



Fundació
La Marató de TV3
XVI SIMPOSIUM
Enfermedades minoritarias

Análisis proteómico de modificaciones postraduccionales de la transtiretina (TTR) como marcador de actividad en pacientes con amiloidosis hereditaria por mutación de TTR: un estudio caso-control

Dr. Josep M. Campistol Plana

FCRB Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica.
Hospital Clínic i Provincial de Barcelona

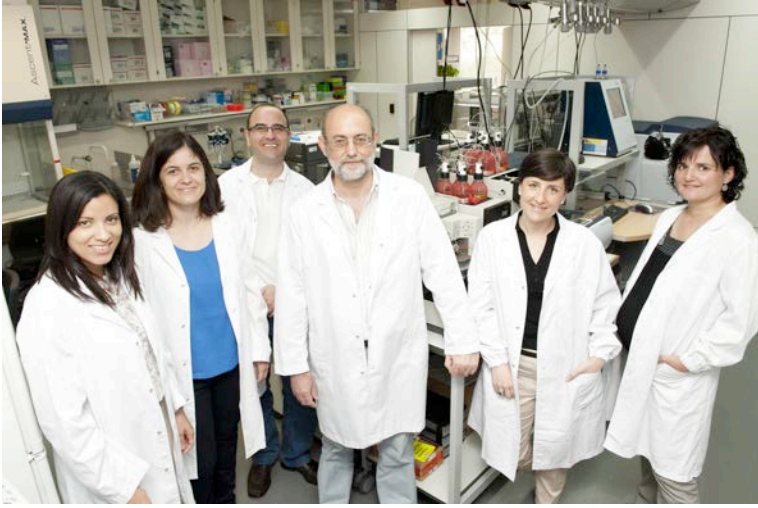
Dr. Francesc Canals Surís

Vall d'Hebron Institut d'Oncologia

Dra. Magda Faijes Simona

Institut Químic de Sarrià URL





1. Resumen del proyecto

Existe amplia evidencia de que las modificaciones postraduccionales (PTM) de la mayoría de proteínas son importantes para su actividad y procesamiento. En este contexto y teniendo en cuenta descubrimientos recientes sobre la relevancia de las PTM de la transtiretina (TTR) en cuanto a su potencial amiloidogénico, planteamos la hipótesis de que nuevas modificaciones metabólicas de la TTR pueden ser identificadas y correlacionadas con la predisposición a desarrollar la amiloidosis por TTR (ATTR), la edad de inicio de los síntomas, los órganos afectados y la gravedad de esta afectación. El objetivo principal de este proyecto fue obtener nuevas evidencias sobre mecanismos moleculares relacionados con la TTR que podrían ser útiles, por un lado, en el diagnóstico y el seguimiento de la ATTR y, por otro lado, en el hallazgo de nuevas dianas terapéuticas.

Como objetivos preliminares para determinar la existencia sugerida de una correlación entre las modificaciones postraduccionales y la amiloidogénesis en pacientes portadores de variantes proamiloidogénicas de TTR, el primer paso consistió en definir la población de estudio. Esta, inicialmente, se basó en una cohorte de pacientes controles (productores de TTR no mutada o *wild-type*) y otras 4 poblaciones de pacientes definidas por su estado de portadores de mutación amiloidogénica de TTR-V30M o E89K, tanto asintomáticos como sintomáticos (receptores de terapia por trasplante de hígado [LT]) y aquellos pacientes no portadores receptores de hígado de un paciente afectado por amiloidosis con TTR mutada (receptores de hígado dominó [DLT]). De estas diferentes cohortes, además de determinar su estatus mediante test genético cuando era procedente (controles sanos y potenciales portadores de TTR-V30M/E89K), se extrajeron una serie de datos clínicos (edad de inicio, órganos afectados, síntomas y gravedad) y paraclínicos (análisis de sangre estándar, electromiograma [EMG], electrocardiograma [ECG], ecocardiograma [ECHO]).

Contemporáneamente se desarrolló una metodología para definir un método de preparación de la muestra de suero con recuperación de todas las PTM en la TTR mediante técnicas de espectrometría de masas y posteriormente evaluar el efecto de las mismas sobre las propiedades biofísicas (estabilidad, agregación, amiloidogenicidad), tanto en péptidos modelos (sintetizados *de novo*) en las diversas mutaciones encontradas en las proteínas

modelos (V30M, E89K, etc.), como en la forma íntegra de cada proteína modelo. En paralelo, a nivel hospitalario se organizó un cribado del banco de plasma (Hospital Clínic) con muestras procedentes de una cohorte ya conocida de portadores de mutaciones amiloidogénicas de TTR, y se procedió a identificar dichas PTM según el método desarrollado. Un análisis estadístico posterior llevó a correlacionar las PTM con factores clínicos en las amiloidosis hereditarias por TTR, y así definir su eventual utilidad como biomarcador para el diagnóstico, el seguimiento e incluso para guiar la propuesta terapéutica en estos pacientes. En el plan de trabajo quedaron definidas 4 tareas a completar, resumidas a continuación:

Tarea 1: diseñar una cohorte adecuada de individuos para estudiar la influencia de las PTM de la TTR sobre diferentes aspectos de la enfermedad (estadio de la enfermedad: portador asintomático, paciente sintomático antes y después de LT/DLT; edad de inicio de la sintomatología; número y tipo de órganos afectados; nivel de gravedad de la afectación de los órganos).

Tarea 2: seleccionar las muestras de suero de individuos portadores de alguna de las mutaciones en estudio de la TTR ya existentes en nuestro banco de sangre y recoger nueva muestra de sangre de aquellos individuos aún vivos o diagnosticados *de novo*.

Tarea 3: realización de los procedimientos clínicos de los individuos incluidos: se realizarán los procedimientos clínicos explicados en el punto 1.2.3 del protocolo original (en resumen: los análisis clínicos y paraclínicos especificados anteriormente).

Tarea 4: correlacionar las PTM de la TTR con los diferentes aspectos clínicos de la enfermedad estudiados.

Modificación del plan de trabajo

Ante las dificultades para añadir muestras históricas (>3 años), como para acceder al material biológico del biobanco por motivos de acceso a los pacientes con muestras históricas mediante el debido consentimiento informado firmado por los pacientes correspondientes, y la necesidad de acceder rápidamente a un número de muestras suficiente, tuvimos que

enmendar el protocolo de base incluyendo la participación de otros centros, entre los cuales destacan los Hospitales de Cruces, Vall d'Hebron, Santa Creu i Sant Pau, Bellvitge, Son Llàtzer de Mallorca y Puerta de Hierro de Madrid; teniendo en cuenta la necesidad añadida de actualizar las hojas de consentimiento informado, así como los acuerdos de transferencia de material (MTA, *material transfer agreements*) exigidos de forma individualizada y con su respectiva aprobación por cada comité de ética de investigación clínica, además de la complejidad de acceso a los pacientes portadores y portadores sintomáticos debido a la rareza de esta patología, la ausencia de carácter endémico en Barcelona, con una mayoría de pacientes viniendo de otros ámbitos, de la rapidez de evolución en algunos y con el obstáculo añadido de las dificultades para la deambulaci3n (sobretudo en los estadios m1s avanzados), y aquellos inherentes a la organizaci3n de citas para las diversas pruebas (dependientes de servicios diferentes; por ejemplo: an1lisis de sangre est1ndar, neurofisiolog1a, ecocardiograf1a, electrocardiograf1a...), la finalizaci3n de las tareas 1, 2 y 3, y la recogida de todos los datos respectivos, se vio enlentecida y finalmente retrasada y sin poder llegar al objetivo total (150 muestras del Banco de Inmunolog1a, 32 ECG, 36 EMG, 37 ECHO), a pesar de que se maximiz3 la coordinaci3n entre servicios y con los diferentes hospitales colaboradores de fuera de Barcelona. Del mismo modo, las extracciones llegaron de forma secuencial y algunas con retraso, lo que justific3 la realizaci3n de un primer an1lisis conjunto con las primeras 55 muestras.

Sin embargo, tras rediseñar parcialmente el protocolo, logramos alcanzar el 85% de las muestras inicialmente planificadas en solo 12 meses (tabla 1).

De forma paralela, los avances terapéuticos cambiaron el paradigma del tratamiento en los últimos dos años, pasándose del trasplante de hígado –como única posibilidad terapéutica– a disponer de los estabilizadores de TTR (Tafamidis [uso autorizado, *on-label*], Diflunisal [uso compasivo, *off-label*]) introducidos entre 2012 y 2013, coincidiendo con la propuesta de los ensayos clínicos con silenciadores de RNA de TTR.

Estos acontecimientos cambiaron el concepto de análisis transversal y nos condujeron a conceptualizar el seguimiento de un mismo paciente según su evolución clínica sin o bajo

estos tratamientos/ensayos (tablas 2 y 3), y por tanto con la necesidad de agregar una estratificación entre pacientes sintomáticos según los estadios de Coutinho (1980) y de Yamamoto (2007) (tabla 1). Por otra parte, finalmente las muestras de pacientes con mutación E89K (7 pacientes) no se incluyeron en el análisis inicial por necesitar un mayor número de muestras para la estandarización de la técnica (cf. artículo de M. VILÀ. *J Proteomics*, relacionado con esta investigación).

2. Resultados

- Se aplicaron los dos métodos de análisis proteómico desarrollados (LC-MS dirigida [*targeted LC-MS*] y análisis de proteína intacta) a las muestras de plasma de una cohorte de pacientes portadores de la mutación amiloidogénica V30M asintomáticos y sintomáticos, en diferentes estadios de progresión de la enfermedad (FAP), junto a un grupo de individuos controles, recogidos y seleccionados como se ha descrito previamente.

Los principales resultados derivados del análisis de las diferentes formas de TTR en estas muestras, son los siguientes:

- Los niveles de TTR total en plasma fueron significativamente superiores en todos los pacientes portadores de TTR-V30M respecto a los controles. No se observaron diferencias significativas al comparar estos niveles entre los diversos estadios de progresión de la enfermedad (figura 5A).
- La proporción entre TTR-V30M y wtTTR se sitúa en torno a 60:40 en todos los portadores, independientemente del estadio de progresión de la enfermedad (figura 5B).

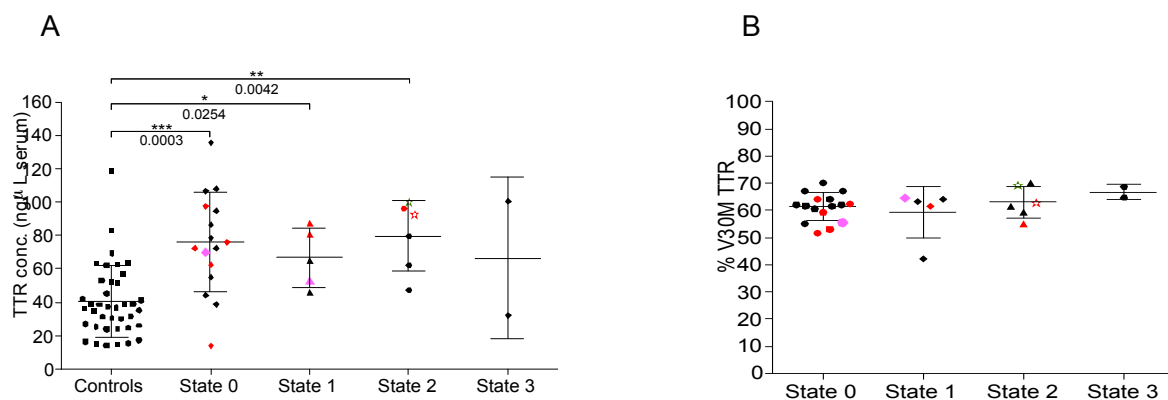


Figura 5. Análisis mediante *targeted LC-MS* de muestras plasmáticas de TTR. A) Concentración de TTR total en individuos controles y en portadores V30M en diferentes estadios de FAP. B) Porcentaje de TTR-V30M en plasma en individuos en diferentes estadios de progresión de FAP.

- Los niveles plasmáticos de las isoformas con Cys-10 y aquellas modificadas con S-Cys y S-sulfonación no presentaron variaciones significativas entre los estadios de progresión de FAP y tampoco difirieron de los controles.
-
- Los niveles plasmáticos de las isoformas S-CysGly y S-GSH de TTR fueron significativamente mayores entre los portadores asintomáticos de TTR-V30M (estadio 0) que entre aquellos aparentemente en progresión inicial (estadios 1 y 2) (figura 6). Estos niveles podrían mostrarse útiles como marcadores de progresión inicial en la ATTR. Este resultado necesita, no obstante, ser validado con un número mayor de muestras en estos estadios.

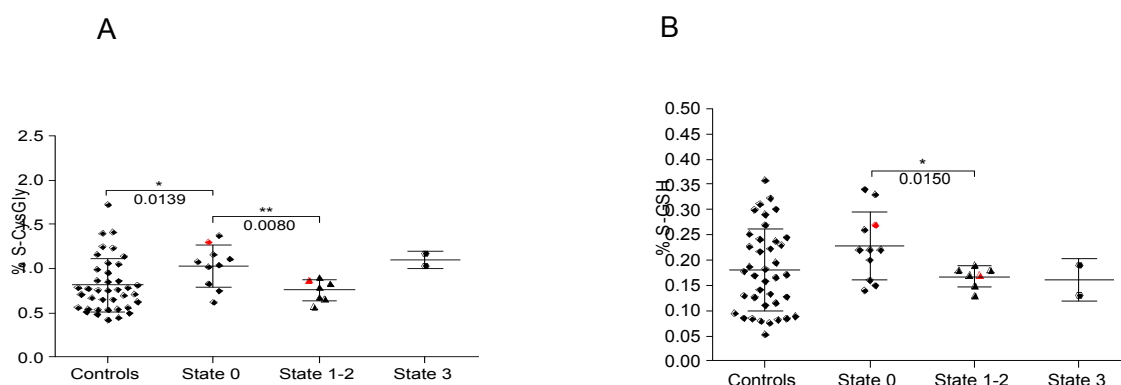


Figura 6. Análisis mediante *targeted LC-MS* de formas modificadas en Cys-10 de la TTR plasmática. A) Niveles de la isoforma S-CysGly en individuos controles y portadores de V30M-TTR en diferentes estadios de FAP. B) Niveles de la isoforma S-GSH en los controles y en los portadores V30M en diferentes estadios de progresión de FAP.

- Estos métodos también se aplicaron al análisis de una cohorte de muestras de pacientes sometidos a LT y DLT, en colaboración con la Universidade de Lisboa y el Hospital Curry Cabral de Lisboa. Con el análisis de una serie temporal de muestras extraídas en momentos diferentes tras la cirugía de trasplante, se pudo medir el tiempo de sustitución de la TTR-V30M en los portadores V30M que habían recibido un hígado *wild-type*, así como la cinética de aparición de la proteína mutante V30M en los receptores de DLT de donantes con hígado productor de TTR-V30M (figura 7A). Por otra parte, el análisis de muestras muy posteriores al LT (años) permitió observar un nivel plasmático de TTR superior en los receptores de DLT comparado con los receptores de hígado *wild-type* (figura 7B). Este resultado es acorde a lo observado en el análisis del grupo de muestras descrito anteriormente.

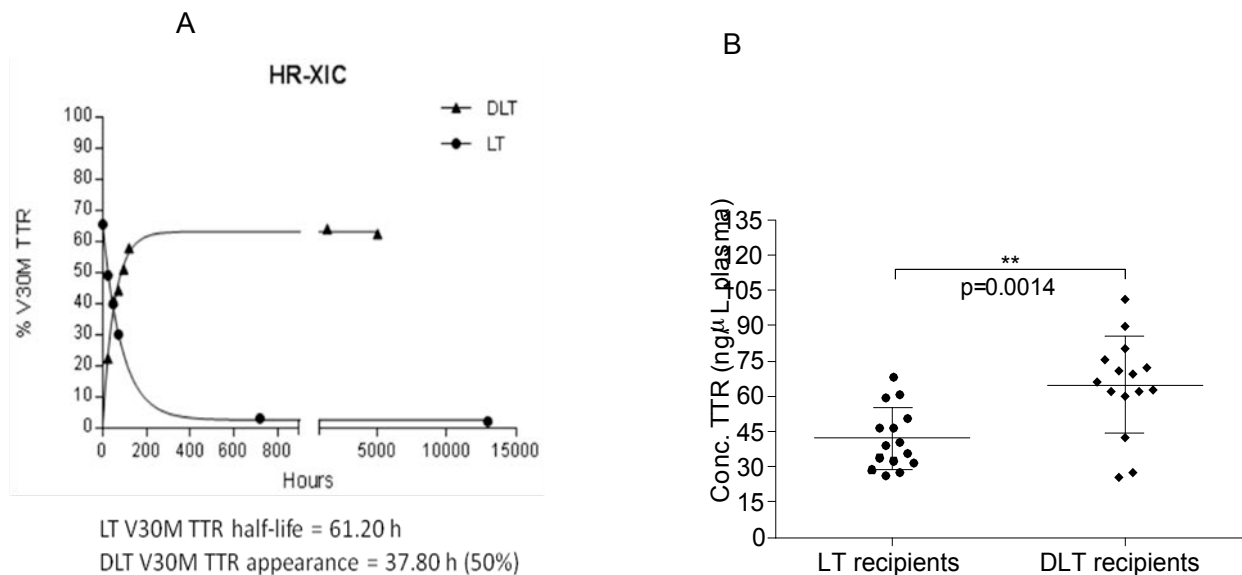


Figura 7. Análisis mediante *targeted LC-MS* de muestras plasmáticas de TTR. A) Niveles de TTR-V30M y *wt* en tiempos diferentes después del LT y del DLT. B) Niveles de TTR total plasmática a largo plazo después del trasplante.

- Hemos desarrollado una metodología para la cuantificación de PTM en muestras de suero, así como para la determinación de los niveles séricos de TTR, a partir de individuos sanos (*wt*) y con TTR amiloidogénica (mutación V30M). Esto supone una etapa de enriquecimiento mediante inmunoprecipitación seguida de análisis de espectrometría de masas de: (i) la proteína TTR intacta y (ii) análisis dirigido LC-MS de péptidos que contienen las PTM de

interés. El análisis de las muestras de suero mediante la combinación de ambos métodos proporciona una información complementaria sobre las cantidades relativas y absolutas de las PTM seleccionadas en TTR. Con estas se demuestra que los métodos basados en proteína intacta están sesgados para PTM específicas, ya que asumen factores de respuesta constante, mientras que el novel método de LC-MS dirigida proporciona la cuantificación absoluta de PTM y el total de variantes de TTR.

- La metodología informada se ha aplicado a dos conjuntos diferentes de muestras clínicas. El análisis de muestras de pacientes con FAP en diferentes etapas de la enfermedad revela cambios en la distribución de las PTM de Cys-10 a lo largo de su progresión clínica, siendo algunas de esas PTM posibles biomarcadores de la aparición de la enfermedad. A través del análisis de una serie temporal de pacientes con FAP receptores de LT o de receptores de DLT, hemos caracterizado la progresión de la proporción *wt*:V30M, así como la evolución de las PTM en Cys-10, desde el trasplante hasta 9 años después. Como resultado del análisis de muestras humanas, señalamos de forma preliminar a las isoformas S-GSH y S-CysGly como biomarcadores de la progresión de la enfermedad. Particularmente, sugerimos que S-GSH y S-CysGly podrían ser buenos indicadores de la presencia de agregados solubles como consecuencia de una situación de aumento de estrés oxidativo. Hemos observado aumento de los niveles de estas dos PTM en Cys-10 en pacientes asintomáticos en comparación con controles sanos y también en los pacientes con trasplante hepático dominó cuando se les compara con los de hígado trasplantado. Más aún, proponemos que los niveles de S-GSH y S-CysGly pueden ser buenos indicadores de FAP incipiente, ya que los niveles de las dos isoformas están disminuidos una vez aparecen los primeros síntomas. Esta disminución en los niveles de S-GSH y S-CysGly podría estar relacionada con un aumento en la actividad glutatión reductasa (GSR) sobre los depósitos de TTR. Por lo tanto, y a pesar de ser preliminares, los resultados que se presentan son muy prometedores, ya que ofrecen una medida no invasiva y objetiva del estadio de la enfermedad, lo que podría permitir una intervención temprana en el tratamiento de la FAP.

3. Relevancia y posibles implicaciones

A través de los métodos de análisis proteómico que hemos puesto a punto en este trabajo, hemos conseguido analizar los niveles en plasma de las diferentes isoformas modificadas en el residuo de cisteína-10 de la TTR. El análisis de grupos de muestras de individuos portadores de la mutación amiloidogénica V30M, sanos y afectados en diferente grado por la amiloidosis, ha revelado niveles diferenciales en algunas de estas formas modificadas.

Si los resultados obtenidos se confirman en un estudio con un número más grande de muestras en estos grupos, la determinación de los niveles de estas isoformas en plasma podría ser útil para la determinación precoz de una amiloidosis por TTR en progresión en individuos hasta entonces portadores sanos, y guiar el inicio de los tratamientos disponibles en los estadios iniciales de la enfermedad, para una mayor eficacia de estos.

4. Bibliografía científica generada

Artículos científicos

Marta Vilà-Rico; Núria Colomé-Calls; Luna Martín-Castel; Marina Gay; Sebastián Azorín; Marta Vilaseca; Antoni Planas; Francesc Canals.

Analysis of post-translational modifications in human transthyretin associated with familial amyloidotic polyneuropathy by targeted LC-MS and intact protein MS.

Journal of Proteomics (2015, en prensa).

Comunicaciones en congresos internacionales

M. Vilà-Rico, N. Colomé, G. Da Costa, C. Cordeiro, E. Barroso, A. Planas, S. Kaspar, P.O. Schmit, C. Baessmann, F. Canals

Analysis of post-translational modifications in human transthyretin associated with familial amyloid polyneuropathy by targeted LC/MS and intact protein MS

13th Human Proteome Organization World Congress (HUPO), Madrid, 5-8 de octubre 2014

M. Vilà , N. Colomé-Calls, A. Planas, S. Kaspar, P. Olivier Schmit, C. Baessmann, F. Canals
Analysis of post-translational modifications in human transthyretin associated with familial
amyloidotic polyneuropathy by targeted LC/MS and intact protein MS

EuPA 2013 European Proteomics Association, Saint Malo, Francia, 14-17 Octubre 2013

M. Vilà , N. Colomé-Calls, A. Planas, S. Kaspar, P. Olivier Schmit, C. Baessmann, F. Canals
Analysis of post-translational modifications in human transthyretin associated with familial
amyloidotic polyneuropathy by targeted LC/MS and intact protein MS

HUPO 12th Annual World Congress. The evolution of technology in proteomics. Yokohama,
Japón, 14-18 Septiembre, 2013

M. Vilà, N. Colomé, F. Canals, A. Planas

Detection of post-translational modifications in human transthyretin associated with familial
amyloidotic polyneuropathy by a SRM mass spectrometry method.

V Congreso de la Sociedad Española de Proteómica, Barcelona, Febrero 2013.

Tabla 1. Características de base, demográficas y clínicas, de la población de estudio

| Characteristics | Overall (N=155) | Controls (N=70) | TTR-V30M (N=78) | | Domino- LT recipients (N=7) | Pending Clustering (Other Hospital) (N=7) | |
|---|--------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--|-------------|
| | | | Asymptomatic (n=29) | Symptomatic (n=42) | | | |
| | | | Non- LT recipients (n=25) | LT-recipients (n=17) | | | |
| Age Mean (SD), y | | 45.8 (13.4) | 43.6 (10.3) | 63.6 (10.5) | 45.6 (10.8) | 70.3 (5.35) | 55.1 (14.8) |
| No (%) | | 70 (45.1) | 29 (37.2) | 25 (32) | 17 (21.8) | 7 (9) | 7 (9) |
| Sex, N (%) | Male | 41 (58.6) | 12 (41.4) | 16 (64) | 8 (47) | 4 (57) | NA |
| | Female | 29 (41.4) | 17 (58.6) | 9 (36) | 9 (53) | 3 (43) | NA |
| | Sex ratio (M/F) | 1.4 | 0.70 | 1.70 | 0.88 | 1.33 | 1.05 |
| Disease Stage Median, [Coutinho] | | | | Stage 2 | Stage 1 | | |
| | 1 | | | 12 (48) | 12 (76.5) | | |
| | 2 | | | 8 (32) | 2 (11.75) | | |
| | 3 | | | 5 (20) | 2 (11.75) | | |
| Disease Stage Median [PND] | | | | II | II | | |
| | I | | | 12 (48) | 8 (47) | | |
| | II | | | 4 (16) | 4 (23.5) | | |
| | IIIA | | | 1 (4) | 0 (0.0) | | |
| | IIIB | | | 4 (16) | 1 (5.9) | | |
| | IV | | | 4 (16) | 1 (5.9) | | |
| USC (% target) | | 48 (56.47) | | | | | |
| EMG (% target) | | 49 (57.64) | | | | | |

| | | |
|-----------------------------------|-------------------|--------|
| ECG (% target) | 53 (62.35) | |
| TTR-stabiliser use, No (%) | 5 (20) | |
| Tafamidis | | 4 (16) |
| male | | 3 (12) |
| female | | 1 (4) |
| Diflunisal | | 1 (4) |
| male | | 1 (4) |
| female | | 0 (0) |

Tabla 2. Seguimiento longitudinal de las muestras

| Population Characteristics | Overall (N=113) | Male | Female |
|---|----------------------------|-------------|---------------|
| -Asymptomatic (n, %) | 35 (33) | 12 (34) | 23 (66) |
| -Symptomatic (n, %) | 45 (42.5) | 36 (80) | 9 (20) |
| -LT (n, %) | 19 (17.9) | 9 (47.4) | 10 (52.6) |
| -Domino-LT (n, %) | 7 (6.6) | 4 (57) | 3 (43) |
| -Other (pending to define – other Facilities) (n, %) | 7 (6.6) | NA | NA |

Tabla 3. Muestreo secuencial

| Sequential Samples' characteristics | N (% of Total) |
|--|-----------------------|
| Overall Sampling | 42 (37) |
| -Range | 2-10 |
| -Mean (sd) | 3.2 (2.35) |
| Number of patients | 13 (11.50) |
| -Asymptomatic | 6 |
| -Symptomatic: | 6 |
| NOT LT: | 4 |
| *Clinical Trial | 2 |
| *TTR stabiliser | 2 (Diflunisal) |
| LT: | 2 |
| *Progression | 1 |
| *Stable | 1 |

Abreviaturas: NA, no disponible; USC, ecocardiograma; ECG, electrocardiograma; EMG, electromiograma. LT, trasplante de hígado. Male, hombre; Female, mujer. Asymptomatic, asintomático. Symptomatic, sintomático. Clinical Trial, ensayo clínico. TTR stabilizer, estabilizador de TTR.