



Non-amiloidojenik Transtiretin Gen Varyantlarının Biyoinformatik Analizi ve His90Asn Varyantının Klinik Önemi

Bioinformatic Analysis of Non-Amyloidogenic Transthyretin Gene Variants and Clinical Importance of His90Asn Variant

Evrım Kömürcü Bayrak^{1,2}, Gizem Çelebi¹, Elif Eroğlu³, Gökhan Kahveci⁴, Fatih Bayrak³

ÖZ

Amaç: Transtiretin (TTR) amiloidozu, otozomal dominant kalıtmımlı değişken penetransa sahip bir hastalıktır. TTR genindeki patojenik varyantlar, TTR proteininin yanlış katlanmasına yol açarak kardiyomiyositlerde birikime ve kalp yetmezliğine sebep olabilmektedir. Bu çalışmada, biventriküler konsantrik hipertrofi olan hastada TTR geninde saptanan His90Asn (H90N) varyantının hastalık patogenezi etkisinin ve non-amiloidojenik varyantlarının biyoinformatik analizlerle klinik önemlerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: İndeks vaka, 18 yıl kardiyolojik açıdan takip edildi ve Illumina TruSight Kardiyomiyopati paneli kapsamında 46 genin ekzonik bölgelerindeki varyantlar araştırıldı. TTR geninde H90N varyantı saptanan vakadan klinik olarak amiloidoz şüphesi ile rektal biopsi örneği alındı. Bu varyant, Sanger dizileme yöntemi ile konfirme edildi.

Bulgular: Onbir yıl önce tanı alan ve ICD implante edilen 32 yaşındaki bir erkek vakada TTR geninin ekzon 3'ünde H90N varyantı heterozigot olarak belirlendi. İndeks vaka, kardiyak amiloidoz açısından değerlendirildiğinde, progresif sistolik disfonksiyona sahip olduğu (sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu, 2013'te %60, 2016'da %35 ve 2017'de %20) ve amiloidoz ile uyumlu epikardiyal ve endokardiyal tabakalarda global longitudinal strain (GLS) skoru ve strain rate değerinin azaldığı belirlendi. Rektal biopsisinde kongo kırmızısı boyamasında amiloid birikimi gözlenmedi. Bu varyant, asemptomatik olan babasında da tespit edildi. İlk defa bu çalışmada, TTR genindeki non-amiloidojenik aminoasit değişimine neden olan tüm varyantlar biyoinformatik analizlerle karşılaştırıldı.

Sonuç: Bu çalışmada, H90N varyantının infiltratif miyokard hastalığındaki patojenik etkisi kanıtlanamamış olsada TTR genindeki H90N varyantı gibi non-amiloidojenik varyantların klinik değerlendirmede dikkate alınması gerektiği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kardiyak amiloidoz, transtiretin, His90Asn varyantı

ABSTRACT

Objective: Transthyretin (TTR) amyloidosis is an autosomal dominant inherited disease with variable penetration. Cardiac deposition of misfolded TTR protein due to missense pathogenic variants causes heart failure. Our aim was to determine the effect of the TTR gene His90Asn (H90N) variant on the pathogenesis of disease in a patient with biventricular concentric hypertrophy, and the clinical significance of variants defined as non-amyloidogenic with bioinformatic analysis.

Materials and Methods: The index case was followed cardiologically for 18 years and pathogenic variants were investigated in the exonic regions of 46 genes using the Illumina TruSight Cardiomyopathy panel. Rectal biopsy specimen was taken from a case where the H90N variant was detected in the TTR gene, with clinical suspicion of amyloidosis. This variant was confirmed by the Sanger sequencing method.

Results: Heterozygote H90N variant was determined in exon3 of the TTR gene in index case of a 32-year-old man with severe heart failure who was diagnosed 11 years ago and implanted with an ICD. He had progressive systolic dysfunction (left ventricular ejection fraction, 60% in 2013, 35% in 2016, and 20% in 2017). GLS score and strain rate were reduced in the epicardial and endocardial layers compatible with amyloidosis in the patient.

¹ İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴ İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kardiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

ORCID: E.K.B. 0000-0003-1271-1208;

G.Ç. 0000-0002-7129-3045;

E.E. 0000-0001-6700-9390;

G.K. 0000-0001-8367-6505;

F.B. 0000-0002-1574-1085

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Evrım Kömürcü Bayrak,

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

E-mail: ebayrak@istanbul.edu.tr

Submitted/Başvuru: 16.09.2020

Accepted/Kabul: 13.10.2020

Citation/Atf: Kömürcü Bayrak E, Çelebi G, Eroğlu E, Kahveci G, Bayrak F. Bioinformatic Analysis of Non-Amyloidogenic Transthyretin Gene Variants and Clinical Importance of His90Asn Variant. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 102-113.

<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-795625>



In congo red staining of rectal biopsy, amyloid deposition was not observed. This variant was detected also in the patient's father, who did not have clinical symptoms. For the first time in this study, all variants that cause non-amyloidogenic amino acid substitutions in the *TTR* gene were compared with bioinformatics analyzes.

Conclusion: In this study, although the pathogenic effect of the H90N variant in infiltrative myocardial disease was not proven, it was revealed that non-amyloidogenic variants such as the H90N variant in the *TTR* gene should be considered in clinical evaluation.

Keywords: Cardiac amyloidosis, transthyretin, His90Asn variant

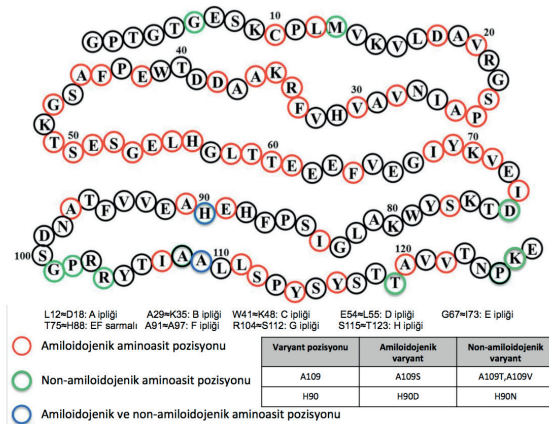
GİRİŞ

İlk kez 150 yıl önce keşfedilmiş olan geniş bir protein katlanma hastalık grubu olan amiloidozlara sebep olan amiloid agregatları, β -kırımlı tabaka yapısında sert, çözünmeyen (insolubl), dallanmayan fibriler yapıya sahiptir (1). Şimdiye kadar insanlarda *in vivo* olarak yaklaşık 36 farklı prekürsör proteinin amiloid agregatları oluşturarak amiloidoza sebep olduğu belirlenmiştir (2). Bu proteinlerden atriyal natriüretik faktör amiloidozu (AANF) kalpte atriyumlara lokalizedir, sistemik olarak ise çoğunlukla böbrek, sinir sistemi, gastrointestinal sistem, dalak ve yumuşak dokular ile birlikte kalpte de amiloid fibrilleri olarak biriken fibrinojen alfa zincir (AFib), apolipoprotein AIV (AApoAIV), apolipoprotein AII (AApoAII), serum amiloid A (AA), immunoglobulin ağır zinciri (AH), immunoglobulin hafif zinciri (AL) ve transtiretin (ATTR) prekürsörleri, kalıtsal veya edinsel tipte amiloidozlara sebep olmaktadır (3). Kardiyak amiloidozlar, sonuç olarak oldukça heterojen bir etiyopatogeneze ve kliniğe sahiptir ve çoğunlukla kardiyoloji, nefroloji, nöroloji, hematoloji, radyoloji, genetik ve patolojiyi ilgilendiren multidisipliner yaklaşımlar ile tanının konulabildiği hastalık grubudur.

Transtiretin (TTR) ilişkili amiloidozlar (ATTR), mutant formdaki transtiretin proteini sebebiyle oluşan ailesel ATTRv (amiloid TTR varyantı) ile doğal-tip transtiretin proteini sebebiyle oluşan edinsel veya senil ATTRdt olarak gruplandırılmaktadır (3). ATTRdt, çoğunlukla sadece kalbi etkilerken bazen yumuşak doku tutulumu ile bilateral karpal tünel sendromu, biseps tendon rüptürü ve spinal stenoza da sebep olmaktadır. ATTRv'nin ise kardiyak tutulumu yanı sıra sıklıkla kalıtsal sensör ve motor sinir küçük lif polinöropatisi meydana gelir. TTR ilişkili kardiyak amiloidozun klinik seyri, transtiretin fibrilinin doğal veya mutant formda olmasına, hastalığın başlangıç yaşına ve spesifik patojenik varyantlara göre değişmektedir (4).

TTR (prealbümin olarak da adlandırılan) proteini, karaciğer, koroid pleksus ve retinal pigment epitelinde sentezlenir, 147 aminositlik primer polipeptidten ilk 20 aminositlik sinyal peptid çıkarılır ve kalan 127 aminoasitten oluşan 14 kDa'lık monomerin iki boyutlu yapısında, bir alfa sarmal

(EF sarmalı) ve 8 beta iplik bulunur (5) (Şekil 1). Plazmada dördüncül formdaki homo-tetramer yapıda, birincil olarak retinolün (Vitamin A) minor olarak tiroksinin (T4) taşınmasından sorumludur. Yaşlanma veya TTR gen varyantları sebebiyle, TTR proteininin tetramer yapısının monomere ayrılacak şekilde tekrar yanlış katlanmalarla oligomer veya fibril yapılarının oluşmasına bağlı olarak, dokularda amiloid fibril birikimi sonucu organ disfonksiyonu meydana gelmektedir (5). TTR genindeki patojenik varyantlar nedeniyle oluşan amiloidozlar (ATTRv), ailesel amiloid polinöropati (FAP) veya ailesel amiloid kardiyomyopati (FAC) veya her ikisine birden neden olabilmektedir (6). Günümüzde insan genom mutasyon veri bankasında (HGMD), TTR geninde 198 adet varyant listelenmektedir ve bunların 191 tanesi aminoasit değişimine neden olan tek nükleotid varyantlarıdır (SNV). Bunlar arasında, amiloid fibrilleri oluşturmayıp ancak *in vivo* fonksiyonel anormalliklere neden olabilen (7) ve non-amiloidojenik olarak gruplandırılan varyantlar da mevcuttur (5). Bu varyantların, farklı popülasyonlarda allel frekansları değişkendir ve özellikle amiloidojenik varyantlar ile birlikte birleşik heterozigositeye sahip olup klinik tabloya ve semptomların şiddetine etki etmektedir (7). Şekil 1'de gösterildiği gibi 127 aminoasitlik matür polipeptid dizisinde 109. pozisyondaki Alanin, amiloidojenik varyant olarak Serine (A109S) değişerek geç başlangıçlı, sensör-motor polinöropatisine neden olurken (8), non-amiloidojenik varyantlar olarak Treonin (A109T) veya



Şekil 1. TTR polipeptidinde amiloidozlarla ilişkili varyantlar ve pozisyonları (7, 10)

Valin'e (A109V) değiştiğinde dominant kalıtlı ötiroid hipertiroksinemiye neden olmaktadır (9). Matür polipeptidde 90. Pozisyondaki Histidin, Aspartat'a değiştiğinde (H90D) amiloidojenik varyant olarak geç başlangıçlı FAP'a (10) sebep olurken Asparajin'e değiştiğinde (H90N) non-amiloidojenik varyant olarak tanımlanmaktadır (7,10).

Bu çalışmada, kardiyoloji tarafından 18 yıl takip edilmiş ileri biventriküler konsantrik hipertrofi erkek hastada *TTR* geninde saptanan H90N varyantının hastalık patogenezinin etkisinin ve diğer muhtemel non-amiloidojenik varyantların biyoinformatik analizlerle klinik önemlerinin belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Vaka Seçimi ve Genetik Analizi

Bu çalışma kapsamında yapılan genetik araştırma, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi ve katılımcılardan çalışma hakkında bilgilendirme sonrasında onam alındı. İndeks vakasının kardiyolojik değerlendirmeler ve takibi, 16 yaşından 34 yaşında eksitus oluncaya kadar devam etti. Kardiyolojik değerlendirmeler, fizik muayene, elektrokardiyografik ve ekokardiyografik olarak yapıldı.

16 yaşında iken hipertofik kardiyomiyopati (HKM) olarak değerlendirilen indeks vaka 28 yaşındayken kendisinden ve ebeveynlerinden EDTA'lı tüplere 10 ml periferik kan alındı. Periferik kandan ayrıştırılan lökositlerinden standart tuzla çöktürme yöntemi ile genomik DNA örnekleri izole edildi. DNA örneklerinin konsantrasyonları nanodrop cihazında ölçüldü. İndeks vakada, kardiyomiyopati ile ilişkili 46 genin ekzonik bölgelerindeki (Illumina TruSight kardiyomiyopati paneli, www.illumina.com/trusight) değişimler, yeni nesil dizileme (YND) platformu ve protokolleri (Illumina MiSeq, U.S.) kullanılarak hizmet alımı şeklinde MiSeq Reporter yazılımı ile araştırıldı. Elde edilen vcf (variant call format) dosyaları incelenerek varyantların hastalıkla ilişkileri değerlendirildi. İndeks vakada, *TTR* geninde heterozigot olarak belirlenen His90Asn (H90N, His110Asn, H110N) varyantının konfirmasyonu ve aile segregasyon analizi için ebeveynlerinin genotiplenmeleri, *TTR* geni 3. ekzonu daha önce tarif edilen yöntemdeki gibi

(11) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Sanger dizileme ile yapıldı.

Biyoinformatik Analizler

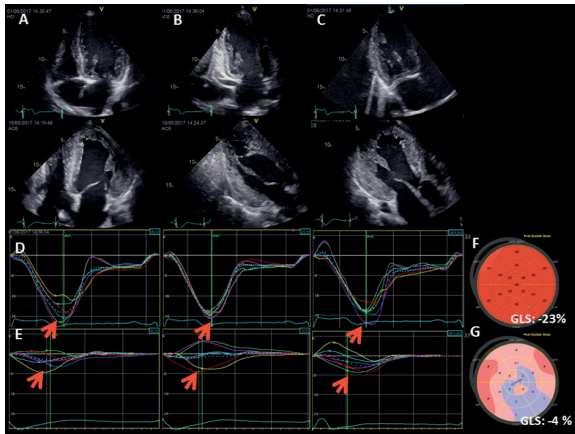
YND yöntemi ile tanımlanan varyantlar, varyant yazılımı (VariantStudio) ile gen transkriptindeki lokalizasyonları ve amino asit substitüsyonları belirlendi. Varyant minimum allel frekansları (MAF: %5 altı), dominant kalıtım modeli ve ekzonik pozisyonuna göre filtrelemeler yapılarak varyant listesi incelendi. İndeks vakada, potansiyel olarak hastalık sebebi olarak, *TTR* genindeki H90N aminoasit değişimine sebep olan c.328C>A varyantı heterozigot olarak belirlendi. Bu varyant ile birlikte *TTR* genindeki diğer non-amiloidojenik varyantlar, varyant dizilerinin yorumlamasında kullanılan ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) sınıflaması (12) ve DANN, MutationTaster, FATHMM, SIFT, PROVEAN, PrimateAI ve GERP araçları kullanılarak elde edilen *in silico* analiz sonuçları için VarSome (<https://varsome.com/>) veritabanında, popülasyonlardaki allel sıklıkları (ExAc, erişime açık data) için dbSNP veritabanında (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), ATTRv ile ilişkileri için HGMD (Human Genome Mutation Database; BIOBASE, <https://portal.biobase-international.com/cgi-bin/portal/login.cgi>) mutasyon veritabanında araştırıldı.

BULGULAR

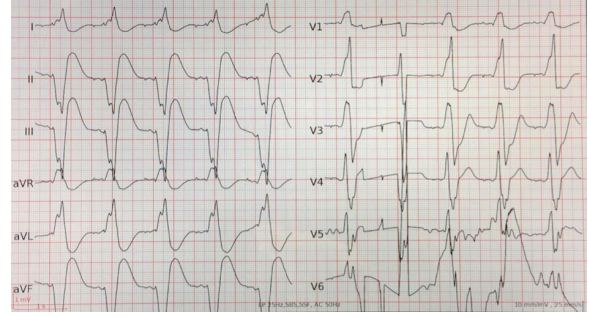
Hasta Hikayesi ve Klinik Değerlendirme

2001 yılında 16 yaşında iken ilk kardiyolojik değerlendirmelerinde hipertrofik kardiyomiyopati tanısı olarak takip edilen erkek hastaya 5 yıl sonra, tam atriyoventriküler blok sebebi ile DDD kalp pili implantasyonu uygulaması yapıldı. Kardiyoloji takipleri düzenli devam eden hastanın 2013 yılında yapılan ekokardiyografik incelemesinde, ejeksiyon fraksiyonu (EF) %60, sol ve sağ ventrikül konsantrik hipertrofisi izlendi, interventriküler septum (ivs): 3.3 cm, posterior duvar kalınlığı (pdk): 2.4 cm, mitral yetersizliği 1. seviye olarak değerlendirildi ve lead ekstraksiyonu ile ICD (kardiyak defibrilatör) implantasyonu yapıldı. 2014 yılındaki kontrollerinde, EF %40 ve biventriküler hipertrofisi olduğu gözlemlendi. 2016

ylındaki kontrollerinde ise EF %35, ivs:3.1 cm, pdk:2.1 cm olarak belirlendi ve CRT-D upgrade işlemi için yeni sol ventrikül lead implantasyonu yapıldı. Bu işleminden 5 ay sonra "atriyal flutter" bulgusu sebebi ile intrakardiyak kardiyoversiyon, 4 ay sonrasında ventriküler taşikardi için uygun ICD şoklaması ortaya çıktı. 32 yaşında EF'si %20, biventrikular hipertrofi and sol ventrikül dilatasyonu gözlemlenen hastadan amiloidoz şüphesi ile rektal biopsi (0.2 cm çapında 4 doku parçası incelenmiş) uygulaması yapıldı ve histopatolojik olarak kongo kırmızısı boyaması ile incelenen dokularda amiloid birikimi saptanmadı. Ancak ekokardiyografik bulguları, Şekil 2'de gösterildiği gibi kardiyak amiloidoz şüphesini doğrulamaktadır. İndeks vaka 32,5 yaşında iken EKG bulguları Şekil 3'de izlenmektedir. EKG bulguları atriyumdan ve takiben ventrikülden yapılan pil ritmi ile uyumludur. QRS ileri derecede genişlemiştir (320 msn). Aynı zamanda vakada, kısa süreli kooperasyon bozulması ve konuşma bozukluğu gelişmesi sebebi ile nörolojik olarak değerlendirildiğinde kontrastsız kaniyal BT sonucunda, belirgin kanama veya patolojik bulgu saptanmadı, karotid ve vertebral arterlerin renkli doppler ultrasonografik incelemesi normal sınırlarda bulundu. Bi-



Şekil 2. Sağlıklı kontrol bireyinde Global longitudinal strain (GLS) analizi (üst panel) ve amiloidoz hastasında GLS analiz (alt panel). Strain ölçümleri apikal 4 boşluk (A), 3 boşluk (B), ve 2 boşluk (C) görüntülerinden elde edilmiştir. Pik sistolik strain aortik kapak kapanmasından önceki en negatif değer olarak saptanmıştır (D, E; oklar). GLS, 3 apikal görüntüden elde edilen ortalama pik sistolik strain olarak tanımlanmıştır. 18 segmetli sol ventrikül strain grafikleri izlenmektedir (F, G). Kontrol bireyde normal GLS (-23 %) ve amiloidozlu hastada ciddi azalmış GLS (-4 %) değerleri izlenmiştir



Şekil 3. İndeks vakanın 32,5 yaşındaki elektrokardiyografi görüntüsü

yokimyasal kan parametreleri, serumda serbest tiroksin (FT4) 25,52 pmol/L (referans değerleri; 11,5-22,7) olarak arttığı, tiroid stimulan hormon (TSH) 3.92 uIU/mL (referans değerleri; 0,25-4,55) olarak normal aralıkta olduğu belirlendi. 1 hafta sonra tekrarlanan ölçümlerde serbest tiroksin (FT4) 29,04 pmol/L (referans değerleri; 11,5-22,7) olarak arttığı, tiroid stimulan hormon (TSH) 1.61 uIU/mL (referans değerleri; 0,25-4,55), serbest triiodotironin (FT3) 3.91 pmol/L (referans değerleri; 3.5-6.5) olarak normal aralıkta olduğu belirlendi. Hasta, 34 yaşında ciddi kalp yetmezliği ve pompa yetersizliği sebebiyle eksitus olduğunda, kardiyak amiloidozu histopatolojik olarak incelenemedi. Hastanın klinik takip aşamaları Tablo 1'de özetlenmektedir.

İncelenen Illumina TruSight kardiyomiyopati gen paneli bölgeleri %98 oranında dizilenmiş olup indeks vakada 97 varyant tespit edildi ve filtrelemeler ardından aminoasit değişimine sebep olan ve klinik önemi belirsiz *TTR* geninde H90N varyantı heterozigot olarak tespit edildi. *TTR* genindeki H90N varyantı için yapılan aile segragasyonu incelemesinde, klinik bulguları olmayan babanın taşıyıcı olduğu tespit edildi. Şekil 4'de Sanger dizileme sonucu gösterilmektedir.

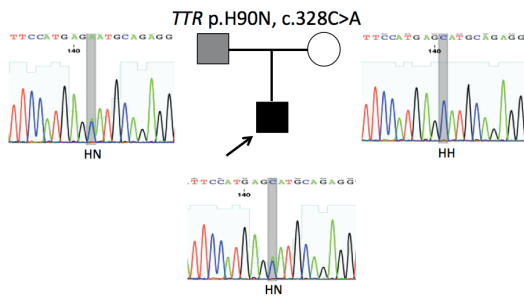
H90N ve Non-amiloidojenik Varyantların Biyoinformatik Değerlendirmesi

Literatürde *TTR* geninde non-amiloidojenik olarak gruplandırılmış 12 farklı yanlış anlamlı (missens) varyant mevcuttur. Amiloidojenik olarak sınıflandırılan H90D ve A109S varyantları ile aynı pozisyondaki non-amiloidojenik varyantlar birlikte biyoinformatik analizlerle incelendi. Toplam 14 adet varyant, Şekil 5'de gösterildiği gibi açık erişimli veribankaları

Tablo 1. İndeks vakanın klinik bulguları

Takip Dönemleri	Bulgular	Klinik Operasyonlar
2001	HCM (hipertrofik kardiomyopati) tanısı	
2006	Tam atriyoventriküler blok	DDD Kalp Pili implantasyonu
2013	Ekokardiyografi: EF: %60, lv ve rv konsantrik hipertrofi, ivs:3.3, pdk: 2.4, my: 1. seviye	Lead extraction ICD değişimi
2014	EF: %40, biventriküler hipertrofi	
2016 Mart ve Nisan	EF: %35, ivs: 3.1, pw: 2.1	CRT yükseltme, lead revizyonu
2016 Temmuz	atriyal flutter	Intrakardiyak kardiyoversiyon
2016 Kasım	Uygun ICD şoku	VT kardiyoversiyon
2017	EF: %20, biventriküler hipertrofi ve lv dilatasyon	Rektal Biyopsi (Kongo kırmızısı boyaması): amiloid birikimi negatif
2019	İleri kalp yetmezliği ile eksitus	

EF: Ejeksiyon fraksiyonu, lv: sol ventrikül, rv: sağ ventrikül, ivs: intraventriküler septum, pdk: diyastolik posterior duvar kalınlığı, my: mitral yetersizliği, ICD: implante edilebilir kardiyoverter defibrilatör



Şekil 4. TTR p.H90N (c.328C>A) varyantının aile segregasyonu. Ok, indeks vakayı, gri kare, asemptomatik taşıyıcı babayı göstermektedir

ve biyoinformatik araçlar kullanılarak *in silico* analizlerle karşılaştırıldı. Şekil 5'de, sinyal peptid (20 aminositlik) çıkartıldıktan sonra oluşan matür polipeptiddeki pozisyonları, referans transkriptteki nükleotid pozisyonları dikkate alınarak, HGMD'de ve dbSNP veritabanlarında daha önce tanımlanmış olanların kodları belirtildi. Ayrıca her bir varyantın, ACMG sınıflamasına göre belirlenen klinik önemle-

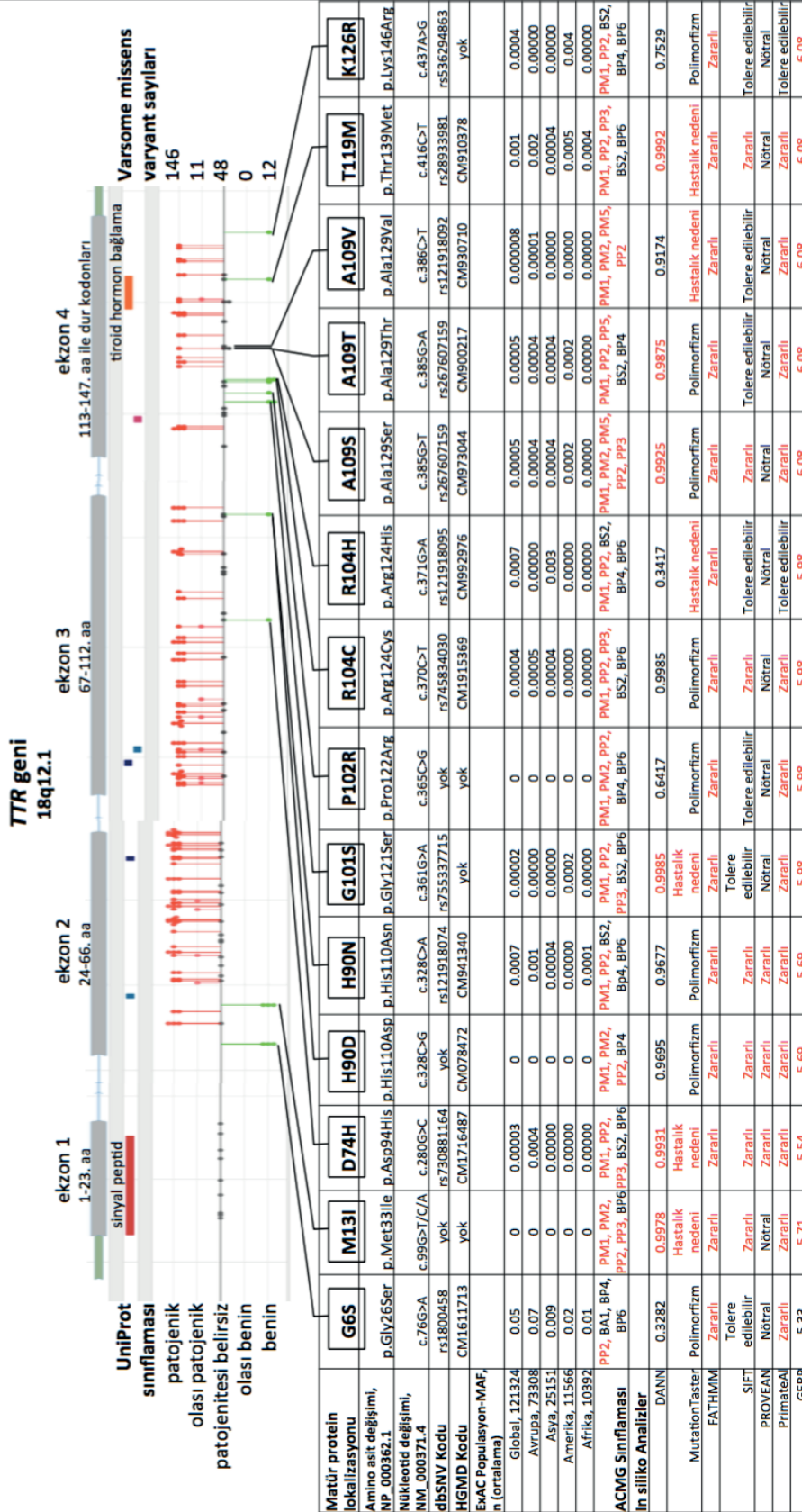
ri, popülasyonlardaki sıklıkları ile *in silico* analizlere göre verilen varsayım sonuçları kıyaslandı. Buna göre, H90N varyantı dahil 10 varyantın popülasyon gruplarında 1/1000'den daha nadir bulunduğu belirlendi. *In silico* analizlerde, H90N varyantı, FATHMM, SIFT, PROVEAN, PrimateAI ve GERP araçlarında zararlı veya riskli skor olarak öngörülürken DANN ve MutationTaster araçlarında ise polimorfik olarak öngörüldüğü belirlendi. Diğer varyantların analiz sonuçları, Şekil 5'de karşılaştırılmaktadır.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, yaklaşık 18 yıl takip edilen biventriküler konsantrik hipertrofi erkek hastada TTR geninde saptanan H90N varyantı ile birlikte diğer non-amiloidojenik varyantlar, biyoinformatik analizler ile karşılaştırılarak klinik önemleri ve hastalık patogenezindeki olası etkileri araştırıldı.

Kardiyak amiloidozda EKG'de düşük voltaj ve ekokardiyografide artmış duvar kalınlığının görülmesi tipik bulgularıdır (6). Vakamızda AV blok nedeni ile kalıcı pil ritmi olduğundan EKG'de düşük voltaj değerlendirilemezken amiloidoz ile uyumlu biventriküler duvar kalınlığı izlendi. Ayrıca kardiyak amiloidozda atrioventriküler blok, hastaların %22'sinde görülebilmektedir (6). Vakamızda AV tam blok nedeni ile 21 yaşında kalıcı kalp pili implantasyonu yapıldı. Kardiyak amiloidozda, global sol ventrikül sistolik fonksiyonları ve ejeksiyon fraksiyonu hastalığın ileri safhalarına kadar korunmakta, sistolik fonksiyonda zamanla ilerleyici bozulma izlenmektedir (6). Benzer olarak, vakamızda da yıllar içerisinde sol ventrikül sistolik fonksiyonunda ilerleyici azalma meydana gelmiştir.

H90N varyantının klinik önemi belirsiz olup non-amiloidojenik olarak tanımlanmaktadır (7, 10). Bu varyantla ilgili ilk araştırma, 1989 yılında, ailesel amiloidotik polinöropatisi olan bir vakada (İtalyan kökenli Amerikalı, 39 yaş, kadın, 34 yaş başlangıçlı sensör nöropati, tek gözde vitroz opasite, muhtemelen nöropati sebebi ile eksitus olmuş anne, amca ve teyzesinde periferik nöropati, kardiyomyopati ve vitroz opasite, hastanın vitroz sıvısında amiloid fibrilleri immunohistokimya ile gösterilen) TTR geninin



Şekil 5. TTR geninde non-amiloidojenik olarak tanımlanmış aminoasit değişimine neden olan varyantların biyoinformatik analizler ile kıyaslanması.

MAF minimum allel frekansı. Tablodaki kırmızı olarak belirtilenler, patojenite ihtimali olanları göstermektedir. ACMG kılavuzuna göre yapılan kısaltmalar (Richards ve diğeri 2015). PM1; mutasyon açısından sıcak nokta ve/veya kritik fonksiyonel alanda bulunması, PM2; kontrol veri bankalarında bulunması, PM5; yeni yanlış anlamlı varyant, BA1; alel frekansı %5'ten fazla olması, PP2; hastalık mekanizması ile ilişkili yanlış anlamlı varyant, PP3; çok sayıda hesaplamalar ile zararlı bir etkiyi desteklemesi, BP4; hesaplamalı analizde gen üzerindeki etkinin olması, BP6; son zamanlarda iyi huylu (benin) varyant olarak raporlanması, BS2; sağlıklı yetişkin bir bireyde erken yaşta beklenen tam penetrant bir hastalıkta gözlemlenmesi

3. ekzonunda SphI restriksiyon enzim kesim bölgesinde 3 amino asitin değişimine sebep olabilecek (glu89, his90 veya ala91) bir değişim belirlenmiş, isoelektrik fokuslama (HIEF, "Hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradient") tekniği ile plazma transtiretin PI değerleri ile daha asidik bir aminoasite değişim olabileceği (ki 90 ve 91 kodonlardaki aminoasitler) öne sürülmüş ancak nükleotid değişimi o dönemdeki moleküler teknikler ile belirlenememiştir (13). Araştırmacılar, 1991 yılında bu vakadaki varyantı tanımlamak için 3. ekzonun PCR fragmentini farklı restriksiyon enzimleri kullanarak incelemişler ancak yine H90N değişimini kanıtlayamamışlardır (14). 1994 yılında aynı indeks vakada, abdominal yağ aspiratında amiloid fibrilleri gösterilmiş, kardiyomyopatisinin ilerlediği ve 42 yaşında ortotopik karaciğer transplantasyonunun yapıldığı bildirilmiştir. Ayrıca, *TTR* genin dört ekzonik bölgesi dizilenecek ekzon 3'deki c.328C>A değişimi ile oluşan H90N varyantı tespit edilmiş aynı zamanda ekzon 2'de E42G (Glu42Gly) substitusyonuna sebep ikinci bir varyant belirlenmiştir (15). E42G varyantı, daha önce alt ekstremite nöropatisi ve kronik diare bulguları olan Japon bir ailede gösterilmiştir (16). Bu İtalyan ailenin aile ağacı sorgulamasında H90N ve E42G varyantlarının birlikte indeks vakanın ölen annesinden segregе olduğu, indeks vakanın 6 kardeşinden 2'sinde (biri 36 yaşında iken abdominal yağ dokusunda amiloid tespit edilmiş ve sensör nöropatisi meydana gelince 37 yaşında karaciğer transplantasyonu olmuş erkek kardeş ile dört yıl önceki klinik değerlendirmesinde 37 yaşında iken asemptomatik olan erkek kardeş) ve ayrıca semptomatik 3 kuzeninde de bu varyantların cis konfigürasyon ile birlikte bulunduğu belirlenmiştir (15). Sonuç olarak, H90N varyantı ilk kez bu çalışmada tespit edilmiş olsa da çalışmamızdaki vakadan farklı olarak nöropati ile seyri ve amiloid birikimi ile ilişkinin amiloidojenik olan ikinci varyantın birleşik heterozigotesinden kaynaklanmaktadır.

1991 yılında başka bir çalışmada (17), 1200 kişilik Portekiz popülasyonunda ki bunların 500'ü V30M (Val30Met) varyantlı FAP hastaları ile asemptomatik aile üyeleri ve FAP'ın sık görüldüğu bir bölgede (Po-

voa de Varzim) yaşayan 700 kişilik random popülasyonda HIEF tekniği (18) ile plazmada TTR protein varyantları taranmış ve bunlar içerisinde asidik TTR varyantı olan bir aile belirlenmiştir. Bu ailedeki FAP'lı indeks vaka, amiloidojenik olan V30M varyantı için heterozigot iken asemptomatik 31 yaşındaki oğlunun V30M ve H90N varyantları için bileşik heterozigot olduğu (plazmada normal TTR monomeri olmayıp H90N varyantı annesinden segregе olmuştur, trans konfigürasyonda) ve 28 yaşındaki kızının ise sadece H90N varyantı için taşıyıcı olduğu belirlenmiştir (17). Ayrıca bu çalışmaya deneysel karşılaştırma amacı ile, Altland ve arkadaşlarının 1987 yılındaki çalışmasında (19) aynı teknikle 4000 kişi taranarak non-patojenik asidik TTR varyantını taşıdığı saptanmış, akrabaları olmayan 2 Alman birey (klinik bilgileri mevcut değil) dahil edilmiştir (17). Ek olarak, 700 kişilik Portekiz popülasyonunda H90N varyantı 3 kişide (biri homozigot olarak) daha tespit edilmiş ve bu bireylerin (6-58 yaş) sağlıklı ve FAP bulgularına sahip olmadığı belirtilerek H90N varyantının hastalıkla ilişkili olmadığı ileri sürülmüştür (17). 1992 yılında Alves ve arkadaşları tarafından, İtalyan indeks vaka ve asemptomatik kardeşinde (13) ve Portekizli 3 bireyde (17) HIEF tekniği ile elde edilen asidik TTR varyant sonuçları, *TTR* ekzonları dizilenecek H90N substitusyonuna neden olan c.328C>A nükleotid değişimini ve genotiplerini konfirme edilmiştir (20). Bu asemptomatik ve sağlıklı olarak değerlendirilmiş H90N varyant taşıyıcılarının ileri yaşlardaki nörolojik ve kardiyak takipleri ile ilgili literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısıyla sağlıklı olarak incelenen Portekiz popülasyonu FAP'ın sık rastlandığı bir coğrafik bölgedendir ve bu araştımalarda H90N varyant taşıyıcılığının kardiyak amiloidoz açısından değerlendirilmemiştir. Bu sebeple, H90N gibi non-amiloidojenik olarak sınıflandırılan, nadir ve patojenite ihtimali bulunan varyant taşıyıcılarının kardiyolojik takipleri önem taşıyabilir.

1993 yılındaki bir çalışmada, Kuzey Portekiz'de V30M varyantını taşıyan FAP ailelerinde hasta ve etkilenmemiş aile bireylerinin serum örnekleri (n=100) HIEF yöntemi ve *TTR* ekzonları PCR-PFLP yöntemleri ile incelenmiştir (21). Bu ailede, 37 yaşın-

daki V30M taşıyıcısı FAP'lı hastanın (eksitus) 55 yaşındaki ablasının T119M (diğer bir non-amiloidojenik varyant) heterozigot taşıyıcı, eşinin H90N heterozigot taşıyıcı olduğu ve bu çiftin 24 yaşındaki oğlunda H90N ve T119M birleşik heterozigotluk tespit edilmiştir. Bu üç bireyde FAP semptomlarının olmadığı ancak T119M varyantına sahip bireyde T4 hormonunun taşınmasında TTR bağlanmasının arttığı, H90N taşıyıcılığının ise hormon bağlama özelliklerinde veya konsantrasyonlarına etkisinin olmadığı belirlenmiştir (21). Ancak bu çalışmada da, bu aile bireyleri kardiyolojik olarak incelenmemiştir ve izlemleri hakkında bilgi mevcut değildir.

2004 yılındaki başka bir çalışmada ise (22), 5 hastanın incelendiği Hollandalı bir FAP'lı ailede, indeks vaka, annesi (72 yaşında ciddi amiloidoz ile eksitus olmuş) ve 2 kız kardeşinde G47E (Gly47Glu) patojenik varyantı tespit edilmiş, ek olarak indeks vakanın yeğeni olan 33 yaşındaki karpal tünel sendromu tanısı alıp sonra 43 yaşında şiddetli amiloid kardiyomiyopatisi, sistemik ortostoz ve gastarointestinal mobilite bozukluğu ile duyu polinöropatisi ve böbrek yetmezliği tanısı alan bir kadın hastada, hem G47E varyantı (babası ile ilgili klinik ve genetik bilgi mevcut değildir) hem de H90N (muhtemelen klinik bilgisi mevcut olmayan annesinden kalıtılmış) varyantı saptanmıştır. Bileşik heterozigot olan bu hastanın kalbinde patolojik olarak ciddi amiloid birikimi tespit edilmiş, kalp ve karaciğer transplantasyonundan 4 ay sonra ani bir şekilde ölmüştür. Çalışmada, H90N varyantının olası etkisi tartışmada belirtilmemiştir (22). H90N varyantı, amiloidojenik G47E varyantı ile birlikte bu vakada klinik bulguların daha şiddetli oluşmasına sebep olmuş olabilir.

2009 yılındaki araştırmada, tekrarlayan serebral kanamaları olan, kardiyak ve periferik nöropati bulguları bulunmayan, abdominal yağ biyopsisinde amiloid belirlenmemiş 46 yaşında bir erkek hastada ve asemptomatik iki kız kardeşinde (40 ve 46 yaş) H90N varyantı tespit edilmiştir. Kız kardeşlerin serebral görüntülemesinde periventriküler beyaz cevherde çok az spesifik olmayan yüksek sinyal yoğunluğu lezyonları görülmüş ancak bulgular amiloidozu desteklememiştir. Diğer yandan, indeksin babasında serebral

hemoraji hikayesi olmasına rağmen bu varyantı taşımadığı belirlenmiştir, muhtemelen bu varyantı taşıyan ölmüş olan anne hakkında bilgi verilmemiştir (23). Bu çalışmada, H90N varyantının amiloidojenik bir potansiyele sahip olmadığı ileri sürülmüş olsa da vakanın annesi ve kız kardeşlerinde kardiyak amiloidoz durumu değerlendirilmemiştir.

2011 yılında, Rus kardiyomiyopati hastalarında (n=270) *TTR* gen varyantları araştırılmış ve 42 yaşında tanı almış H90N varyant taşıyıcısı hastada, majör bulgular olarak progresif kardiyopulmoner yetmezlik, akciğer arter dallarında tekrarlayan tromboemboli, periferik ödem ve asidemi tarif edilmiştir (24). Bu hastada, kardiyak amiloidozun klinik tanısı, sol ventrikülde miyokardiyal kitle indeksinde belirgin bir artış ve elektrokardiyografik dinamik voltajın azalmasıyla ortaya çıkan kardiyovasküler ve solunum sistemlerinin açık tutulumu sırasında hastalığın terminal aşamasında konulmuştur. Hastanın ölümü, aniden sinoatriyal blokaj nedeniyle olmuştur. Otopside, sistemik ve ağırlıklı kardiyopulmoner amiloidoz formunun hafif aterosklerozlu koroner arterlerde olduğunu belirlenmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda AL amiloidoz olmadığı belirlenmiştir. İndeks vaka hastalığın klinik bulgularına sahip olmayan annesinde (74 yaş) de H90N varyantı tespit edilmiştir (24). Bu vakanın klinik izlemi ve semptomatik olmadığı için sağlıklı olarak değerlendirilmiş bir ebeveyninden kalıtılması açısından çalışmamızdaki vaka ile benzerdir. Transtiretin (*TTR*) amiloidozu, otozomal dominant olarak kalıtıldığı ve değişken penetransa sahip olması sebebi ile H90N varyantına sahip vakalardaki klinik heterojenite, başka modifiye edici genetik ve epigenetik faktörlerden kaynaklanıyor olabilir.

2015 yılında, FAP hikayesi olan geniş bir İrlandalı ailede, *TTR* c.328C>G nükleotid değişimi sonucu ile oluşan H90D varyantı ilk kez tanımlanmıştır (10). 74 yaşındaki polinöropatili kadın indeks vakanın sinir biyopsisinde amiloid depozitleri gösterilmiş, 10 yıl öncesinde karpal tünel sendromu sonrasında alt bacak güçsüzlüğü gelişmiş hasta 80 yaşında konjestif kalp yetmezliği ile eksitus olmuştur. Probandın 54 yaşındaki H90D taşıyıcısı kızı, kardiyolojik açıdan da de-

ğlendirilmiş ve anormallik saptanmamıştır (10). Bu çalışmada, *in siliko* olarak H90D ve H90N varyantlarının PyMoL ile üç boyutlu yapıları karşılaştırılmış ve H90D varyantının H90N'ye göre bağları değiştireceği ve tetramer stabilitesini önemli ölçüde bozabileceği öngörülmüştür (10). H90D varyantı, eksitus olan vakada yapılan sinir biyopsisinde amiloid birikimi gösterilebildiği için amiloidojenik varyant olarak sınıflandırılmıştır (10). Ancak literatürde sadece H90N taşıyıcısı Rus vaka (24) otopsi dışında hiç bir vakada amiloid birikimi gösterilememiştir. Bu çalışmadaki en önemli kısıtlılık, vakamız hayattayken invaziv bir girişim olan kardiyak biyopsinin yapılmaması ve eksitus sonrası sosyopsikolojik nedenlerle dokularında histopatolojik değerlendirme yapılamamış olmasıdır. İleride benzer otopsi vakalarında, farklı dokularda amiloid birikimleri histopatolojik olarak belirlenebilir. Amiloidoz tanısında, görüntüleme yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen doku biopsisi halen altın standart olarak değerlendirilse de (6) vakamızdan alınan rektal biyopside amiloid birikimi gösterilememiş olup birikim olabilecek diğer dokular incelenememiştir.

TTR ile ilişkili amiloidoz yaş, cinsiyet, coğrafi bölgeler, epigenetik değişiklikler ve çevresel faktörlere göre fenotipik varyasyonlarla birçok farklı formda ortaya çıkabilmektedir (6). Sonuç olarak, literatürde H90N varyantının kardiyak amiloidozdaki patojenik etkisi ile ilgili veri eksikliği mevcuttur. Bu çalışmada, özellikle nadir rastlanan ve *in siliko* analizlerle patojenik olarak tahmin edilen non-amiloidojenik varyantların amiloidoz patogenezinde rol oynayabileceği öne sürülmektedir. Ancak bu hipotezi destekleyecek daha fazla deneysel ve takipli klinik araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür: PCR primerlerinin temininden Mehveş Poda'ya teşekkür ederiz.

Acknowledgements: Thanks to Mehveş Poda for providing PCR primers.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım E.K.B, G.Ç.; Veri Toplama- E.K.B, E.E., G.K., F.B.; Veri Analizi/Yorumlama- E.K.B, E.E., G.K., F.B.; Yazı Taslağı- E.K.B, F.B.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- F.B.; Son Onay ve Sorumluluk- E.K.B, G.Ç., E.E., G.K., F.B.

Author Contributions: Conception/Design of Study- E.K.B, G.Ç.; Data Acquisition- E.K.B, E.E., G.K., F.B.; Data Analysis/Interpretation- E.K.B, E.E., G.K., F.B.; Drafting Manuscript- E.K.B, F.B.; Critical Revision of Manuscript- F.B.; Final Approval and Accountability- E.K.B, G.Ç., E.E., G.K., F.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 42173 ve TDP-2017-22581).

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit. (Project No: 42173 and TDP-2017-22581).

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Riek R, Eisenberg DS. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature* 2016; 539(7628):227-35.
2. Angelini A, Zanco F, Castellani C, Di Francesco A, Barbera MD, Vescovo GM, et al. Cardiac amyloidosis: a review of the literature and a practical approach for the clinicians. *Italian Journal of Medicine* 2019; 13: 73-90.
3. Guan J, Mishra S, Falk RH, Liao R. Current perspectives on cardiac amyloidosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302(3):H544-H552.
4. Ruberg FL, Berk JL. Transthyretin (TTR) cardiac amyloidosis. *Circulation* 2012; 126(10): 1286-300.
5. Park GY, Jamerlan A, Shim KH, An SSA. Diagnostic and Treatment Approaches Involving

- Transthyretin in Amyloidogenic Diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20(12):2982.
6. Kocabaş GÜ, Kocabaş U, Gültekin N. Kardiyak Amiloidoz; Patofizyoloji, Teşhis ve Tedavi. Gültekin N, editör. İnfiltratif Kardiyomiyopatiler, Lizozomal Depo Hastalıkları, Mitokondriyal ve Genetik Mutasyonlara Bağlı Kardiyomiyopatiler. Ankara: Türkiye Klinikleri 2018; p.11-22.
 7. Saraiva MJ. Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Hum Mutat* 2001;17(6):493-503.
 8. Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Shirieda K, Fujimoto T, Matsukura S. Detection of three transthyretin gene mutations in familial amyloidotic polyneuropathy by analysis of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Neurol Sci* 1997;150(2):143-8.
 9. Refetoff S, Marinov VS, Tunca H, Byrne MM, Sunthornthepvarakul T, Weiss RE. A new family with hyperthyroxinemia caused by transthyretin Val109 misdiagnosed as thyrotoxicosis and resistance to thyroid hormone--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(9):3335-40.
 10. Jimenez-Zepeda VH, Bahlis NJ, Gilbertson J, Rendell N, Porcari R, Lachmann HJ, et al. A novel transthyretin variant p.H110D (H90D) as a cause of familial amyloid polyneuropathy in a large Irish kindred. *Amyloid* 2015;22(1):26-30.
 11. Durmuş-Tekçe H, Matur Z, Mert Atmaca M, Poda M, Çakar A, Hıdır Ulaş Ü, et al. Genotypic and phenotypic presentation of transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Turkey. *Neuromuscul Disord* 2016; 26(7):441-6.
 12. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17(5):405-24.
 13. Skare JC, Saraiva MJ, Alves IL, Skare IB, Milunsky A, Cohen AS, et al. A new mutation causing familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164(3):1240-6.
 14. Skare JC, Milunsky JM, Milunsky A, Skare IB, Cohen AS, Skinner M. A new transthyretin variant from a patient with familial amyloidotic polyneuropathy has asparagine substituted for histidine at position 90. *Clin Genet* 1991;39(1):6-12.
 15. Skare J, Jones LA, Myles N, Kane K, Milunsky A, Cohen A, et al. Two transthyretin mutations (glu42gly, his90asn) in an Italian family with amyloidosis. *Clin Genet* 1994;45(6):281-4.
 16. Ueno S, Uemichi T, Takahashi N, Soga F, Yorifuji S, Tarui S. Two novel variants of transthyretin identified in Japanese cases with familial amyloidotic polyneuropathy: transthyretin (Glu42 to Gly) and transthyretin (Ser50 to Arg). *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 169(3):1117-21.
 17. Saraiva MJ, Almeida MR, Alves IL, Moreira P, Gawinowicz M, Costa PP, Rauh S, Banzhoff A, Altland K. Molecular analyses of an acidic transthyretin Asn 90 variant. *Am J Hum Genet* 1991;48(5):1004-8.
 18. Altland K, Banzhoff A. Separation by hybridisoelectric focusing of normal human plasma transthyretin (prealbumin) and a variant with a methionine for valine substitution associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Electrophoresis* 1986; 7(11):529-33.
 19. Altland K, Becher P, Banzhoff A. Paraffin oil protected high resolution hybridisoelectric focusing for the demonstration of substitutions of neutral amino acids in denatured proteins: the case off our human transthyretin (prealbumin) variants associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Electrophoresis* 1987;8(6): 293-7.
 20. Alves IL, Almeida MR, Skare J, Skinner M, Kurose K, Sakaki Y, Costa PP, Saraiva MJ. Amyloidogenic and non-amyloidogenic transthyretin Asn 90 variants. *Clin Genet* 1992;42(1):27-30.

21. Alves IL, Divino CM, Schussler GC, Altland K, Almeida MR, Palha JA, et al. Thyroxine binding in a TTR Met 119 kindred. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(2):484-8.
22. Haagsma EB, Hawkins PN, Benson MD, Lachmann HJ, Bybee A, Hazenberg BP. Familial amyloidotic polyneuropathy with severe renal involvement in association with transthyretin Gly47Glu in Dutch, British and American-Finnish families. *Amyloid* 2004;11(1):44-9.
23. Bersano A, Del Bo R, Ballabio E, Cinnante C, Lanfranconi S, Comi GP, et al. Transthyretin Asn90 variant: amyloidogenic or non-amyloidogenic role. *J Neurol Sci.* 2009; 284(1-2):113-5.
24. Solov'ev KV, Grudinina NA, Semernin EN, Morozova IV, Smirnova SA, Poliakov DS, Aleĭnikova TD, Shliakhto EV, Gudkova AY, Shavlovskii MM. Transthyretin gene V30M, H90N, and del9 mutations in cardiomyopathy patients from St. Petersburg. *Genetika.* 2011;47(4):543-9.