

Séries de Revisão**DEFICIÊNCIA DE ALFA₁-ANTITRIPSINA. 4: FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR.****D. A. Lomas, H. Parfrey**

THORAX 2004; 59: 529-535

Reproduzido com autorização de BMJ Publishing Group

Neste artigo se revisam as bases moleculares da Deficiência de Alfa₁-Antitripsina e se amostra que se deve á acumulação da proteína mutada como polímeros ordenados no retículo endoplásmico dos hepatócitos. Os objetivos actuais são determinar a resposta celular á alfa₁-antitripsina polimérica e desenvolver estratégias terapêuticas para bloquear a polimerização in vivo.

A deficiência de alfa₁-antitripsina (AAT) se reportou numa menina oriunda de Alaska que faleceu há 800 anos¹ e também pode haver dado conta da morte prematura de Federico Chopin em 1849^{2, 3}. Foi descrita por primeira vez como uma entidade clínica em 1963 por Laurell e Ericksson, quem notaram a ausência da banda α_1 (alfa₁) na electroforese de proteínas séricas⁴. A principal função da AAT é de proteger aos tecidos da elastase, enzima produzida pelos neutrófilos^{5, 6}. O seu rol de proteger os pulmões contra um ataque proteolítico está garantizado pela associação do déficit plasmático e a aparição precoce de enfisema panacinar⁷. Esta descoberta, junto com a observação que a instilação intrapulmonar de enzimas elastolíticas também se deriva em enfisema⁸⁻¹¹, chegou a formular a hipótese de protease-antiprotease para a doença pulmonar. Normalmente há um balance entre as proteases e antiproteases, mas quando há um excesso de proteases produz-se a destruição do tecido. Esta hipótese desenvolveu-se há mais de 35 anos e segue sendo central para a nossa compreensão da patogénese da doença pulmonar. Neste artigo fazemos uma revisão dos mecanismos moleculares que estão detrás da deficiência de AAT e amostramos como a compreensão deste mecanismo nos permitiu explicar a deficiência doutros membros da superfamilia dos inibidores das serin proteases ou serpinas (por suas siglas em inglês, *serine protease inhibitors*). Estes incluem a deficiência de antitrombina, inibidor C1, alfa₁-antiquimotripsina e neuroserpina associada com trombose, angioedema, obstrucção do fluxo aéreo e demência respectivamente. Agrupamos estas condições com o nome de “serinopatías”¹²⁻¹⁴. A sua fisiopatologia em comum provê uma plataforma para o desenvolvimento de estratégias para tratar os síndromes clínicos associados.

ESTRUCTURA E FUNÇÃO DA ALFA₁-ANTITRIPSINA (AAT)

A AAT é uma glicoproteína de fase aguda, de 52 kDa e 394 aminoácidos que está codificada no cromossoma 14q31-32.1¹⁵⁻¹⁷. É sintetizada pelos hepatócitos¹⁸⁻¹⁹ e é secretada ao plasma a uma concentração de 1.9-3.5 mg/ml. Também a sintetizam e secretan macrófagos²⁰, células intestinais²¹ e células epiteliais bronquiais²². Inicialmente se denominou assim pela sua habilidade de inibir á tripsina pancreática²³. Posteriormente encontrou-se que era um efectivo inibidor de uma variedade de outras proteases incluindo a elastase dos neutrófilos⁵, catepsina G⁵ e protease 3²⁴. O amplo espectro de inibição de proteases deu pé ao seu nome alternativo de inibidor da protease alfa₁²⁵, apesar que é muito pouco exacto já que há outras proteínas na banda α_1 do soro que são também inibidores de protease (como a alfa₁-antiquimotripsina).

Estudos cristalográficos amostraram que a AAT está composta por três lâminas β (A-C) e um laço reactivo exposto móvil (Fig. 1) que tem uma sequência peptídica que serve como pseudo substrato para a protease²⁶⁻³⁰. Os aminoácidos críticos dentro deste laço são os resíduos P1-P1' metionina serina, já que actuam como “anzol” da elastase dos neutrófilos³¹. Uma vez que a enzima é presa, rompe a união peptídica P1-P1' da AAT³² e a protease se inactiva por uma acção de tipo ratoeira (Fig.1), que a faz girar desde o polo superior ao inferior da proteína em associação com a inserção do laço reactivo como uma linha extra na lâmina β A³³⁻³⁷. Esta conformação alterada da AAT unida ao seu substrato enzimático é logo reconhecida por receptores hepáticos e eliminada da circulação³⁸.

Esta assombrosa acção de ratoeira da AAT é central para o seu rol de inibidor efectivo de serin proteases. Paradójicamente, é também o seu calcanhar de Aquiles já que mutações pontuais nesses dominios móveis fazem a molécula vulnerável a transições conformacionais aberrantes como a que subjaze na deficiência de AAT.

DEFICIÊNCIA DE ALFA₁-ANTITRIPSINA (AAT)

A deficiência de AAT é a anormalidade mais amplamente identificada dum inibidor de protease que causa doença pulmonar. Descreeveram-se mais de 70 variantes que ocorren naturalmente e foram caracterizadas pela sua migração em geles de isoelectroenfoque--o sistema de inibidor de protease ou sistema Pi³⁹. As variantes deficientes mais comuns, S e Z são o resultado de mutações pontuais no gene AAT⁴⁰⁻⁴² e são chamadas assim porque geram uma proteína que migra mais lentamente que a proteína AAT normal M. As mutações que geram proteínas AAT que migram mais rapidamente se designam de A a L.

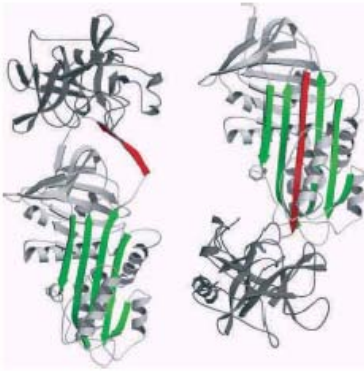


Figura 1: A alfa₁-antitripsina pode considerar-se que actúa como uma ratoeira para ratos^{26, 37, 138}. Logo após prender (esquerda) a elastase dos neutrófilos (cinzenta) se inactiva por um movimento desde o polo superior ao inferior da proteína (direita). Isto vai associado com a inserção do laço reactivo (vermelho) como uma linha extra na lâmina β A (verde). Reproduzido por autorização de Lomas e Carrell¹².

Uma recente revisão de 70 pesquisas de opiniões proveio uma estimação da frequência e distribuição dos alelos S e Z da AAT em toda Europa⁴³. A maior frequência do alelo S ocorre na península Ibérica e gradualmente se vai reduzindo em direcção de sul a norte e de oeste a este. A AAT S (ácido glutâmico²⁶⁴ →valina) encontra-se até em 28% dos europeus do sul e, embora resulta em valores plasmáticos que são o 60% do alelo M, não está associada a sequelas pulmonares. Por outra parte, o alelo Z é mais comum no noroeste de Europa, com frequências que diminuem de oeste a este e de norte a sul. A variante Z (ácido glutâmico³⁴² →lisina) dá como resultado uma deficiência mais severa que se caracteriza, no homocigoto, em valores plasmáticos de AAT que são o 10% do alelo normal M e 60% no heterocigoto MZ (50% pelo alelo M e 10% pelo alelo Z). A mutação Z resulta na acumulação de AAT como inclusões no retículo endoplasmático enrugado do fígado⁴⁴. Estas inclusões predispoem ao homocigoto a hepatite juvenil, cirrose⁴⁵⁻⁴⁶ e carcinoma hepatocelular⁴⁷. Ademais, a falta de proteína circulante predispoem á aparição precoce de enfisema panlobular^{7, 48-49}.

PATOLOGÍA MOLECULAR DA DOENÇA HEPÁTICA ASSOCIADA A PI Z AAT

Há actualmente uma abrumadora evidência de que a doença hepática associada com a variante Z da AAT se deve á acumulação da proteína agregada mais que a uma deficiência plasmática. Um forte apoio a isto o porve o facto que os alelos nulos (null), que não produzem AAT, não estão associados com cirrose³⁹. Mais ainda, a sobre-expressão de AAT Z em modelos animais resulta em dano hepático^{50, 51}. Nossa compreensão das bases moleculares da deficiência de AAT produziu-se a partir do reconhecimento de que a proteína normal activa atravessa uma profunda transição conformacional ao inibir á elastase neutrofílica (ver Fig.1). A mutação Z da AAT está no residuo P17 (17 resíduos proximais ao centro activo) na parte principal da linha 5 da lâmina β A e a base do laço reactivo móvil (Fig. 2). A mutação abre a lâmina β A, favorecendo desta maneira a inserção do laço reactivo numa segunda molécula de AAT para formar um dímero^{26, 52-54}. Isto se pode estender para logo formar polímeros que ficam atrapados no retículo endoplasmático do hepatócito e formam os corpos de inclusão (Fig. 3). Isto está baseado na demonstração que a proteína AAT Z purificada do plasma forma correntes de polímeros quando se la incuba em condições fisiológicas⁵². A velocidade de formação do polímero se acelerava ao aumentar a temperatura a 41°C e se conseguiu bloquear com péptidos que competiam por unirem-se á lâmina β A^{52, 55}. O rol da polimerização in vivo foi confirmado pelo achado de polímeros de AAT em corpos de inclusão do fígado de homocigotos Z AAT com cirrose^{52, 56} e em linhas celulares hepáticas que expressam a variante Z⁵⁷. Mais ainda, utilizando um sistema de expressão de ovocito de *Xenopus* se observou que mutações pontuais que bloqueiam a polimerização aumentaram a secreção da AAT mutante⁵⁸.

A via de polimerização da AAT foi determinada por análise bioquímico, biofísico e cristalográfico como se amostra na Figura 2^{53, 59}. O passo 1 representa a mudança conformacional de AAT para uma forma monomérica polimerogénica (M*), o passo 2 representa a formação de polímeros (P) e o passo 3 representa uma via lateral que leva á formação duma conformação latente monomérica estável (L). A mutação Z causa que a maior parte da proteína instável forme polímeros. A presença do intermediário instável polimerizante M* foi predita a partir da análise biofísico de formação de polímeros⁵³, a demonstração dum intermediário desdobrado⁶⁰⁻⁶² e resolvendo a estrutura cristalina duma mutante da alfa₁-antiquimotripsina⁵⁹. Nossos dados mais recentes sugerem que a mutação Z força á AAT a uma conformação que se aproxima á M* instável, favorecendo a formação de polímeros⁶³.

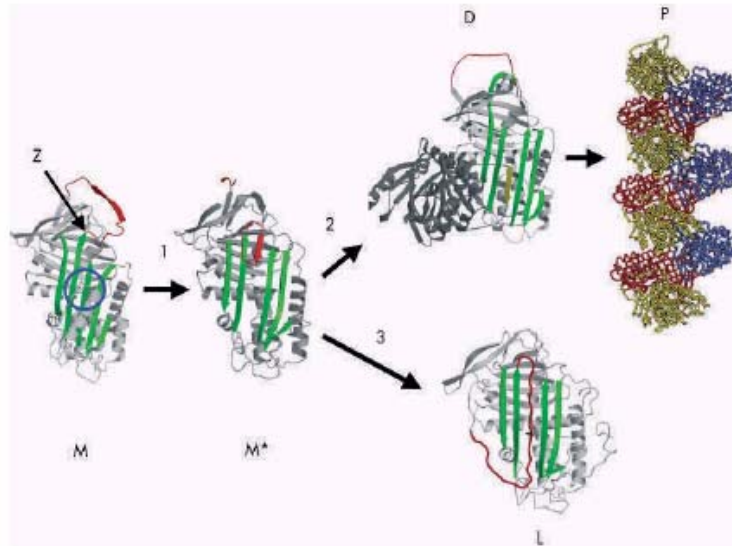


Figura 2: A estrutura da AAT centra-se numa lâmina β A (verde) e o laço centro activo móvel (vermelho). A formação do polímero se produz a partir da variante Z da AAT (Glu342Lis em P17-flecha) ou as mutações no domínio "shutter" (círculo azul) Siiyama, Mmalton, S ou I que abrem a lâmina β A e favorecem a inserção parcial do laço (passo 1) e a formação dum intermediário instável M^* ^{59,63}. Essa estrutura pode depois aceitar o laço doutra molécula (passo 2) para formar um dímero D que logo estende-se para formar um polímero P ^{26, 52, 54} ou bem aceita o seu próprio laço (passo 3) para formar uma conformação latente L^{139, 140}. As moléculas individuais de AAT dentro do polímero estão coloridas de vermelho, amarelo e azul. Reproduzido com autorização de Gooptu e col⁵⁹.

Actualmente estão sendo clarificados os mecanismos de controle de qualidade para manejar os polímeros dentro do hepatócito⁶⁴⁻⁶⁶. Em elegantes estudos se demonstrou que são os resíduos de asparagina unida a oligossacáridos os que dirigem a rota efectiva de eliminação no-proteómica dos polímeros AAT Z dentro do hepatócito. Entretanto, o proteossoma tem muita importância no metabolismo da AAT Z de algumas linhas celulares hepáticas⁶⁷ e não hepáticas⁶⁸⁻⁶⁹. Mais ainda, há uma crescente evidência de que a AAT Z retida estimula uma resposta autofágica dentro do hepatócito⁷⁰⁻⁷¹. Apesar da nossa maior compreensão sobre a rota de eliminação, ainda permanece pouco claro como a acumulação de AAT Z causa morte celular e cirrose hepática.

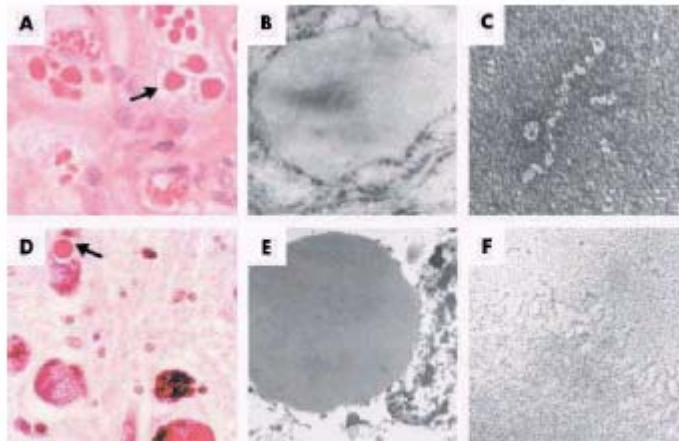


Figura 3: A α_1 -antitripsina Z (AAT) é retida dentro dos hepatócitos como inclusões intracelulares. (A) Essas inclusões são PAS positivas e resistentes á diastase (flecha) e estão associadas á hepatite neonatal e á carcinoma hepatocelular. (B) Microfotografia electrónica dum hepatócito do fígado dum paciente com deficiência de AAT Z aonde se amostra a acumulação de AAT Z no retículo endoplasmático enrugado. Estas inclusões estão compostas por correntes de polímeros de AAT neste caso do plasma dum homocigoto AAT Siiyama (C) e do fígado de un homocigoto AAT Z (F). Mutações similares na AAT e na neuroserpina resultam em inclusões intracelulares similares de AAT e neuroserpina como se amostra em (A) hepatócitos e (D) neuróns com coloração de PAS e como agregados endoplasmáticos das proteínas anormais por microscopia electrónica (B e E respectivamente). A microscopia electrónica confirma que a neuroserpina anormal forma polímeros com forma de contas ou abalorios e agregados poliméricos enredados, idênticos aos amostrados aqui com a AAT Z (C e F respectivamente). Magnificação de esquerda a direita: x200; x20.000; x220.000. Reproduzido com autorização de Carrell e Lomas¹⁴.

A dependência da polimerização da temperatura e concentração⁵²⁻⁵³, assim como de factores genéticos⁷²⁻⁷³, podem dar conta da heterogeneidade da doença hepática entre indivíduos que são homocigotos para a mutação Z. A síntese de AAT aumenta durante episódios de inflamação como parte da resposta de fase aguda. Neste período é possível que a formação de polímeros supere a via degradativa, exacerbando, desta maneira, a formação de inclusões hepáticas e o dano hepatocelular associado. Esta hipótese foi posta em dúvida por estudos celulares que não mostram um incremento de AAT Z em resposta a um aumento de temperaturas⁷⁴. No entanto, nossos dados recentes num modelo de déficit de AAT em *Drosophila* mostram claramente que a polimerização depende da temperatura in vivo⁷⁵. Há também uma evidência clínica anedótica que apoia o rol da temperatura em exacerbar a doença hepática associada à AAT Z no estudo prospectivo sueco de Sveger e col.⁴⁵⁻⁴⁶. Eles estudaram 200.000 recém nascidos e identificaram 120 homocigotos ZZ a quem seguiram até à adolescência tardia. Dois desses pacientes desenvolveram icterícia progressiva durante o estudo; num caso se desenvolveu uma apendicite aguda e no outro uma pneumonia severa. Outras crianças assintomáticas desenvolveram marcados desarranjos nas análises de função hepática em associação com rinite aguda e eczema. Se requerem mais estudos prospectivos para avaliar se os episódios febris ocorrem mais frequentemente e aumentam o risco de polímeros intra hepáticos nos homocigotos AAT Z que desenvolvem doença hepática comparados com aqueles indivíduos que permanecem assintomáticos.

Apesar que se descreveram muitas variantes da deficiência de AAT, só duas (além do alelo Z) foram associadas em forma similar com a deficiência plasmática e as inclusões hepáticas: a AAT Siiyama (serina⁵³→fenilalanina), que é a deficiência de AAT mais frequente no Japão⁷⁶⁻⁷⁷ e a Mmalton (também conhecida como Mnichinan⁷⁸ e Mcagliari⁷⁹, deleção da fenilalanina na posição 52) que é a causa mais comum de deficiência de AAT em Cerdonha. Estas duas variantes desestabilizam e abrem a lâmina β A (Fig.2) para permitir a formação de intermediários dobrados^{61, 62} e polímeros laço-lâmina (loop-sheet) in vivo^{81, 82}. A polimerização também é a base da deficiência plasmática moderada das variantes AAT S (Glu264Val) e I (Arg39Cys)^{82, 83}. As mutações pontuais responsáveis destas variantes causam menos desarranjos na lâmina β A que a variante Z. Assim, a velocidade de formação do polímero é mais baixa que na AAT Z⁵³ e isso resulta numa menor retenção de proteína dentro do hepatócito, uma deficiência plasmática mais leve e a ausência de fenotipo clínico. No entanto, se se herda uma variante com velocidade de formação de polímero lenta como S ou I junto com uma variante Z, de alta formação de polímero, ambas podem interagir para formar heteropolímeros dentro do hepatócito levando a inclusões e finalmente cirrose⁸³⁻⁸⁵.

PATOLOGIA MOLECULAR DA DOENÇA PULMONAR ASSOCIADA A PI Z AAT

O factor mais importante para o desenvolvimento de enfisema em pacientes com deficiência de AAT é o fumar^{49, 56}. A combinação de deficiência de antiprotease e o fumo do cigarro pode ter um efeito devastador sobre a função pulmonar,^{48, 87} provavelmente por permitir a acção sem oposição de enzimas proteolíticas. Os níveis de AAT estão muito diminuídos nos pulmões de indivíduos com deficiência de AAT⁸⁸. Mais ainda, a AAT que está disponível para proteger os pulmões é aproximadamente 5 vezes menos efectiva em inibir a elastase dos neutrófilos que a AAT normal M^{55, 89-91}. A acção inibitória da AAT Z pode ver-se reduzida ainda mais já que a AAT é susceptível de inactivação por oxidação do resíduo metionina por radicais livres dos leucócitos ou por oxidação directa pelo fumo do cigarro^{5, 6, 92, 93}. Finalmente, a mutação Z favorece a formação espontânea de polímeros laço-lâmina (loop-sheet) de AAT nos pulmões⁹⁴. Esta transição conformacional inactiva a AAT como inibidor de protease, reduzindo, ainda mais por este motivo, os níveis que já de por si são baixos de AAT disponíveis para proteger os alvéolos (Fig.4). Os mecanismos que conduzem à formação de polímeros AAT Z no pulmão são desconhecidos. É possível que a polimerização possa acelerar-se pelo ambiente inflamatório que existe no pulmão dos indivíduos com deficiência de AAT Z. Ademais, o fumo de cigarro é moderadamente ácido e estudos prévios demonstraram que a polimerização de AAT se acelera a pH baixo⁵³. Assim, o fumo do cigarro pode actuar de várias maneiras para promover a inactivação da AAT Z in vivo.

Os pacientes com deficiência de AAT Z têm um número excessivo de neutrófilos no fluido de lavado broncoalveolar⁹⁵ e em secções de tecido do parênquima pulmonar¹³ comparado com contróis. Isto pode reflexar um excesso de agentes quimioattractantes como o leucotrieno B4 (LTB4) e a interleucina (IL)-8⁹⁶⁻⁹⁷. No entanto, estudos recentes amostraram que os polímeros são, por si mesmos, quimiotácticos para neutrófilos humanos in vitro⁹⁸. A magnitude deste efeito foi similar ao do quimioattractante C5a e se apresentou no rango de concentrações fisiológicas (EC₅₀ 4,5 (2) µg/ml). Os polímeros também induziram uma mudança na forma dos neutrófilos, estimularam a liberação de mieloperoxidase e a aderência dos neutrófilos⁹⁸. É possível que os polímeros de AAT Z se formem in vivo e actuem logo como quimioattractantes crónicos causando um influxo de células inflamatórias¹³. Eles poderiam evadir os sistemas defensivos do pulmão aderindo-se ao interstício. Qualquer efeito proinflamatório dos polímeros provavelmente esteja exacerbado por citocinas inflamatórias, AAT partida ou complexada⁹⁹, produtos de degradação da elastina¹⁰⁰ e fumo de cigarro quem, por si mesmos, provocam o recrutamento de neutrófilos. Nossa compreensão das propriedades biológicas da AAT prevê assim novas rotas para a patogênese da enfisema em indivíduos que são homocigotos para a mutação Z (Fig. 4). Certamente, a presença de polímeros pode explicar a progressão da doença pulmonar em indivíduos homocigotos Z logo que deixaram de fumar e apesar duma adequada terapia de reposição intravenosa com AAT plasmática. A relação entre polímeros intrapulmonares de AAT Z e o fumar, as infecções, a produção de citocinas e a proporção de declinação da

função pulmonar requerem a avaliação tanto em modelos animais e celulares da doença assim como de estudos prospectivos em indivíduos homozigotos Z.

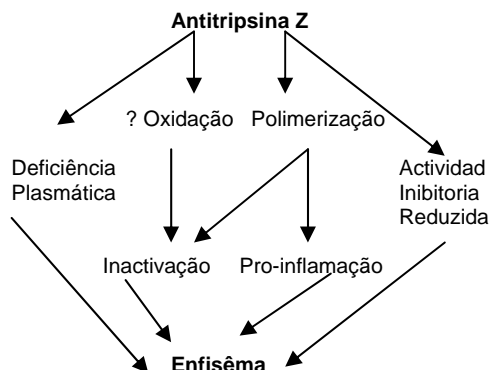


Figura 4: Modelo proposto para a patogênese do enfisema em pacientes com deficiência de alfa-antitripsina (AAT) Z. A deficiência plasmática e a actividade inibitória reduzida da AAT Z podem exacerbar-se pela polimerização da AAT Z dentro dos pulmões. Estes processos inactivam ao inibidor, reduzindo, por esta razão, ainda mais a tela de antiprotease. Os polímeros de AAT podem também actuar como um estímulo pro-inflamatório para atrair e activar neutrófilos, aumentando, em consequência, o dano tisular. Reproduzido com autorização de Lomas e Mahadeva¹³.

PATOLOGÍA MOLECULAR DOUTRAS CONDIÇÕES ASSOCIADAS COM PI Z AAT

A deficiência de Pi Z AAT foi descrita junto com paniculite que se caracteriza por uma infiltração inflamatória aguda da pele e necrose gordurosa^{101, 102}. Também há uma associação entre o alelo Z de AAT e a asma^{103, 104}, vasculite^{105, 106}, bronquiectasias¹⁰⁷, pancreatite¹⁰⁸ e aneurismas vasculares^{109, 110}, embora a associação com bronquiectasias e doenças vasculares tenha sido disputada por outros estudos^{108, 111}. A característica comum que vincula muitas destas condições é a inflamação mediada por neutrófilos, e é possível que os polímeros de AAT sejam um dos factores que impulsionem esta inflamação e a progressão da doença⁹⁸.

DOENÇAS CAUSADAS PELA POLIMERIZAÇÃO DE OUTRAS SERPINAS

A AAT é o membro arquetípico da superfamília das serpinas ou o inibidor da serin protease. Esta família inclui membros como a alfa₁-antiquimotripsina, o inibidor C1, a antitrombina e o ativador inibidor-1 do plasminogénio, que têm um importante rol no control das proteases involucradas nas cachoeiras inflamatórias, do complemento, da coagulação e fibrinolítica, respectivamente^{25, 112}. A família se caracteriza por ter um 30% de homologia de sequência com respeito á AAT e conservação da estrutura terciária^{13, 113}. Consequentemente, os processos fisiológicos e patológicos que afectam a um membro podem ser extrapoláveis a outro. O fenómeno de polimerização laço-lâmina (loop-sheet) não está restringido á AAT e foi recentemente reportado em mutantes doutros membros da superfamília das serpinas causando doenças: as serpinopatías. Mutantes do inibidor C1, a antitrombina e a alfa₁-antiquimotripsina também podem desestabilizar a sua arquitectura proteica formando polímeros inactivos que estão associados com deficiência plasmática e angioedema, trombose e doença pulmonar obstructiva crónica respectivamente^{39, 114-120}.

O processo manifesta-se em forma surpreendente pelos corpos de inclusão em demência, a encefalopatia familiar com corpos de inclusão com neuroserpinas (FENIB, por suas siglas em inglês)¹²¹. Nós demonstramos que esta demência está causada por mutações nas neuroserpinas que são homólogas a aquelas que causam cirrose hepática na deficiência de AAT¹²¹. Além disso, ambas, a cirrose hepática e a doença neurodegenerativa têm um padrão idêntico de polimerização intracelular e formação de corpos de inclusão (Fig. 3). Foram descritas mais famílias de mutações em neuroserpinas polímero genéticas e se está evidenciando que há uma relação directa entre a magnitude da acumulação intracelular de neuroserpina e a severidade do síndrome clínico¹²². Mais ainda, um recente trabalho nosso demonstrou que uma das mutantes de neuroserpina que causa FENIB (Ser49Pro) polimeriza a uma velocidade até 13 vezes maior que a proteína selvagem¹²³ (normal, não mutada). Isto provê um grande apoio ao rol da polimerização de neuroserpinas aberrantes na patogênese de FENIB.

PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE POLÍMEROS

Actualmente há evidência substancial que os polímeros de AAT e de todas as outras serpinas, formam-se por uma união aberrante entre o laço do centro reactivo duma molécula e a lâmina β A da outra^{26, 32, 34, 124-127}. Isto permitiu o desenvolvimento de novas estratégias para atenuar a polimerização e para tratar a doença associada. Amostramos previamente que é possível bloquear a polimerização de AAT Z por meio da união de péptidos do laço reactivo á lâmina β A^{52, 128}. Esses péptidos tinham uma extensão de 11-13 resíduos e se podiam unir a outros membros da superfamília de serpinas^{128, 129}. Isto foi claramente demonstrado pela descoberta de que o péptido do laço reactivo da antitrombina se introduzia fácilmente na lâmina β A da AAT Z vice-versa¹³⁰. Estes péptidos, apesar de serem úteis para estabelecer o mecanismo de polimerização, são muito grandes para serem aptos para um desenho racional de drogas. Mais recentemente desenhamos um péptido 6-mer que se une especificamente com a AAT Z sómente e bloqueia a polimerização⁶³.

Actualmente se desenvolveram péptidos trimeros que podem unir-se com a lâmina β A da antitrombina *in vitro*¹³¹. Agora a nossa aspiração é, de converter esses péptidos em drogas que possam ser usadas *in vivo*.

Uma segunda estratégia dum identificação dum bolso hidrofóbico na AAT que está definido pela linha 2A e as hélices D e E^{29, 132}. A cavidade é aparente na proteína nativa mas enche-se quando a lâmina β A aceita um laço reactivo peptídico exógeno durante a polimerização²⁹. Demonstramos que introduzindo mutações nesse bolso se atraza a polimerização de AAT M e aumenta a secreção de AAT Z num sistema de expressão de ovocitos de *Xenopus*¹³³. Esta cavidade é então um objetivo ideal para o desenvolvimento de drogas que estabilizem a lâmina β A e portanto reduza a formação de polímeros.

Uma estratégia alternativa é utilizar chaperones químicos para estabilizar os intermediários na rota de ceder. Osmolitos como a betaína, o óxido de trimetilamina e a sarcosine estabilizam a AAT contra a formação de polímeros¹³⁴. O chaperon óxido de trimetilamina não teve efeito na secreção de AAT Z ao meio de cultivo⁷⁴ já que favoreceu a conversão de AAT Z desdobrada a polímeros¹³⁵. Pelo contrário, o glicerol aumentou a secreção de AAT Z em linhas celulares⁷⁴ provavelmente porque se une e estabiliza a lâmina β A¹³¹. O 4-fenil butirato (4-PBA) também aumentou a secreção de AAT Z em linhas celulares e ratos transgenéticos⁷⁴. Este agente foi utilizado durante muitos anos para tratar crianças com transtornos no ciclo da uréia e, mais recentemente o 4-PBA demonstrou incrementar a expressão duma proteína mutante (Δ F508) de membrana reguladora em fibrose quística, tanto *in vitro*¹³⁶ como *in vivo*¹³⁷. Estes alentadores descobrimentos levaram-nos á realização dum estudo piloto que actualmente está em curso para avaliar o potencial do 4-PBA para promover a secreção de AAT em pacientes com deficiência de AAT.

CONCLUSÃO

Se delucidaram as bases moleculares da deficiência de AAT Z, mediante estudos bioquímicos, celulares e estruturais. Os objetivos actuais são determinar a resposta celular á polimerização de AAT e desenvolver estratégias terapêuticas para bloquear a polimerização *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio do Conselho de Investigação Médica (Reino Unido), Wellcome Trust, Alpha-1 Foundation e o consórcio Papworth NHS. H. Parfrey es “training fellow” do MRC e receptor da Beca Sackler.

AFILIAÇÕES DOS AUTORES

D. A. Lomas, H. Parfrey. Unidade de Medicina Respiratória. Departamento de Medicina, Universidade de Cambridge, Instituto de Investigações Médicas de Cambridge, Cambridge CB2XY, UK.

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

TRADUÇÃO EM PORTUGUÊS

Amadeu José Ferreira Monteiro: Associação Alfa-1 de Espanha
Correio Electrónico: amadeujfmonteiro@hotmail.com
Colaboração: Elaine Alfonzo, Presidenta, Fundação Alfa-1 de Porto Rico
Correio Electrónico: ealfonzo@alfal.org

Com autorização dos autores e da editorial BMJ Publishing Group

REFERÊNCIAS

- 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 α 1-globulin pattern of serum in α 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 α 1-proteinase inhibitor and α 1-antichymotrypsin. *J Biol Chem* 1980;255:3931-4.
- Carrell RW, Jeppsson J-O, Laurell C-B, et al. Structure and variation of human α 1-antitrypsin. *Nature* 1982;298:329-34.
- Eriksson S. Studies in α 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; 118:585-90.
- 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 α 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: α 1-antitrypsin, α 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, Regoezi 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 α 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 α 1-antitrypsin gene is expressed in a human intestinal epithelial cell line. *J Biol Chem* 1989; 264:9485-90.
- Cichy J, Potempa J, Travis J. Biosynthesis of a 1-proteinase inhibitor by human lung-derived epithelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:8250-5.
- 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 α 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 α 1-antitrypsin at 2.7 Å. *Structure* 1996;4:1181-92.
28. Elliott PR, Abrahams J-P, Lomas DA. Wildtype α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 α 1-proteinase inhibitor, α 1-antichymotrypsin, antithrombin III, α 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 α 1-antitrypsin. *Biochim Biophys Acta* 1976;453:257-61.
41. Jeppsson J-O. Amino acid substitution Glu R Lys in α 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-ZZ) associated with plasma activity deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:1324-8.
43. Blanco I, Ferná'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 unrecognised 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 α 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. Dyaico MJ, Grant SGN, Felts K, et al. Neonatal hepatitis induced by α 1-antitrypsin: a transgenic mouse model. *Science* 1988;242:1409-12.
51. Carlson JA, Barton Rogers B, Sifers RN, et al. Accumulation of PiZ α 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 α 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 α 1-antitrypsin. *J Biol Chem* 1999; 274:9548-55.
54. Sivasothy P, Dafforn TR, Gettins PGW, et al. Pathogenic α 1-antitrypsin polymers are formed by reactive loop- β -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 α 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 α 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 α 1-antitrypsin deficiency variants. *J Biol Chem* 1995; 270:8393-6.
59. Gooptu B, Hazes B, Chang W-SW, et al. Inactive conformation of the serpin α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 secretory protein, α 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 α 1-antitrypsin associated with profound deficiency. *J Clin Invest* 1998; 101:2693-701.
70. Teckman JH, Perlmutter DH. Retention of mutant α 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 α 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 α 1-antitrypsin correlates with liver disease phenotype in homozygous PiZZ α 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 α 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 α 1-antitrypsin (α 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 α 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. α 1-antitrypsin-deficient variant Siiyama (Ser53[TCC] to Phe53[TTC]) is prevalent in Japan. Status of α 1-antitrypsin deficiency in Japan. *Am Rev Respir Dis* 1995; 152:2119-26.
78. Matsunaga E, Shiokawa S, Nakamura H, et al. Molecular analysis of the gene of the α 1-antitrypsin deficiency variant, Mnichinan. *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 α 1-antitrypsin molecule (M-like α 1-antitrypsin deficiency). *Lab Invest* 1994;70:130-3.
80. Lomas DA, Finch JT, Seyama K, et al. α 1-antitrypsin Siiyama (Ser530Phe); 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 α 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 α 1-antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest* 1999;103:999-1006.
84. Cruz M, Molina JA, Pedrola D, et al. Cirrhosis and heterozygous α 1-antitrypsin deficiency in a 4 year old girl. *Helv Paediatr Acta* 1975;30:501-7.
85. Campra 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 α 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 α 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 α 1-antitrypsin is less competent than M1-type α 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 α 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 α 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 α 1-antitrypsin activity in rat lung. *Science* 1979;206:1313-4.
94. Elliott PR, Bilton D, Lomas DA. Lung polymers in Z α 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 α 1-proteinase inhibitor deficiency or chronic obstructive bronchitis: antilastase 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 α 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 α 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 α 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. α 1-antitrypsin deficiency-associated panniculitis. Resolution with intravenous α 1-antitrypsin administration and liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63:480-2.
103. Colp C, Pappas J, Moran D, et al. Variants of α 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, α 1-antitrypsin and proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: a comparison between α 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. α 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. α 1-antitrypsin deficiency in intracranial aneurysms and cervical artery dissection. *Lancet* 1994;343:452-3.
110. Cox DW. α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 α 1-proteinase inhibitor probed by limited proteolysis. *Biochemistry* 1992; 31:2720-8.
126. Huntington JA, Pannu NS, Hazes B, et al. A 2.6 \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 \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 glycereol. *J Biol Chem* 2003; 278:15116-22.
132. Lee C, Maeng J-S, Kocher J-P, et al. Cavities of α 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 α 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 α 1-antitrypsin (α 1-AT) with trimethylamine N-oxide. Implications for the treatment of α 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 α 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.