

**Serie de Revisión****DEFICIENCIA DE ALFA<sub>1</sub>-ANTITRIPSINA. 4: FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR.****D. A. Lomas, H. Parfrey**


---

 THORAX 2004; 59: 529-535 reproducido con permiso de BMJ Publishing Group.

En este artículo se revisan las bases moleculares de la Deficiencia de Alfa<sub>1</sub>-Antitripsina y se muestra que se debe a la acumulación de la proteína mutada como polímeros ordenados en el retículo endoplásmico de los hepatocitos. Los objetivos actuales son determinar la respuesta celular a la alfa<sub>1</sub>-antitripsina polimérica y desarrollar estrategias terapéuticas para bloquear la polimerización in vivo.

---

La deficiencia de alfa<sub>1</sub>-antitripsina (AAT) se reportó en una niña oriunda de Alaska que falleció hace 800 años<sup>1</sup> y también puede haber dado cuenta de la muerte prematura de Federico Chopin en 1849<sup>2, 3</sup>. Fue descrita por primera vez como una entidad clínica en 1963 por Laurell y Ericksson, quienes notaron la ausencia de la banda  $\alpha_1$  (alfa<sub>1</sub>) en la electroforesis de proteínas séricas<sup>4</sup>. La principal función de la AAT es proteger a los tejidos de la elastasa, enzima producida por los neutrófilos<sup>5, 6</sup>. Su rol de proteger los pulmones contra un ataque proteolítico está avalado por la asociación del déficit plasmático y la aparición temprana de enfisema panacinar<sup>7</sup>. Este hallazgo, junto con la observación que la instilación intrapulmonar de enzimas elastolíticas también resulta en enfisema<sup>8-11</sup>, llevó a formular la hipótesis de proteasa-antiproteasa para la enfermedad pulmonar. Normalmente hay un balance entre las proteasas y antiproteasas, pero cuando hay un exceso de proteasas se produce la destrucción del tejido. Esta hipótesis se desarrolló hace más de 35 años y sigue siendo central para nuestra comprensión de la patogénesis de la enfermedad pulmonar. En este artículo hacemos una revisión de los mecanismos moleculares que están detrás de la deficiencia de AAT y mostramos cómo la comprensión de este mecanismo nos ha permitido explicar la deficiencia de otros miembros de la superfamilia de los inhibidores de las serin proteasas o serpinas (por sus siglas en inglés, **serine protease inhibitors**). Estos incluyen la deficiencia de antitrombina, inhibidor C1, alfa<sub>1</sub>-antiquimotripsina y neuroserpina en asociación con trombosis, angioedema, obstrucción del flujo aéreo y demencia, respectivamente. Hemos agrupado estas condiciones bajo el nombre de “serinopatías”<sup>12-14</sup>. Su fisiopatología en común provee una plataforma para el desarrollo de estrategias para tratar los síndromes clínicos asociados.

**ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA ALFA<sub>1</sub>-ANTITRIPSINA (AAT)**

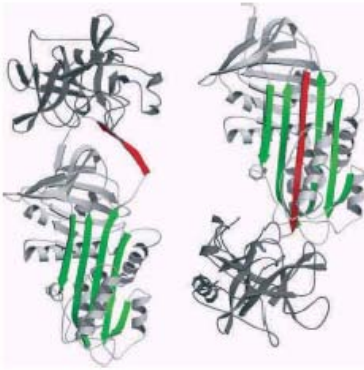
La AAT es una glicoproteína de fase aguda, de 52 kDa y 394 aminoácidos que está codificada en el cromosoma 14q31-32.1<sup>15-17</sup>. La sintetizan los hepatocitos<sup>18-19</sup> y es secretada al plasma a una concentración de 1.9-3.5 mg/ml. También la sintetizan y secretan macrófagos<sup>20</sup>, células intestinales<sup>21</sup> y células epiteliales bronquiales<sup>22</sup>. Inicialmente se la denominó así por su habilidad de inhibir a la tripsina pancreática<sup>23</sup>. Posteriormente se encontró que era un efectivo inhibidor de una variedad de otras proteasas incluyendo la elastasa de los neutrófilos<sup>5</sup>, catepsina G<sup>5</sup> y proteasa 3<sup>24</sup>. El amplio espectro de inhibición de proteasas dio pie a su nombre alternativo de inhibidor de la proteasa alfa<sub>1</sub><sup>25</sup>, a pesar que es muy poco exacto ya que hay otras proteínas en la banda  $\alpha_1$  del suero que son también inhibidores de proteasa (como la alfa<sub>1</sub>-antiquimotripsina).

Estudios cristalográficos han mostrado que la AAT está compuesta por tres láminas  $\beta$  (A-C) y un lazo reactivo expuesto móvil (Fig. 1) que tiene una secuencia peptídica que sirve como pseudo sustrato para la proteasa<sup>26-30</sup>. Los aminoácidos críticos dentro de este lazo son los residuos P1-P1' metionina serina, ya que actúan como “anzuelo” de la elastasa de los neutrófilos<sup>31</sup>. Una vez atrapada, la enzima rompe la unión peptídica P1-P1' de la AAT<sup>32</sup> y la proteasa se inactiva por una acción de tipo ratonera (Fig.1), que la hace girar desde el polo superior al inferior de la proteína en asociación con la inserción del lazo reactivo como una hebra extra en la lámina  $\beta$  A<sup>33-37</sup>. Esta conformación alterada de la AAT unida a su sustrato enzimático es luego reconocida por receptores hepáticos y eliminada de la circulación<sup>38</sup>.

Esta asombrosa acción de ratonera de la AAT es central para su rol de inhibidor efectivo de serin proteasas. Paradójicamente, es también su talón de Aquiles ya que mutaciones puntuales en esos dominios móviles hacen a la molécula vulnerable a transiciones conformacionales aberrantes como la que subyace en la deficiencia de AAT.

**DEFICIENCIA DE ALFA<sub>1</sub>-ANTITRIPSINA (AAT)**

La deficiencia de AAT es la anomalía más ampliamente identificada de un inhibidor de proteasa que causa enfermedad pulmonar. Se han descrito más de 70 variantes que ocurren naturalmente y han sido caracterizadas por su migración en geles de isoelectroenfoque--el sistema de inhibidor de proteasa o sistema Pi<sup>39</sup>. Las variantes deficientes más comunes, S y Z son el resultado de mutaciones puntuales en el gen AAT<sup>40-42</sup> y son llamadas así porque generan una proteína que migra más lentamente que la proteína AAT normal M. Las mutaciones que generan proteínas AAT que migran más rápidamente se designan de A a L.



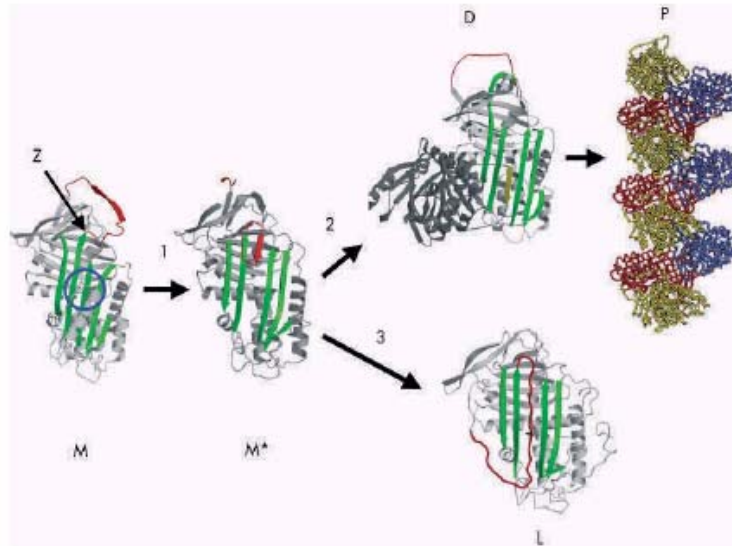
**Figura 1:** La  $\alpha_1$ -antitripsina puede considerarse que actúa como una trampa para ratones<sup>26, 37, 138</sup>. Luego de atraparla (izquierda) la elastasa de los neutrófilos (gris) se inactiva por un movimiento desde el polo superior al inferior de la proteína (derecha). Esto va asociado con la inserción del lazo reactivo (rojo) como una hebra extra en la lámina  $\beta$  A (verde). Reproducido por permiso de Lomas y Carrell<sup>12</sup>.

Una reciente revisión de 70 encuestas ha provisto una estimación de la frecuencia y distribución de los alelos S y Z de la AAT en toda Europa<sup>43</sup>. La mayor frecuencia del alelo S ocurre en la península Ibérica y gradualmente se va reduciendo en dirección sur a norte y de oeste a este. La AAT S (ácido glutámico<sup>264</sup>  $\rightarrow$ valina) se encuentra en hasta el 28% de los europeos del sur y, aunque resulta en valores plasmáticos que son el 60% del alelo M, no está asociada a secuelas pulmonares. En contraste, el alelo Z es más común en el noroeste de Europa, con frecuencias que disminuyen de oeste a este y de norte a sur. La variante Z (ácido glutámico<sup>342</sup>  $\rightarrow$ lisina) da como resultado una deficiencia más severa que se caracteriza, en el homocigoto, en valores plasmáticos de AAT que son el 10% del alelo normal M y 60% en el heterocigoto MZ (50% por el alelo M y 10% por el alelo Z). La mutación Z resulta en la acumulación de AAT como inclusiones en el retículo endoplásmico rugoso del hígado<sup>44</sup>. Estas inclusiones predisponen al homocigoto a hepatitis juvenil, cirrosis<sup>45-46</sup> y carcinoma hepatocelular<sup>47</sup>. Además, la falta de proteína circulante predispone a la aparición temprana de enfisema panlobular<sup>7, 48-49</sup>.

#### **PATOLOGÍA MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA ASOCIADA A PI Z AAT**

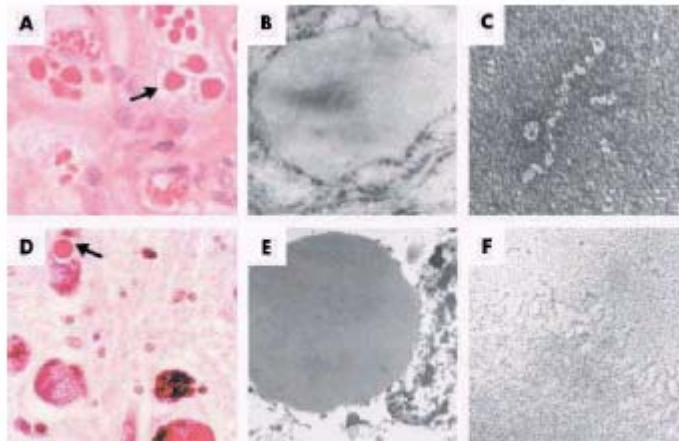
Hay actualmente una abrumadora evidencia de que la enfermedad hepática asociada con la variante Z de la AAT se debe a la acumulación de la proteína agregada más que a una deficiencia plasmática. Un fuerte apoyo a esto lo provee el hecho que los alelos nulos (null), que no producen AAT, no están asociados con cirrosis<sup>39</sup>. Más aún, la sobre-expresión de AAT Z en modelos animales resulta en daño hepático<sup>50, 51</sup>. Nuestra comprensión de las bases moleculares de la deficiencia de AAT se produjo a partir del reconocimiento que la proteína normal activa atraviesa una profunda transición conformacional al inhibir a la elastasa neutrofilica (ver Fig.1). La mutación Z de la AAT está en el residuo P17 (17 residuos proximales al centro activo) en la parte principal de la hebra 5 de la lámina  $\beta$  A y la base del lazo reactivo móvil (Fig. 2). La mutación abre la lámina  $\beta$  A, favoreciendo de esta manera la inserción del lazo reactivo de una segunda molécula de AAT para formar un dímero<sup>26, 52-54</sup>. Esto se puede extender para formar luego polímeros que quedan atrapados en el retículo endoplásmico del hepatocito y forman los cuerpos de inclusión (Fig. 3). Esto está basado en la demostración que la proteína AAT Z purificada del plasma forma cadenas de polímeros cuando se la incuba en condiciones fisiológicas<sup>52</sup>. La velocidad de formación del polímero se aceleraba al aumentar la temperatura a 41°C y se pudo bloquear con péptidos que competían por unirse a la lámina  $\beta$  A<sup>52, 55</sup>. El rol de la polimerización in vivo fue confirmado por el hallazgo de polímeros de AAT en cuerpos de inclusión del hígado de homocigotos Z AAT con cirrosis<sup>52, 56</sup> y en líneas celulares hepáticas que expresan la variante Z<sup>57</sup>. Más aún, utilizando un sistema de expresión de ovocito de *Xenopus* se observó que mutaciones puntuales que bloquean la polimerización aumentaron la secreción de la AAT mutante<sup>58</sup>.

La vía de polimerización de la AAT ha sido determinada por análisis bioquímico, biofísico y cristalográfico y se muestra en la Figura 2<sup>53, 59</sup>. El paso 1 representa el cambio conformacional de AAT hacia una forma monomérica polimerogénica (M\*), el paso 2 representa la formación de polímeros (P) y el paso 3 representa una vía lateral que lleva a la formación de una conformación latente monomérica estable (L). La mutación Z causa que la mayor parte de la proteína inestable forme polímeros. La presencia del intermediario inestable polimerizante M\* fue predicha a partir del análisis biofísico de formación de polímeros<sup>53</sup>, la demostración de un intermediario desplegado<sup>60-62</sup> y resolviendo la estructura cristalina de una mutante de la  $\alpha_1$ -antitripsina<sup>59</sup>. Nuestros datos más recientes sugieren que la mutación Z fuerza a la AAT a una conformación que se aproxima a la M\* inestable, favoreciendo la formación de polímeros<sup>63</sup>.



**Figura 2:** La estructura de la AAT se centra en una lámina  $\beta$  A (verde) y el lazo centro activo móvil (rojo). La formación del polímero se produce a partir de la variante Z de la AAT (Glu342Lis en P17-flecha) o las mutaciones en el dominio "shutter" (círculo azul) Siyama, Mmalton, S o I que abren la lámina  $\beta$  y favorecen la inserción parcial del lazo (paso 1) y la formación de un intermediario inestable  $M^{*59,63}$ . Esa estructura puede luego aceptar el lazo de otra molécula (paso 2) para formar un dímero D que luego extenderse para formar un polímero  $P^{26, 52, 54}$  o bien acepta su propio lazo (paso 3) para formar una conformación latente  $L^{139, 140}$ . Las moléculas individuales de AAT dentro del polímero están coloreadas de rojo, amarillo y azul. Reproducido con permiso de Gooptu y col<sup>65</sup>.

Actualmente están siendo clarificados los mecanismos de control de calidad para manejar los polímeros dentro del hepatocito<sup>64-66</sup>. En elegantes estudios se demostró que son los residuos de asparagina unida a oligosacáridos los que dirigen la ruta efectiva de eliminación no-proteosómica de los polímeros AAT Z dentro del hepatocito. Sin embargo, el proteosoma tiene mucha importancia en el metabolismo de la AAT Z de algunas líneas celulares hepáticas<sup>67</sup> y no hepáticas<sup>68-69</sup>. Más aún, hay una creciente evidencia de que la AAT Z retenida estimula una respuesta autofágica dentro del hepatocito<sup>70-71</sup>. A pesar de nuestra mayor comprensión sobre la ruta de eliminación, aún permanece poco claro cómo la acumulación de AAT Z causa muerte celular y cirrosis hepática.



**Figura 3:** La alfa-antitripsina Z (AAT) es retenida dentro de los hepatocitos como inclusiones intracelulares. (A) Esas inclusiones son PAS positivas y resistentes a la diastasa (flecha) y están asociadas a hepatitis neonatal y a carcinoma hepatocelular. (B) Microfotografía electrónica de un hepatocito del hígado de un paciente con deficiencia de AAT Z donde se muestra la acumulación de AAT Z en el retículo endoplásmico rugoso. Estas inclusiones están compuestas por cadenas de polímeros de AAT en este caso del plasma de un homocigoto AAT Siyama (C) y del hígado de un homocigoto AAT Z (F). Mutaciones similares en la AAT y en la neuroserpina resultan en inclusiones intracelulares similares de AAT y neuroserpina como se muestra en (A) hepatocitos y (D) neuronas con coloración de PAS y como agregados endoplásmicos de las proteínas anormales por microscopía electrónica (B y E respectivamente). La microscopía electrónica confirma que la neuroserpina anormal forma polímeros con forma de cuentas o abalorios y agregados poliméricos enredados, idénticos a los mostrados aquí con la AAT Z (C y F, respectivamente). Magnificación de izquierda a derecha: x200; x20.000; x220.000. Reproducido con permiso de Carrell y Lomas<sup>14</sup>.

La dependencia de la polimerización de la temperatura y concentración<sup>52-53</sup>, así como de factores genéticos<sup>72-73</sup>, pueden dar cuenta de la heterogeneidad de la enfermedad hepática entre individuos que son homocigotos para la mutación Z. La síntesis de AAT aumenta durante episodios de inflamación como parte de la respuesta de fase aguda. En este período es posible que la formación de polímeros supere a la vía degradativa, exacerbando, de esta manera, la formación de inclusiones hepáticas y el daño hepatocelular asociado. Esta hipótesis ha sido puesta en duda por estudios celulares que no muestran un incremento de AAT Z en respuesta a un aumento de temperaturas<sup>74</sup>. Sin embargo, datos recientes nuestros en un modelo de déficit de AAT en *Drosophila* muestran claramente que la polimerización depende de la temperatura in vivo<sup>75</sup>. Hay también una evidencia clínica anecdótica que respalda el rol de la temperatura en exacerbar la enfermedad hepática asociada a AAT Z en el estudio prospectivo sueco de Sveger y col.<sup>45-46</sup>. Ellos estudiaron 200.000 recién nacidos e identificaron 120 homocigotos ZZ a quienes siguieron hasta la adolescencia tardía. Dos de esos pacientes desarrollaron ictericia progresiva durante el estudio; en un caso se desarrolló una apendicitis aguda y en el otro una neumonía severa. Otros infantes asintomáticos desarrollaron marcados desarreglos en los análisis de función hepática en asociación con rinitis aguda y eczema. Se requieren más estudios prospectivos para evaluar si los episodios febriles ocurren más frecuentemente y aumentan el riesgo de polímeros intra hepáticos en homocigotos AAT Z que desarrollan enfermedad hepática comparados con aquellos individuos que permanecen asintomáticos.

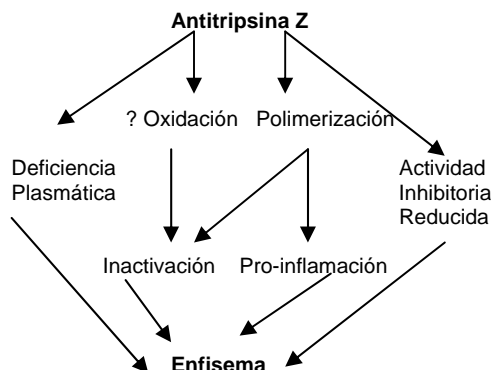
A pesar que se han descrito muchas variantes de la deficiencia de AAT, sólo dos (además del alelo Z) han sido asociadas en forma similar con la deficiencia plasmática y las inclusiones hepáticas: la AAT Siiyama (serina<sup>53</sup>→fenilalanina), que es la deficiencia de AAT más frecuente en Japón<sup>76-77</sup> y la Mmalton (también conocida como Mnichinan<sup>78</sup> y Mcagliari<sup>79</sup>, delección de la fenilalanina en la posición 52) que es la causa más común de deficiencia de AAT en Cerdeña. Estas dos mutantes desestabilizan y abren la lámina β A (Fig.2) para permitir la formación de intermediarios plegados<sup>61, 62</sup> y polímeros lazo-lámina (loop-sheet) in vivo<sup>81, 82</sup>. La polimerización también es la base de la deficiencia plasmática moderada de las variantes AAT S (Glu264Val) e I (Arg39Cys)<sup>82, 83</sup>. Las mutaciones puntuales responsables de estas variantes causan menos desarreglos en la lámina β A que la variante Z. Así, la velocidad de formación del polímero es más baja que en la AAT Z<sup>53</sup> y eso resulta en una menor retención de proteína dentro del hepatocito, una deficiencia plasmática más leve y la ausencia de fenotipo clínico. Sin embargo, si se hereda una variante con velocidad de formación de polímero lenta como S o I junto con una variante Z, de alta formación de polímero, ambas pueden interactuar para formar heteropolímeros dentro del hepatocito llevando a inclusiones y finalmente cirrosis<sup>83-85</sup>.

## **PATOLOGÍA MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD PULMONAR ASOCIADA A PI Z AAT**

El factor más importante para el desarrollo de enfisema en pacientes con deficiencia de AAT es el fumar<sup>49, 56</sup>. La combinación de deficiencia de antiproteasa y el humo del cigarrillo puede tener un efecto devastador sobre la función pulmonar,<sup>48, 87</sup> probablemente por permitir la acción sin oposición de enzimas proteolíticas. Los niveles de AAT están muy disminuidos en los pulmones de individuos con deficiencia de AAT<sup>88</sup>. Más aún, la AAT que está disponible para proteger los pulmones es aproximadamente 5 veces menos efectiva en inhibir la elastasa de los neutrófilos que la AAT normal M<sup>55, 89-91</sup>. La acción inhibitoria de la AAT Z puede verse reducida aún más ya que la AAT es susceptible de inactivación por oxidación del residuo metionina por radicales libres de los leucocitos o por oxidación directa por el humo del cigarrillo<sup>5, 6, 92, 93</sup>. Finalmente, la mutación Z favorece la formación espontánea de polímeros lazo-lámina (loop-sheet) de AAT en los pulmones<sup>94</sup>. Esta transición conformacional inactiva a la AAT como inhibidor de proteasa, reduciendo, por este motivo aún más los niveles de por sí bajos de AAT disponibles para proteger los alvéolos (Fig.4). Los mecanismos que conducen a la formación de polímeros AAT Z en el pulmón son desconocidos. Es posible que la polimerización pueda acelerarse por el ambiente inflamatorio que existe en el pulmón de los individuos con deficiencia de AAT Z. Además, el humo de cigarrillo es moderadamente ácido y estudios previos han mostrado que la polimerización de AAT se acelera a pH bajo<sup>53</sup>. Así, el humo del cigarrillo puede actuar de varias maneras para promover la inactivación de la AAT Z in vivo.

Los pacientes con deficiencia de AAT Z tienen un número excesivo de neutrófilos en el fluido de lavado broncoalveolar<sup>95</sup> y en secciones de tejido del parénquima pulmonar<sup>13</sup> comparado con controles. Esto puede reflejar un exceso de agentes quimioattractantes como el leucotrieno B4 (LTB4) y la interleukina (IL)-8<sup>96-97</sup>. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que los polímeros son, por sí mismos, quimiotácticos para neutrófilos humanos in vitro<sup>98</sup>. La magnitud de este efecto fue similar al del quimioattractante C5a y se presentó en el rango de concentraciones fisiológicas (EC<sub>50</sub> 4,5 (2) µg/ml). Los polímeros también indujeron un cambio en la forma de los neutrófilos, estimularon la liberación de mieloperoxidasa y la adhesión de los neutrófilos<sup>98</sup>. Es posible que los polímeros de AAT Z se formen in vivo y actúen luego como quimioattractantes crónicos causando un influxo de células inflamatorias<sup>13</sup>. Estos podrían evadir los sistemas defensivos del pulmón adhiriéndose al intersticio. Cualquier efecto proinflamatorio de los polímeros probablemente esté exacerbado por citoquinas inflamatorias, AAT partida o complejada<sup>99</sup>, productos de degradación de la elastina<sup>100</sup> y humo de cigarrillo los cuales, por sí mismos, provocan el reclutamiento de neutrófilos. Nuestra comprensión de las propiedades biológicas de la AAT provee así nuevas rutas para la patogénesis del enfisema en individuos que son homocigotos para la mutación Z (Fig. 4). Ciertamente, la presencia de polímeros puede explicar la progresión de la enfermedad pulmonar en individuos homocigotos Z luego que han dejado de fumar y a pesar de una adecuada terapia de reemplazo intravenosa con AAT plasmática. La relación entre polímeros intrapulmonares de AAT Z y el fumar, las infecciones, la producción de

citoquinas y la proporción de declinación de la función pulmonar requieren la evaluación tanto en modelos animales y celulares de la enfermedad así como de estudios prospectivos en individuos homocigotos Z.



**Figura 4:** Modelo propuesto para la patogénesis del enfisema en pacientes con deficiencia de alfa<sub>1</sub>-antitripsina (AAT) Z. La deficiencia plasmática y la actividad inhibitoria reducida de la AAT Z pueden exacerbarse por la polimerización de la AAT Z dentro de los pulmones. Estos procesos inactivan al inhibidor, reduciendo, por esta razón, aún más la pantalla de antiproteasa. Los polímeros de AAT pueden también actuar como un estímulo pro-inflamatorio para atraer y activar neutrófilos, aumentando, en consecuencia, el daño tisular. Reproducido con permiso de Lomas y Mahadeva<sup>13</sup>.

### PATOLOGÍA MOLECULAR DE OTRAS CONDICIONES ASOCIADAS CON PI Z AAT

La deficiencia de Pi Z AAT se ha descrito junto con paniculitis que se caracteriza por una infiltración inflamatoria aguda de la piel y necrosis grasa<sup>101, 102</sup>. También hay una asociación entre el alelo Z de AAT y el asma<sup>103, 104</sup>, vasculitis<sup>105, 106</sup>, bronquiectasias<sup>107</sup>, pancreatitis<sup>108</sup> y aneurismas vasculares<sup>109, 110</sup>, aunque la asociación con bronquiectasias y enfermedades vasculares ha sido disputada por otros estudios<sup>108, 111</sup>. La característica común que vincula muchas de estas condiciones es la inflamación mediada por neutrófilos, y es posible que los polímeros de AAT sean uno de los factores que impulsen esta inflamación y la progresión de la enfermedad<sup>98</sup>.

### ENFERMEDADES CAUSADAS POR LA POLIMERIZACIÓN DE OTRAS SERPINAS

La AAT es el miembro arquetípico de la superfamilia de las serpinas o de los inhibidores de la serin proteasa. Esta familia incluye miembros como la alfa<sub>1</sub>-antitripsina, el inhibidor C1, la antitrombina y el activador inhibitor-1 del plasminógeno, que tienen un importante rol en el control de las proteasas involucradas en las cascadas inflamatoria, del complemento, de la coagulación y fibrinolítica, respectivamente<sup>25, 112</sup>. La familia se caracteriza por tener un 30% de homología de secuencia con respecto a la AAT y conservación de la estructura terciaria<sup>13, 113</sup>. Consecuentemente, los procesos fisiológicos y patológicos que afectan a un miembro pueden ser extrapolables a otro. El fenómeno de polimerización lazo-lámina (loop-sheet) no está restringido a la AAT y ha sido recientemente reportado en mutantes de otros miembros de la superfamilia de las serpinas causando enfermedades: las serpinopatías. Mutantes del inhibidor C1, la antitrombina y la alfa<sub>1</sub>-antitripsina también pueden desestabilizar su arquitectura proteica formando polímeros inactivos que están asociados con deficiencia plasmática y angioedema, trombosis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, respectivamente<sup>39, 114-120</sup>.

El proceso se manifiesta en forma sorprendente por los cuerpos de inclusión en demencia, la encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión con neuroserpinas (FENIB, por sus siglas en inglés)<sup>121</sup>. Nosotros hemos demostrado que esta demencia está causada por mutaciones en **las neuroserpinas** que son homólogas a aquellas que causan cirrosis hepática en la deficiencia de AAT<sup>121</sup>. Más aún, ambas, la cirrosis hepática y la enfermedad neuro-degenerativa tienen un patrón idéntico de polimerización intracelular y formación de cuerpos de inclusión (Fig. 3). Se han descrito más familias de mutaciones en neuroserpinas polimerogénicas y se está evidenciando que hay una relación directa entre la magnitud de la acumulación intracelular de las neuroserpinas y la severidad del síndrome clínico<sup>122</sup>. Más aún, un trabajo reciente nuestro demostró que una de las mutantes de las neuroserpinas que causa FENIB (Ser49Pro) polimeriza a una velocidad hasta 13 veces mayor que la proteína salvaje<sup>123</sup> (normal, no mutada). Esto provee un gran apoyo al rol de la polimerización de las neuroserpinas aberrantes en la patogénesis de FENIB.

### PREVENCIÓN DE LA FORMACIÓN DE POLÍMEROS

Actualmente hay evidencia sustancial que los polímeros de AAT y de todas las otras serpinas, se forman por una unión aberrante entre el lazo del centro reactivo de una molécula y la lámina  $\beta$  A de la otra<sup>26, 32, 34, 124-127</sup>. Esto ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias para atenuar la polimerización y para tratar la enfermedad asociada. Nosotros hemos mostrado previamente que es posible bloquear la polimerización de AAT Z por medio de la unión de péptidos del lazo reactivo a la lámina  $\beta$  A<sup>52, 128</sup>. Esos péptidos tenían una longitud de 11-13 residuos y se podían unir a otros miembros de la superfamilia de serpinas<sup>128, 129</sup>. Esto fue claramente demostrado por el hallazgo de que el péptido del lazo reactivo de la antitrombina se insertaba fácilmente en la lámina  $\beta$  A de la AAT Z y viceversa<sup>130</sup>. Estos péptidos, a pesar de ser útiles para establecer el mecanismo de polimerización, son muy grandes para ser aptos para un diseño racional de drogas. Más

recientemente hemos diseñado un péptido 6-mer que se une específicamente con la AAT Z solamente y bloquea la polimerización<sup>63</sup>. Actualmente se han desarrollado péptidos trímeros que pueden unirse con la lámina  $\beta$  A de la antitrombina in vitro<sup>131</sup>. La aspiración ahora es convertir esos péptidos en drogas que puedan ser usadas in vivo.

Una segunda estrategia proviene de la identificación de un bolsillo hidrofóbico en la AAT que está definido por la hebra 2A y las hélices D y E<sup>29, 132</sup>. La cavidad es aparente en la proteína nativa pero se llena cuando la lámina  $\beta$  A acepta un lazo reactivo peptídico exógeno durante la polimerización<sup>29</sup>. Nosotros hemos demostrado que introduciendo mutaciones en ese bolsillo se retarda la polimerización de AAT M y aumenta la secreción de AAT Z en un sistema de expresión de ovocitos de *Xenopus*<sup>133</sup>. Esta cavidad es entonces un objetivo ideal para el desarrollo de drogas que estabilicen la lámina  $\beta$  A y por lo tanto aminore la formación de polímeros.

Una estrategia alternativa es utilizar chaperones químicos para estabilizar los intermediarios en la ruta de plegado. Osmolitos como la betaína, el óxido de trimetilamina y la sarcosina estabilizan a la AAT en contra de la formación de polímeros<sup>134</sup>. El chaperón óxido de trimetilamina no tuvo efecto en la secreción de AAT Z al medio de cultivo<sup>74</sup> ya que favoreció la conversión de AAT Z desplegada a polímeros<sup>135</sup>. Por el contrario, el glicerol aumentó la secreción de AAT Z en líneas celulares<sup>74</sup> probablemente porque se une y estabiliza a la lámina  $\beta$  A<sup>131</sup>. El 4-fenil butirato (4-PBA) también aumentó la secreción de AAT Z en líneas celulares y ratones transgénicos<sup>74</sup>. Este agente ha sido utilizado durante muchos años para tratar niños con desórdenes en el ciclo de la urea y, más recientemente el 4-PBA ha demostrado incrementar la expresión de una proteína mutante ( $\Delta$ F508) de transmembrana regulatoria en fibrosis quística, tanto in vitro<sup>136</sup> como in vivo<sup>137</sup>. Estos alentadores hallazgos han llevado a la realización de un estudio piloto que actualmente está en marcha para evaluar el potencial del 4-PBA para promover la secreción de AAT en pacientes con deficiencia de AAT.

## CONCLUSIÓN

Se han dilucidado las bases moleculares de la deficiencia de AAT Z, mediante estudios bioquímicos, celulares y estructurales. Los objetivos actuales son determinar la respuesta celular a la polimerización de AAT y desarrollar estrategias terapéuticas para bloquear la polimerización in vivo.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo de Investigación Médica (Reino Unido), Wellcome Trust, Alpha-1 Foundation y el consorcio Papworth NHS. H. Parfrey es "training fellow" del MRC y receptor de la Beca Sackler.

## AFILIACIONES DE LOS AUTORES

**D. A. Lomas, H. Parfrey.** Unidad de Medicina Respiratoria. Departamento de Medicina, Universidad de Cambridge, Instituto de Investigaciones Médicas de Cambridge, Cambridge CB2XY, UK.

**Correspondencia:** Profesor D. Lomas, Cambridge Institute for Medical Research, Wellcome Trust/MCR Building, Hills Road, Cambridge CB2 2XY, UK, E-mail: dal16@cam.ac.uk

## TRADUCCIÓN

Por: Sonia Iujvidin, Ph.D. Ciencias Químicas, Pro-Asociación Alfa-1 de Argentina  
 Correo Electrónico: soniadin@movi.com.ar  
 Colaboración: Elaine Alfonzo, Presidenta, Fundación Alfa-1 de Puerto Rico  
 Correo Electrónico: ealfonzo@alfa1.org

Con permiso de los autores y de la editorial BMJ Publishing Group

## REFERENCIAS

- Kiernan V. Warm hearts in a cold land. *New Scientist* 1995;4 March:10.
- Kuzemko JA. Chopin's illnesses. *J R Soc Med* 1994;87:769-72.
- Kubba AK, Young M. The long suffering of Frederic Chopin. *Chest* 1997;113:210-6.
- Laurell C-B, Eriksson S. The electrophoretic  $\alpha$ 1-globulin pattern of serum in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 1963;15:132-40.
- Beatty K, Bieth J, Travis J. Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor and  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. *J Biol Chem* 1980;255:3931-4.
- Carrell RW, Jeppsson J-O, Laurell C-B, et al. Structure and variation of human  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Nature* 1982;298:329-34.
- Eriksson S. Studies in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand* 1965;432(Suppl):1-85.
- Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, et al. Experimental emphysema. Its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health* 1965;11:50-8.
- Senior RM, Tegner H, Kuhn C, et al. The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis* 1977;116:469-75.
- Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, et al. Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: Tissue localization of the instilled protease. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:461-78.
- Snider GL, Lucey EC, Christensen TG, et al. Emphysema and bronchial secretory cell metaplasia induced in hamsters by human neutrophil products. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:155-60.
- Lomas DA, Carrell RW. Serpinopathies and the conformational dementias. *Nature Reviews Genetics* 2002;3:759-68.
- Lomas DA, Mahadeva R. Alpha-1-antitrypsin polymerisation and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest* 2002; 1585-90.
- Carrell RW, Lomas DA. Alpha-1-antitrypsin deficiency: a model for conformational diseases. *N Engl J Med* 2002;346:45-53.
- Huber R, Carrell RW. Implications of the three-dimensional structure of  $\alpha$ 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* 1989;28:8951-66.
- Aronsen KF, Ekelund G, Kindmark CO, et al. Sequential changes of plasma proteins after surgical trauma. *Scand J Clin Lab Invest* 1972;29(Suppl 124):127-36.
- Billingsley GD, Walter MA, Hammond GL, et al. Physical mapping of four serpin genes:  $\alpha$ 1-antitrypsin,  $\alpha$ 1-antichymotrypsin, corticosteroid-binding globulin, and protein C inhibitor, within a 280 kb region on chromosome 14q31.1. *Am J Hum Genet* 1993;52:343-53.
- Koj A, Regoeczi E, Toews CJ, et al. Synthesis of antithrombin III and alpha-1-antitrypsin by the perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1978;539:496-504.
- Eriksson S, Alm R, A\*stedt B. Organ cultures of human fetal hepatocytes in the study of extra- and intracellular  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Biochim Biophys Acta* 1978;542:496-505.
- Mornex JF, Chytil-Weir A, Martinet Y, et al. Expression of the alpha-1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin-deficient individuals. *J Clin Invest* 1986;77:1952-61.
- Perlmutter DH, Daniels JD, Auerbach HS, et al. The  $\alpha$ 1-antitrypsin gene is expressed in a human intestinal epithelial cell line. *J Biol Chem* 1989; 264:9485-90.

22. Cichy J, Potempa J, Travis J. Biosynthesis of  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor by human lung-derived epithelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:8250-5.
23. Schultze HE, Heide K, Haupt H. Alpha-1-antitrypsin aus humanserum. *Klin Wchschr* 1962;40:427-9.
24. Rao NV, Wehner NG, Marshall BC, et al. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structure and functional properties. *J Biol Chem* 1991;266:9540-8.
25. Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1994;269:15957-60.
26. Elliott PR, Lomas DA, Carrell RW, et al. Inhibitory conformation of the reactive loop of  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Nat Struct Biol* 1996;3:676-81.
27. Ryu S-E, Choi H-J, Kwon K-S, et al. The native strains in the hydrophobic core and flexible reactive loop of a serine protease inhibitor: crystal structure of an uncleaved  $\alpha$ 1-antitrypsin at 2.7 Å. *Structure* 1996;4:1181-92.
28. Elliott PR, Abrahams J-P, Lomas DA. Wildtype  $\alpha$ 1-antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation. *J Mol Biol* 1998;275:419-25.
29. Elliott PR, Pei XY, Dafforn TR, et al. Topography of a 2.0 Å structure of  $\alpha$ 1-antitrypsin reveals targets for rational drug design to prevent conformational disease. *Protein Sci* 2000;9:1274-81.
30. Kim S-J, Woo J-R, Seo EJ, et al. A 2.1 Å resolution structure of an uncleaved  $\alpha$ 1-antitrypsin shows variability of the reactive centre and other loops. *J Mol Biol* 2001;306:109-19.
31. Johnson D, Travis J. Structural evidence for methionine at the reactive site of human  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 1978;253:7142-4.
32. Wilczynska M, Fa M, Ohlsson P-I, et al. The inhibition mechanism of serpins. Evidence that the mobile reactive centre loop is cleaved in the native protease-inhibitor complex. *J Biol Chem* 1995;270:29652-5.
33. Wilczynska M, Fa M, Karolin J, et al. Structural insights into serpin-protease complexes reveal the inhibitory mechanism of serpins. *Nat Struct Biol* 1997;4:354-7.
34. Stratikos E, Gettins PGW. Major proteinase movement upon stable serpin-proteinase complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;4:453-8.
35. Stratikos E, Gettins PGW. Mapping the serpin-proteinase complex using single cysteine variants of  $\alpha$ 1-antitrypsin inhibitor Pittsburgh. *J Biol Chem* 1998;273:15582-9.
36. Stratikos E, Gettins PGW. Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive centre loop into b-sheet A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4808-13.
37. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 2000;407:923-6.
38. Mast AE, Enghild JJ, Pizzo SV, et al. Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed, and reactive site cleaved serpins: comparison of  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor,  $\alpha$ 1-antichymotrypsin, antithrombin III,  $\alpha$ 2-antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. *Biochemistry* 1991;30:1723-30.
39. Brantly M, Nukiwa T, Crystal RG. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Med* 1988;84 (Suppl 6A):13-31.
40. Owen MC, Carrell RW, Brennan SO. The abnormality of the S variant of human  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Biochim Biophys Acta* 1976;453:257-61.
41. Jeppsson J-O. Amino acid substitution Glu R Lys in  $\alpha$ 1-antitrypsin PiZ. *FEBS Lett* 1976;65:195-7.
42. Yoshida A, Lieberman J, Gaidulis L, et al. Molecular abnormality of human alpha-1-antitrypsin variant (Pi-Z) associated with plasma activity deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:1324-8.
43. Blanco I, Ferns'ndez E, Bustillo EF. Alpha-1-antitrypsin PI phenotypes S and Z in Europe: an analysis of the published surveys. *Clin Genet* 2001;60:31-41.
44. Sharp HL, Bridges RA, Krivit W, et al. Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. *J Lab Clin Med* 1969;73:934-9.
45. Sveger T. Liver disease in alpha-1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. *N Engl J Med* 1976;294:1316-21.
46. Sveger T. The natural history of liver disease in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr Scand* 1988;77:847-51.
47. Eriksson S, Carlson J, Velez R. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha-1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1986;314:736-9.
48. Larsson C. Natural history and life expectancy in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *PiZ. Acta Med Scand* 1978;204:345-51.
49. Piitulainen E, Eriksson S. Decline in FEV1 related to smoking status in individuals with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 1999;13:247-51.
50. Dycayo MJ, Grant SGN, Felts K, et al. Neonatal hepatitis induced by  $\alpha$ 1-antitrypsin: a transgenic mouse model. *Science* 1988;242:1409-12.
51. Carlson JA, Barton Rogers B, Sifers RN, et al. Accumulation of PiZ  $\alpha$ 1-antitrypsin causes liver damage in transgenic mice. *J Clin Invest* 1989;83:1183-90.
52. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, et al. The mechanism of Z  $\alpha$ 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 1992;357:605-7.
53. Dafforn TR, Mahadeva R, Elliott PR, et al. A kinetic description of the polymerisation of  $\alpha$ 1-antitrypsin. *J Biol Chem* 1999;274:9548-55.
54. Sivasothy P, Dafforn TR, Gettins PGW, et al. Pathogenic  $\alpha$ 1-antitrypsin polymers are formed by reactive loop- $\beta$ -sheet A linkage. *J Biol Chem* 2000;275:33663-8.
55. Lomas DA, Evans DL, Stone SR, et al. Effect of the Z mutation on the physical and inhibitory properties of  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Biochemistry* 1993;32:500-8.
56. Janciauskiene S, Dominaitiene R, Sternby NH, et al. Detection of circulating and endothelial cell polymers of Z and wildtype alpha-1-antitrypsin by a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 2002;277:26540-6.
57. Le A, Ferrell GA, Dishon DS, et al. Soluble aggregates of the human PiZ  $\alpha$ 1-antitrypsin variant are degraded within the endoplasmic reticulum by a mechanism sensitive to inhibitors of protein synthesis. *J Biol Chem* 1992;267:1072-80.
58. Sidhar SK, Lomas DA, Carrell RW, et al. Mutations which impede loop/sheet polymerisation enhance the secretion of human  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency variants. *J Biol Chem* 1995;270:8393-6.
59. Gooplt B, Hazes B, Chang W-SW, et al. Inactive conformation of the serpin  $\alpha$ 1-antichymotrypsin indicates two stage insertion of the reactive loop; implications for inhibitory function and conformational disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:67-72.
60. Yu M-H, Lee KN, Kim J. The Z type variation of human  $\alpha$ 1-antitrypsin causes a protein folding defect. *Nat Struct Biol* 1995;2:363-7.
61. Kim J, Lee KN, Yi G-S, et al. A thermostable mutation located at the hydrophobic core of  $\alpha$ 1-antitrypsin suppresses the folding defect of the Z-type variant. *J Biol Chem* 1995;270:8597-601.
62. Kang HA, Lee KN, Yu M-H. Folding and stability of the Z and Siiyama genetic variants of human  $\alpha$ 1-antitrypsin. *J Biol Chem* 1997;272:510-6.
63. Mahadeva R, Dafforn TR, Carrell RW, et al. Six-mer peptide selectively anneals to a pathogenic serpin conformation and blocks polymerisation: implications for the prevention of Z  $\alpha$ 1-antitrypsin related cirrhosis. *J Biol Chem* 2002;277:6771-4.
64. Cabral CM, Choudhury P, Liu Y, et al. Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways. *J Biol Chem* 2000;275:25015-22.
65. Cabral CM, Liu Y, Sifers RN. Dissecting the glycoprotein quality control in the secretory pathway. *TIBS* 2001;26:619-23.
66. Cabral CM, Liu Y, Moremen KW, et al. Organizational diversity among distinct glycoprotein ER-associated degradation programs. *Mol Biol Cell* 2002;13:2639-50.
67. Teckman JH, Burrows J, Hidvegi T, et al. The proteasome participates in degradation of mutant  $\alpha$ 1-antitrypsin Z in the endoplasmic reticulum of hepatoma-derived hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:44865-72.
68. Qu D, Teckman JH, Omura S, et al. Degradation of a mutant serpin protein,  $\alpha$ 1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J Biol Chem* 1996;271:22791-5.
69. Novorodovskaya N, Lee J, Yu Z-X, et al. Inhibition of intracellular degradation increases secretion of a mutant form of  $\alpha$ 1-antitrypsin associated with profound deficiency. *J Clin Invest* 1998;101:2693-701.
70. Teckman JH, Perlmutter DH. Retention of mutant  $\alpha$ 1-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G961-74.
71. Perlmutter DH. Liver injury in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency: an aggregated protein induces mitochondrial injury. *J Clin Invest* 2002;110:1579-83.
72. Wu Y, Whitman I, Molmenti E, et al. A lag in intracellular degradation of mutant  $\alpha$ 1-antitrypsin correlates with liver disease phenotype in homozygous PiZZ  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9014-8.
73. Teckman JH, Perlmutter DH. The endoplasmic reticulum degradation pathway for mutant secretory proteins  $\alpha$ 1-antitrypsin Z and S is distinct from that for an unassembled membrane protein. *J Biol Chem* 1996;271:13215-20.
74. Burrows JAJ, Willis LK, Perlmutter DH. Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant  $\alpha$ 1-antitrypsin ( $\alpha$ 1-AT) Z: a potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1796-801.
75. Green C, Brown G, Dafforn TR, et al. Mutations in the Drosophila serpin necrotic mirror disease-associated mutations of human serpins. *Development* 2003;130:1473-8.
76. Seyama K, Nukiwa T, Takabe K, et al. Siiyama (serine 53 (TCC) to phenylalanine 53 (TTC)). A new  $\alpha$ 1-antitrypsin-deficient variant with mutation on a predicted conserved residue of the serpin backbone. *J Biol Chem* 1991;266:12627-32.
77. Seyama K, Nukiwa T, Souma S, et al.  $\alpha$ 1-antitrypsin-deficient variant Siiyama (Ser53[TCC] to Phe53[TTC]) is prevalent in Japan. Status of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in Japan. *Am Rev Respir Dis* 1995;152:2119-26.
78. Matsunaga E, Shiohara S, Nakamura H, et al. Molecular analysis of the gene of the  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency variant, Mhichinan. *Am J Hum Genet* 1990;46:602-12.
79. Sergi C, Consalez GC, Fabbretti G, et al. Immunohistochemical and genetic characterization of the M Cagliari  $\alpha$ 1-antitrypsin molecule (M-like  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency). *Lab Invest* 1994;70:130-3.
80. Lomas DA, Finch JT, Seyama K, et al.  $\alpha$ 1-antitrypsin Siiyama (Ser53Phe); further evidence for intracellular loop-sheet polymerisation. *J Biol Chem* 1993;268:15333-5.
81. Lomas DA, Elliott PR, Sidhar SK, et al. Alpha-1-antitrypsin Mmalton (52Phe deleted) forms loop-sheet polymers in vivo: evidence for the C sheet mechanism of polymerisation. *J Biol Chem* 1995;270:16864-70.
82. Elliott PR, Stein PE, Bilton D, et al. Structural explanation for the dysfunction of S  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Nat Struct Biol* 1996;3:910-1.
83. Mahadeva R, Chang W-SW, Dafforn T, et al. Heteropolymerisation of S, I and Z  $\alpha$ 1-antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest* 1999;103:999-1006.
84. Cruz M, Molina JA, Pedrola D, et al. Cirrhosis and heterozygous  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in a 4 year old girl. *Helv Paediatr Acta* 1975;30:501-7.
85. Campa JL, Craig JR, Peters RL, et al. Cirrhosis associated with partial deficiency of alpha-1-antitrypsin in an adult. *Ann Intern Med* 1973;78:233-8.
86. Seersholm N, Kok-Jensen A, Dirksen A. Survival of patients with severe  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency with special reference to non-index cases. *Thorax* 1994;49:695-8.
87. Janus ED, Phillips NT, Carrell RW. Smoking, lung function, and  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 1985; i:152-4.
88. Wewers MD, Casolaro MA, Sellers SE, et al. Replacement therapy for alpha-1-antitrypsin deficiency associated with emphysema. *N Engl J Med* 1987;316:1055-62.
89. Ogushi F, Fells GA, Hubbard RC, et al. Z-type  $\alpha$ 1-antitrypsin is less competent than M1-type  $\alpha$ 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1987;80:1366-74.
90. Guzdek A, Potempa J, Dubin A, et al. Comparative properties of human  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor glycosylation variants. *FEBS Lett* 1990;272:125-7.
91. Llewellyn-Jones CG, Lomas DA, Carrell RW, et al. The effect of the Z mutation on the ability of  $\alpha$ 1-antitrypsin to prevent neutrophil mediated tissue damage. *Biochim Biophys Acta* 1994;1227:155-60.
92. Gadek JE, Fells GA, Crystal RG. Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science* 1979;206:1315-6.
93. Janoff A, Carp H, Lee DK, et al. Cigarette smoke inhalation decreases  $\alpha$ 1-antitrypsin activity in rat lung. *Science* 1979;206:1313-4.
94. Elliott PR, Bilton D, Lomas DA. Lung polymers in Z  $\alpha$ 1-antitrypsin related emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:670-4.
95. Morrison HM, Kramps JA, Burnett D, et al. Lung lavage fluid from patients with  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor deficiency or chronic obstructive bronchitis: antielastase function and cell profile. *Clin Sci* 1987;72:373-81.

96. Hubbard RC, Fells G, Gadek J, et al. Neutrophil accumulation in the lung in alpha 1-antitrypsin deficiency. Spontaneous release of leukotriene B4 by alveolar macrophages. *J Clin Invest* 1991;88:891-7.
97. Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B4 and interleukin 8. *Thorax* 2002; 57:709-14.
98. Parmar JS, Mahadeva R, Reed BJ, et al. Polymers of  $\alpha$ 1-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26:723-30.
99. Banda MJ, Rice AG, Griffin GL, et al. The inhibitory complex of human  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor and human leukocyte elastase is a neutrophil chemoattractant. *J Exp Med* 1988;167:1608-15.
100. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic activity of elastin derived peptides. *J Clin Invest* 1980;66:859-62.
101. Warter J, Storck D, Grosshans E, et al. Syndrome de Weber-Christian associe a un deficit en alpha-1-antitrypsine; enquete familiale. *Ann Med Interne (Paris)* 1972;123:877-82.
102. O'Riordan K, Blei A, Rao MS, et al.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency-associated panniculitis. Resolution with intravenous  $\alpha$ 1-antitrypsin administration and liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63:480-2.
103. Colp C, Pappas J, Moran D, et al. Variants of  $\alpha$ 1-antitrypsin in Puerto Rican children with asthma. *Chest* 1993; 103:812-5.
104. Eden E, Mitchell D, B M, et al. Atopy, asthma, and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:68-74.
105. Griffith ME, Lovegrove JU, Gaskin G, et al. C-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity in vasculitis patients is associated with the Z allele of alpha-1-antitrypsin, and P-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity with the S allele. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:438-43.
106. Baslund B, Szpirt W, Eriksson S, et al. Complexes between proteinase 3,  $\alpha$ 1-antitrypsin and proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: a comparison between  $\alpha$ 1-antitrypsin PiZ allele carriers and non-carriers with Wegener's granulomatosis. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:786-92.
107. King MA, Stone JA, Diaz PT, et al.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency: evaluation of bronchiectasis with CT. *Radiology* 1996; 199:137-41.
108. Seersholm N, Kok-Jensen A. Extrapulmonary manifestations of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:A343.
109. Schievink WI, Prakash UBS, Piepgras DG, et al.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in intracranial aneurysms and cervical artery dissection. *Lancet* 1994;343:452-3.
110. Cox DW.  $\alpha$ 1-antitrypsin: a guardian of vascular tissue. *Mayo Clin Proc* 1994;69:1123-4.
111. Cuvelier A, Muir J-F, Hellot M-F, et al. Distribution of  $\alpha$ 1-antitrypsin alleles in patients with bronchiectasis. *Chest* 2000; 117:415-9.
112. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, novel functions, mechanism of inhibition and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001; 276:33293-6.
113. Whisstock JC, Skinner R, Lesk AM. An atlas of serpin conformations. *Trends Biochem Sci* 1998; 23:63-7.
114. Aulak KS, Eldering E, Hack CE, et al. A hinge region mutation in C1-inhibitor (Ala436RThr) results in nonsubstrate-like behavior and in polymerization of the molecule. *J Biol Chem* 1993; 268:18088-94.
115. Eldering E, Verpy E, Roem D, et al. COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. *J Biol Chem* 1995;270:2579-87.
116. Bruce D, Perry DJ, Borg J-Y, et al. Thromboembolic disease due to thermolabile conformational changes of antithrombin Rouen VI (187AsnRAsp). *J Clin Invest* 1994; 94:2265-74.
117. Lindo VS, Kakkar VV, Learmonth M, et al. Antithrombin-TRI (Ala382 to Thr) causing severe thromboembolic tendency undergoes the S-to-R transition and is associated with a plasma-inactive high-molecular-weight complex of aggregated antithrombin. *Br J Haematol* 1995;89:589-601.
118. Poller W, Faber J-P, Weidinger S, et al. A leucine-to-proline substitution causes a defective  $\alpha$ 1-antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease. *Genomics* 1993;17:740-3.
119. Faber J-P, Poller W, Olek K, et al. The molecular basis of  $\alpha$ 1-antichymotrypsin deficiency in a heterozygote with liver and lung disease. *J Hepatol* 1993; 18:313-21.
120. Crowther DC, Serpell LC, Dafforn TR, et al. Nucleation of  $\alpha$ 1-antichymotrypsin polymerisation? *Biochemistry* 2002;42:2355-63.
121. Davis RL, Shrimpton AE, Holohan PD, et al. Familial dementia caused by polymerisation of mutant neuroserpin. *Nature* 1999;401:376-9.
122. Davis RL, Shrimpton AE, Carrell RW, et al. Association between conformational mutations in neuroserpin and onset and severity of dementia. *Lancet* 2002;359:2242-7.
123. Belorgey D, Crowther DC, Mahadeva R, et al. Mutant neuroserpin (Ser49Pro) that causes the familial dementia FENIB is a poor proteinase inhibitor and readily forms polymers in vitro. *J Biol Chem* 2002; 277:17367-73.
124. Schulze AJ, Baumann U, Knof S, et al. Structural transition of  $\alpha$ 1-antitrypsin by a peptide sequentially similar to b-strand s4A. *Eur J Biochem* 1990;194:51-6.
125. Mast AE, Enghild JJ, Salvesen G. Conformation of the reactive site loop of  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor probed by limited proteolysis. *Biochemistry* 1992; 31:2720-8.
126. Huntington JA, Pannu NS, Hazes B, et al. A 2.6 $\text{\AA}$  structure of a serpin polymer and implications for conformational disease. *J Mol Biol* 1999;293:449-55.
127. Dunstone MA, Dai W, Whisstock JC, et al. Cleaved antitrypsin polymers at atomic resolution. *Protein Sci* 2000;9:417-20.
128. Skinner R, Chang W-SW, Jin L, et al. Implications for function and therapy of a 2.9 $\text{\AA}$  structure of binary-complexed antithrombin. *J Mol Biol* 1998;283:9-14.
129. Fitton HL, Pike RN, Carrell RW, et al. Mechanisms of antithrombin polymerisation and heparin activation probed by insertion of synthetic reactive loop peptides. *Biol Chem* 1997;378:1059-63.
130. Chang W-SW, Wardell MR, Lomas DA, et al. Probing serpin reactive loop conformations by proteolytic cleavage. *Biochem J* 1996;314:647-53.
131. Zhou A, Stein PE, Huntington JA, et al. Serpin polymerisation is prevented by a hydrogen bond network that is centered on His-334 and stabilized by glyceroel. *J Biol Chem* 2003; 278:15116-22.
132. Lee C, Maeng J-S, Kocher J-P, et al. Cavities of  $\alpha$ 1-antitrypsin that play structural and functional roles. *Protein Sci* 2001;10:1446-53.
133. Parfrey H, Mahadeva R, Ravenhill N, et al. Targeting a surface cavity of  $\alpha$ 1-antitrypsin to prevent conformational disease. *J Biol Chem* 2003; 278:33060-6.
134. Chow MKM, Devlin GL, Bottomley SP. Osmolytes as modulators of conformational changes in the serpins. *Biol Chem* 2001; 382:1593-9.
135. Devlin GL, Parfrey H, Tew DJ, et al. Prevention of polymerization of M and Z  $\alpha$ 1-antitrypsin ( $\alpha$ 1-AT) with trimethylamine N-oxide. Implications for the treatment of  $\alpha$ 1-AT deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:727-32.
136. Rubenstein RC, Egan ME, Zeitlin PL. In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest* 1997; 100:2457-65.
137. Rubenstein RC, Zeitlin PL. A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:484-90.
138. Mahadeva R, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency, cirrhosis and emphysema. *Thorax* 1998; 53:501-5.
139. Lomas DA, Elliott PR, Chang W-SW, et al. Preparation and characterisation of latent  $\alpha$ 1-antitrypsin. *J Biol Chem* 1995; 270:5282-8.
140. Im H, Woo M-S, Hwang KY, et al. Interactions causing the kinetic trap in serpin protein folding. *J Biol Chem* 2002; 277:46347-54.