieňujúce ATTR-PN majú podiel 25 % (Thr60Ala írského pôvodu) a 16 % (Val30Met paneurópskeho pôvodu). Ostatných približne 40 mutácií má frekvenciu spravidla nižšiu ako 1 %. Pre populáciu Sicílie, Sardínie a balkánskych krajín je frekventovaným variantom Glu89Gln s manifestáciou FAP vo veku 40 až 60 rokov<sup>(26,27)</sup>, ale často aj s prejavmi kardiomyopatie. Publikovaný prehľad o výskyte TTR-FAP v európskych krajinách<sup>(28)</sup> neobsahuje informácie týkajúce sa stredoeurópskych a východoeurópskych krajín zrejme kvôli nedostatočnej diagnostike. Iná štúdia<sup>(29)</sup> vychádza z údajov o viac ako 500 pacientov z 32 krajín konštatuje, že najfrekventovanejšie sú štyri mutácie – Val30Met (47,6%), Ser77Tyr (10,0 %), Ala97Ser (6,5 %) a Phe64Leu (4,4 %). Údaje sú ovplyvnené skutočnosťou, že až 18 % vzoriek pochádza z endemických oblastí Portugalska, Švédska, Japonska s prevahou mutácie Val30Met. V diagnostike a záchyťe pacientov s ATTR-PN na Slovensku došlo v posledných rokoch k významnému progresu a boli identifikované rodiny s variantmi Leu12Pro, Val30Met, Val71Ala a Ileu107Val. Na obrázku 6 sú znázornené varianty TTR vo forme zámen v TTR proteíne vo svete a v SR. Prehľad o výskyte a manifestácií ochorení s rôznymi typmi mutácií možno nájsť v kapitole, Amyloidosis“ Benson<sup>(15)</sup> a v databázach:

<https://www.omim.org/entry/176300> a [www.amyloidosismutations.com/mut-attr.php](http://www.amyloidosismutations.com/mut-attr.php).

### Diagnostika transtyretínových porúch

Transtyretínová amyloidóza je zriedkavé ochorenie, s ktorým sa stretne len málo lekárov. Vzhľadom na dominantné postihnutie nervového systému a polyneuropatiu spravidla to je neurológ, ktorý supponuje takéto ochorenie a musí zväziť indikáciu potrebných vyšetrení. Hereditárna povaha ochorenia predurčuje, že na diagnostike ochorenia participujú genetici, ktorí vyhodnotia genealogické údaje a navrhnu DNA diagnostiku. Diagnostický algoritmus určujú aj technické možnosti krajiny, pričom sa zohľadňujú medzinárodne odporúčané diagnostické, guideliney“, pozri žiadanka na vyšetrenie TTR v SR na stránke: <https://www.unb.sk/ustav-lekarskej-biologie-genetiky-a-klinickej-genetiky-lf-uk-a-unb/>. V populácií s nízkou prevalenciou ATTR-PN, so sporadickými formami a s neskorou manifestáciou by mala špeciálnym vyšetreniam predchádzať biopsia tkanív a dôkaz amyloidózy histologickými (farbenie Kongo červeňou) alebo imunohistochemickými metódami. Vhodné tkanivá sú subkutánne tukové tkanivo, koža, rektálna mukóza, nervové tkanivo, slinné žľazy, obličky. Senzitivita a špecifickosť tohto vyšetrenia sa pohybuje okolo 70 % až 80 %. Druhý krok nevyhnutne predstavuje proteomická analýza (v SR nedostupná) alebo molekulárno-genetická analýza TTR<sup>(30)</sup>. Diagnózu ATTR nie je možné určiť na základe vyšetrenia určitého špecifického markera séra alebo plazmy. Pomocou proteomických metód (MS) je možné po

Obrázok 5. Mechano-enzýmový koncept TTR amyloidogenézy



imunoprecipitácii transtyreínu séra a ďalších náročných postupov určiť proteínové varianty<sup>(31)</sup> a diagnózu definitívne potvrdiť molekulárno-genetickou analýzou. Pri endemickom výskyte a vysokom zastúpení určitého variantu možno indikovať vyšetrenie konkrétneho variantu a podobne možno postupovať, ak je v rodine známa mutácia. V ostatných prípadoch sa indikuje sekvenčná analýza celého génu. Senzitivita a špecifickosť vyšetrenia je takmer 100 % nakoľko u *TTR* génu boli zistené iba mutácie charakteru bodových substitúcií. Vzhľadom na podmienenosť vzniku amyloidóz viacerými proteínmi a viacerými génovými variantmi sa odporúča v niektorých vyspelých krajinách (USA) náročnejší diagnostický algoritmus s kombináciou proteomických a molekulárno-genetických metód. Proteomické analýzy sú robustné prístupy, pomocou ktorých možno identifikovať typ amyloidogénneho proteínu a jeho štrukturálne zmeny. Prehľad proteomických prístupov pri diagnostike amyloidóz je podrobne popísaný v citovaných publikáciách<sup>(32,33)</sup>. Iniciatíva viacerých európskych krajín s vyšším výskytom ATTR (European Network for TTR-FAP – ATTReUNET) viedla k vypracovaniu odporúčania diagnostického postupu založenom na aplikácii neurologických testov, histologických a genetických analýz (sekvenčná analýza *TTR*) ako zlatého diagnostického štandardu<sup>(34)</sup>. Na druhej strane, nové a finančne nenáročnejšie technológie masívneho paralelného sekvenovania (MPS-NGS) opodstatňujú uprednostniť pri diagnostike familiárnych systémových amyloidóz genetický prístup s vyšetrením panelu cielených génov (targeted next generation sequencing)<sup>(35)</sup>. Vo vzťahu k správne načasovaniu terapie ATTR je nutné monitorovať progresiu

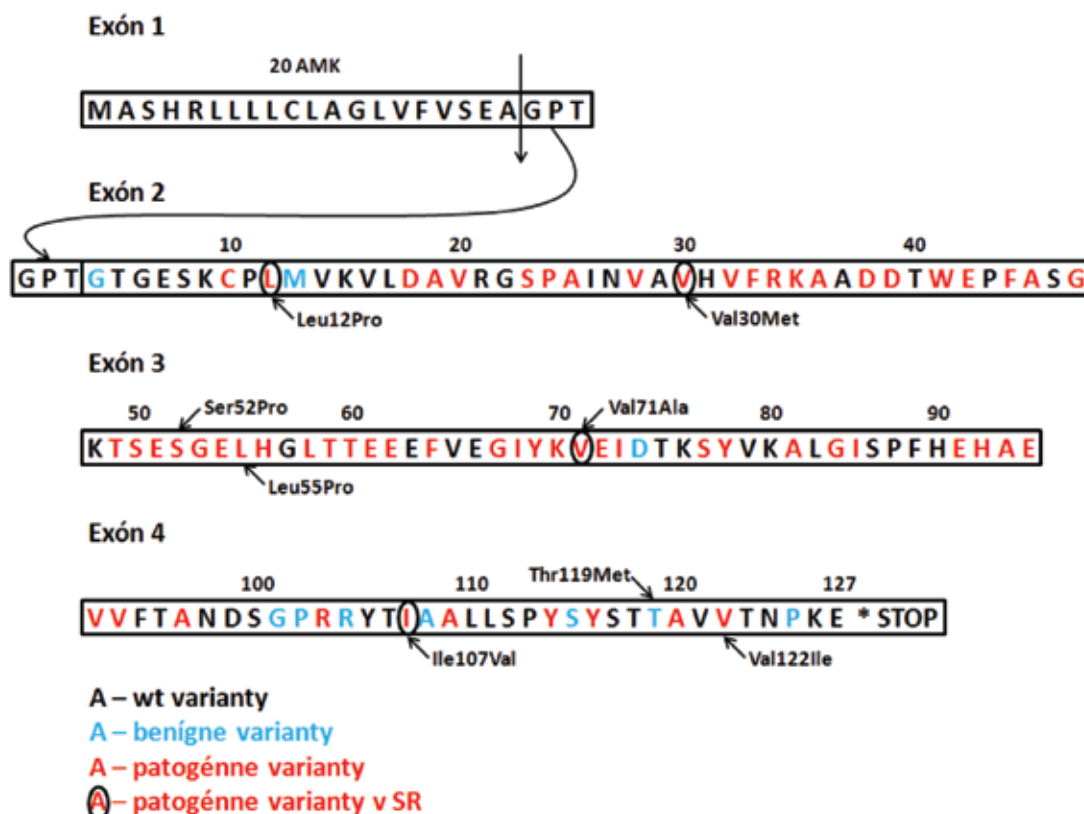
ochorenia a posúdiť stupeň poškodenia periférnych nervov. Zdá sa, že k tomuto cieľu by bolo možné využiť ako vhodný biomarker určenie hladín plazmatického neurofilamentového ľahkého reťazca (pNFL), ktorého nárast koreluje so štádiom ATTR-PN u pacientov s Val30Met variantom<sup>(36)</sup>.

### Molekulárne a genetické mechanizmy ovplyvnenia transtyreínovej amyloidózy

ATTR-FAP je príkladom zriedkavého ochorenia, u ktorého poznanie etiológie a mechanizmov patogenézy podstatne prispelo k vývoju nových efektívnych terapií. Z hľadiska mechanizmu účinku súčasne dostupné terapie ATTR môžu ovplyvniť:

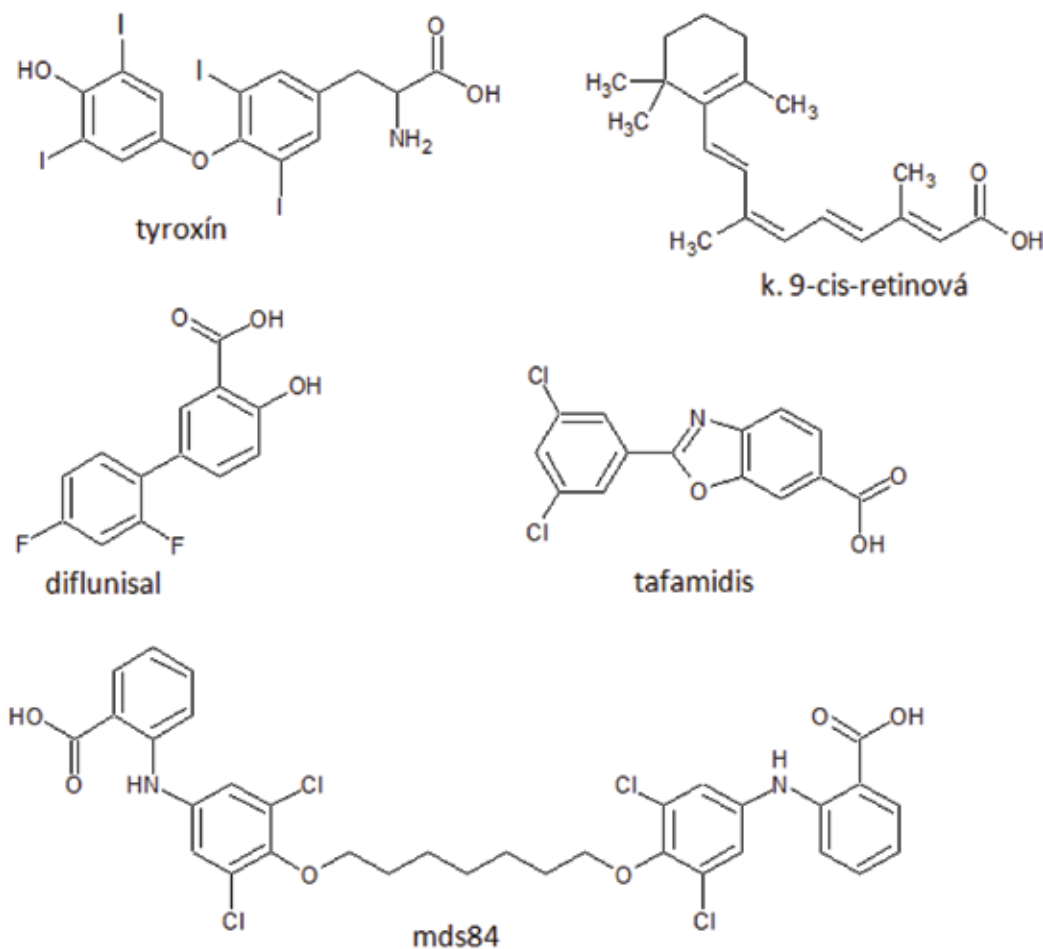
- zastavenie syntézy patogénneho ATTRv transplantáciou pečene,
- posttranskripčnú represiu génovej expresie ATTRv pomocou antisense oligonukleotidov (ASO) alebo pomocou krátkych inhibujúcich RNA (siRNA),
- blokovanie efektu missfolding proteínov pomocou protilátok – imunoterapia,
- zablokovanie disociácie RBP-TTR komplexov pomocou iných proteínov,
- inhibícia proteolytického štiepenia TTR,
- stabilizácia TTR homotetramérov prírodnými látkami a farmakami
- zníženie tvorby agregátov a amyloidových fibril.

Obrázok 6. Výskyt variantov TTR proteínu vo svete a v SR





Obrázok 7. Chemická štruktúra látok stabilizujúcich RBP-TTR komplexy



Vzhľadom na veľký rozsah poznatkov obmedzujeme sa len na stručný popis molekulárnych mechanizmov ovplyvňujúcich amyloidogézu a odvolávame sa na početné publikácie (37,38,39,40). Od prvej transplantácie v r. 1996, transplantácia sa dlho považovala za štandardný a účinný prístup, nakoľko eliminovala efekt patogénneho ATTR. Z hľadiska mechanizmu ide v podstate o génovú terapiu. Neodporúča sa pri variantoch *TTR*, ktoré súčasne vyvolávajú aj amyloidózu myokardu (*TTR-FAC*). Najviac skúseností vo svete je s pacientmi s Val30Met variantom, u ktorých má táto terapia dobrý a dlhodobý efekt. Medzi terapiu založenú na genetickom princípe môžeme zaradiť tzv. RNA supresiu pomocou syntetických oligonukleotidov, ktoré sa viažu na 3' neprekľadané oblasti (UTR) transkriptu mRNA. Inotersen predstavuje ASO s jedným reťazcom DNA (ssDNA), ktorý je komplementárny k mRNA-TTR a po jeho naviazaní zapríčiní degradáciu komplexu pomocou RNázy H. Patisiran je dvojvláknová RNA (dsRNA), ktorá po rozštiepení proteínom Dicer vytvorí siRNA, táto sa naviaže na mRNA-TTR a pomocou komplexu proteínov sa tento RNA hybrid degraduje<sup>(41)</sup>. Po úspešnom využití imunoterapie pri liečbe genetických chorôb je aj na liečbu transtyreťinovej amyloidózy výzvou využitie rekombinantných protilátok, ktoré by sa viazali s missfolding proteínmi. Uvažuje sa aj o ďalších proteínoch alebo peptidoch, ktoré by zablokovali tvorbu agregátov TTR alebo inhibovali proteolytické štiepenie transtyreťinu<sup>(21,42)</sup>. Medzi významné nízkomolekulové látky – supresory tvorby TTR amyloidov patria

prirodené látky, ako je retinol, kyselina trans-retinová, 9-cis-retinová, polyfenoly, ktoré sa viažu na RBP, ale aj na TTR kanál, a tým stabilizujú štruktúru RBP-TTR. Ďalšiu skupinu predstavujú syntetické látky, ktoré fungujú ako chaperóny a využívajú sa pri liečbe transtyreťinovej amyloidózy (**tafamidis**, **diflunisal**), alebo by sa potenciálne mohli využiť<sup>(43,44)</sup>. Ich účinok je čiastočne obmedzený tým, že sa vyznačujú negatívnym kooperačným efektom a neumožňujú naviazanie ligandov aj na druhé väzobné miesto, čím by sa dosiahla lepšia stabilizácia TTR tetramérov. Toto obmedzenie sa snaží prekonať vývoj tzv. bivalentných TTR stabilizátorov, ktoré sa súčasne viažu na obe väzobné miesta<sup>(45,46,47)</sup>. Štruktúra niektorých prírodných a syntetických ligandov je znázornená na **obrázku 7**. V terapeutickej praxi sa taktiež využíva kombinované použitie deoxycykínu a tauroxydeoxycholovej kyseliny (TUDCA), ktoré znižuje tvorbu agregátov a fibril. Táto terapia sa odporúča aj pri ATTR-CM forme.

*Vyhlásenie o bezkonfliktnosti: nemáme potenciálny konflikt záujmov.*

#### Adresa pre korešpondenciu:

doc. MUDr. Ján Chandoga, CSc  
 Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB,  
 Oddelenie molekulovej a biochemickej genetiky, Nemocnica Staré Mesto  
 Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava  
 e-mail: cgd@sm.unb.sk

## Literatúra

1. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 2018;25(4):215–219.
2. Ostertag B. Familiäre Amyloid-Erkrankung. *Z Mensch Vererbungs Konstt Lehre* 1950; 30:105-115.
3. Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy. *Brain*. 1952;75(3):408–427.
4. Saraiva MJ, Birken S, Costa PP et al. Amyloid fibril protein in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Definition of molecular abnormality in transthyretin (prealbumin). *Journal of Clinical Investigation* 1984;74(1):104–119.
5. Kapoor M, Rossor AM, Laura M et al. Clinical Presentation, Diagnosis and Treatment of TTR Amyloidosis. *JND* 2019;6(2):189–199.
6. Damy T, Costes B, Hagège AA et al. Prevalence and clinical phenotype of hereditary transthyretin amyloid cardiomyopathy in patients with increased left ventricular wall thickness. *European Heart Journal* 2015;37(23):1826–1834.
7. Wixner J, Mundayat R, Karayal ON et al. THAOS: Gastrointestinal manifestations of transthyretin amyloidosis - common complications of a rare disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2014;9(1):61-70.
8. Pinney JH, Whelan CJ, Petrie A et al. Senile Systemic Amyloidosis: Clinical Features at Presentation and Outcome. *Journal of the American Heart Association* 2013;2(2).
9. Richardson SJ. Tweaking the Structure to Radically Change the Function: The Evolution of Transthyretin from 5-Hydroxyisourate Hydrolase to Triiodothyronine Distributor to Thyroxine Distributor. *Frontiers in Endocrinology* 2015;5(245):1-9
10. Hennebery SC. Evolutionary changes to transthyretin: structure and function of transthyretin-like ancestral protein. *FEBS Journal* 2009;276(19):5367–5379.
11. Alvarez-Lario B, Macaron-Vicente J. Uric acid and evolution. *Rheumatology* 2010;49(11):2010–2015.
12. Kratzer JT, Lanaspá MA, Murphy MN. et al. Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014;111(10):3763–3768.
13. Ingenbleek Y, Bernstein LH. Plasma Transthyretin as a Biomarker of Lean Body Mass and Catabolic States. *Advances in Nutrition* 2015;6(5):572–580.
14. Liz MA, Leite SC, Juliano L et al. Transthyretin is a metallopeptidase with an inducible active site. *Biochemical Journal* 2012;443(3):769–778.
15. Benson MD. Amyloidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*. Kingsport: Quebecor Printing; 2001; 4: 5345-5370.
16. Azevedo E, Silva PF, Palhano F et al. Transthyretin-Related Amyloidoses: A Structural and Thermodynamic Approach. *Amyloidosis InTech*; 2013; 6 :113-130.
17. Groenning M, Campos RI, Hirschberg D et al. Considerably Unfolded Transthyretin Monomers Precede and Exchange with Dynamically Structured Amyloid Protofibrils. *Scientific Reports* 2015;5(11443).
18. Saelices L, Johnson LM, Liang WY et al. Uncovering the Mechanism of Aggregation of Human Transthyretin. *Journal of Biological Chemistry* 2015;290(48):28932–28943.
19. Mangione PP, Porcari R, Gillmore JD et al. Proteolytic cleavage of Ser52Pro variant transthyretin triggers its amyloid fibrillogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014;111(4):1539–1544.
20. Lashuel HA, Wurth C, Woo L et al. The Most Pathogenic Transthyretin Variant, L55P, Forms Amyloid Fibrils under Acidic Conditions and Protofibrils under Physiological Conditions†. *Biochemistry* 1999;38(41):13560–13573.
21. Saad M, Lu C, Koya C et al. Proteolytic truncation of human transthyretin linked to amyloidosis is mediated by a trypsin like enzyme: In vitro demonstration using model peptides. *Biochemical Compounds* 2016;4(5): 1-13
22. Marcoux J, Mangione PP, Porcari R et al. A novel mechano-enzymatic cleavage mechanism underlies transthyretin amyloidogenesis. *EMBO Molecular Medicine* 2015;7(10):1337–1349.
23. Hou X, Aguilar M-I, Small DH. Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. *FEBS Journal* 2007;274(7):1637–1650.
24. Takaoka Y, Ohta M, Miyakawa K et al. Cysteine 10 Is a Key Residue in Amyloidogenesis of Human Transthyretin Val30Met. *The American Journal of Pathology* 2004;164(1):337–345.
25. Rowczenio D, Quarta CC, Fontana M et al. Analysis of the TTR gene in the investigation of amyloidosis: A 25-year single UK center experience. *Human Mutation* 2018;40(1):90–96.
26. Mazzeo A, Russo M, Di Bella G et al. Transthyretin-Related Familial Amyloid Polyneuropathy (TTR-FAP): A Single-Center Experience in Sicily, an Italian Endemic Area. *JND* 2015;2(S2):S39–S48.
27. Barbov and G Kalcev I. Epidemiological and Clinical Characteristics of Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy in the Republic of North Macedonia. *Acta Scientifica Medical Sciences* 2019;3(12):03–05.
28. Parman Y, Adams D, Obici L et al. Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Current Opinion in Neurology* 2016;29:S3–S13.
29. Waddington-Cruz M, Schmidt H, Botteman MF et al. Epidemiological and clinical characteristics of symptomatic hereditary transthyretin amyloid polyneuropathy: a global case series. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2019;14(1):1-7.
30. Gertz MA, Benson MD, Dyck PJ et al. Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Transthyretin Amyloidosis. *Journal of the American College of Cardiology* 2015;66(21):2451–2466.
31. Bergen HR III., Zeldenrust SR, Butz ML et al. Identification of Transthyretin Variants by Sequential Proteomic and Genomic Analysis. *Clinical Chemistry* 2004;50(9):1544–1552.
32. Vrana JA, Theis JD, Dasari S et al. Clinical diagnosis and typing of systemic amyloidosis in subcutaneous fat aspirates by mass spectrometry-based proteomics. *Haematologica* 2014;99(7):1239–1247.
33. Loo D, Mollee PN, Renaut P et al. Proteomics in Molecular Diagnosis: Typing of Amyloidosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011;2011:1–9.
34. Adams D, Suhr OB, Hund E et al. First European consensus for diagnosis, management, and treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Current Opinion in Neurology* 2016;29(1):S14–S26.
35. Chyra Kufova Z, Sevcikova T, Januska J. et al. Newly designed 11-gene panel reveals first case of hereditary amyloidosis captured by massive parallel sequencing. *Journal of Clinical Pathology* 2018;71(8):687–94.
36. Maia LF, Maceski A, Conceição I et al. Plasma neurofilament light chain: an early biomarker for hereditary ATTR amyloid polyneuropathy. *Amyloid* 2020:1–6.
37. Ando Y, Coelho T, Berk JL et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013;8(1):31:1-18.
38. Gertz MA, Mauermann ML, Grogan M et al. Advances in the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis: A review. *Brain and Behavior* 2019;9(9): 1-12.
39. Iakovleva I. Selection of Transthyretin Amyloid Inhibitors. Doctoral thesis 2016. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:947035/FULLTEXT03.pdf>
40. Ueda M, Ando Y. Recent advances in transthyretin amyloidosis therapy. *Translational Neurodegeneration* 2014;3(1):1-19.
41. Mathew V, Wang AK. Inotersen: new promise for the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis. *Drug Design, Development and Therapy* 2019;13:1515–1525.
42. Greene MJ, Klimchuk ES, Seldin DC et al. Cooperative Stabilization of Transthyretin by Clusterin and Diflunisal. *Biochemistry* 2014;54(2):268–278.
43. Bulawa CE, Connelly S, DeVit M et al. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109(24):9629–9634.
44. Coelho T, Maia LF, da Silva AM et al. Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Journal of Neurology* 2013;260(11):2802–2814.
45. Kolstoe SE, Mangione PP, Bellotti V, et al. Trapping of palindromic ligands within native transthyretin prevents amyloid formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107(47):20483–20488.
46. Mangione PP, Deroo S, Ellmerich S et al. Bifunctional crosslinking ligands for transthyretin. *Open Biology* 2015;5(9):150105.
47. Verona G, Mangione PP, Raimondi S et al. Inhibition of the mechano-enzymatic amyloidogenesis of transthyretin: role of ligand affinity, binding cooperativity and occupancy of the inner channel. *Scientific Reports* 2017;7(182).