

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mila V. Ljujić

STRUKTURNA I FUNKCIONALNA
ANALIZA GENA ZA ALFA-1-ANTITRIPSIN
U BOLESTIMA PLUĆA ČOVEKA

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mila V. Ljujić

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
ANALYSIS OF ALPHA-1-ANTITRYPSIN
GENE IN HUMAN LUNG DISEASES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTOR:

dr **Dragica Radojković**, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za
molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr **Gordana Matić**, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA:

dr **Dragica Radojković**, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za
molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr **Gordana Matić**, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr **Aleksandra Divac**, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za
molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr **Aleksandra Topić**, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom dr Dragice Radojković koja je bila mentor ovog rada i kojoj zahvaljujem na ukazanom poverenju još od početka rada na Institutu, dragocenim savetima i kritičkoj oceni ovog rada.

Dr Gordani Matić hvala na značajnoj podršci tokom doktorskih studija i prilikom realizacije ove teze.

Dr Aleksandri Divac zahvaljujem na energiji i trudu koji je uložila u realizaciju ove teze, na svemu što me je naučila i što je radila sa mnom i za mene.

Dr Aleksandri Topić hvala na korisnim diskusijama i savetima tokom naše saradnje.

Dr Snežani Kojić hvala na angažovanju u eksperimentalnom radu i savetima tokom izrade ove teze.

Dr Eleni Mirandi Banos sa Univerziteta u Rimu hvala na nesebičnoj pomoći i savetima zahvaljujući kojima je realizovan deo eksperimenata u okviru ove teze.

Dr Aleksandri Nikolić hvala na najlepšem uvodu u laboratorijski rad, na ogromnoj količini podrške koju mi pruža i na tome što je uvek glas razuma.

Dragim kolegama iz laba Ljilji, Jeleni, Mariji, Đorđu, Jovani i Sandri, kao i novoj nadi lab03 Aleksandri V. zahvaljujem na podršci i pomoći prilikom izvođenja ove teze.

Mojoj dragoj 'petak popodne' ekipi - Vanji, Ivi, Aleki i Branku hvala na inspirativnim diskusijama i pozitivnoj energiji koju unose u svakodnevni laboratorijski život.

Neizmernu zahvalnost dugujem i Aleksandru Krstiću na svim savetima i pomoći u toku rada na ovoj tezi.

Dr Nataši Petrović Stanojević hvala na divnoj saradnji tokom svih ovih godina.

Mojoj porodici hvala na svemu što su činili i čine za mene.

Strukturna i funkcionalna analiza gena za alfa-1-antitripsin u bolestima pluća čoveka

REZIME:

Alfa-1-antitripsin je inhibitor serin proteaza čija je osnovna biološka funkcija inhibicija elastaze neutrofila – enzima koji učestvuje u degradaciji elastina i koji dovodi do oštećenja tkiva pluća. Deficijencija i disfunkcija alfa-1-antitripsina leže u osnovi više oboljenja od kojih su najčešći emfizem pluća i oboljenja jetre, a mogu predstavljati i faktor rizika za nastanak karcinoma pluća. Ovaj rad je imao za cilj da ispita postojanje strukturnih promena u kodirajućim egzonima gena za alfa-1-antitripsin kod ispitanika sa emfizemom pluća i kod ispitanika sa karcinomom pluća, kao i da istraži funkcionalne posledice otkrivenih promena i njihov eventualni značaj u nastanku i razvoju bolesti.

Strukturnom analizom gena za alfa-1-antitripsin DGGE metodom i DNK sekvenciranjem detektovano je prisustvo deficijentnih varijanti Z, S i Mmalton, kao i dve nove varijante označene kao G320R i V321F.

Elektroforezom u denaturišućem poliakrilamidnom gelu uočeno je da varijante G320R i V321F migriraju brže u odnosu na WT varijantu, a analizom u denaturišućem poliakrilamidnom gelu sa 5M ureom pokazano je da ove varijante verovatno imaju smanjenu hidrofobnost u odnosu na WT varijantu. Analizom formiranih kompleksa između alfa-1-antitripsina i elastaze pankreasa u SDS gelovima, utvrđeno je da se inhibitorna aktivnost ispitivanih varijanti ne razlikuje od inhibitorne aktivnosti WT varijante proteina.

Nativna elektroforeza preparata alfa-1-antitripsina inkubiranih na različitim temperaturama pokazala je da mutirane varijante proteina imaju blago smanjenu termostabilnost u odnosu na WT protein, a elektroforeza proteina eksprimiranih u COS7 ćelijskoj liniji pokazala je da varijante G320R i V321F pod fiziološkim uslovima ne formiraju polimere. Metodom imunofluorescencije na tranzijentno transfekovanim COS7 ćelijama pokazano je da su varijante G320R i V321F, kao i WT protein, lokalizovane u Goldžijevom aparatu i da se ne zadržavaju u endoplazmatičnom retikulumu.

Rezultati ovog rada potvrđuju pretpostavku da su retke varijante alfa-1-antitripsina verovatno zastupljenije nego što se pretpostavlja i ukazuju na to da su metode genotipizacije neophodne u pravilnoj detekciji ali i u proceni učestalosti varijanti alfa-1-antitripsina. Rezultati funkcionalne analize varijanti G320R i V321F ukazuju na to da ove dve novootkrivene varijante nemaju uticaja na funkciju proteina, ali je prisutan efekat na strukturu proteina. Funkcionalna analiza varijanti G320R i V321F alfa-1-antitripsina predstavlja prve podatke o funkcionalnoj analizi ovog regiona u proteinu.

KLJUČNE REČI: Alfa-1-antitripsin, emfizem pluća, karcinom pluća, retke varijante, G320R, V321F, inhibitorna aktivnost, polimerizacija, termostabilnost

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija

UDK BROJ: 616.24-007.63 + 616.24-006 (043.3)

575.22 : 575.224.2 (043.3)

Structural and functional analysis of alpha-1-antitrypsin gene in human lung diseases

SUMMARY

Alpha-1-antitrypsin is a serine protease inhibitor whose main biological function is inhibition of neutrophil elastase – enzyme capable of digestion of elastin and involved in lung tissue destruction. Deficiency and dysfunction of alpha-1-antitrypsin is associated with emphysema and liver disease, and can represent a risk factor for development of lung cancer. The objective of this work was to perform structural analysis of alpha-1-antitrypsin gene in subjects with emphysema and lung cancer, as well as to perform functional analysis of discovered variants in order to estimate their role in disease development.

Structural analysis of alpha-1-antitrypsin gene, using DGGE and DNA sequencing, revealed presence of deficient variants Z, S and Mmalton, as well as two novel variants – G320R and V321F.

Denaturing PAGE analysis showed that variants G320R and V321F exhibited increased gel mobility compared to WT variant, and electrophoresis in the presence of 5M urea showed that these variants effected the protein structure, probably by changing its hydrophobicity. Nondenaturing electrophoresis of heat treated proteins showed that both variants had slightly decreased thermostability when compared to WT variant and non-denaturing PAGE of COS7 expressed proteins showed that these variants did not form polymers under physiological conditions.

Inhibitory activity of variants G320R and V321F, determined by analysis of SDS-PAGE resistant complexes between alpha-1-antitrypsin and porcine pancreas elastase, was same as in WT variant.

Immunofluorescence of transiently transfected COS7 cell line showed that variants G320R and V321F, as well as WT protein, were predominantly localized at Golgi apparatus indicating that they are not retained in endoplasmic reticulum.

Results of this study indicate that rare alpha-1-antitrypsin variants are probably more frequent than it is assumed and highlight the need for use of genotyping methods in detection of alpha-1-antitrypsin variants. Results of functional analysis of novel variants G320R and V321F showed that although the effect on the protein structure was present, their functional activity was not impaired. Functional analysis of G320R and V321F variants is the first functional study of this region of alpha-1-antitrypsin.

KEY WORDS: Alpha-1-antitrypsin, emphysema, lung cancer, rare variants, G320R, V321F, inhibitory activity, polymerization, thermostability

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology

UDC NUMBER: 616.24-007.63 + 616.24-006 (043.3)

575.22 : 575.224.2 (043.3)

SKRAĆENICE:

AAT	alfa-1-antitripsin
AGT	angiotenzinogen
CBG	kortikosteroid vezujući globulin
CFTR	eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
DGGE	elektroforeza u gelu sa gradijentom denaturišućih agenasa (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
FEV1	forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi
FVC	eng. Forced Vital Capacity
GFP	zeleni fluorescentni protein (eng. Green Fluorescent Protein)
HNF	eng. Hepatocyte Nuclear Factors
HRP	peroksidaza biljke ren (eng. Horseradish Peroxidase)
IEF	izoelektrično fokusiranje
IL6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
LTB4	leukotrijen B4
NFκB	nuklearni faktor κB
NOD	eng. Non-Obese Diabetic
NSCLC	nesitnoćelijski karcinom pluća (eng. Non-Small-Cell Lung Carcinoma)

PAGE	eng. Polyacrilamide Gel Electrophoresis
PCR	lančana reakcija umnožavanja polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction)
PDB	eng. Protein Data Bank
Pi	inhibitor proteaza
RCL	mobilna reaktivna petlja (eng. Reactive Centre Loop)
SCLC	sitnoćelijski karcinom pluća (eng. Small-Cell Lung Carcinoma)
SDS	natrijum dodecil sulfat (eng. Sodium Dodecyle Sulfate)
SERPIN	inhibitor serin proteaza (eng. Serine Protease Inhibitor)
SI	stehiometrija inhibicije
TBG	tiroksin vezujući globilin
VEGF	eng. Vascular Endothelial Growth Factor
WT	eng. Wild Type

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1. 1.	Familija serpin proteina	1
1. 1. 1.	Struktura i konformacija serpin proteina	2
1. 1. 2.	Konformaciona stanja serpin proteina	3
1. 2.	Struktura i funkcija alfa-1-antitripsina	6
1. 3.	Gen za alfa-1-antitripsin i regulacija njegove ekspresije	10
1. 4.	Fiziološka uloga alfa-1-antitripsina	12
1. 4. 1.	Nove biološke uloge alfa-1-antitripsina	14
1. 5.	Varijante alfa-1-antitripsina	16
1. 6.	Alfa-1-antitripsin i bolesti jetre	22
1. 7.	Deficijencija alfa-1-antitripsina i emfizem	24
1. 8.	Alfa-1-antitripsin i karcinom pluća	28
2.	CILJ	30
3.	MATERIJAL I METODE	31
3. 1	Ispitanici	31
3. 2.	Materijal	31
3. 2. 1	Uzorci periferne krvi	31
3. 2. 2.	Vektori	31
3. 2. 3.	Bakterijski sojevi	34
3. 2. 4.	Ćelijske linije	34
3. 2. 5.	Oligonukleotidi	34
3. 2. 6.	Antitela	35
3. 3.	Metode	36
3. 3. 1.	Izolacija DNK iz periferne krvi	36
3. 3. 2.	Elektroforeza DNK u gelu od agaroze	36
3. 3. 3.	Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)	37

3. 3. 4.	Elektroforeza u gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa (DGGE)	39
3. 3. 5.	Bojenje DNK u gelu od poliakrilamida srebro-nitratom	40
3. 3. 6.	Prečišćavanje DNK fragmenata	40
3. 3. 7.	Sekvenciranje DNK	41
3. 3. 8.	Izolacija RNK	42
3. 3. 9.	Sinteza cDNK	42
3. 3. 10.	Ligacija	44
3. 3. 11.	Mutageneza	45
3. 3. 12.	Kultivacija bakterija	47
3. 3. 13.	Priprema kompetentnih ćelija za transformaciju toplotnim šokom	47
3. 3. 14.	Transformacija bakterija toplotnim šokom	47
3. 3. 15.	Izolacija plazmidne DNK	48
3. 3. 16.	Prečišćavanje DNK fragmenata iz gela od agaroze	48
3. 3. 17.	Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi	49
3. 3. 18.	Indukcija ekspresije rekombinantnog alfa-1-antitripsina	50
3. 3. 19.	Prečišćavanje rekombinantnog proteina	50
3. 3. 20.	Elektroforeza proteina u denaturišućem poliakrilamidnom gelu	51
3. 3. 21.	Koncentrovanje proteina i izmena pufera	52
3. 3. 22.	Prenos proteina na membranu	52
3. 3. 23.	Western blot analiza	53
3. 3. 24.	Određivanje inhibitorne aktivnosti alfa-1-antitripsina	53
3. 3. 25.	Termalna denaturacija alfa-1-antitripsina	54
3. 3. 26.	Kultivacija ćelijskih linija	55
3. 3. 27.	Elektroforeza proteina u nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima	55
3. 3. 28.	Tranzijentna transfekcija CO7 ćelijske linije	55
3. 3. 29.	Imunofluorescencija	56
3. 3. 30.	Kompjuterska predikcija uticaja mutacija na protein	57
4.	REZULTATI	58

4. 1.	Ispitanici	58
4. 2.	Strukturna analiza gena za alfa-1-antitripsin	61
4. 2. 1.	Analiza egzona gena za alfa-1-antitripsin DGGE metodom	61
4. 2. 2.	Analiza egzona gena za alfa-1-antitripsin DNK sekvenciranjem	65
4. 3.	Kompjuterska predikcija uticaja mutacija na protein	71
4. 4.	Konstrukcija ekspresionih vektora	72
4. 5.	Ekspresija i izolacija proteina	74
4. 6.	Inhibitorna aktivnost rekombinantnog alfa-1-antitripsina	77
4. 7.	Termalna denaturacija alfa-1-antitripsina	80
4. 8.	Detekcija formiranja polimera proteina na nedenedurirajućim poliakrilamidnim gelovima	82
4. 9.	Imunofluorescencija	84
5.	DISKUSIJA	86
5. 1.	Strukturna analiza gena za alfa-1-antitripsin	86
5. 2.	Funkcionalna analiza varijanti G320R i V321F alfa-1-antitripsina	95
5. 2. 1.	Analiza migracije proteina u denaturirajućim poliakrilamidnim gelovima	96
5. 2. 2.	Inhibitorna aktivnost novootkrivenih varijanti alfa-1-antitripsina	97
5. 2. 3.	Formiranje polimera i unutarćelijska lokalizacija	100
6.	ZAKLJUČCI	104
7.	LITERATURA	106

1. UVOD

Alfa-1-antitripsin (AAT) je jednolančani glikoprotein koji pripada superfamiliji serpin proteina - inhibitora serin proteaza (eng. serine protease inhibitors - serpin). Predstavlja najzastupljeniji serpin molekul u plazmi, a često se smatra i arhetipskim predstavnikom ove familije proteina, pa se označava i samo kao proteazni inhibitor (Pi) (Chappell, 2004). Njegova osnovna fiziološka uloga je zaštita donjih delova respiratornog trakta od destruktivnog dejstva elastaze neutrofila koja je njegov primarni ciljni molekul (Crystal, 1990).

Do sada je poznato više od 100 varijanti alfa-1-antitripsina, od kojih je za oko 20 dokazana povezanost sa bolestima pluća i jetre čoveka (Crystal, 1990). Promene u genu za alfa-1-antitripsin koje utiču na koncentraciju i funkciju proteina dovode do neadekvatne zaštite tkiva pluća od dejstva elastaze neutrofila i predstavljaju rizik za nastanak emfizema pluća. Oštećenja tkiva pluća usled prekomernog dejstva elastaze neutrofila predstavlja i pogodnu sredinu za nastanak i razvoj karcinoma pluća (Sun, 2004). Određene varijante alfa-1-antitripsina su sklone formiranju polimera što može dovesti do oštećenja jetre (Carrell, 2002).

1. 1. Familija serpin proteina

Serpin proteini, kojima pripada i alfa-1-antitripsin, su široko rasprostranjeni među eukariotima, pronađeni su kod biljaka, arhea, nematoda, artropoda, viših životinja kao i kod virusa (Krem, 2003) i imaju važnu ulogu u regulaciji enzima uključenih u proteolitičku kaskadu.

Iako termin serpin predstavlja akronim koji opisuje funkcionalno svojstvo velikog broja članova ove superfamilije, njima pripadaju i proteini koji nemaju proteaznu aktivnost ali dele strukturnu sličnost sa ostalim članovima ove familije, kao i neki proteini koji su inhibitori cistein proteaza. Sedam od ukupno 34 humanih serpin molekula je neinhibitorno. U ovu grupu spadaju hormon vezujući serpini – kortikosteroid vezujući globulin (CBG) i

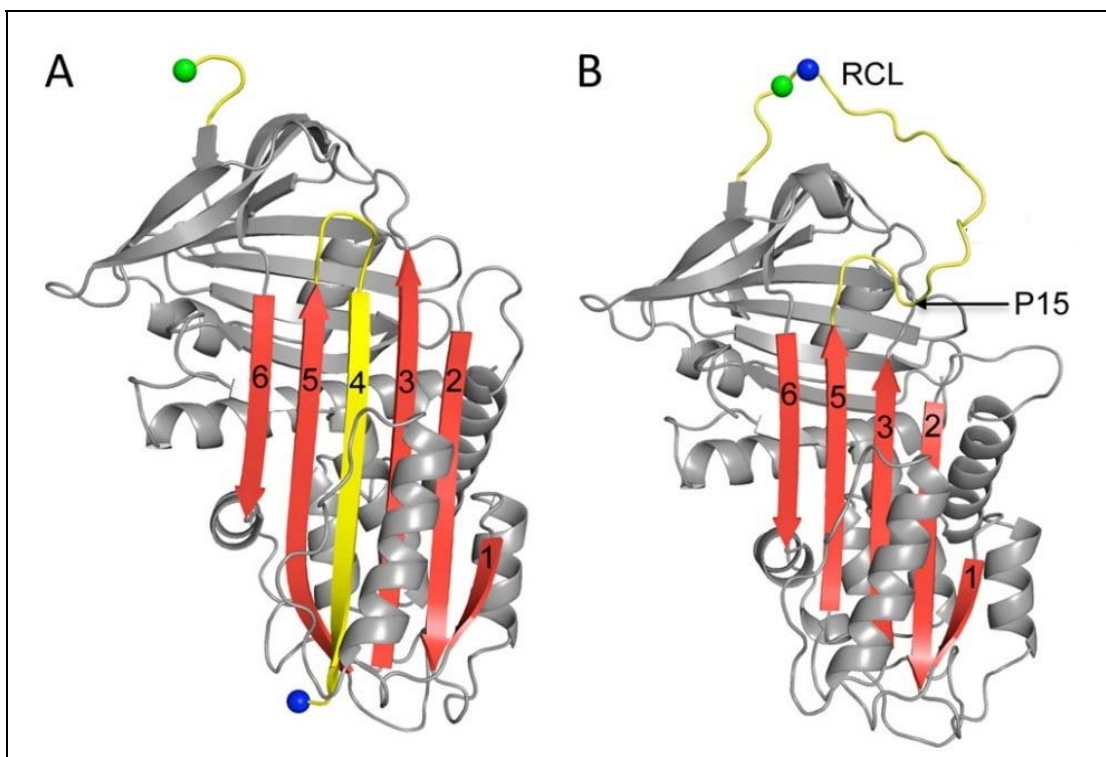
tiroksin vezujući globilin (TBG); hormon prekursor angiotenzinogen (AGT), tumor supresor maspin, anti-angiogeni faktor PEDF i dva kolagen šaperona – CBP-1 i CBP-2.

Svi do sada opisani serpin proteini svrstani su u 16 klasa označenih od A do P, sa 10 neklasifikovanih 'orphan' serpina (Gettins, 2002). Članovi unutar jedne klade označavaju se brojevima. Alfa-1-antitripsin je prvi član klase A tako da se označava i kao SERPINA1.

1. 1. 1. Struktura i konformacije serpin proteina

Članove serpin familije odlikuje više od 30% homologije u sekvenci i očuvanost tercijarne strukture (Lomas, 2002). Osnovu strukture članova serpin familije odlikuje prisustvo domena koji čine tri β naborane ploče i 8-9 α heliksa kao i set neobičnih strukturnih i funkcionalnih svojstava koji su posledica prisustva ovog domena.

Glavna β naborana ploča je ploča A i ona je ujedno najveća od 3 ploče, a sastavljena je od 5 traka. Prvu traku čini 5-6 rezidua dok su ostale trake dužine 12-15 rezidua. Dve centralne trake (s3A i s5A) u β ploči A zauzimaju tipičnu paralelnu strukturu, a ploča postaje potpuno antiparalelna tek insercijom reaktivne petlje između ove dve trake (s4A). Insercijom reaktivne petlje unutar β ploče A se postiže potpuna antiparalelnost i dobija forma sa 6 traka (Slika 1). U odnosu na ravan koju čini β ploča A svi alfa heliksi, osim heliksa F, se nalaze iza ploče A. Heliks F se prostire ispred ploče A i ima ulogu u kontroli otvaranja ploče i stabilizaciji konformacije (Baek, 2007).



Slika 1. Struktura sečene (A) i nativne (B) forme alfa-1-antitripsina. Mobilna reaktivna petlja (reactive centre loop – RCL) je obeležena žutom bojom, β ploča A je obeležena crvenom bojom (trake su numerisane brojevima od 1 do 6). Proteaza seče reaktivnu petlju serpina između aminokiselina P1 (plava boja) i P1' (zeleno boja). U nativnoj formi alfa-1-antitripsina (B) reaktivna petlja je izložena, a β ploča ima 5 traka u β ploči A dok se u sečenoj formi reaktivna petlja ubacuje u β ploču A kao traka broj 4. Aminokiselina označena kao P15 je prva koja se inkorporira u β ploču nakon proteolitičkog sečenja (slika modificirana iz reference Yamasaki, 2010)

1. 1. 2. Konformaciona stanja serpin proteina

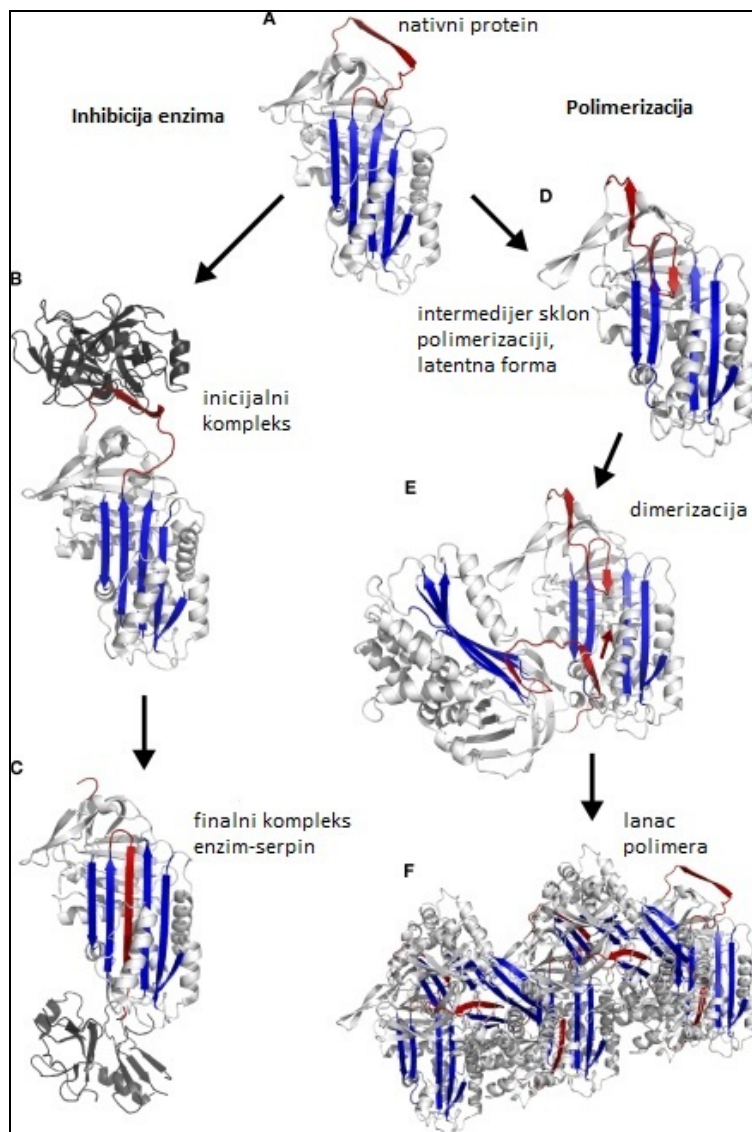
Normalno funkcionisanje serpin proteina sa inhibitornom funkcijom zahteva visok stepen konformacione fleksibilnosti. Serpin proteini se mogu naći u pet konformacionih stanja – nativnom, isečenom, latentnom, δ , i u vidu polimera (Slika 2). Ova konformaciona stanja se prvenstveno razlikuju u strukturi reaktivne petlje (Whisstock, 1998).

U nativnom stanju reaktivna petlja je solubilna i nalazi se izložena u produžetku strukture koju čini β ploča proteina. Na ovaj nači petlja predstavlja mamac-supstrat za ciljnu proteazu. Nativna forma serpin proteina nije istovremeno i njihova termodinamički najstabilnija forma već predstavlja metastabilno stanje.

Po formiranju kompleksa sa ciljnom proteazom dolazi do raskidanja veze u aktivnom mestu antiproteaze od strane proteaze. Prva kristalna struktura serpin proteina je bila određena za alfa-1-antitripsin nakon proteolitičkog tretmana himotripsinom (Loebermann, 1984) pri čemu je utvrđeno da su dve rezidue koje čine aktivno mesto proteina (P1- P1') međusobno udaljene 70Å. Nakon interakcije sa proteazom reaktivna petlja se ubacuje u β ploču A čime se formira ireverzibilni enzim-inhibitor kompleks a reaktivna petlja na taj način formira dodatnu traku unutar β ploče (Stein, 1991; Whisstock, 2000b). Ova konformaciona promena je poznata kao “loop sheet insertion” i praćena je prelazom metastabilne nativne strukture u stabilniju konformaciju (Yamasaki, 2010). Ovaj prelaz iz nativne u isećenu formu oznaćava se i kao “stressed to relaxed” (S→R) prelaz (Carrell, 1985).

U latentnom stanju reaktivno mesto proteina je intaktno ali je reaktivna petlja ubaćena u β ploču A kao u isećenoj formi, što je oznaćeno kao alternativno R stanje. Latentna konformacija se moće formirati i inkorporacijom egzogenog peptida aminokiselinske sekvence slične aminokiselinskoj sekvenci reaktivne petlje (Huntington, 2006).

Kod varijante alfa-1antihimotripsina sa mutacijom Leu55Pro opisana je δ struktura u kojoj je reaktivna petlja delimićno ubaćena u β ploču A i predstavlja intermedijerno stanje između nativne i latentne forme (Gooptu, 2000).

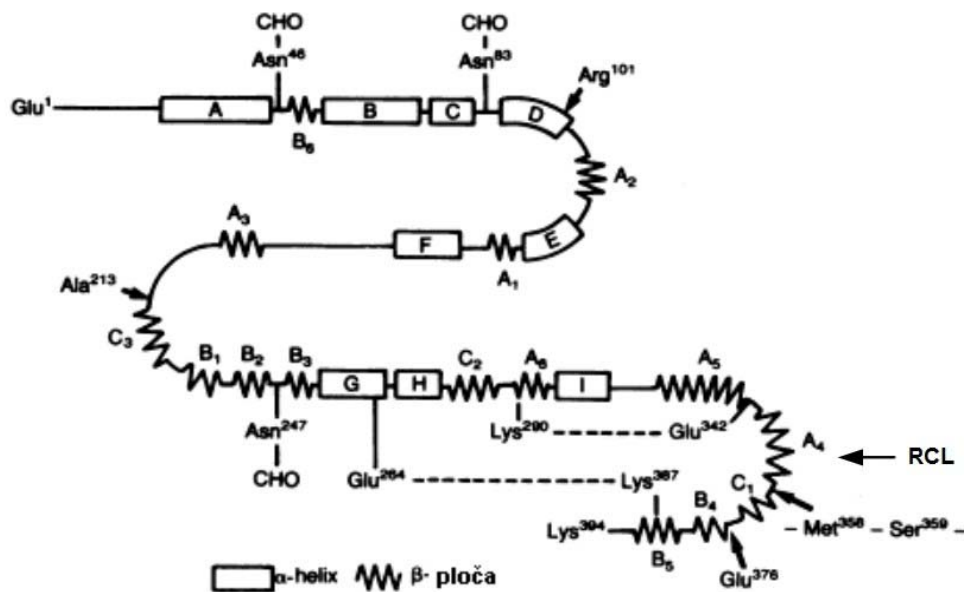


Slika 2. Konformaciona stanja alfa-1-antitripsina. Reaktivna petlja alfa-1-antitripsina (crveno) se vezuje za elastazu neutrofila (tamno sivo) što dovodi do raskidanja veze u aktivnom mestu alfa-1-antitripsina i konformacione promene koja prebacuje enzim sa vrha u osnovu proteina (C). Ovo je vezano sa insercijom reaktivne petlje alfa-1-antitripsina kao dodatne trake u β ploču A (plavo) i inaktivacijom proteaze. Tačkaste mutacije menjaju ovaj mehanizam što dovodi do konformacione tranzicije (D) i formiranja polimera (E i F) (slika modifikovana iz reference Gooptu, 2008)

Insercija reaktivne petlje u β ploču A koja je neophodna za efikasnost antiproteinaza ujedno ih čini i podložnim konformacionim promenama koje uzrokuju bolesti označene kao serpinopatije. Konformaciona promena je ključna pri interakciji sa proteazom i čini protein podložnim mutacijama koje omogućavaju inserciju reaktivnog centra jednog molekula u β ploču drugog molekula pri čemu dolazi do stvaranja polimera. Svi članovi familije serpina odlikuju se sličnom proteinskom strukturom naročito u mobilnim delovima molekula, a najčešći razlog gubitka funkcije su upravo mutacije koje pogađaju ove regione molekula. Posledice mogu biti gubitak funkcije molekula što se odražava na fiziološku ulogu svakog od serpina: mutacije u antitrombinu dovode do pojave tromboza, u inhibitoru proteina C1 su povezane sa angioedemima, a u antiplazminu sa hemoragijama (Carrell, 2002). Pored toga ove mutacije mogu dovesti ili do spontane promene u konformaciji koja omogućava inserciju intaktne reaktivne petlje u glavnu β ploču i rezultira u formiranju inaktivne latentne forme, ili do insercije reaktivne petlje jednog molekula u β ploču drugog što rezultuje formiranjem polimera. Ovaj mehanizam polimerizacije je označen kao 'loop-sheet' mehanizam i leži u osnovi formiranja hepatičnih inkluzija kod osoba sa Z formom alfa-1-antitripsina i deficijencije alfa-1-antitripsina.

1. 2. Struktura i funkcija alfa-1-antitripsina

Alfa-1-antitripsin je jednolančani glikoprotein dužine 394 aminokiselina. Njegova struktura predstavlja tipičnu strukturu serpin proteina i on se smatra arhetipskim predstavnikom ove familije proteina. Strukturu alfa-1-antitripsina čini 9 α heliksa (A-I) i 3 β naborane ploče koju čine paralelne i antiparalelne trake (ploča A trake 1-6, ploča B trake 1-6 i ploča C trake 1-3) (Slika 3) (Crystal, 1990).



Slika 3. Shematski prikaz strukture AAT proteina. Protein je prikazan u linearnoj formi, mesta glikozilacije su Asn⁴⁶, Asn⁸³ i Asn²⁴⁷. Struktura proteina je determinisana prisustvom 9 α heliksa i 3 β ploče. Na slici su prikazane i aminokiseline na pozicijama 101, 213 i 376 koje učestvuju u deteminaciji uobičajenih M alela i položaj mobilne reaktivne petlje (RCL) (slika modifikovana iz reference Crystal, 1990)

Alfa-1-antitripsin podleže posttranslacionoj glikozilaciji u endoplazmatičnom retikulumu na tri asparaginska ostatka (Asn⁴⁶, Asn⁸³ i Asn²⁴⁷) dajući protein od 52kD koji se luči u plazmu. Tokom sinteze molekul zauzima sferoidan oblik (globularnu formu). Poluživot alfa-1-antitripsina u plazmi iznosi 4-5 dana i zavisi od ugljenohidratnih bočnih lanaca. Neglikozilovani polipeptidi nestaju iz cirkulacije u roku od nekoliko sati, dok delecija samo jednog bočnog lanca znatno umanjuje poluživot (Satoh, 1988). Glikozilacija u slučaju inhibitornih serpin molekula, kakav je i alfa-1-antitripsin, nema ulogu u stabilizaciji nativnog stanja proteina, ali ga čini otpornijim na degradaciju proteazama i tako produžava poluživot (Sarkar, 2011).

Na C terminalnom kraju alfa-1-antitripsina se nalazi izložena mobilna petlja sa reaktivnim centrom (eng. reactive centre loop – RCL) koji čini peptidna veza Met³⁵⁸ - Ser³⁵⁹ kodirana egzonom 5. Tri ugljenohidratna bočna lanca i aktivno mesto se nalaze na suprotnim krajevima molekula. Met³⁵⁸ lociran na izloženoj petlji molekula formira mamac za elastazu neutrofila, a peptidna veza Met³⁵⁸ - Ser³⁵⁹ precizno odgovara njenom aktivnom centru i na taj način se alfa-1-antitripsin ponaša kao idealan supstrat za elastazu. Rezidue koje čine reaktivno mesto se označavaju i kao P1 i P1' a ostale rezidue u reaktivnoj petlji se u odnosu na njih označavaju prim obeleženim bojevima (P') ukoliko su na C terminusu i neobebeženim brojevima (P) ukoliko su na N terminusu proteina (Schechter, 1967). Reaktivnu petlju alfa-1-antitripsina čine aminokiseline P17–P4' (Irving, 2000). Nakon vezivanja proteaze reaktivna petlja se ubacuje u β ploču A čime se formira stabilan kompleks između alfa-1-antitripsina i proteaze (Huntington, 2000).

Za postizanje konformacione promene neophodne za inhibitornu funkciju alfa-1-antitripsina važni su sledeći regioni proteina:

- deo koji čine aminokiseline P15-P9 u mobilnoj reaktivnoj petlji (Hopkins, 1993) i koji obezbeđuje mobilnost neophodnu pri prelazu iz S u R stanje, označen kao 'hinge' region.
- region lociran na vrhu β ploče A koji je mesto inicijalne insercije reaktivne petlje u β ploču označen kao 'breach' region, uključuje vrhove traka s3A, s5A, s2B, s3B i s4B (Whistock, 2000b).
- region označen kao 'shutter' region je hidrofobni region lociran ispod ploče A i odgovoran je za kontrolu otvaranja ploče A. Ovaj region čine deo trake s6B, vrh heliksa B, središnji delovi traka s5A i s3A (Whistock, 2000b) i on je visoko konzerviran kod serpin proteina.

Regioni 'breach' i 'shutter' omogućavaju otvaranje β ploče A i prihvatanje 'hinge' regiona reaktivne petlje, što dovodi do translokacije proteaze sa jednog kraja molekula na drugi (Whistock, 2000a). Različite biohemijske (Wright, 1995; Huntington, 1997) i

strukturne (Aertgeerts, 1995; Lukacs, 1996) studije ukazuju da je brzina kojom se petlja ubacuje u ploču od kritičnog značaja za inhibitornu funkciju alfa-1-antitripsina.

Na važnost ovih regiona u modulaciji i kontroli tokom konformacione promene pri interakciji sa proteazom ukazuju i posledice prisustva mutacija u ovom regionu. Mutacije Siiyama i Mmalton koje su locirane u traci s6B na početku heliksa B (deo 'shutter' regiona) menjaju fleksibilnost ploče A čime olakšavaju formiranje polimera. Mutacija Siiyama (Ser53Phe) usled razlike u veličini između originalne i mutirane aminokiseline dovodi do otvaranja β ploče A što kao posledicu ima polimerizaciju. S druge strane, delecija fenilalanina prisuna kod Mmalton (Phe52 del) mutacije rezultuje zatvaranjem ploče (Jung, 2004) i spontanom prelaskom molekula u latentno stanje.

Za pravilnu strukturu molekula alfa-1-antitripsina veoma su važne dve unutrašnje elektrostatičke interakcije Glu³⁴²-Lys²⁹⁰ i Glu²⁶⁴-Lys³⁸⁷, pa stoga njihovo narušavanje igra značajnu ulogu u patogenezi čestih deficijentnih stanja, kao što je to u slučaju varijanti Z (Glu342Lys) i S (Glu264Val). Glu342 lociran na vrhu β ploče A, u osnovi reaktivne mobilne petlje (P17), formira elektrostatičku interakciju sa Lys290. Prisustvo Z mutacije uklanja ovu interakciju što dovodi do otvaranja β ploče i čini protein prijemčivijim za reaktivnu petlju drugog molekula (Lomas, 1993a). Mutacija S (Glu264Val) dovodi do gubitka intramolekulske veze sa Lys387 koja je važna u terciarnoj strukturi proteina, i ima posledice na konformacionu stabilnost molekula.

Alfa-1-antitripsin ima afinitet prema velikom broju proteaza, uključujući i katepsin G, trombin, plazmin i elastazu pankreasa. Najveći afinitet ima prema elastazi neutrofila (Beatty, 1980) tako da se ona smatra njegovim primarnim ciljnim molekulom. Osnovna i najbolje izučena fiziološka uloga alfa-1-antitripsina je zaštita donjih delova respiratornog trakta od destruktivnog dejstva elastaze neutrofila (Crystal, 1990). Novija istraživanja pokazuju da alfa-1-antitripsin ima inhibitornu aktivnost i prema kaspazama (Petrache, 2006a; Lockett, 2012) kao i niz novih bioloških funkcija (Petrache, 2006b; Zhang, 2007; Ikebe, 2000).

1. 3. Gen za alfa-1-antitripsin i regulacija njegove ekspresije

Gen za alfa-1-antitripsin se nalazi u okviru klastera gena na hromozomu 14q32.1 koji čini 11 gena za serpin proteine (Zhao, 2007). Gen za alfa-1-antitripsin je dugačak 12.2 kb i organizovan je u 7 egzona i 6 introna. Egzoni označeni kao IA, IB i IC su regulatorni i imaju različitu ulogu u različitim ćelijama koje eksprimiraju AAT, dok egzoni II-V kodiraju protein.

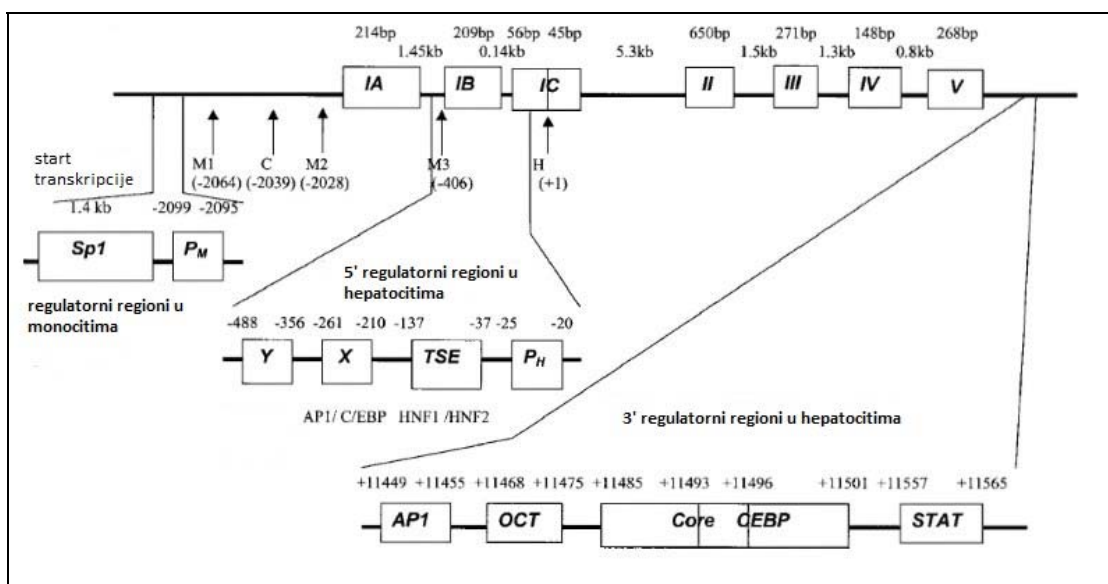
Glavno mesto sinteze alfa-1-antitripsina su hepatociti i informaciona RNK za alfa-1-antitripsin predstavlja nazastupljeniji transkript u hepatocitima (Marsden, 2003). Ekspresija alfa-1-antitripsina je u manjoj meri prisutna i u ekstrahepatičnim tkivima kao što su monociti (Mornex, 1986), bronhijalne epitelne ćelije i alveolarne epitelne ćelije (Sallenave, 1997), intestinalnim epitelnim ćelijama (Perlmutter, 1989), kao i u ćelijama rožnjače (Twining, 1994). Procenjuje se da u bazalnim uslovima monociti proizvode otprilike 1% ukupne količine alfa-1-antitripsina (Rogers, 1983).

Promotori i mesta početka transkripcije gena za alfa-1-antitripsin se razlikuju za hepatocite i ekstrahepatična tkiva. U hepatocitima region od 500bp uzvodno od promotora sadrži najmanje tri regulatorna elementa (Kalsheker, 2002). Tkivno specifični element se nalazi na poziciji -137 do -37 uzvodno od starta transkripcije i predstavlja dominantan region u regulaciji ekspresije alfa-1-antitripsina u hepatocitima (De Simone, 1987). Region označen kao X domen nalazi se na poziciji -261 do -210 i njegova delecija smanjuje ekspresiju za oko 4 puta (De Simone, 1987). U okviru ovog regiona se nalazi oktamera sekvenca TGTGGTTT na poziciji -232 do -225 koja odgovara kanonskoj sekvenci enhancer elementa. Y domen se nalazi između nukleotida -488 i -356. Bazalna ekspresija alfa-1-antitripsina u hepatocitima je regulisana tkivno specifičnim transkripcionim faktorima HNF 1 α i HNF4 (HNF - hepatocyte nuclear factors). 1.2kb nizvodno od egzona 5 AAT gena nalazi se 3' enhanser element dugačak oko 100bp. U okviru ovog regiona nalaze se vezujuća mesta za proteine AP1, OCT, STAT i C/EBP (Morgan, 1997).

Promotor koji je aktivan u monocitima je lociran oko 2000bp uzvodno od promotora koji je aktivan u hepatocitima (Perlino, 1987). Postoje tri potencijalna starta transkripcije u

monocitima označena kao M1, M2 i M3 (Slika 4) od kojih nastaju transkripti dužine 2.0, 1.95 i 1.8 kb. Hepatociti proizvode transkript dužine 1.6kb (Hafeez, 1992), a epitelne ćelije rožnjače proizvode transkript dužine 1.95kb (Li, 1998).

Početak translacije za sve AAT transkripte se nalazi na početku egzona II. Start kodon koji kodira metionin (ATG) počinje na poziciji -5360, a stop kodon (TAA) na poziciji -10143. Transkript kodira protein dužine 418 aminokiselina, uključujući i signalni peptid dužine 24 aminokiselina.



Slika 4. Shematski prikaz strukture gena za alfa-1-antitripsin. Start transkripcije u monocitima (M1-M3), u rožnjači (C), start transkripcije u hepatocitima H(+1), P_H – promotor u hepatocitima, P_M promotor u monocitima, TSE – tkivno specifični element, X – X domen, Y – Y domen (slika modificovana iz reference Morgan, 1997)

Alfa-1-antitripsin je reaktant akutne faze i njegova koncentracija se tokom inflamacije povećava dva do četiri puta (Crystal, 1990). Gen za alfa-1-antitripsin sadrži dva enhanser elementa, jedan na 5' kraju i jedan na 3' kraju. Funkcionalne studije na HepG2

ćelijskoj liniji su pokazale da je enhanser na 5' kraju dominantan u bazalnim uslovima. Nakon stimulacije citokinom interleukinom 6 (IL6), 3' element postaje dominantan ali je za maksimalan odgovor neophodna interakcija sa 5' elementom (Morgan, 2002). Mutacije u Oct-1 vezujućem mestu u 3' enhanseru su povezane sa hroničnom opstruktivnom bolesti pluća, što ukazuje na značaj ovog elementa tokom akutne faze (Kalsheker, 1994).

Sinteza alfa-1-antitripsina je stimulisana u HepG2 ćelijskoj liniji u prisustvu IL6 i onkostatina M, dok je u epitelnim ćelijama pluća prvenstveno stimulisana onkostatinom M. Nakon stimulacije onkostatinom M i transformišućim faktorom rasta β koji deluju sinergistički, ekspresija alfa-1-antitripsina se u ćelijama pluća povećava i do 100 puta (Sallenave, 1997; Boutten, 1998). Ovi rezultati ukazuju na važnu ulogu epitelnih ćelija u antiproteaznoj zaštiti pluća tokom inflamacije. Lokalna produkcija alfa-1-antitripsina predstavlja dostupan i inducibilan izvor antiproteaze u okruženju u kojem alfa-1-antitripsin iz cirkulacije ne može biti brzo dopremljen u velikim količinama. Brz i višestruk lokalni porast koncentracije alfa-1-antitripsina važan je u lokalnoj regulaciji aktivnosti serin proteaza i zaštiti tkiva od proteolitičke destrukcije.

1. 4. Fiziološka uloga alfa-1-antitripsina

Alfa-1-antitripsin nakon sinteze u jetri prelazi u cirkulaciju odakle difunduje u većinu organa gde štiti ekstracelularne strukture od proteolitičkog dejstva proteaza. Alfa-1-antitripsin je najzastupljeniji inhibitor serin proteaza u plazmi sa sposobnošću da inhibira veliki broj proteaza - elastazu neutrofila, katepsin G, proteinazu 3, elastazu pankreasa. Najveći afinitet ima prema elastazi neutrofila (Beatty, 1980) tako da ona predstavlja njegov osnovni supstrat. Elastaza neutrofila je enzim koji pripada himotripsin superfamiliji serpin proteaza čija je osnovna uloga zaštita od mikroorganizama, naročito Gram-negativnih bakterija (Belaouaj, 1998). Elastaza neutrofila se sintetiše u promijelocitima a u neutrofilima se nalazi smeštena u azurofilnim granulama (Chua, 2006). Pored toga što ima ulogu u urođenom imunitetu, elastaza neutrofila ima i sposobnost degradacije velikog broja komponenti ekstracelularnog matriksa, uključujući elastin i kolagen, i uključena je u patogenezu bolesti pluća (Sun, 2004). Neutrofili prisutni na mestu inflamacije oslobađaju

elastazu i ostale proteaze što dovodi do degradacije ekstracelularnog matriksa u tkivu pluća (Knoell, 1998). Alfa-1-antitripsin je reaktant akutne faze i njegova koncentracija se povećava u inflamatornim stanjima (Morgan, 2002). Kao glavni inhibitor elastaze neutrofila, alfa-1-antitripsin ima važnu ulogu u zaštiti tkiva pluća od proteolitičkog dejstva proteaze. Inhibicija elastaze neutrofila se dešava formiranjem stabilnog ekvimolarnog kompleksa između alfa-1-antitripsina i elastaze neutrofila u kojem se proteaza vezuje za aktivno mesto alfa-1-antitripsina (Travis, 1983). Najveći deo alfa-1-antitripsina u tkivu pluća je poreklom iz cirkulacije, ali je mali deo i lokalnog porekla iz makrofaga i bronhijalnih i alveolarnih epitelnih ćelija (Gooptu, 2008). U zidovima alveola AAT čini više od 90% zaštitnog sloja protiv proteaza tako da su donji delovi respiratornog trakta naročito osetljivi na nedostatak alfa-1-antitripsina (Gadek, 1981; Wewers, 1987).

Normalna koncentracija alfa-1-antitripsina u plazmi iznosi 20-53 μ M (Brantly, 1991). Koncentracija alfa-1-antitripsina u plazmi niža od 11 μ M se smatra deficijentnom jer je količina alfa-1-antitripsina nedovoljna da zaštiti donje delove respiratornog trakta od elastaze neutrofila što dovodi do progresivnog oštećenja alveola koje može dovesti do nastanka emfizema (American Thoracic Society, 2003).

Deficijencija alfa-1-antitripsina je jedno od najčešćih naslednih oboljenja, pogađa pripadnike svih rasa i procenjuje se da ima oko 120 miliona nosilaca i obolelih u 58 zemalja sveta (de Serres, 2002). Deficijencija alfa-1-antitripsina se nasleđuje autozomno recesivno i predstavlja prototip bolesti povezanih sa poremećajima u funkciji serpin proteina – serpinopatija. Najistaknutija karakteristika serpinopatija je nedostatak proteina u plazmi u čijoj se osnovi najčešće nalazi poremećaj u konformacionoj stabilnosti proteina. Kao klinički entitet deficijencija alfa-1-antitripsina je prvi put opisana 1963. godine od strane Laurella i Erikssona koji su zapazili odsustvo α 1 elektroforetske frakcije (Laurell, 1963). Metodom izoelektričnog fokusiranja proteina detektovano je više od 100 varijanti alfa-1-antitripsina (DeMeo, 2004) od kojih je za oko 20 potvrđeno da su povezani sa patološkim stanjima (Crystal, 1990). Procenjuje se da je normalan MM genotip prisutan kod 94-96% pripadnika bele rase (Brantly, 2006). Deficijentni aleli rezultuju sniženim količinama alfa-1-antitripsina u plazmi (< 11 μ M) i većina je u određenom stepenu povezana sa emfizemom

pluća. Učestalost ovih alela u različitim populacijama se razlikuje. Aleli Z i S su najčešći uzročnici deficijencije u populaciji belaca i procenjuje se da je prisustvo Z alela u homozigotnom stanju uzrok deficijencije alfa-1-antitripsina u više od 95% slučajeva (Stoller, 2012). U Japanu je najčešći uzročnik deficijencije alfa-1-antitripsina Siiyama mutacija (Seyama, 1995), dok je na Sardiniji to mutacija Mmalton (Ferrarotti, 2005).

Osnovne kliničke manifestacije deficijencije alfa-1-antitripsina su emfizem pluća i oboljenja jetre što je povezano sa njegovom fiziološkom ulogom i mestom sinteze. Poremećaj u ravnoteži između alfa-1-antitripsina i elastaze neutrofila dovodi i do oštećenja tkiva pluća što može stvoriti povoljnu sredinu za delovanje kancerogena i razvoj tumora tako da nosioci deficijentnih alela alfa-1-antitripsina mogu imati povećan rizik za razvoj kancera pluća. Ređe posledice deficijencije alfa-1-antitripsina uključuju i aneurizme, bronhiektazije i astmu (Sun, 2004).

Kako simptomi poremećaja funkcije ili koncentracije alfa-1-antitripsina zavise od tipa mutacije i veoma su varijabilni, precizna detekcija varijanti je neophodna u proceni rizika za nastanak bolesti kao i za pravilno lečenje obolelih. Uobičajene laboratorijske metode za dijagnostikovanje deficijencije alfa-1-antitripsina podrazumevaju određivanje koncentracije proteina u plazmi, fenotipizaciju izoelektričnim fokusiranjem proteina (pH 4.2-4.9) i detekciju deficijentnih alela koji su česti u populaciji belaca (S i Z) genotipizacijom. Predloženi algoritam za dijagnostiku deficijencije alfa-1-antitripsina podrazumeva kvantifikaciju i genotipizaciju alfa-1-antitripsina, kao i fenotipizaciju u slučaju da rezultati genotipizacije ne odgovaraju izmerenoj koncentraciji alfa-1-antitripsina (Snyder, 2006). Testiranje na deficijenciju alfa-1-antitripsina se preporučuje kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolesti pluća, astmom, bolestima jetre nepoznate etiologije i nekrotizirajućim panikulitisom (American Thoracic Society, 2003).

1. 4. 1. Nove biološke uloge alfa-1-antitripsina

Iako se inhibicija elastaze neutrofila smatra primarnom fiziološkom ulogom alfa-1-antitripsina, u poslednje vreme se pojavio veliki broj istraživanja koja ukazuju na to da je njegova biološka uloga znatno raznovrsnija i kompleksnija.

Alfa-1-antitripsin je jedan od nekoliko proteina seruma za koje je pokazan citoprotektivan efekat u uslovima indukcije apoptoze u odsustvu seruma (Ikari, 2001). Alfa-1-antitripsin, zajedno sa alfa-1-antihimotripsinom i alfa-2-makroglobulinom, sprečava apoptozu vaskularnih glatkih mišićnih ćelija gajenih u odsustvu seruma. Gajenje ćelija u medijumu sa serumom, ali bez ovih proteina, dovodi do apoptoze što znači da alfa-1-antitripsin predstavlja kritičan faktor u preživljavanju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija.

Alfa-1-antitripsin inhibira apoptozu i na modelu ishemije/reperfuzije jetre i bubrega (Daemen, 2000; Ikebe, 2000) mehanizmom koji najverovatnije uključuje i direktna antiapoptotska, ali i antiinflamatorna svojstva ovog proteina.

Citoprotektivna uloga alfa-1-antitripsina pokazana je i na beta ćelijama pankreasa što potencijalno može imati značaja u lečenju dijabetesa tip 1. Tretman alfa-1-antitripsinom indukuje imunsku toleranciju prema alograftu kod miševa prilikom transplantacije Langerhansovih ostrvaca u odsustvu bilo kakvih drugih imunosupresivnih agenasa (Lewis, 2005; Zhang, 2007). Alfa-1-antitripsin čini ostrvca manje podložnim inflamaciji i produžava njihov opstanak. Kod NOD (non-obese diabetic) miševa, koji predstavljaju model sistem za izučavanje dijabetesa tip 1, alfa-1-antitripsin smanjuje destrukciju β ćelija (insulitis) i sprečava razvoj dijabetesa (Koulmanda, 2008).

Antiapoptotsko dejstvo alfa-1-antitripsin potvrđeno je i na neinflamatornom modelu emfizema pluća indukovano blokodom VEGF (vascular endothelial growth factor) receptora (Petrache, 2006b). VEGF je faktor rasta koji povećava permeabilnost endotela i neophodan je za rast endotelijalnih ćelija. Proces programirane ćelijske smrti endotelinih i epitelinih ćelija kapilara u plućima, pored oksidativnog stresa, destrukcije ekstracelularnog matriksa i inflamacije, ima važnu ulogu u patogenezi emfizema (Yokohori, 2004). Hronična blokada VEGF receptora kod pacova dovodi do emfizema usled apoptoze alveolarnih ćelija (Kasahara, 2000). Tretman alfa-1-antitripsinom u neinflamatornom modelu emfizema inhibira apoptozu alveolarnih ćelija pluća čime je pokazano da efekti alfa-1-antitripsina na apoptozu uključuju i druge mehanizme osim antiinflamatornih i antielastaznih. Antiapoptotski mehanizam dejstva alfa-1-antitripsina u ovom modelu je

direktan i ostvaruje se inhibicijom kaspaze-3 što podrazumeva internalizaciju aplikovanog alfa-1-antitripsina od strane ćelije (Petrače, 2006a). U ovom modelu antiapoptotski efekat nije pokazan za monomerne i polimerne varijante sa isečenom reaktivnom petljom, kao ni za karboksi terminalni region alfa-1-antitripsina C36.

Antiapoptotski efekat nije svojstven samo normalnoj M varijanti proteina. Ektopična ekspresija Z varijante alfa-1-antitripsina ima antiapoptotsko dejstvo na bronhijalne epitelne ćelije i ovaj mehanizam takođe uključuje inhibiciju kaspaze-3 ali i povećanje ekspresije celularnog inhibitora apoptoze cIAP1 (Greene, 2010). Povećana ekspresija cIAP1 proteina nije primećena u ćelijskoj liniji HEK293 u kojoj ekspresija Z proteina dovodi do apoptoze. Ovo može ukazati da odgovor na ekspresiju Z proteina zavisi od tipa ćelije kao i da je cIAP1 faktor koji ima bitnu ulogu u tome da li će ekspresija Z proteina imati anti- ili proapoptotski efekat. Antiapoptotski efekat Z varijante alfa-1-antitripsina na ćelije pluća može ukazivati na to da iako prisustvo polimera Z varijante proteina ima destruktivno dejstvo na ćelije pluća, ektopična ekspresija od strane bronhijalnih ćelija ima protektivnu ulogu.

Najnoviji podaci ukazuju na to da osim na kaspazu 3, AAT ima inhibitorno dejstvo i na kaspaze 6 i 7, kao i da je njegova inhibitorna aktivnost prema kaspazama zavisna od prisustva reaktivne petlje (Lockett, 2012). Oksidacija reaktivnog mesta alfa-1-antitripsina nakon izlaganja duvanskom dimu značajno smanjuje aktivnost prema kaspazi, ali je ova aktivnost prisutna kod Z varijante proteina.

1. 5. Varijante alfa-1-antitripsina

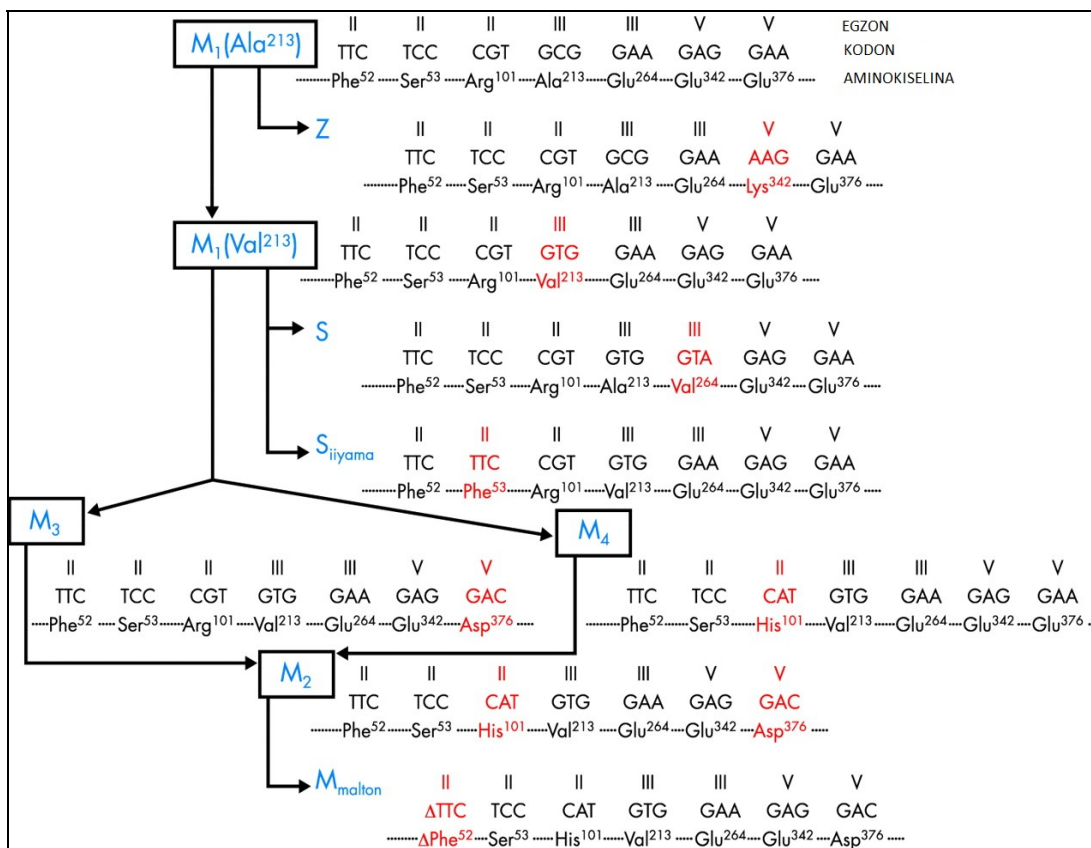
Gen za alfa-1-antitripsin je veoma polimorfan, sa više od 100 alelskih varijanti detektovanih do sada. Nomenklatura koja se trenutno koristi za klasifikaciju varijanti alfa-1-antitripsina označena je kao Pi sistem i zasniva se na pokretljivosti proteina tokom analize izoelektričnim fokusiranjem. Na osnovu brzine migracije u elektroforezi koja se prvobitno koristila za razdvajanje proteina (eng. starch-gel electrophoresis) Pi sistemi su bili označeni kao M (medium), S (slow), F (fast), Z (very slow). Kada je počelo da se koristi razdvajanje proteina na osnovu izoelektrične tačke (izoelektrično fokusiranje na

tankom poliakrilamidnom gelu na pH 4-5) AAT varijante su označavane prvim slovima abecede (A-L) ukoliko migriraju brže i poslednjim slovima (N-Z) ukoliko migriraju sporije u odnosu na M alel (Luisetti, 2004; Crowther, 2004).

Na osnovu koncentracije alfa-1antitripsina u plazmi i funkcije proteina varijante AAT-a se klasifikuju u četiri glavne kategorije (American Thoracic Society, 2003):

1. Normalne varijante se odlikuju normalnim nivoom AAT-a u plazmi (20-53 μ M) i ne predstavljaju rizik za oboljenja pluća i jetre. U ovu grupu spadaju četiri najčešće M varijante (M1-M4), kao i manje česte varijante koje se označavaju slovima abecede na osnovu brzine migracije i imenom grada u kome je detektovan najstariji poznati nosilac varijante (npr. L_{frankfurt}).

M varijante se razlikuju u aminokiselinskom sastavu na pozicijama 101, 213 i 376. M1 varijanta ima dva podtipa (subtipa) okarakterisanih sekvenciranjem-M1Val213 i M1Ala213. Poređenjem sekvenci Pi lokusa među primatima zaključeno je da je varijanta M1Ala213 (Arg101-Ala213-Glu376) najstarija i da je iz nje baznom zamenom nastala varijanta M1Val213 (Arg101-Val213-Glu376) koja je najčešća među pripadnicima bele rase u Severnoj Evropi (Crystal, 1990). Iz varijante M1Val213 nastala je varijanta M3 (Arg101-Val213-Asp376) a iz M3 je nastala M2 (His101-Val213-Asp376). Alel M4 (His101-Val213-Glu376) je mogao nastati ili iz M1Val213 ili M2 ili je nastao intragenom rekombinacijom između ove dve varijante (Seixas, 2001). Prikaz filogenije gena za alfa-1-antitripsin dat je na Slici 5.



Slika 5. Filogenetsko drvo gena za alfa-1-antitripsin (slika modifikovana iz reference Seixas, 2001)

Z alel je najčešći deficijentni alel sa učestalošću od 1-2% među pripadnicima bele rase u SAD. U evropskoj populaciji Z alel je najzastupljeniji u Skandinaviji (>1,5%) što ukazuje na mogući pravac širenja ovog alela u Evropi od severa ka jugu. Frekvencija ovog alela u srpskoj populaciji iznosi 1,27% (Jelic-Ivanovic, 1994). Procenjuje se da je Z alel prisutan kod više od 95% osoba sa deficijencijom alfa-1-antitripsina (Brantly, 1988). Z varijanta je nastala iz M1Ala213 alela zamenom Glu³⁴²Lys. Ova promena destabilizuje β ploču A što može dovesti do inkorporacije petlje drugog molekula proteaze i stvaranja lanaca polimera koji se zadržavaju unutar endoplazmatičnog retikuluma. Čelije koje nose Z mutaciju luče 10-15% od količine proteina koju luče čelije bez mutacija u AAT genu (Mornex, 1986). Analize kinetike savijanja proteina pokazale su da se Z varijanta proteina sporije savija od M varijante proteina i da ovaj defekt u savijanju vodi do akumulacije intermedijera koji

imaju tendenciju akumulacije (Yu, 1995). Zadržavanje proteina unutar hepatocita koje dovodi do oštećenja jetre opisano je osim za Z mutaciju i kod retkih deficijentnih alela S_{iiyama} (Ser53Phe), koji je najčešći uzrok deficijencije u Japanu (Seyama, 1995), i M_{malton} (Phe52 del) (Lomas, 1993b; Lomas, 1995).

Varijanta S_{iiyama} nastaje kao posledica bazne zamene TCC u TTC na kodonu na poziciji 53 što dovodi do zamene serina u fenilalanin. Zamena hidrofilnog serina u hidrofobni fenilalanin utiče na integritet i organizaciju molekula.

Varijanta M_{malton} je nastala iz alela M2 delecijom 3 bazna para (TTC) što rezultuje delecijom fenilalanina na poziciji 52 u hidrofobnom regionu proteina i insercijom petlje reaktivnog centra u β ploču A kao u latentnoj formi. Nastala konformacija je termodinamički stabilnija od native forme ali je inaktivna zbog nedostupnosti reaktivnog centra (Jung, 2004). Kao i Z alel i M_{malton} je povezan i sa deficijencijom alfa-1-antitripsina i bolestima jetre (Lomas, 1995). Ova varijanta je najčešći uzrok deficijencije na Sardiniji (Ferrarotti, 2005).

S varijanta je nastala iz M1Val213 alela zamenom nukleotida GAA u GTA u kodonu na poziciji 264 (Glu264Val) (Curiel, 1989) a njena učestalost je najveća u Portugalu i Španiji (>9%), tako da se Iberijsko poluostrvo smatra mestom porekla ove varijante. U srpskoj populaciji procenjena učestalost ove varijante je 0,7% (Jelic-Ivanovic, 1994). Promena Glu264Val utiče na vezu Glu264-Lys387 što menja unutrašnju arhitekturu AAT molekula. Alfa-1-antitripsin molekul sa S mutacijom funkcioniše normalno kao inhibitor elastaze neutrofila, a homozigotni nosioci ove mutacije imaju 60% normalnog nivoa AAT-a u plazmi. Mehanizam koji dovodi do smanjene koncentracije S varijante alfa-1-antitripsina u plazmi nije još uvek do kraja razjašnjen. Količina iRNK kod S varijante je ista kao kod M varijante (Curiel, 1989). Na model sistemu humanih fibroblasta kože pokazano je da, slično kao i Z varijantu, i S varijantu karakteriše unutarćelijsko zadržavanje, ali se za razliku od Z varijante ona može okarakterisati kao sporopolimerišuća, što ukazuje na to je mehanizam kojim prisustvo S mutacije menja svojstva proteina, u blažoj formi, sličan onom kod Z varijante (Teckman, 1996). S alel ne predstavlja faktor rizika za bolesti jetre ali u

kombinaciji sa konformaciono nestabilnijom Z varijantom predstavlja rizik za nastanak bolesti pluća i jetre (Mahadeva, 1999).

Retka I varijanta (Arg39Cys) slično S varijanti uzrokuje blagu AAT deficijenciju ali se ne akumulira u jetri.

Prikaz nekih od deficijentnih varijanti alfa-1-antitripsina dat je u Tabeli 1.

Tabela 1. Prikaz deficijentnih varijanti alfa-1-antitripsina

Varijanta	Genotip	Egzon	Mutacija
I	M1 (Val213)	II	R39C (CGC→TGC)
Mprocida	M1(Val213)	II	L41P (CTG→ CCG)
Mpalermo	M1 (Val213)	II	F51 (TTC →Delete)
Mmalton	M2	II	F52 (TTC → Delete)
Siiyama	M1 (Val213)	II	F53S (TIC → TCC)
Mmineralsprings	M1(Ala213)	II	G67E (GGG →GAG)
F	M1(Val213)	III	R223C (CGT→ TGT)
Plowell	M1 (Val213)	III	D256V (GAT →GTT)
Pduarte	M4	III	D256V (GAT → GTT)
S	M1(Val213)	III	E264V (GAA→GTA)
Wbethesda	M1 (Val213)	V	A336T (GCT →ACT)
Z	M1(Ala213)	V	E342K (GAG→ AAG)
Mheerlen	M1(Ala213)	V	P369L (CCC →CTC)
Mwurzburg	M1(Ala213)	V	P369S (CCC→TCC)

3. Nulte varijante su retke i odlikuje ih potpuno odsustvo alfa-1-antitripsina u plazmi. Ove varijante nisu povezane sa bolestima jetre ali predstavljaju rizik za nastanak emfizema pluća. Iako se pretpostavlja da je broj ovih mutacija veliki one su retke na populacionom nivou. Većina nastaje usled mutacija koje prerano uvode stop kodon kao što je to slučaj kod varijante **Null**_{bellingham} (Satoh, 1988) ili velikim delecijama u slučaju varijante **Null**_{isola di procida} koja nastaje delecijom fragmenta veličine 17 kb koji obuhvata egzone od 2 do 5 (Takahashi, 1990).

AAT varijanta **Null**_{saarbrucken} (**Null**_{saar}) nastaje kao posledica bazne zamene GAA u TGA na poziciji Glu376 na M1Ala213 alelu što rezultuje preranim uvođenjem stop kodona u

protein i skraćanjem proteina za 19 aminokiselina na C terminalnom kraju. Ovako izmenjen protein ne formira nerastvorne agregate unutar ćelije ali se zadržava u endoplazmatičnom retikulumu (Lin, 2001). Produženo zadržavanje unutar endoplazmatičnog retikuluma primećeno je i kod drugih varijanti alfa-1-antitripsina koje imaju skraćenje na C terminalnom kraju proteina, poput varijanti **Null_{clayton}** (Brantly, 1997) i **Null_{hong kong}** (Sifers, 1988).

Varijanta **Null_{clayton}** je isto kao i varijanta **Null_{saar}** skraćena za 19 aminokiselina u odnosu na normalan protein ali nastaje na M1Val213 alelu.

AAT Null_{hong kong} varijanta nastaje delecijom TC dinukleotida u kodonu za Leu na poziciji 318. Ova delecija uzrokuje promenu okvira čitanja u iRNK što rezultuje sintezom proteina koji je za 61 aminokiselinu kraći od normalnog i kojem nedostaje aktivno mesto.

Prikaz nekih od nultih varijanti alfa-1-antitripsina dat je u Tabeli 2.

Tabela 2. Prikaz nultih varijanti alfa-1-antitripsina

Varijanta	Genotip	Egzon	Mutacija
Null _{granite falls}	M1(Ala213)	II	Y160X (TAC → delC → 5' shift → TAG)
Null _{bellingham}	M1(Val213)	III	K217X (AAG → TAG)
Null _{isola di procida}	/	II-V	delecija 17kb
Null _{hong kong}	M2	IV	L318 CTC → delTC → 5' shift → stop334 TAA
Null _{matawa}	M1(Val213)	V	L353 TTA → insT → F353 TTT → 3' shift → stop376TAG
Null _{saarbrucken}	M1(Ala213)	V	Q376X (GAA → TGA)
Null _{clayton}	M1(Val213)	V	Q376X (GAA → TGA)

4. Disfunkcionalne varijante – promena ATG kodona na poziciji 358 u proteinu u kodonu AGG dovodi do zamene metionina u aktivnom centru proteina argininom. Ovakav protein ima funkcionalnu analogiju sa antitrombinom III koji je inhibitor koagulacionih proteaza i čije reaktivno mesto čini Arg-Ser veza. Ova varijanta alfa-1-antitripsina je poznata kao **Pittsburgh** i s obzirom na izmenjeno aktivno mesto proteina ne funkcioniše kao inhibitor

elastaze neutrofila već kao inhibitor trombina i uzrokuje poremećaje krvarenja (Scott, 1986; Vidaud, 1992).

1. 6. Alfa-1-antitripsin i bolesti jetre

Jedna od osnovnih kliničkih manifestacija deficijencije alfa-1-antitripsina su oboljenja jetre kod dece – neonatalni hepatitis i juvenilna ciroza (Sveger, 1976). Procenjeno je da oko 15% novorođenčadi sa ZZ genotipom razvije hepatitis, a kod 25% od njih se razvije i obstruktivna žutica i ciroza što može dovesti do smrti pre osme godine života (Sveger, 1976). Holestaza koja se javlja kod 10% novorođenčadi sa ZZ genotipom predstavlja glavni zdravstveni rizik kod ovih osoba u prve dve decenije života (Sveger, 1978). U adultnom dobu poremećaji u funkciji i sintezi alfa-1-antitripsina se mogu klinički manifestovati kao ciroza jetre i hepatocelularni karcinom (Eriksson, 1986). Procenjuje se da se samo kod 12-15% homozigota za Z alel javljaju oboljenja jetre (Sveger, 1988; Sveger, 1995).

Osnovni faktor rizika za bolesti jetre povezane sa disfunkcijom alfa-1-antitripsina je prisustvo varijanti proteina koje su sklone polimerizaciji - Z, M_{malton} (Lomas, 1995), S_{iiyama} (Lomas, 1993b). Ipak, s obzirom na varijabilnost kliničke slike kod nosilaca homozigotnih varijanti, kao i na činjenicu da samo određeni broj njih razvije bolesti jetre u toku života, patofiziologija bolesti jetre se ne može pripisati samo AAT genotipu. Pretpostavlja se da ostali sredinski, kao i genetički, faktori imaju važnu ulogu u predispoziciji ka nastanku bolesti. Postoje indicije i da intragenske varijacije unutar alfa-1-antitripsina mogu imati ulogu u osetljivosti prema bolesti (Chappell, 2008). Formiranje polimera alfa-1-antitripsina je favorizovano povećanjem tempertaure i koncentracije proteina tako da je pretpostavka da značajnu ulogu imaju i epizode inflamacije tokom kojih dolazi do povećane sinteze alfa-1-antitripsina (Lomas, 1992). Alfa-1-antitripsin je protein akutne faze i njegova koncentracija se značajno povećava tokom inflamacije i moguće je da formiranje polimera prevazilazi degradativne kapacitete ćelije što dovodi do formiranja hepatičnih inkluzija i oštećenja ćelije (Lomas, 1992).

Osnovni mehanizam kojim se objašnjava oštećenje jetre je patološka polimerizacija varijanti alfa-1-antitripsina pre sekrecije iz jetre koja, usled nemogućnosti ćelija da se oslobodi ovih polimera degradacijom, ima hepatotoksični efekat. Intracelularne inkluzije alfa-1-antitripsina su prisutne u hepatocitima pacijenata koji nose mutacije koje uzrokuju intracelularnu akumulaciju proteina - Z, M_{malton} i S_{iiyama}. Inkluzije mutiranog proteina u endoplazmatičnom retikulumu hepatocita mogu uzrokovati juvenilni hepatitis, cirozu i hepatocelularni karcinom.

Faktori uključeni u mehanizam degradacije proteina u endoplazmatičnom retikulumu su potencijalni kandidati za genetičke modifikatore koji su uključeni u podložnost ili zaštitu od oštećenja jetre polimerizacijom. Pokazano je da su fibroblasti kože homozigotnih nosilaca Z alela sa oboljenjima jetre manje efikasni u degradaciji mutiranog alfa-1-antitripsina u odnosu na ćelije kože ZZ osoba bez oboljenja jetre (Wu, 1994) što ukazuje na to da bitnu ulogu u modifikaciji bolesti imaju mehanizmi uključeni u uklanjanje mutiranog proteina.

Degradacija Z proteina koji se nakuplja u endoplazmatičnom retikulumu se vrši na nekoliko načina. Degradacija alfa-1-antitripsina u proteazomima može biti i ubikvitin zavisna i nezavisna i smatra se da je ovaj mehanizam odgovoran za degradaciju rastvornih formi Z varijante (Teckman, 2000; Qu, 1996). Zadržavanje alfa-1-antitripsina unutar endoplazmatičnog retikuluma aktivira i autofagiju (Teckman, 2000) koja igra bitnu ulogu u degradaciji alfa-1-antitripsina zadržanog unutar endoplazmatičnog retikuluma i to naročito nerastvornih agregata i polimera (Kamimoto, 2006; Kruse, 2006).

Polimeri Z varijante alfa-1-antitripsina unutar ćelije imaju uređenu strukturu i njihovo prisustvo ne aktivira signalni put označen kao UPR (unfolded protein response) koji se aktivira u prisustvu proteina nepravilne konformacije ali dovodi do aktiviranja nuklearnog faktora kappaB (NFκB) (Hidvegi, 2005). NFκB indukuje ekspresiju interleukina 8 koji dovodi do infiltracije neutrofila tako da akumulacija polimera u ćelijama jetre i epitelnim respiratornim ćelijama indukuje karakteristično inflamatorno stanje (Hidvegi, 2005). Aktivacija NFκB faktora ima ulogu i u kancerogenezi povezanoj sa

inflamacijom (Pikarsky, 2004; Greten, 2004; Maeda, 2005) i na taj način može imati ulogu u nastanku hepatocelularnog karcinoma u deficijenciji alfa-1-antitripsina.

1. 7. Deficijencija alfa-1-antitripsina i emfizem

Emfizem pluća je progresivno oboljenje koje se anatomski definiše trajnim povećanjem vazdušnog prostora distalno od terminalne bronhiole, destrukcijom plućnog parenhima, gubitkom elastične retraktilnosti pluća i zatvaranjem malih disajnih puteva (Filipović, 2006).

U glavne faktore rizika spoljašnje sredine za nastanak emfizema pluća spadaju duvanski dim, prašina i hemikalije iz radnog okruženja, aerozagađenje, infekcije i socioekonomski status (GOLD, 2006). Teška deficijencija alfa-1-antitripsina je, do sada, najbolje opisani genetički faktor rizika za nastanak emfizema pluća. Koncentracija alfa-1-antitripsina u plazmi niža od granične koncentracije od $11\mu\text{M}$ rezultuje u neadekvatnoj zaštiti tkiva pluća od proteolitičkog dejstva elastaze neutrofila. Ovakvo oštećenje pluća dovodi do razvoja emfizema u trećoj ili četvrtoj deceniji života (Mulgrew, 2007; Evald, 1990).

Predloženi mehanizmi uključeni u nastanak emfizema pluća izazvanog deficitom alfa-1-antitripsina u nastanku emfizema pluća su disbalans između proteaza i antiproteaza, inflamacija i pojačana hemotaksija.

Teorija o disbalansu između proteaza i antiproteaza je najstarija i najprihvaćenija teorija o patogenezi emfizema u AAT deficijenciji. Ovaj disbalans se smatra osnovnim uzrokom oštećenja tkiva pluća u emfizemu (Taggart, 2005). U normalnim plućima antiproteaze su prisutnije od proteaza čime se obezbeđuje antiproteazna zaštita pluća (Taggart, 2005). S obzirom da je alfa-1-antitripsin najzastupljeniji antiproteazni protein u zidovima pluća a da je njegov glavni ciljni molekul elastaza neutrofila ovo oštećenje se može pripisati disbalansu između alfa-1-antitripsina i elastaze neutrofila. Elastaza neutrofila ima važnu ulogu u urođenom imunitetu i ima snažno dejstvo u odbrani od mikroorganizama ali učestvuje i u degradaciji velikog broja supstrata, uključujući elastin i ostale proteine ekstracelularnog matriksa (kolagen, proteoglikan, fibronektin i kaderini)

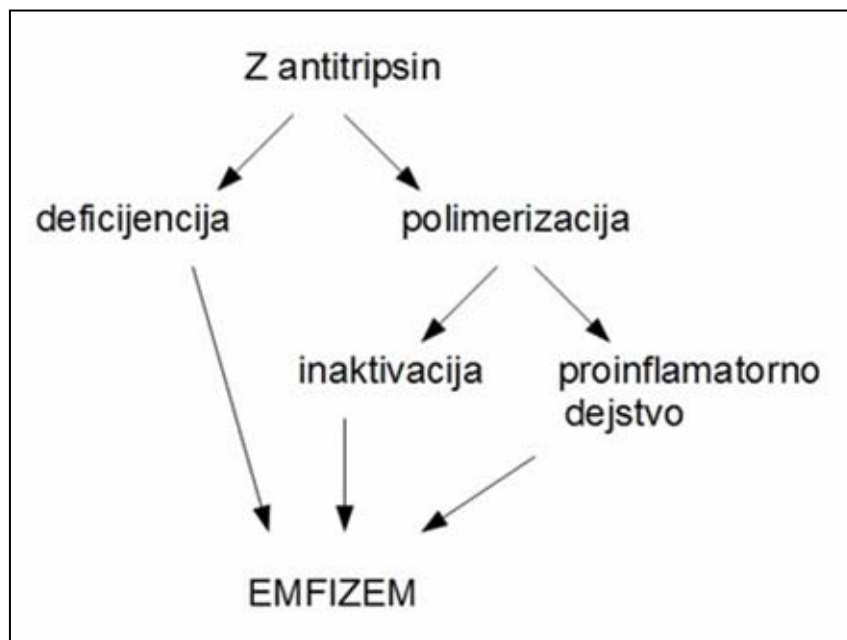
(Chua, 2006). Aktivna elastaza neutrofila se nalazi u azurofilnim granulama neutrofila odakle se nakon stimulacije neutrofila egzocitozom izbacuje van ćelije ili učestvuju u fagocitozi patogena.

Poremećaj u ravnoteži između elastaze i alfa-1-antitripsina, nastao bilo smanjenjem količine alfa-1-antitripsina ili povećanjem količine elastaze, može rezultovati u oštećenju tkiva pluća. Destruktivno dejstvo elastaze neutrofila se, osim sa emfizemom, povezuje i sa akutnim oštećenjem pluća (Lee, 2001) i sindromom akutnog respiratornog distresa (Lee, 2001). Dodatni faktor koji određuje početak nastanka i razvoja emfizema je duvanski dim, ali je varijabilnost u stepenu bolesti prisutna čak i kod pušača sa istim genotipom (npr. ZZ). Duvanski dim oksiduje metionin u aktivnom centru alfa-1-antitripsina u metionin sulfoksid čime se formiranje kompleksa alfa-1-antitripsin – elastaza neutrofila smanjuje za oko 1000 puta (Crystal, 1990). Izbegavanje duvanskog dima generalno odlaže početak bolesti, ali čak i kod nepušača postoje znatne razlike u simptomima (Sun, 2004; DeMeo, 2004).

Inflamacija nastala usled prevelike količine neutrofila u plućima ima značajnu ulogu u patogenezi emfizema nastalog usled deficijencije alfa-1-antitripsina. Nakupljanje neutrofila u plućima na mestu inflamacije se dešava kao odgovor na inflamaciju i infekciju i predstavlja prvu liniju odbrane od infekcije.

Proteaze prisutne u granulama neutrofila mogu predstavljati potencijalnu inflamatornu komponentu u plućima obolelih od deficijencije alfa-1-antitripsina koja se ionako odlikuju povećanim brojem aktiviranih neutrofila. Elastaza neutrofila stimuliše oslobađanje potentnih hemoatraktanata za neutrofile – interleukina 8 (IL-8) i leukotrijena B4 (LB4) iz makrofaga (Walsh, 2001; Hubbard, 1991) što dodatno povećava količinu neutrofila u donjim delovima respiratornog trakta. Procenjuje se da u sputumu pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća 47% hemotaktične aktivnosti za neutrofile pripada leukotrijenu B4, dok IL-8 doprinosi do 31% hemotakse za neutrofile (Woolhouse, 2002). Pored toga, povišene koncentracije alfa-1-antitripsina imaju sinergističko dejstvo sa elastazom u oslobađanju IL-8 i LTB4 od strane makrofaga (Spencer, 2004).

Pokazano je i da polimeri alfa-1-antitripsina imaju hemotaktično dejstvo na neutrofile. Iako polimerizacija alfa-1-antitripsina usled prisustva mutacije rezultuje u zadržavanju proteina unutar hepatocita, deo proteina dospeva do cirkulacije i tkiva a polimerizaciji je podložan i alfa-1-antitripsin lokalno sintetisan u plućima. Polimeri alfa-1-antitripsina detektovani su u bronhoalveolarnoj tečnosti pacijenata sa Z varijantom alfa-1-antitripsina (Elliott, 1998). Formiranje polimera alfa-1-antitripsina u plućima dodatno smanjuje već smanjenu koncentraciju aktivne antiproteazne zaštite što dodatno utiče na lokalni nedostatak inhibitora. Ova konformaciona promena predstavlja i snažan proinflamatorni stimulus za neutrofile čime protein menja ulogu iz antiinfamatorne, koju ima kao monomer, u proinflamatornu koju ima kao polimer. Hemotaktična aktivnost polimera alfa-1-antitripsina pokazana je za neutrofile *in vitro*, kao i *in vivo* u plućima miša gde uzrokuju influks neutrofila (Parmar, 2002; Mulgrew, 2004; Mahadeva, 2005). Ovaj efekat nije primećen za monomerne varijante proteina. Hemotaktična svojstva polimera alfa-1-antitripsina pružaju objašnjenje za višak neutrofila u plućima homozigota za Z alel i predlažu novu paradigmu u patogenezi emfizema kod ovih pacijenata. Shematski prikaz uloge alfa-1-antitripsina na primeru Z varijante dat je na Slici 6.



Slika 6. Predloženi mehanizam patogeneze emfizema kod Z varijante alfa-1-antitripsina. Deficijencija alfa-1-antitripsina u plućima je povećana njegovom polimerizacijom. Neaktivni polimeri dodatno smanjuju zaštitu tkiva pluća od proteaza i ispoljavaju proinflamatorno dejstvo privlačenjem i aktiviranjem neutrofila (slika modifikovana iz reference Parmar, 2002)

Proinflamatorno dejstvo ekstracelularnih polimera alfa-1-antitripsina pored hemotaksije, obuhvata i degranulaciju neutrofila i uticaj na promenu oblika i adheziju (Parmar, 2002). Činjenica da polimeri alfa-1-antitripsina stimulišu i hemotaksu i adheziju neutrofila je značajna s obzirom da ovi procesi predstavljaju važne komponente transmigracije neutrofila kroz endotel. Ovo ukazuje na to da razvoju bolesti pluća kod osoba sa AAT deficijencijom uzrokovanom Z alelom, osim gubitka inhibitorne aktivnosti, doprinose i proinflamatorna dejstva polimera alfa-1-antitripsina.

Proinflamatorna svojstva polimera alfa-1-antitripsina predstavljaju i jedno od objašnjenja za opstanak Z alela u populaciji tokom evolucije jer je nosiocima pružao selektivnu prednost u periodu pre pronalaska antibiotika kada su infektivne bolesti bile glavni uzrok smrti (Lomas, 2006).

1. 8. Alfa-1-antitripsin i karcinom pluća

Karcinom pluća je po učestalosti drugi najčešći karcinom kod muškaraca i treći kod žena (Cancer research UK - cancerresearchuk.org). Maligni tumori pluća su uzrok 12,8% svih slučajeva kancera i u 17,8% slučajeva su odgovorni za smrt uzrokovanu kancerom (Parkin, 1999; Franceschi, 1999). Prema kliničkim i histološkim karakteristikama karcinom pluća se može podeliti u dva tipa – sitnoćelijski karcinom (small cell lung carcinoma – SCLC) i nesitnoćelijski karcinom (non-small cell lung carcinoma – NSCLC) koji zahtevaju različit pristup u lečenju (Spira, 2004).

Sitnoćelijski karcinom čini oko 20-25% svih karcinoma pluća, veoma je agresivan i odlikuje se brzim napredovanjem. Kod ovog tipa karcinoma metastaze nastaju u ranim fazama tumorigeneze tako da su obično već prisutne u vreme dijagnoze. Terapija ovog tipa karcinoma podrazumeva hemoterapiju i radioterapiju (Cooper, 2005). Nesitnoćelijski karcinom pluća čini 75 – 80% svih karcinoma pluća i čini ga nekoliko subtipova - adenokarcinom, karcinom skvamoznih ćelija i karcinom velikih ćelija. Kod ovog tipa karcinoma metastaze se dešavaju u kasnijim fazama razvoja tumora tako da terapija podrazumeva i operativno lečenje. Karcinom skvamoznih ćelija se odlikuje centralnom lokalizacijom u većim disajnim putevima i keratinizacijom i formiranjem intercelularnih veza oivičenih dezmozomima (Cooper, 2005). Adenokarcinomi nastaju iz ćelija koje čine zid alveola, odlikuju se produkcijom mucina, i čine većinu karcinoma pluća kod nepušača i kod žena (Liu, 2000; Bryant, 2007). Karcinom krupnih ćelija nastaje od nekoliko različitih tipova ćelija.

Duvanski dim i hronična opstruktivna bolest pluća, u koju spada i emfizem pluća, predstavljaju glavne faktore rizika za nastanak karcinoma pluća. Oštećenje tkiva pluća nastalo kao posledica promene u ravnoteži između elastaze neutrofila i alfa-1-antitripsina može predstavljati predispoziciju za nastanak karcinoma pluća. Ova ravnoteža može dodatno biti narušena oksidacijom metionina u aktivnom mestu proteina duvanskim dimom čime se smanjuje njegovo inhibitorno dejstvo.

Nekoliko studija je pokazalo da je ekspresija alfa-1-antitripsina prisutna u ćelijama tumora i da ukazuje na agresivnost kancera. Prisustvo alfa-1-antitripsina je pokazano i povezano sa invazivnim potencijalom adenokarcinoma kolona, želuca i pluća (Karashima, 1990; Allgayer, 1998; Higashiyama, 1992). Povećana ekspresija alfa-1-antitripsina pronađena je i *microarray* analizom tkiva insulinoma (de Sá, 2007) kao i u limfomima (Duplantier, 2006). Povećana ekspresija alfa-1-antitripsina pokazana je i u adenokarcinomu pluća gde je takođe povezana sa lošijim prognostičkim ishodom (Higashiyama, 1992). Neke studije su pokazale da među obolelima od plućnog karcinoma ima više nosilaca deficitarnih alela nego u opštoj populaciji kao i da nosioci deficitarnih alela alfa-1-antitripsina mogu imati povećan rizik za razvoj bronhoalveolarnog karcinoma i karcinoma skvamoznih ćelija (Yang, 1999).

Tumorigeno dejstvo je pokazano i za C terminalni fragment alfa-1-antitripsina koji nastaje proteolitičkim dejstvom matriksmetaloproteinaza. Alfa-1-antitripsin je supstrat za matriksmetaloproteinaze – matrilizin, kolagenazu neutrofila, stromelizin 1 i 3. Matrilizin najefikasnije hidrolizuje alfa-1-antitripsin, a stromelizin 3 je efikasniji od kolagenaze i stromelizina 1 (Zhang, 1994; Sires, 1994; Pei, 1994). Proteoliza alfa-1-antitripsina metaloproteinazama dešava se u peptidnoj vezi koja čini aktivni centar proteina, rezultuje gubitkom njegove inhibitorne funkcije i stvaranjem C terminalnog fragmenta (C 36 peptid). Za ovaj fragment je pokazano da povećava rast i invazivnost ćelija humanog adenokarcinoma pankreasa *in vivo* (Kataoka, 1999) kao i ćelija kancera dojke (Zelvyte, 2003). Ovi rezultati ukazuju na to da i modifikovane, neinhibitorne, forme alfa-1-antitripsina imaju ulogu u razvoju kancera i da je uloga alfa-1-antitripsina u patogenezi karcinoma pluća znatno složenija od mehaničkog oštećenja tkiva.

2. CILJ

Od velikog broja do sada otkrivenih varijanti alfa-1-antitripsina, samo za nekoliko najčešćih je poznata uloga u molekularnoj osnovi bolesti povezanih sa deficijencijom i disfunkcijom alfa-1-antitripsina. Poznato je da različite mutacije u genu za AAT imaju različite posledice na funkciju i svojstva proteina i povezane su sa različitim patološkim stanjima. Poznavanje promene odgovorne za izmenjena svojstva proteina neophodno je u proceni rizika za nastanak bolesti, kao i u određivanju terapijskog pristupa. Metode koje se rutinski koriste u detekciji varijanti alfa-1-antitripsina su pouzdane u detekciji čestih varijanti, ali retke varijante često ostaju nedetektovane ili pogrešno klasifikovane.

Ciljevi ovog rada su sledeći:

1. strukturna analiza gena za alfa-1-antitripsin u plućnim bolestima čoveka koja će omogućiti preciznu i pouzdanu detekciju svih prisutnih varijanti gena
2. analiza uticaja promena u genu na funkcionalnu aktivnost proteina
3. analiza uticaja promena u genu na stabilnost proteina i njegovu sklonost ka formiranju polimera
4. praćenje lokalizacije otkrivenih varijanti proteina u ćeliji

Na osnovu rezultata funkcionalne karakterizacije retkih varijanti biće pretpostavljena njihova uloga u patologiji bolesti povezanih sa deficijencijom i disfunkcijom alfa-1-antitripsina. S obzirom na mali broj podataka o funkcionalnim posledicama mutacija u genu za AAT, ovi podaci će doprineti razumevanju uticaja promena u određenim delovima proteina na njegova svojstva i funkciju.

3. MATERIJAL I METODE

3. 1. Ispitanici

Istraživanjem je obuhvaćeno 27 ispitanika sa emfizemom pluća i 66 ispitanika sa karcinomom pluća kojima je u periodu od 2004. do 2008. god. postavljena dijagnoza u KBC Zvezdara, a od kojih su za analizu uzeti uzorci periferne krvi.

Ispitanici obuhvaćeni ovom studijom dali su pismenu saglasnost za obavljanje molekularno-genetičkih analiza. Ovo istraživanje je odobrio Etički komitet Kliničko-bolničkog centra Zvezdara.

3. 2. Materijal

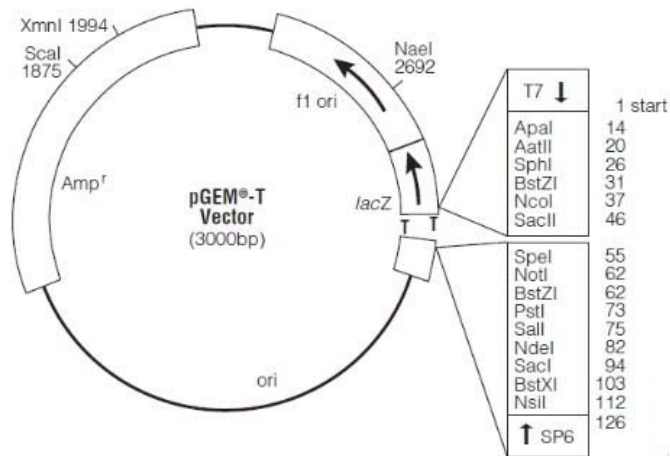
3. 2. 1. Uzorci periferne krvi

Za analizu su korišćeni uzorci periferne krvi ispitanika sa emfizemom i ispitanika sa karcinomom pluća. Uzorci krvi su uzimani sa 0,38% natrijum citratom ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) kao antikoagulansom.

3. 2. 2. Vektori

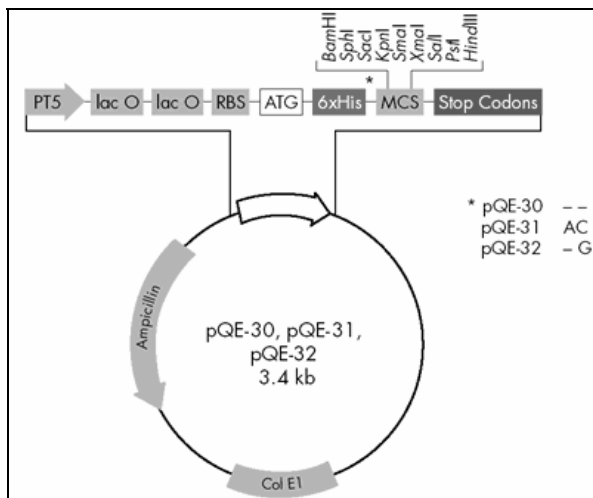
U ovom radu su korišćeni vektori pGEM-T Easy (Promega), pQE31 (Qiagen), pEGFP-N1 (Clontech) i pcDNA3 (Invitrogen).

Vektor pGEM-T Easy, veličine 3015bp, je prokariotski vektor sa ampicilinskom rezistencijom (Slika 7).



Slika 7. Shematski prikaz vektora pGEM-T Easy (slika preuzeta sa sajta promega.com)

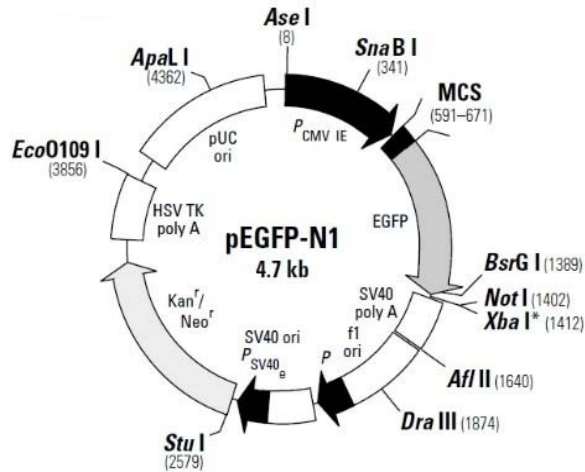
Vektor pQE31, veličine 3463bp, je prokariotski vektor sa ampicilinskom rezistencijom za ekspresiju proteina koji na N terminalnom kraju sadrže 6xHis (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz vektora pQE-31 (slika preuzeta sa sajta qiagen.com)

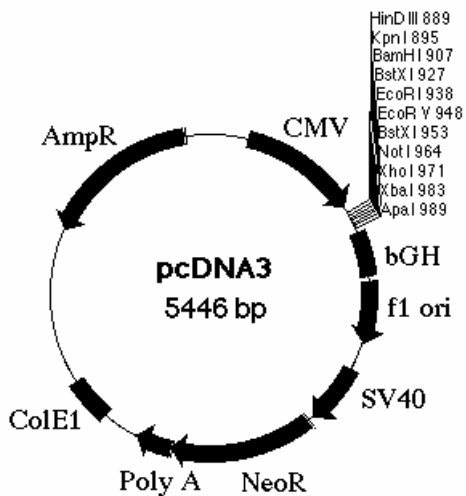
Vektor pEGFP-N1, veličine 4731 bp, je eukariotski vektor sa neomicinskom rezistencijom za ekspresiju proteina koji na C terminalnom kraju sadrže EGFP (enhanced

green fluorescent protein). EGFP je izmenjena varijanta proteina GFP proteina koja je optimizirana za jaču fluorescenciju i viši nivo ekspresije u sisarskim ćelijama (Slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz vektora pEGFP-N1 (slika preuzeta sa sajta clontech.com)

Vektor pcDNA3 je eukarotski ekspresioni vektor, veličine 5428 bp, sa neomicinskom rezistencijom (Slika 10).



Slika 10. Shematski prikaz vektora pcDNA3 (slika preuzeta sa sajta invitrogen.com)

3. 2. 3. Bakterijski sojevi

U ovom radu su korišćeni bakterijski sojevi:

- **XL1-Blue** *E. coli* (genotip: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)])
- **BL21-CodonPlus-RIL** *E. coli* soj (genotip: *E. coli* B F– *ompT hsdS*(rB– mB–) *dcm+* Tetr *gal endA Hte* [*argU ileY leuW Camr*]).

3. 2. 4. Ćelijske linije

U ovom radu su korišćene sledeće humane permanentne ćelijske linije:

- HepG2, poreklom iz humanog hepatoblastoma (ATCC br. HB-8065), korišćena je za dobijanje cDNK humanog alfa-1-antitripsina
- COS-7, poreklom iz bubrega zelenog majmuna (ATCC br. CRL-1651), korišćena je za eksperimente transfekcije

3. 2. 5. Oligonukleotidi

Sekvence oligonukleotida korišćenih u radu date su u Tabeli 3.

Tabela 3. Sekvence oligonukleotida korišćenih u radu

naziv oligonukleotida	sekvenca
2A	5'-TCATCATGTGCCTTGACTION-3'
2AGC	5'-(40GC) GGTATAGGCTGAAGGCCGAAC-3'
2B GC	5'-(40GC) CCACCATGATCAGGATCACC-3'
2B	5'-TCCACTAGCTTCAGGCCCTC-3'
2C	5'-CAATGGCCTGTTCTCAGC-3'
2CGC	5'-(40GC)GCCAAGGAGAGTTCAAGAACTG-3'
3	5'-TCTTCCAAACCTTCACTCACC-3'
3GC	5'-(40GC) TTCTTGGTCACCCTCAGGTT-3'

4 GC	5'-(40GC) GAACAAGAGGAATGCTGTGC-3'
4	5'-ATGGTGCAACAAGGTCGTC-3'
5A	5'-GCCTTACAACGTGTCTCTGC-3'
5A GC	5'-(40GC) GATAGACATGGGTATGGCCTC-3'
5B	5'-GAAAGGGACTGAAGCTGCTG-3'
5BGC	5'- (40GC) GTTGAGGAGCGAGAGGCAG-3'
ex2 s1	5'-TGCAATCCCTGATCACT-3'
ex2 s2	5'-TTGCTTGTTTCTATGGGAAC-3'
ex3 s1	5'-GGTTTCTTTATTCTGCTACA-3'
ex3 s2	5'-TCAGTCCCAACATGGCTAA-3'
ex4 s1	5'- GGCAGAAATAATCAGAAAAG -3'
ex4 s2	5'- TGGTATCTGTAGGGAAGA -3'
ex5 1	5'- GTGACAGGGAGGGAGAGGA -3'
ex5 s2	5'-GGAGGGATTTACAGTCACAT-3'
HindIII Forward	5'-CCAAGCTTATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCA-3'
KpnI Reverse	5'-GCGGTACCTTATTTTTGGGTGGGATTCACCACT-3'
AAT Kpn GFPN1	5'- CAGGTACCGCTTTTTGGGTGGG-3'
XhoI Reverse	5'-GCCTCGAGTTATTTTTGGGTGGGATTCACCACT-3'
G320Rmut	5'-GCTGACCTCTCCAGGGTCACAGAGGAGG-3'
V321Fmut	5'-GCTGACCTCTCCGGGTTACAGAGGAGG-3'
AATZmut	5'-GTCTTCTTAATGATTGACCAAATACCAAGTCTCCCC-3'

3. 2. 6. Antitela

Antitela korišćena u ovom radu data su u Tabeli 4.

Tabela 4. Pregled korišćenih antitela. *Antitelo konjugovano sa peroksidazom biljke ren (Horseradish peroxidase).

antitelo	poreklo/tip antitela	proizvođač
Anti alfa-1-antitripsin	kozje poliklonalno	Abcam
Anti goat HRP*	Zečje poliklonalno	Sigma
Anti goldžin-97	Mišje monoklonalno	Molecular Probes
Anti mouse Texas red	Zečje poliklonalno	Sigma

3. 3. Metode

3. 3. 1. Izolacija DNK iz periferne krvi

Za izolaciju DNK iz limfocita periferne krvi koristi se komercijalni kit QIAamp DNA Blood Mini. Izolacija se vrši iz 200 μ L periferne venske krvi uzete sa natrijum citratom kao antikoagulansom, u koju se dodaje 20 μ L QIAGEN proteaze i 200 μ L pufera AL. Smeša se zatim vorteksuje i inkubira 10min na 56°C, nakon čega se dodaje 200 μ L 70% etanola i smeša se nanosi na prethodno sklopljenu kolonu i epruvetu za sakupljanje i centrifugira 1min na 8000rpm. Tečnost iz epruvete za sakupljanje se odliva, a na kolonu se doda 500 μ L pufera AW1. Nakon centrifugiranja od 1min na 8000rpm sakupljena tečnost se odbacuje. Nakon toga se na kolonu doda 500 μ L pufera AW2 i vrši se centrifugiranje 3min na 13000rpm. Kolona se zatim prebaci u epruvetu od 1,5mL i na nju se doda 200 μ L sterilne vode. Ovako pripremljena kolona se inkubira 1min na sobnoj temperaturi i zatim centrifugira 1min na 8000rpm. Nakon centrifugiranja kolona se odbaci, a u epruveti ostaje 200 μ L rastvora DNK.

3. 3. 2. Elektroforeza DNK u gelu od agaroze

Analiza prinosa i kvaliteta DNK izolovane iz periferne krvi i iz kultivisanih ćelija i analiza prinosa plazmidne DNK izolovane iz bakterijskih kultura vrše se pomoću

elektroforeze u 1% gelu od agaroze. Provera fragmenata DNK dobijenih reakcijom lančanog umnožavanja vrši se elektroforezom u 2% gelu od agaroze.

Za pripremu gelova i elektroforezu se koristi 1xTAE pufer (40mM Tris, 20mM Na-acetat, 1mM Na₂EDTA). Elektroforeza se vrši pri naponu 7-10V/cm. Vizuelizacija DNK se omogućava dodavanjem etidijum bromida u gel (0,5µg/mL) i osvetljavanjem gela UV svetlošću.

3. 3. 3. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)

Reakcija lančanog umnožavanja DNK (Polymerase Chain Reaction - PCR) omogućava umnožavanje segmenta DNK definisanog oligonukleotidima koji su komplementarni njegovim krajevima. Sastavi reakcionih smeša i uslovi umnožavanja fragmenata korišćenih u DGGE analizi dati su u Tabeli 5 dok su sastavi reakcionih smeša i uslovi umnožavanja fragmenata korišćenih u analizi gena DNK sekvenciranjem dati u Tabeli 6. Sve reakcije se vrše u zapremini od 50µL sa količinom DNK od 100 do 150ng.

Tabela 5. Sastavi smeša i uslovi reakcije lančanog umnožavanja DNK fragmenata korišćenih u DGGE analizi

fragment	dužina (bp)	sastav reakcione smeše	temperaturni uslovi
egzon 2A	280	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne) 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 30pmol oligonukleotida AT2A/AAT2A GC 1U <i>Taq</i> (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	94 °C 5' 94 °C 1' 54 °C 1' 40 ciklusa 72 °C 2' 72 °C 10'
egzon 2B	382	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne) 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 30pmol oligonukleotida AAT2B/AAT2B GC 1U <i>Taq</i> (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	94 °C 5' 94 °C 1' 58 °C 1' 40 ciklusa 72 °C 2' 72 °C 10'
Egzoni 2C, 3, 5A	2C-357 3-390 5A-162	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne) 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 25pmol oligonukleotida AAT2C/AAT2C GC 35pmol oligonukleotida AAT3/AAT3 GC 20pmol oligonukleotida AT5A/AAT5A GC 1U <i>Taq</i> (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	94 °C 5' 94 °C 1' 54 °C 1' 40 ciklusa 72 °C 2' 72 °C 10'
egzon 4	270	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne) 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 35pmol oligonukleotida AAT4/AAT4 GC 1U <i>Taq</i> (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	94 °C 5' 94 °C 1' 54 °C 1' 40 ciklusa 72 °C 2' 72 °C 10'
egzon 5B	219	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne) 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 35pmol oligonukleotida AAT5B/AAT5B GC 1U <i>Taq</i> (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	94 °C 5' 94 °C 1' 58 °C 1' 40 ciklusa 72 °C 2' 72 °C 10'

Tabela 6. Sastavi smeša i uslovi reakcije lančanog umnožavanja DNK korišćenih u analizi gena DNK sekvenciranjem

fragment	dužina (bp)	sastav reakcione smeše	temperaturni uslovi
egzon 2	769	1 X QIAGEN PCR Buffer 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 2pmol oligonukleotida ex2s1/ex2s2 1U HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) 100-150 ng DNK	94 °C 5' 94 °C 1' 56 °C 1' 30 ciklusa 68 °C 1' 68 °C 10'
egzon 3	407	1 X QIAGEN PCR Buffer 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 2pmol oligonukleotida ex3s1/ex3s2 1U HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) 100-150ng DNK	94 °C 5' 94°C 1' 56°C 1' 30 ciklusa 68°C 1' 68 °C 10'
egzon 4	297	1 X QIAGEN PCR Buffer 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 2pmol oligonukleotida ex4s1/ex4s2 1U HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) 100-150ng DNK	94 °C 5' 94 °C 1' 56 °C 1' 30 ciklusa 68 °C 1' 68 °C 10'
egzon 5	434	1 X QIAGEN PCR Buffer 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 2pmol oligonukleotida ex5-1/ex5s2 1U HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) 100-150ng DNK	94 °C 5' 94 °C 1' 56 °C 1' 30 ciklusa 68 °C 1' 68 °C 10'

3. 3. 4. Elektroforeza u gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa (DGGE)

Elektroforezom u gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE) razdvajaju se fragmenti DNK na osnovu topljivosti. U poliakrilamidnom gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa fragment DNK putuje u zavisnosti od svoje dužine dok ne dođe do koncentracije denaturišućeg agensa koja počinje da otvara domen DNK sa najnižom tačkom topljenja. Na toj tački u gelu oblik molekula se menja od linearnog dvolančanog u parcijalno otvoreni dvolančani molekul, a putovanje molekula u gelu se naglo usporava. Svaka promena u sekvenci DNK menja tačku u gelu na

kojoj molekul počinje da se denaturiše. Na jednom kraju molekula nalazi se GC fragment dužine 25-55bp koji ima najvišu tačku topljenja, tako da se svi ostali delovi molekula denaturišu pre njega. Ova tehnika najefikasnija je za otkrivanje promena u molekulu DNK dužine do 500bp (Wallis, 2002). Kao konstantan denaturišući agens koristi se temperatura od 60°C (na kojoj se nalazi pufer u kome se odvija elektroforeza), a gradijent denaturišućeg agensa u gelu čine urea (od 8,4% do 29,4%) i formamid (od 8% do 28%) (Ljujic, 2006).

Za analizu se koriste 6,5% poliakrilamidni gelovi (6,34% (w/v) akrilamid, 0,16%(w/v) N,N-metilenbisakrilamid, 40mM Tris, 20mM Na-acetat, 1mM Na₂EDTA, 0,1%(w,v) amonijum persulfat, 0,01%(w/v) TEMED). Pre nanošenja na gel uzorci se denaturišu 5 minuta na 94°C, renaturišu 5 minuta na temperaturi vezivanja oligonukleotida, a zatim stavljaju na led. Elektroforeza teče u 1xTAE puferu (40mM Tris, 20mM Na-acetat, 1mM Na₂EDTA, pH 7,4) pri konstantnom naponu od 10V/cm, u trajanju od 6 sati.

3. 3. 5. Bojenje DNK u gelu od poliakrilamida srebro-nitratom

Poliakrilamidni gelovi se po završenoj elektroforezi fiksiraju 20min u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline (Radojkovic, 2000). Gelovi se boje 10min u 0,1% rastvoru srebro-nitrata, a potom dva puta isperu destilovanom vodom radi uklanjanja viška rastvora srebro-nitrata. Razvijanje se vrši 20min u rastvoru 1,5% natrijumhidroksida, 0,01% natrijumborhidrida i 0,048% formaldehida.

3. 3. 6. Prečišćavanje DNK fragmenata

Prečišćavanje PCR fragmenata umnoženih za sekvenciranje kao i DNK fragmenata za ligaciju se vrši pomoću komercijalnog kita QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). U 40µL PCR produkta se doda 200µL pufera PB. Smeša se nanese na prethodno sklopljene kolonu i epruvetu za sakupljanje i centrifugira 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja tečnost iz epruvete za sakupljanje se odliva, a na kolonu se sipa 750µL pufera PE. Zatim se vrše dva centrifugiranja od po 1min na 13000rpm, a nakon svakog se ukloni tečnost iz epruvete za sakupljanje. Kolona se potom prebaci na epruvetu od 1,5mL i na kolonu se sipa 30µL sterilne vode. Nakon inkubacije od 5min na sobnoj temperaturi vrši se centrifugiranje

1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja kolona se odbaci, a u epruveti ostaje 30 μ L rastvora prečišćenih DNK fragmenata.

3. 3. 7. Sekvenciranje DNK

Metodom sekvenciranja određuje se redosled nukleotida u molekulu DNK. Metoda se zasniva na sposobnosti DNK sekvenaze da sintetiše komplementaran lanac DNK nastavljajući oligonukleotidni lanac vezan za jednolančanu DNK (Sanger, 1997). Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugrađivanjem didezoksiribonukleotida (ddNTP) koji ne poseduje 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze neophodnu za elongaciju molekula DNK. Kao produkti reakcije sekvenciranja dobijaju se fragmenti DNK čije se dužine razlikuju za po 1 nukleotid, a koji se završavaju jednim od obeleženih dideoksinukleotida.

Za sekvenciranje se koristi BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Kao matrica u reakciji sekvenciranja se koristi prečišćena dvolančana DNK dobijena u reakciji lančanog umnožavanja ili prečišćena plazmidna DNK. Odgovarajuća količina prečišćenog PCR produkta (1-2ng/100bp) ili plazmida (150-300ng) pomeša se sa 3,2pmol jednog od oligonukleotida kojim je vršeno umnožavanje u zapremini od 6 μ L. U smešu se zatim doda 2 μ L BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix. Nakon inicijalne denaturacije fragmenta od 1min na 96°C i 25 ciklusa umnožavanja: 10sec na 96°C, 5sec na 50°C i 4min na 60°C, produkti reakcije sekvenciranja se precipitiraju pre nanošenja na aparat. U 8 μ L smeše u kojoj je vršena reakcija sekvenciranja doda se 40 μ L 0,1M Na-acetata pH5,2 rastvorenog u etanolu, centrifugira se 10min na 13000rpm i ukloni supernatant. Talog se zatim ispere dva puta sa po 200 μ L 70% etanola, a nakon svakog ispiranja smeša se centrifugira 10min na 13000rpm i supernatant ukloni. Talog se suši nekoliko minuta na sobnoj temperaturi i pre nanošenja na aparat rastvori u 25 μ L Hi-Di Formamide (Applied Biosystems). Produkti reakcije sekvenciranja se analiziraju kapilarnom elektroforezom na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) u komercijalnom polimeru POP-7 Polymer (Applied Biosystems). Za analizu dobijenih

sekvenci se koristi Sequencing Analysis Software v5.3.1 with KB Basecaller v1.4 (Applied Biosystems).

3. 3. 8. Izolacija RNK

Ukupna RNK iz ćelija Hep G2 se izoluje korišćenjem kita RNeasy plus (Qiagen). Za izolaciju se zaseje 2×10^5 ćelija koje se gaje na 5% CO₂/37°C 24 sata, a zatim se liziraju dodavanjem 350µL pufera RTL Plus. Lizat se homogenizuje na QIAshredder koloni centrifugiranjem 2min na 13000rpm. Da bi se izbegla DNK kontaminacija, homogenizovani lizat se nanosi na gDNA Eliminator kolonu i centrifugira 0,5min na 13000rpm. Nakon toga se u eluat dodaje 350µL 70% etanola i celokupna zapremina se prebacuje na RNeasy kolonu za koju se vezuje RNK. Ova kolona se centrifugira 15sek na 13000rpm, a zatim se dodaje 70µL pufera RW1 i kolona ponovo centrifugira 15sek na 13000rpm. U narednom koraku RNK se ispira dva puta sa po 500µL pufera RPE. Kolona se centrifugira 2min na 13000rpm, a nakon toga još jednom 1 min, kako bi se uklonili svi tragovi pufera. RNK se sa kolone eluira sa 40µL sterilne vode, centrifugiranjem 1min na 13000rpm. Prinos i kvalitet izolata RNK se proverava horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu i merenjem koncentracije na spektrofotometru.

3. 3. 9. Sinteza cDNK

Ukupna RNK izolovana iz HepG2 ćelija koristi se kao matrica za sintezu cDNK. Totalna cDNK iz HepG2 ćelija se dobija reverznom transkripcijom korišćenjem kita High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) koji omogućava prevođenje celokupne iRNK u cDNK. Sastav i temperaturni uslovi reakcije reverzne transkripcije prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Sastav i uslovi reakcije reverzne transkripcije

sastav i volumen smeše	temperaturni uslovi
1 X RT pufer	
0,8 μ L 25 X dNTP	25 °C 10'
2 μ L 10 X Random oligonukleotida	37 °C 120'
1 μ L MultiScribe reverzne transkriptaze	85 °C 5''
1000 ng RNK	4 °C ∞
H ₂ O bez RNaze do 20 μ L	

Dobijena totalna cDNK iz HepG2 ćelija koristi se za umnožavanje cDNK koja kodira *wild type* (WT) varijantu alfa-1-antitripsina. Umnožavanjem pomoću oligonukleotida HindIII F i XhoI R je dobijen fragment koji je iz pGEM-T Easy vektora prekloniran u pcDNA3 vektor, pomoću oligonukleotida HindIII F i KpnI R je dobijen fragment koji je prekloniran u pQE31 vektor, a pomoću oligonukleotida HindIII F i AAT KpnI GFPN1 je dobijen fragment koji je prekloniran u pEGFP-N1 vektor. Reakcija umnožavanja AAT cDNK se vrši u zapremini od 50 μ L; sastav reakcione smeše i uslovi umnožavanja dati su u Tabeli 8.

Tabela 8. Sastav i uslovi reakcije umnožavanja AAT cDNK

fragment za subkloniranje u vektor	sastav smeše (ukupan volumen 50 μ L)	temperaturni uslovi
pcDNA3	1 X QIAGEN PCR Buffer 200 μ M dNTP 2, mM MgCl ₂ 1 X Q-Solution 2pmol oligonukleotida HindIII F / XhoI R 1U <i>HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)</i> 100-150ng DNK 50 μ L	94 °C 5' 94 °C 1' 55 °C 2' 35 ciklusa 72 °C 1' 72 °C 10'
pEGFP-N1	1 X QIAGEN PCR Buffer 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 1 X Q-Solution 10pmol oligonukleotida HindIII F/AAT KpnI GFPN1 1U <i>HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)</i> 100-150ng DNK 50 μ L	94 °C 5' 94 °C 1' 55 °C 2' 35 ciklusa 72 °C 1' 72 °C 10'
pQE31	1 X QIAGEN PCR Buffer 200 μ M dNTP 2,5mM MgCl ₂ 1 X Q-Solution 10pmol oligonukleotida HindIII F / KpnI R 1U <i>HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)</i> 100-150ng DNK 50 μ L	94 °C 5' 94 °C 1' 55 °C 2' 35 ciklusa 72 °C 1' 72 °C 10'

3. 3. 10. Ligacija

Ligacija prečišćenih fragmenata DNK dobijenih umnožavanjem pomoću odgovarajuće kombinacije oligonukleotida sa vektorom pGEM-T Easy se vrši pomoću komercijalnog kita pGEM-T Easy Vector System (Promega). Reakcija ligacije ukupne zapremine 10 μ L sadrži 1X pufer za ligazu (Promega), 1 μ L ligaze (10U/ μ L, Promega), 50ng linearizovanog pGEM-T Easy vektora (Promega) i 20ng prečišćenog fragmenta. Reakciona smeša se inkubira preko noći na 4°C.

Ligacija prečišćenih fragmenata dobijenih isecanjem inserta iz pGEM-T Easy vektora sa vektorima pcDNA3, pQE31 i pEGFP-N1 vrši se pomoću enzima T4 ligaze. Fragmenti za ligaciju u vektor pQE31 su isecani enzimima BamHI i KpnI, za ligaciju u vektor pcDNA3 enzimima HindIII i XhoI, a za ligaciju u vektor pEGFP-N1 enzimima HindIII i KpnI. Reakcija ligacije ukupne zapremine 10 μ L sadrži 1X pufer za ligazu (Promega), 1 μ L T4 ligaze (10U/ μ L, Promega), 50ng linearizovanog pGEM-T Easy vektora (Promega) i 40ng prečišćenog fragmenta. Reakcija se odvija preko noći na 4°C.

3. 3. 11. Mutageneza

In situ PCR dirigovana mutageneza se koristi za uvođenje promena u DNK sekvenci cirkularnih vektora. Za izvođenje ove metode koristi se modifikacija uputstva za QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

Za svako mesto koje se mutira potreban je po jedan odgovarajući oligonukleotid. Oligonukleotidi koji se koriste u mutagenezi bi trebalo da sadrže 25-45 nukleotida i da temperatura njihovog topljenja bude ≥ 75 °C. Temperatura topljenja se može izračunati pomoću sledeće formule:

$$T_m = 81,5 + 0,41 X (\text{GC}\%) - 675/N - \text{MN}\%; \text{GC-GC sastav (\%)}, N\text{-dužina oligonukleotida (bp)}, \text{MN-nespareni nukleotidi (\%)}$$

Poželjno je da GC sastav bude najmanje 40% i da se oligonukleotid završava nukleotidom G ili C. Mutacija koja se uvodi treba da se nalazi u sredini oligonukleotida koji mora biti fosforilisan na 5'OH kraju.

U ovom radu za mutagenezu se koriste oligonukleotidi G320Rmut, V321Fmut i AATZmut prethodno fosforilisani na 5'OH kraju. Sastav smeša za fosforilaciju oligonukleotida i temperaturni uslovi dati su u Tabeli 9.

Tabela 9. Uslovi reakcije fosforilacije oligonukleotida za mutagenezu.

sastav smeše	temperaturni uslovi
5 μ L 100 μ M oligonukleotida za mutagenezu 2.5 μ L pufera 10X T4 Polynucleotide Kinase 1.25 μ L 10mM ATP 1 μ L T4 Polynucleotide Kinase (USB, Pharmacia) sterilna H ₂ O do 25 μ L	37 °C 45' 65°C 5' (inaktivacija enzima)

U svaku od reakcija se nakon inaktivacije dodaje 25 μ L dH₂O i reakcije se propuštaju kroz G50 kolonicu (GE Healthcare) kako bi se oslobodile soli.

Procedura dobijanja mutiranog plazmida se sastoji iz tri koraka. Prvi korak obuhvata PCR reakciju u kojoj se vrši ekstenzija mutiranog oligonukleotida pomoću miksa DNK polimeraza *Pfu* i *Vent*. Kao matrica za umnožavanje koristi se vektor sa ukloniranom sekvencom u koju se uvodi mutacija. Dobijaju se dvolančani molekuli DNK, a samo jedan lanac nosi mutacije i prekide koji se zatvaraju pomoću enzimske smeše. Sastav PCR smeše i uslovi umnožavanja su prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Uslovi reakcije PCR mutageneze.

sastav i volumen smeše	temperaturni uslovi
1 X PfuPol buffer (Fermentas) 1 μ L 25mM dNTP 1 μ L (100 ng) oligonukleotida za mutagenezu 100ng plazmidne DNK 0.5 μ L PfuI polimeraze (Fermentas) 0.5 μ L Vent polimeraze (BioLabs) sterilna H ₂ O do 50 μ L	95 °C 1' 95 °C 1' 55 °C 1' 30 ciklusa 65 °C 8'20"

Drugi korak mutageneze obuhvata digestiju produkta PCR reakcije endonukleazom DpnI koja seče metilovanu i hemimetilovanu DNK (5'Gm6ATC-3') i na taj način odstranjuje DNK lanac koji je korišćen kao matrica za mutagenezu. Uslovi reakcije su prikazani u Tabeli 11.

Tabela 11. Uklanjanje metilovane DNK.

sastav smeše	temperaturni uslovi	produkt digestije
20U <i>DpnI</i> (Biolabs) 25 μ L PCR reakcije	37 °C, 1 h	jednolančana cirkularna nemetilovana DNK

Treći korak obuhvata transformaciju kompetentnih *E. Coli* XL 1-Blue ćelija mutiranom zatvorenom jednolančanom DNK koja se *in vivo* prevodi u dvolančanu DNK.

3. 3. 12. Kultivacija bakterija

Bakterije soja *E. coli* XL1-Blue se gaje na 37°C u hranljivom medijumu LB u tečnim bakterijskim kulturama uz aeraciju ili na čvrstoj podlozi. Tečni medijum LB sadrži 1% tripton, 0,5% ekstrakt kvasca i 0,5% NaCl, a čvrstu podlogu za gajenje bakterija čine medijum LB i 1,5% agar. Prilikom gajenja bakterija na selektivnoj podlozi u čvrstu podlogu i medijum LB se dodaje odgovarajući antibiotik.

3. 3. 13. Priprema kompetentnih ćelija za transformaciju toplotnim šokom

Kompetentne ćelije za transformaciju toplotnim šokom se pripremaju iz 400mL tečne kulture bakterija u logaritamskoj fazi rasta. Po 200mL tečne kulture se centrifugira 10min na 3000rpm i 4°C. Supernatanti se odbace, a talozi se resuspenduju u po 5mL ohlađenog 0,1M CaCl₂. Nakon inkubacije od 15min na ledu i centrifugiranja 10min na 3000rpm i 4°C, supernatanti se odbace, a talozi rastvore u po 1mL pufera RF2 (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% glicerol, pH6,8). Nakon inkubacije od 15min na ledu rastvori kompetentnih bakterijskih ćelija se alikvotiraju i čuvaju na -80°C.

3. 3. 14. Transformacija bakterija toplotnim šokom

Rastvor svežih kompetentnih ćelija (200 μ L) se pomeša sa 5 μ L produkta reakcije ligacije, pa se smeša dalje inkubira 1h na ledu. Nakon toga, smeša se inkubira najpre 2min na 42°C, a potom 5min ponovo na ledu. Na selektivnu podlogu se zatim nanese svih 200 μ L

smeše. Nakon prekonoćne inkubacije na 37°C, transformanti se uočavaju kao pojedinačne kolonije.

3. 3. 15. Izolacija plazmidne DNK

Izolacija plazmidne DNK iz bakterija se vrši pomoću komercijalnog kita QIAprep MiniPrep (Qiagen). Bakterijske ćelije iz kojih se vrši izolacija plazmidne DNK se talože u epruveti od 1,5mL u tri centrifugiranja od po 1min na 13000rpm iz 4,5mL prekonoćne bakterijske kulture. Talog se resuspenduje u 250 μ L pufera P1, a zatim se doda 250 μ L pufera P2, nakon čega se epruvete blago mućkaju. U smešu se zatim doda 350 μ L pufera N3 i epruvete se blago promućkaju, a potom centrifugiraju 10min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja supernatant se prebaci na prethodno sklopljene kolonu i epruvetu za sakupljanje i centrifugira 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja tečnost iz epruvete za sakupljanje se odlije, a na kolonu se sipa 500 μ L pufera PB i epruveta centrifugira 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja tečnost iz epruvete za sakupljanje se odlije, a kolona se ispira sa 750 μ L pufera PE. Zatim se vrše dva centrifugiranja od po 1min na 13000rpm, a nakon svakog se uklanja tečnost iz epruvete za sakupljanje. Kolona se potom prebaci na epruvetu od 1,5mL i na kolonu se sipa 50 μ L sterilne vode. Elucija DNK se nakon inkubacije od 5min na sobnoj temperaturi vrši centrifugiranjem 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja kolona se odbaci, a u epruveti ostaje 50 μ L rastvora prečišćene plazmidne DNK.

3. 3. 16. Prečišćavanje DNK fragmenata iz gela od agaroze

Inserti isečeni odgovarajućim restrikcionim enzimima iz vektora pGEM-T Easy se prečišćavaju iz gela od agaroze pomoću komercijalnog kita QIAquick PCR Purification (Qiagen). Produkti digestija plazmida razdvajaju se elektroforezom u 2% gelu od agaroze u koji je dodat etidijum bromid (0,5 μ g/mL). Elektroforeza teče u 0,25xTBE puferu (25mM Tris, 20mM borna kiselina, 0,25mM EDTA pH8) pri naponu 10V/cm. Vizuelizacija traka se vrši osvetljavanjem gela UV svetlošću. Trake odgovarajuće dužine (1200bp) se iseku iz gela i prebace u epruvete od 1,5mL, u kojima se potom meri masa agaroze. U epruvetu se zatim doda 3 zapremine pufera QG i smeša se inkubira na 50°C, 10 minuta ili do potpunog

rastvaranja agaroze, uz povremeno vorteksovanje. Smeša se zatim nanese na prethodno sklopljene kolonu i epruvetu za sakupljanje i centrifugira 1min na 13000rpm. Nakon centrifugiranja tečnost iz epruvete za sakupljanje se odlije, a na kolonu se sipa 750 μ L pufera PE. Zatim se vrše dva centrifugiranja od po 1min na 13000rpm, a nakon svakog se ukloni tečnost iz epruvete za sakupljanje. Kolona se potom prebaci na epruvetu od 1,5mL i na kolonu se sipa 30 μ L sterilne vode. Nakon inkubacije od 5min na sobnoj temperaturi vrši se centrifugiranje 1min na 13000rpm.

3. 3. 17. Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi

Plazmidne DNK iz bakterija u kojima su propagirani vektori pCDNA3 i p123GFP sa odgovarajućim insertima pripremaju se za transfekciju ćelija u kulturi pomoću komercijalnog kita EndoFree Plasmid Mini (Qiagen). Bakterijska kolonija sa petri šolje se zaseje u 5mL LB medijuma sa 5 μ L rastvora antibiotika ampicilina (100mg/mL) i gaji 8h na 37°C na 300rpm. Alikovot osmočasovne bakterijske kulture od 6 μ L se zaseje u 3mL LB medijuma, pa se bakterije potom gaje 16h na 37°C na 300rpm. Bakterijska kultura se zatim centrifugira 15min na 4°C na 3000rpm i supernatant odbaci. Talog se resuspenduje u 300 μ L pufera P1, zatim se doda 300 μ L pufera P2, uz blago mućkanje. Nakon inkubacije od 5min na sobnoj temperaturi, doda se 300 μ L pufera P3, smeša blago promućka i potom inkubira 5min na ledu. Nakon toga, smeša se centrifugira 10min na 13000rpm i supernatant se potom prebaci na prethodno pripremljeni Qiagen-tip 20 koji je prethodno pripremljen ispiranjem sa 1mL pufera QBT. Nakon propuštanja smeše, Qiagen-tip 20 se ispere dva puta sa po 2mL pufera QC. Qiagen-tip 20 se zatim prebaci u odgovarajuću tubu za centrifugiranje i potom ispere sa 800 μ L pufera QN. U rastvor dobijen eluiranjem sa Qiagen-tip 20 se doda 560 μ L izopropanola i smeša se, nakon blagog mućkanja, centrifugira 30min na 10000rpm. Nakon pažljivog odlivanja supernatanta, talog se pere u 1mL 70% etanola i centrifugira 10min na 10000rpm. Pošto se ukloni supernatant, preostali talog se osuši na sobnoj temperaturi, a potom rastvori u 50 μ L pufera TE.

3. 3. 18. Indukcija ekspresije rekombinantnog alfa-1-antitripsina

Za određivanje funkcionalne aktivnosti i termostabilnosti alfa-1-antitripsina koristi se rekombinantni protein, kloniran u bakterijskom ekspresionom vektoru pQE-31 (Qiagen) i ekspimiran u bakterijskom *E. coli* soju BL21-CodonPlus-RIL. Transkripcija rekombinantnog proteina u vektoru pQE-31 regulisana je fagnim promotorom T5 i dvema sekvencama *lac* operatora. Ekspresija proteina se vrši u bakterijskom soju BL21-CodonPlus-RIL koji sadrži dodatne kopije gena koji kodiraju tRNK koje najčešće limitiraju translaciju heterolognih proteina i pogodan je za ekspresiju proteina koji se slabo ekspimiraju. Indukcija ekspresije vrši se dodavanjem IPTG-a (izopropil- β -D-tiogalaktozid) koji se vezuje za *lac* represor protein i inaktivira ga.

Izolacija rekombinantnog alfa-1-antitripsina se vrši iz 600mL bakterijske kulture. Bakterijski klon proteina AAT zasejava se sa sveže petri šolje ili iz glicerolskog stoka u 10ml medijuma LB sa antibioticima (ampicilin 100 μ g/ml, hloramfenikol 30 μ g/ml). Kultura se inkubira preko noći na 37°C uz lagano mućkanje na 180rpm. Sledećeg dana 10 ml prekonoćne kulture se razblaži 60 puta medijumom LB sa antibioticima i inkubacija nastavlja na 30°C uz lagano mućkanje. Kada su bakterije u logaritmskoj fazi rasta (OD₆₀₀ 0,5-0,7), indukuje se ekspresija rekombinantnog proteina dodavanjem IPTG-a finalne koncentracije 1mM i kultura inkubira još 5 sati pod istim uslovima. Nakon toga, bakterijske ćelije se talože centrifugiranjem 20min pri sili od 4000g, na 4°C. Talozi se čuvaju na -20°C.

3. 3. 19. Prečišćavanje rekombinantnog proteina

Za prečišćavanje proteina pod nativnim uslovima koristi se afinitetna hromatografija na komercijalnom matriksu TALON (TALON Metal Affinity Resin Clontech Laboratories Inc). Prečišćavanje se vrši po uputstvu proizvođača, uz manje modifikacije. Ova procedura se zasniva na reverzibilnoj interakciji imobilizovanih metalnih jona kobalta sa polihistidinskim repićem rekombinantnog proteina. Rekombinantni protein eluira se imidazolom koji kompetira polihistidinskom repiću vezanom za matriks.

Bakterijski talog iz 600ml kulture se resuspenduje u 50ml litičkog pufera (50mM NaH₂PO₄ pH 7,0; 300mM NaCl; 10 mM imidazol; smeša proteinaznih inhibitora (Complete, EDTA free, Roche). Čelije se liziraju 30min na ledu, u prisustvu lizozima (0,75mg/ml). Kratkom sonikacijom (sonikator Sonic dismembrator model 300, Fisher), sa tri pulsa 70-80% maksimalne jačine u trajanju od 15 s na ledu, fragmentiše se genomska DNK bakterija. Sonikat se oslobađa ćelijskih ostataka centrifugiranjem 30 min na 7500 g na 4°C. U bistri supernatant se potom dodavaje 1ml 50% TALON matriksa prethodno dva puta opranog sa po 10ml litičkog pufera. Posle jednočasovne inkubacije proteinskog lizata i matriksa na 4°C i uz blago mućkanje, matriks sa vezanim proteinima se obara centrifugiranjem 5min na 480 g. Nespecifično vezani proteini se odstranjuju sa matriksa puferom za pranje (50mM NaH₂PO₄ pH 7,0; 300mM NaCl; 10mM imidazol). Matriks se ispira 3 puta sa po 2,5ml pufera za pranje u trajanju od 10min na 4°C. Proteini vezani za smolu se eluiraju 2 puta u trajanju od sat vremena sa po 3ml pufera za eluciju nativnih proteina (50mM NaH₂PO₄ pH 7,0; 300mM NaCl; 150mM imidazol). Koncentracija proteina se određuje metodom Bradforda (BioRad), po uputstvu proizvođača. Efikasnost prečišćavanja analizira se elektroforezom u denaturišućim poliakrilamidnim gelovima.

3. 3. 20. Elektroforeza proteina u denaturišućem poliakrilamidnom gelu

Uzorci proteina se razdvajaju elektroforezom u 12% SDS poliakrilamidnim gelovima u puferu sastava: 25mM Tris baza, 192mM glicin i 0,1% SDS. Uzorcima se dodaje ista zapremina dva puta koncentrovanog pufera za uzorak (50mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 715mM β-merkaptotanol; 0,02% boja bromophenol blue), a pred nanošenje na gel proteini se denaturišu 5min na 95°C. Posle elektroforeze, gelovi se boje komasi plavim (0,4% comassie blue; 10% sirćetna kiselina; 40% metanol) i odbojavaju u rastvoru 7% sirćetne kiseline i 25% metanola. Za analizu uzroka razlike u pokretljivosti različitih varijanti alfa-1-antitripsina na SDS gelovima, u gel i pufer za elektroforezu se, kao dodatni denaturišući agens, dodaje i urea u koncentraciji od 5M.

3. 3. 21. Koncentrovanje proteina i izmena pufera

Prečišćen protein se koncentruje, a s obzirom da imidazol u puferu za eluciju ometa reakciju alfa-1-antitripsina sa elastazom, istovremeno se vrši i izmena pufera propuštanjem kroz Amicon Ultra 30K kolonicu (Millipore). Na kolonicu se nanosi 500 μ L proteina i uzorak centrifugira na 8000g dok na kolonici ne ostane 50 μ L rastvora proteina. Nakon toga se na kolonicu nanosi 450 μ L pufera sastava 30mM Na-fosfat, 160mM NaCl, pH7,4 i uzorak centrifugira 8min na 14000g dok na kolonici ne ostane 50 μ L rastvora proteina. Postupak dodavanja novog pufera i centrifugiranja ponavlja se 3 puta tako da se finalno dobija 10 puta koncentrovan protein u puferu bez imidazola. Ukoncentrovani uzorci se alikvotiraju i čuvaju na -70°C do upotrebe. Koncentracija proteina se određuje metodom Bradforda (BioRad), po uputstvu proizvođača.

3. 3. 22. Prenos proteina na membranu

Proteini razdvojeni elektroforezom na denaturišućem poliakrilamidnom gelu preneti su na membranu polusuvim transferom. Nakon završene elektroforeze gel se inkubira 5min u katodnom puferu (25mM Tris-HCl pH 9,4; 40mM glicin; 20% metanol). Membrana, na koju se vrši prenos proteina iz gela, priprema se na sledeći način: najpre se potapa 10sek u metanol, zatim se dva puta ispira destilovanom vodom (prvi put 5sek, drugi put 5min) i na kraju inkubira 5min u anodnom puferu II (25mM Tris-HCl pH 10,4; 20% metanol).

Membrana i gel se slažu u sendvič između elektroda sledećim redosledom: anoda se kvasi anodnim puferom I (300mM Tris-HCl pH 10,4; 20% metanol) i na nju se stavljaju 3 parčeta filter papira (Watman 3 MM) - donja dva natopljena u anodnom puferu I, a gornje u anodnom puferu II, potom se polaže membrana, pa gel i na kraju opet 3 parčeta 3 MM papira natopljena u katodnom puferu. Aparatura se zatvara postavljanjem katode na složeni sendvič. Transfer se vrši 1h pri snazi od 5mA/cm² gela. Za prenos proteina koristi se Immobilon-P membrana za transfer (Millipore) od polivinilden fluorida (PVDF).

3. 3. 23. Western blot analiza

Za detekciju proteina koristi se primarno antitelo – kozje poliklonsko antitelo na humani alfa-1-antitripsin (Abcam). Sekundarno antitelo je konjugovano sa peroksidazom rena (horse radish peroxidaze - HRP) i prepoznaje kozje proteine (Sigma).

Posle završenog prenosa proteina, membrana se inkubira 1h na sobnoj temperaturi (ili preko noći na 4°C) u PBS puferu (50mM K₂PO₄, pH 7,2; 150mM NaCl) kome je dodato 10% obrano mleko u prahu i 0,05% Tween 20. Pre inkubacije sa primarnim antitelom, membrana se ispira nekoliko puta rastvorom PBS pufera sa 0,05% Tween 20. Antitelo na alfa-1-antitripsin razblažuje se 10000 puta u PBS puferu sa 1% posnim mlekom i 0,05% Tween 20. Membrana se inkubira u rastvoru razblaženog primarnog antitela preko noći na 4°C uz konstantno mućkanje. Nespecifično vezano primarno antitelo se uklanja pranjem membrane 3 puta po 10min rastvorom 1x PBS pufera sa 0,05% Tween 20. Membrana se zatim inkubira sa sekundarnim antitelom (200000x razblaženim u rastvoru PBS puferu sa 5% bezmasnim mlekom i 0,05% Tween20) 1h na sobnoj temperaturi uz konstantno mućkanje. Pre detekcije, nespecifično vezano sekundarno antitelo se uklanja pranjem membrane 3 puta po 10min rastvorom 1x PBS pufera sa 0,05% Tween 20. Signal se detektuje Immobilion Western Chemiluminiscent HRP supstratom (Millipore). Za vreme detekcije membrana je zaštićena od dejstva svetlosti. Bojena reakcija se prekida pranjem membrane u destilovanoj vodi i sušenjem.

3. 3. 24. Određivanje inhibitorne aktivnosti alfa-1-antitripsina

Inhibitorna aktivnost rekombinantnog alfa-1-antitripsina određuje se u reakciji sa elastazom pankreasa (elastase from porcine pancreas, SERVA) (Lee, 1998). Aktivnost elastaze u preparatu određuje se titracijom sa supstratom N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide (SERVA). Hidrolizom supstrata u alkalnoj sredini oslobađa se žuto obojeni 4-nitroanilin koji se meri spektrofotometrijski. Reakcija titracije radi se sa rastućim koncentracijama elastaze (od 0 do 101,6μM) i konstantnom količinom supstrata (1mM) u puferu za esej sledećeg sastava: 30mM NaH₂PO₄ pH 7.0, 160mM NaCl, 0,1% PEG600, 0,1% TritonX100, pH7,4 u zapremini od 50μL. Reakcija se inkubira 10min na 37°C, zatim

zaustavlja dodavanjem 450 μ l pufera, tj. razblaživanjem 10x, i absorbanca svake reakcije se određuje na 410nm na aparatu Multiskan RC (Labsystems). Na ovaj način se određuje minimalna koncentracija preparata elastaze potrebnog da izreaguje sa svim supstratom u reakciji i ova količina se zatim koristi u određivanju stehiometrije reakcije sa preparatima rekombinantnog alfa-1-antitripsina.

Određivanje stehiometrije inhibicije izolata alfa-1-antitripsina radi se sa konstantnom, prethodno određenom, količinom elastaze i rastućim koncentracijama alfa-1-antitripsina u reakciji od 50 μ L sledećeg sastava: 30mM NaH₂PO₄ pH 7.0, 160mM NaCl, 0,1% PEG600, 0,1% Tritonx100. Reakcija se inkubira 15min na 37°C, nakon čega se dodaje supstrat u finalnoj koncentraciji od 1mM i reakcija inkubira još 10min. Nakon toga reakcija se prekida dodavanjem 450 μ L pufera i absorbanca se meri na 410nm. Na ovaj način se određuje količina proteina neophodna da inhibira svu elastazu u reakciji, odnosno količina u kojoj su proteaza i njen inhibitor u odnosu 1:1.

Za analizu kompleksa izolata rekombinantnog alfa-1-antitripsina i elastaze rezistentnih na SDS, 3 μ g antitripsina se inkubira sa elastazom u molarnim odnosima 1:0.3, 1:0.6 i 1:1 u puferu za esej. Uzorcima se zatim dodaje ista zapremina dva puta koncentrovanog pufera za uzorak (50mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 715mM β -merkaptioetanol; 0,02% boja bromophenol blue), denaturišu se 5min na 95°C i zatim nanose 10% SDS poliakrilamidni gel. Gelovi se posle elektroforeze boje komasi plavim (0,4% comassie blue; 10% sirćetna kiselina; 40% metanol) i odbojavaju u rastvoru 7% sirćetne kiseline i 25% metanola.

3. 3. 25. Termalna denaturacija alfa-1-antitripsina

Za ispitivanje termostabilnosti varijanti alfa-1-antitripsina G320R i V321F po 3 μ g proteina u PBS puferu (137mM NaCl, 3,375mM KCl, 1,76mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄) se inkubira 1h vremena na sledecim temperaturama: 4°C, 40°C, 45°C, 55°C i 60°C. Na ovaj način se termalnom denaturacijom indukuje formiranje polimera alfa-1-antitripsina. Deo uzorka se nakon inkubacije odvaja za eseje inhibitorne aktivnosti prema elastazi dok se ostatak analizira elektroforezom u nativnim poliakrilamidnim gelovima.

3. 3. 26. Elektroforeza proteina u nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima

Određivanje termostabilnosti proteina vrši se u 10% nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima u anodnom puferu sastava 0,1M Tris baza, pH 7,8 i katodnom puferu sastava 53mM Tris baza, 68mM glicin, pH 8,9. Uzorcima se dodaje ista zapremina dva puta koncentrovanog pufera za uzorak (1M Tris-HCl pH 6,8; 20% glicerol; 0,02% boja bromophenol blue). Posle elektroforeze, gelovi se boje komasi plavim (0,4% comassie blue; 10% sirćetna kiselina; 40% metanol) i odbojavaju u rastvoru 7% sirćetne kiseline i 25% metanola.

Sklonost alfa-1-antitripsina ekspimiranog u eukariotskom sistemu ka formiranju polimera takođe se analizira elektroforezom na 10% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu u puferu za nanošenje uzoraka bez SDS-a i β merkptoetanolu. Čelijski ekstrakti i medijumi COS7 ćelija transfekovanih pcDNA 3 vektorom sa odgovarajućim insertom prikupljaju se 24h nakon transfekcije i koncentruju propuštanjem kroz Amicon Ultra 30K kolonicu (Millipore). Nakon elektroforeze vrši se transfer proteina na membranu i detekcija odgovarajućim antitelom.

3. 3. 27 Kultivacija ćelijskih linija

Za gajenje ćelijskih linija COS7 i HepG2 se koristi medijum DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA) obogaćen fetalnim goveđim serumom (FBS, Fetal Bovine Serum, PAA) i sa dodatkom 0,05mg/mL gentamicina. Čelije HepG2 se gaje u prisustvu 1x MEM neesencijalnih aminokiselina (SIGMA). Obe ćelijske linije se gaje u inkubatoru na 37°C i sa automatskim protokom 5% CO₂.

3. 3. 28. Tranzijentna transfekcija COS7 ćelijske linije

Transfekcija ćelijske linije COS7 se vrši pomoću reagensa Polyfect (Qiagen) prema priloženom uputstvu proizvođača. Za transfekcije se koristi 2×10^5 ćelija koje se gaje u plastičnim sudovima površine 3,9cm² u medijumu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA) obogaćenom sa 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, Fetal Bovine Serum,

PAA) i u prisustvu 0,05mg/mL gentamicina. Nakon 24h gajenja vrši se transfekcija ćelija sa 1000ng plazmida pEGFP-N1 sa odgovarajućim insertom. Nakon što se DNK i Polyfect pomešaju u odnosu 1µg:5µL sa rastvorom DMEM u zapremini od 100µL, smeša se kratko vorteksuje i inkubira 10min na sobnoj temperaturi. U međuvremenu se ćelije operu puferom PBS (137mM NaCl, 3,375mM KCl, 1,76mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄). Formiranje kompleksa između DNK i reagensa Polyfect se nakon 10min prekine dodavanjem 600µL medijuma u smešu, nakon čega se smeša doda u ćelije. Nakon transfekcije ćelije se gaje naredna 3h, potom se doda još po 1mL medijuma u svaki sud i ćelije gaje dalje do isteka 24h od transfekcije.

3. 3. 29. Imunofluorescencija

Određivanje lokalizacije varijanti G320R i V321F alfa-1-antitripsina unutar ćelije vrši se praćenjem kolokalizacije proteina obeleženih zelenim fluorescentnim proteinom (GFP) sa markerom Goldžijevog aparata (goldžin-97). Dan pre transfekcije 2×10^5 COS7 ćelija se zasejava na pokrovna stakalca veličine 20x20mm koja su prethodno tretirana rastvorom kolagena (60µg/mL kolagena u 0,02N sirćetnoj kiselini). Transfekcija COS7 ćelija vektorima pEGFP-N1, pEGFP-N1-WT, pEGFP-N1-G320R, pEGFP-N1-V321F i pEGFP-N1-Z vrši se Polyfect reagensom. Dan nakon transfekcije ćelije se fiksiraju 2% rastvorom saharoze u 3% paraformaldehidu 20min, nakon čega se ispiraju 1x rastvorom PBS pufera a zatim inkubiraju 5min u 0,1M rastvoru glicina u 1xPBS puferu kako bi se inaktivirao paraformaldehid. Permeabilizacija se vrši inkubacijom ćelija u 1% rastvoru TritonX-100 u 1xPBS puferu 3 puta po 10min, nakon čega se vrši bloking u 2% rastvoru BSA u 1xPBS puferu. Ćelije se inkubiraju sa primarnim antitelom preko noći na 4°C. Antitela se razblažuju u rastvoru 1%BSA u 1xPBS puferu. Anti- Goldžin 97 antitelo se koristi u razblaženju od 1:500. Nespecifično vezano primarno antitelo se uklanja pranjem uzoraka 3 puta po 10min rastvorom 1x PBS pufera sa 0,2% Tween20. Preparati se zatim inkubiraju sa 11000x razblaženim sekundarnim antitelom 1h na sobnoj temperaturi nakon čega se nespecifično vezano sekundarno antitelo uklanja pranjem membrane 3 puta po 10min rastvorom 1x PBS pufera sa 0,2% Tween 20. Na pločice se zatim dodaje po 15µL

0,016µg/mL rastvora DAPI boje u Vectashield reagensu (Vector laboratories). Preparati se analiziraju na fluorescentnom mikroskopu BX51 (Olympus).

3. 3. 30. Kompjuterska predikcija uticaja mutacija na protein

Potencijalni efekti novootkrivenih promena u egzonu 4 AAT gena na protein preliminarno su testirani kompjuterskim predikcijama korišćenjem servera HOPE (cmbi.ru.nl/hope/home) i PolyPhen-2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2/). HOPE je server za analizu mutacija koji prikuplja informacije o strukturi iz različitih izvora uključujući proračune 3D strukture proteina, Uniprot bazu podataka i predikcije sa DAS servera, kombinuje ove informacije i daje procenu i vizuelizaciju efekta određene mutacije na strukturu proteina (Venselaar, 2010). PolyPhen-2 služi za predikciju potencijalnog uticaja aminokiselinske zamene na strukturu i funkciju proteina (Adzhubei, 2010). Predikcija se zasniva na velikom broju karaktristika koje server povlači iz različitih baza podataka počevši od sekvence, filogenetskih i strukturnih informacija koje karakterišu substituciju i daje procenu efekta aminokiselinske zamene na protein. Kao unos za HOPE i PolyPhen-2 analizu korišćen je AAT Uniprot broj P01009 i zamene G344R i V345F.

4. REZULTATI

4. 1. Ispitanici

Ova studija je uključila 27 ispitanika obolelih od emfizema pluća i 66 ispitanika sa karcinomom pluća. Kod ispitanika sa emfizemom pluća dijagnoza je postavljena na osnovu kliničke slike, rendgena grudnog koša i testova funkcije pluća FEV₁ i FVC, prema kriterijumima Evropskog respiratornog društva (GOLD 2006). Grupa ispitanika sa emfizemom pluća je obuhvatila 8 žena i 19 muškaraca starosti od 20 do 75 godina. Više od 70% ispitanika su bili pušači, pri čemu je u grupi ispitanika muškog pola bilo više pušača (77,8%) nego u grupi ispitanika ženskog pola (55,5%). Odabrane karakteristike ispitanika sa emfizemom pluća date su u Tabeli 12.

Tabela 12. Odabrane karakteristike ispitanika sa emfizemom pluća (podaci za pušački status su izraženi u procentima, ostali podaci kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom)

	Muškarci (n=18)	Žene (n=9)	Ukupno (n=27)
godine starosti (srednja vrednost ± SD)	39,3±18,58	26,6±11,89	34,92±18,18
FEV ₁ (% od predviđene vrednosti)	33,4±15,5	39,6±25,7	35,9±19,8
FVC (% od predviđene vrednosti)	64,2±21	61,5±25	62,7±22,5
Pušači (%)	77,8	55,5	70,3

Ispitanici sa karcinomom pluća su prema histološkom tipu karcinoma klasifikovani u ispitanike sa sitnoćelijskim karcinomom (small cell lung carcinoma – SCLC) i ispitanike sa nesitnoćelijskim karcinomom (nonsmall cell lung carcinoma – NSCLC). Za svakog od ovih ispitanika prikupljeni su podaci o pušačkom statusu, ličnoj i porodičnoj istoriji hronične obstruktivne bolesti pluća (HOBP) i porodičnoj istoriji karcinoma pluća. Pušački status je izražen kao paklo/godina (jedna paklo/godina je jedna pakla cigareta svakog dana godinu dana). Kod ispitanika je određivana i koncentracija alfa-1-antitripsina u serumu. Grupa ispitanika sa karcinomom pluća je obuhvatila 12 žena i 54 muškarca starosti od 45 do 75 godina. Vrednosti koncentracije alfa-1-antitripsina su bile povišene ($2,31 \pm 0,81 \text{ g/L}$) u odnosu na referentne vrednosti ($1,21 - 2,17 \text{ g/L}$). Od ukupnog broja 97% ispitanika su bili pušači, pri čemu su svi ispitanici muškog pola bili pušači dok je kod ispitanika ženskog pola bilo 87% pušača. Većina ispitanika (72%) je imala sitnoćelijski karcinom. Odabrane karakteristike ispitanika sa karcinomom pluća date su u Tabeli 13.

Tabela 13. Odabrane karakteristike ispitanika sa karcinomom pluća. Svi podaci, osim starosti i paklo godina su iskazani u procentima.

	Muškarci (n=54)	Žene (n=12)	Ukupno (n=66)
godine starosti (srednja vrednost ± SD)	57,96±7,81	61,83±7,48	58,67±7,84
histološki tip karcinoma pluća			
SCLC	70	92	72
NSCLC	30	8	28
Pušači (%)	100	83	97
paklo/godina	46,9±33,8	34±8,2	49,4±43
AAT koncentracija (g/L)	2,36±0,85 (n=27)	2,13± 0,64 (n=7)	2,31±0,81
istorija HOBP	17	0	13
porodična istorija HOBP	11	18	12
porodična istorija karcinoma pluća	4	0	3
ekstratorakalne metastaze	45	33	43

HOBP – hronična obstruktivna bolest pluća, SCLC – small cell lung carcinoma, NSCLC – nonsmall cell lung carcinoma.

4. 2. Strukturna analiza gena za alfa-1-antitripsin

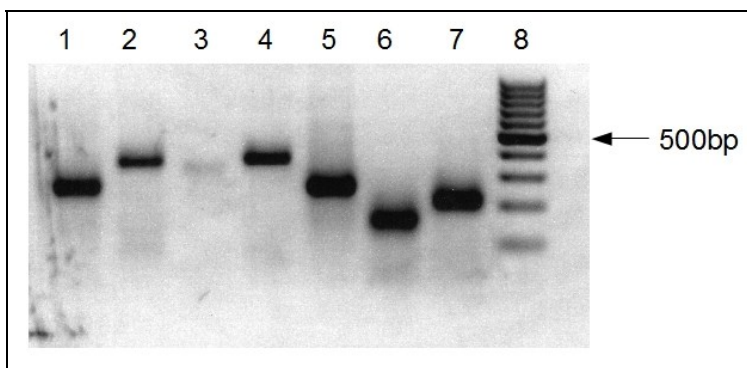
Iz uzoraka periferne krvi ispitanika obolelih od emfizema i karcinoma pluća izolovana je DNK koja je korišćena u analizi gena za alfa-1-antitripsin. Prinos i kvalitet izolovane DNK je proveravan na 1% agaroznim gelovima. DNK je dalje korišćena za umnožavanje u PCR reakciji.

Analiza gena za alfa-1-antitripsin kod pacijenata sa emfizemom pluća vršena je DGGE metodom a sve pronađene promene su potvrđene sekvenciranjem DNK, dok je kod pacijenata sa karcinomom pluća vršena direktno DNK sekvenciranjem.

4. 2. 1. Analiza egzona gena za alfa-1-antitripsin DGGE metodom

Elektroforeza u gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa (DGGE) omogućava razdvajanje fragmenata na osnovu topljivosti. Pošto se tačke topljenja različitih egzona razlikuju moguće je istovremeno analizirati više različitih egzona u istom uzorku. Svi kodirajući egzoni AAT gena – 2, 3, 4 i 5 kod ispitanika sa emfizemom pluća su analizirani DGGE metodom. Egzon 2 je zbog kompleksnog obrasca topljenja podeljen u tri amplikona - 2A, 2B i 2C, a egzon 5 u dva - 5A i 5B.

Za umnožavanje DNK fragmenata korišćeni su prajmeri prikazani u Tabeli 2, a uslovi umnožavanja su prikazani u Tabeli 4. Prinos PCR reakcija je proveravan na 2% agaroznim gelovima. Rezultati umnožavanja egzona AAT gena za analizu DGGE metodom prikazani su na Slici 11.

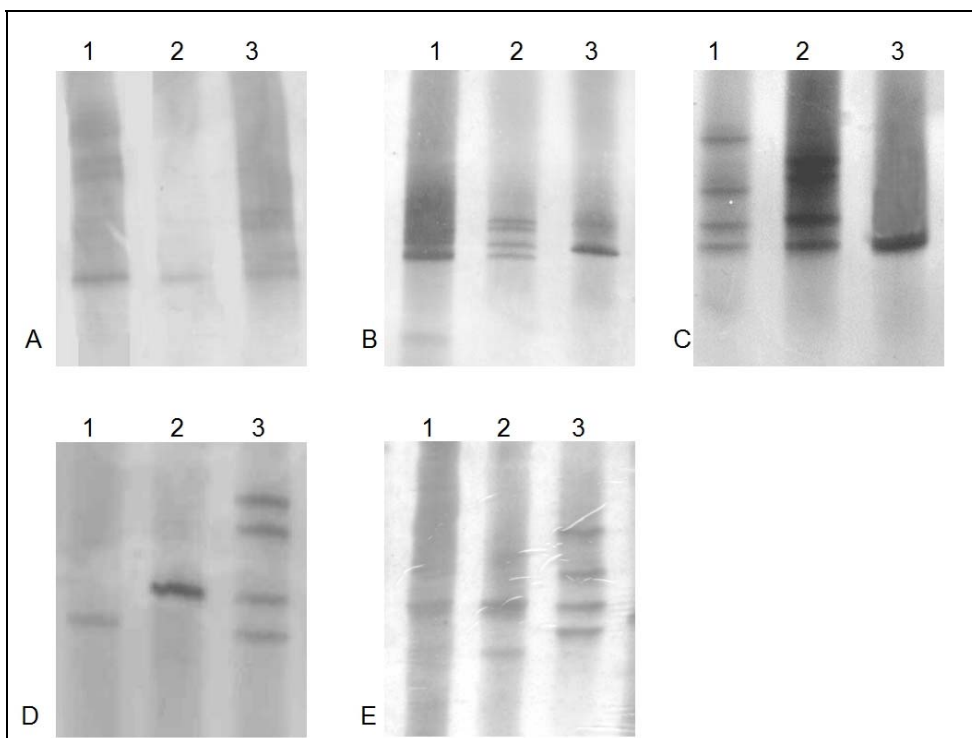


Slika 11. Elektroforetska analiza PCR produkata umnožavanih za DGGE analizu

- 1) fragment umnožen pomoću oligonukleotida AAT2A i AAT2A GC dužine 280bp
- 2) fragment umnožen pomoću oligonukleotida AAT2B i AAT2B GC dužine 382bp
- 3) fragment umnožen pomoću oligonukleotida AAT2C i AAT2C GC dužine 357bp
- 4) fragment umnožen pomoću oligonukleotida AAT3 i AAT3 GC dužine 390bp
- 5) fragment umnožen pomoću oligonukleotida AAT4 i AAT4 GC dužine 270bp
- 6) fragment umnožen pomoću oligonukleotida AAT5A i AAT5A GC dužine 162bp
- 7) fragment umnožen pomoću oligonukleotida AAT5B i AAT5B GC dužine 219bp
- 8) DNK lestvica od 100bp

Svi egzoni AAT gena umnoženi za DGGE analizu analizirani su pod istim eksperimentalnim uslovima. Elektroforeza u gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa je vršena u 6,5% poliakrilamidnom gelu sa denaturišućim gradijentom uree u gradijentu denaturišućih agenasa od 20-70%, 6 sati na naponu od 240V.

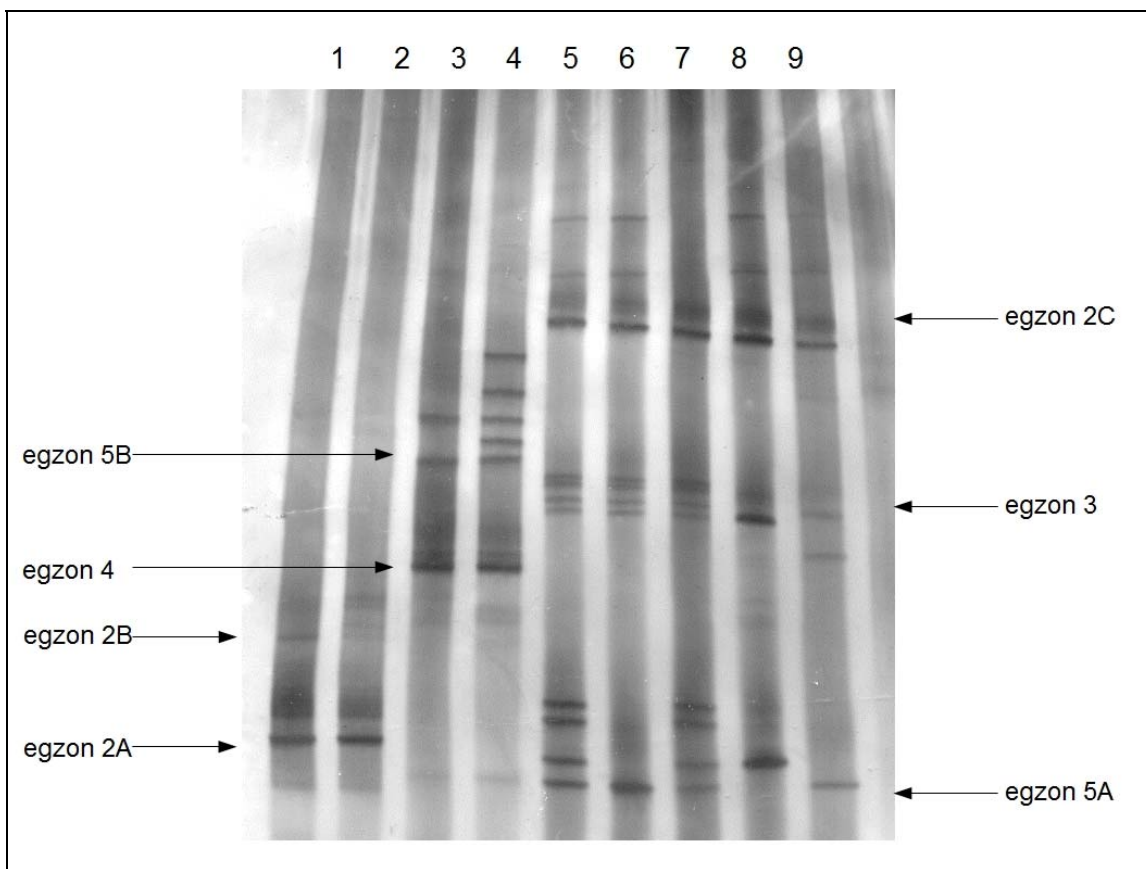
DGGE analizom kodirajućih delova AAT gena detektovane su heterozigotne i homozigotne promene u egzonima 2B, 3, 5A i 5B (Slika 12). Sekvenciranjem DNK je potvrđeno da se radi o varijanti Arg101His u egzonu 2B, Ala213Val u egzonu 3, varijanti Z u egzonu 5A i varijanti Glu376Asp u egzonu 5B. U egzonu 4 AAT gena DGGE metodom su detektovane dve različite heterozigotne promene kod dva različita ispitanika sa emfizemom pluća koje su okarakterisane kao G320R i V321F. U egzonima 2A i 2C nisu uočene promene ni kod jednog od analiziranih ispitanika.



Slika 12. Analiza egzona AAT gena DGGE metodom

- A) egzon 2B: ležište 1 M_{malton}/WT , ležište 2 WT, ležište 3 Arg101His
- B) egzon 3: ležište 1 Ala213, ležište 2 Ala213Val, ležište 3 Val213
- C) egzon 4: ležište 1 G320R, ležište 2 V321F, ležište 3 WT
- D) egzon 5A: ležište 1 WT, ležište 2 ZZ, ležište 3 Z/WT
- E) egzon 5B: ležišta 1 i 2- WT, ležište 3 Glu376Asp

Analiza svih egzona AAT gena različitih ispitanika sa emfizemom pluća na jednom gelu prikazana je na Slici 13.

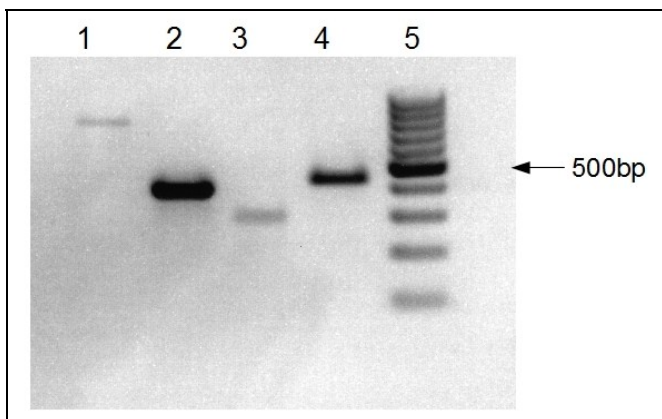


Slika 13. Analiza svih egzona AAT gena različitih ispitanika DGGE metodom

- 1) egzon 2B-Arg101, egzon 2A WT
- 2) egzon 2B-Arg101His, 2A WT
- 3) egzon 5B- Glu376, egzon 4 WT
- 4) egzon 5B-Glu376Asp, egzon 4 WT
- 5) egzon 2C, egzon 3 Val213Ala, egzon 5A Z/WT
- 6) egzon 2C, egzon 3 Val213Ala, egzon 5A WT
- 7) egzon 2C, egzon 3 Val213Ala, egzon 5A Z/WT
- 8) egzon 2C, egzon 3 Ala213, egzon 5A ZZ
- 9) egzon 2C, egzon 3 Val213, egzon 5A WT

4. 2. 2. Analiza egzona gena za alfa-1-antitripsin DNK sekvenciranjem

Strukturna analiza gena za AAT kod ispitanika sa karcinomom pluća vršena je DNK sekvenciranjem kodirajućih egzona AAT gena zajedno sa okolnim intronskim sekvencama. Kod ispitanika sa emfizemom pluća sekvenciranje DNK je bilo korišćeno nakon DGGE metode u cilju karakterizacije promena pronađenih u egzonima 2B, 3, 4 i 5. Za umnožavanje DNK fragmenata korišćeni su oligonukleotidi prikazani u Tabeli 2, a uslovi umnožavanja su prikazani u Tabeli 5. Prinos PCR reakcija je proveravan na 2% agaroznim gelovima. Rezultati umnožavanja egzona AAT gena za DNK sekvenciranje prikazani su na slici 14. Prečišćeni produkti umnožavanja sekvencirani su jednim od oligonukleotida koji su korišćeni za umnožavanje.

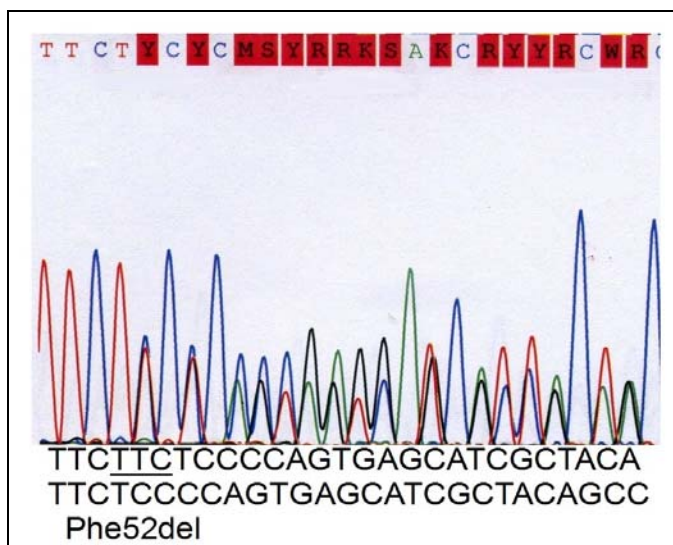


Slika 14. Elektroforetska analiza PCR produkata umnožavanih za DNK sekvenciranje

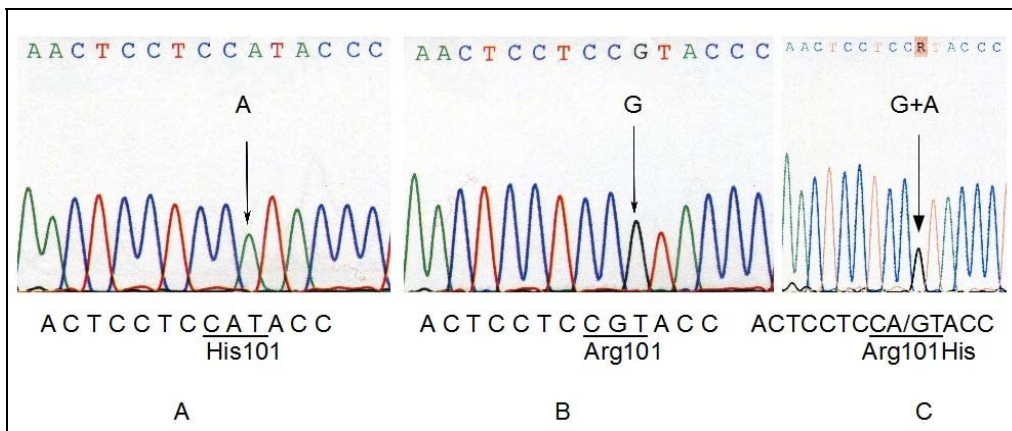
- 1) fragment umnožen pomoću oligonukleotida ex2s1 i ex2s2 dužine 769bp
- 2) fragment umnožen pomoću oligonukleotida ex3s1 i ex3s2 dužine 407bp
- 3) fragment umnožen pomoću oligonukleotida ex4s1 i ex4s2 dužine 297bp
- 4) fragment umnožen pomoću oligonukleotida ex5 1 i ex5s2 dužine 434bp
- 5) DNK lestvica 100bp

DNK sekvenciranjem AAT gena kod ispitanika sa emfizemom pluća i kod ispitanika sa karcinomom pluća detektovane su sledeće promene:

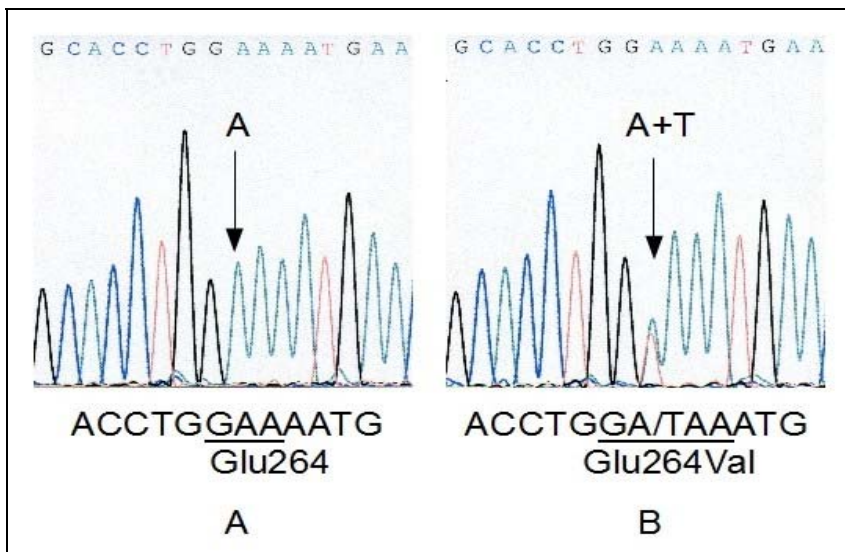
- varijanta Mmalton (Phe52del) u egzonu 2 (Slika 15)
- varijanta Arg101His u egzonu 2 (Slika 16)
- varijanta S (Glu264Val) u egzonu 3 (Slika 17)
- varijanta Ala213Val u egzonu 3 (Slika 18)
- Varijanta G320R u egzonu 4 (Slika 19)
- Varijanta V321F u egzonu 4 (Slika 19)
- Varijanta Glu376Asp u egzonu 5 (Slika 20)
- varijanta Z (Glu342Lys) u egzonu 5 (Slika 21)



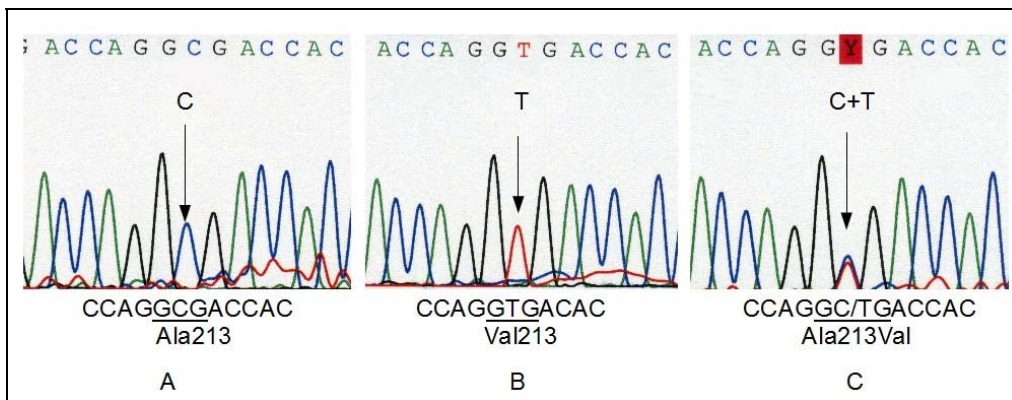
Slika 15. Rezultati sekvenciranja egzona 2 gena za alfa-1-antitripsin – Mmalton varijanta (Phe52del)



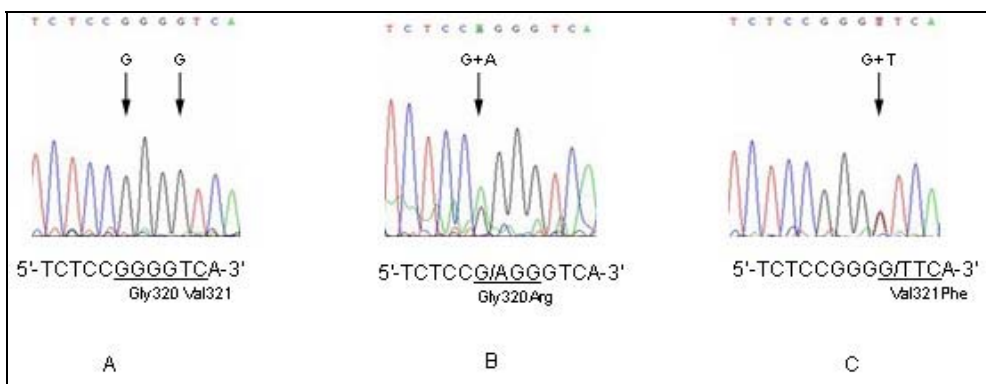
Slika 16. Rezultati sekvenciranja egzona 2 gena za alfa-1-antitripsin A) Arg101 varijanta B) His101varijanta C) Arg101His varijanta



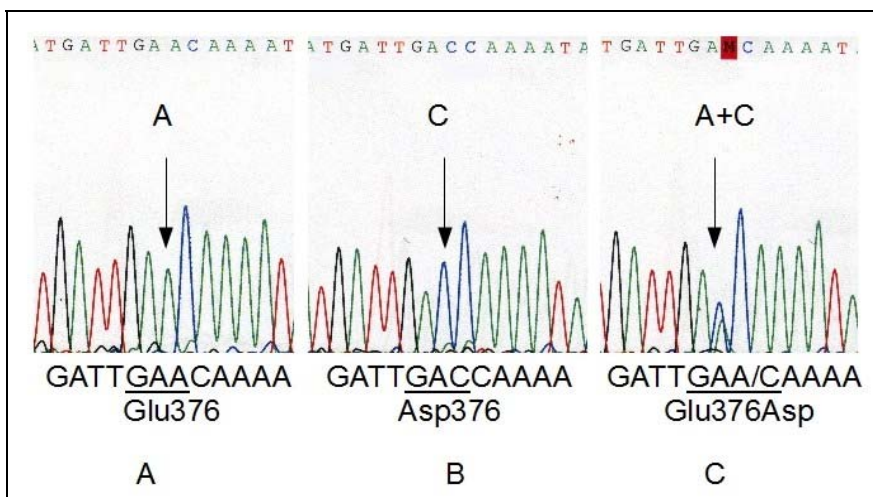
Slika 17. Rezultati sekvenciranja egzona 3 gena za alfa-1-antitripsin, region varijante S. A) WT varijanta B) S varijanta (heterozigotni nosilac Glu264Val)



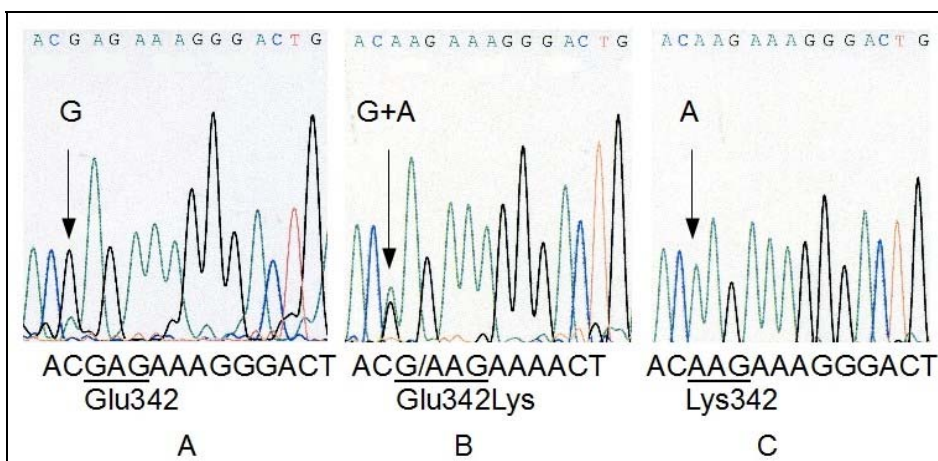
Slika 18. Rezultati sekvenciranja egzona 3 gena za alfa-1-antitripsin. A) Ala213 varijanta B) Val213 varijanta C) Ala213Val varijanta



Slika 19. Rezultati sekvenciranja egzona 4 gena za alfa-1-antitripsin. A) WT varijanta B) G320R varijanta C) V321F varijanta



Slika 20. Rezultati sekvenciranja egzona 5 gena za alfa-1-antitripsin. A) Glu376 varijanta B) Asp376 varijanta C) Glu376Asp varijanta



Slika 21. Rezultati sekvenciranja egzona 5 gena za alfa-1-antitripsin. A) WT varijanta B) Z varijanta (heterozigotni nosilac) C) Z varijanta (homozigotni nosilac)

Z alel je bio prisutan u homozigotnom stanju kod tri ispitanika sa emfizemom pluća, i u heterozigotnom stanju kod jednog ispitanika sa emfizemom i kod jednog ispitanika sa karcinomom pluća. Kod jednog od ispitanika sa karcinomom pluća je detektovano i prisustvo mutacije S u heterozigotnom stanju, dok je kod jednog ispitanika sa emfizemom pluća detektvano prisustvo Mmalton mutacije u kombinaciji sa mutacijom Z. Deficijentni

aleli su bili zastupljeniji u ispitanika sa emfizemom (14,8%) u odnosu na ispitanike sa karcinomom pluća (1,5%). Rezultati strukturne analize gena za alfa-1-antitripsin kod ispitanika sa emfizemom pluća i ispitanika sa karcinomom pluća dati su u Tabeli 14.

Tabela 14. Distribucija varijanti alfa-1-antitripsina kod ispitanika obolelih od emfizema pluća i kod ispitanika obolelih od karcinoma pluća

AAT genotip	Emfizem pluća (n=27)	Karcinom pluća (n=66)
M1	7 (25,9%)	34 (51,5%)
M1M2	10 (37%)	12 (18,2%)
M1M3	2 (7,4%)	7 (10,6%)
M1M4	2 (7,4%)	5 (7,6%)
M2	/	1 (1,5%)
M2M3	/	2 (3%)
M2M4	/	1 (1,5%)
ZZ	3 (11,1%)	/
M1Z	1 (3,7%)	2 (3%)
M1G320R	1 (3,7%)	1 (1,5%)
M1V321F	1 (3,7%)	/
M1S	/	1 (1,5%)

Sekvenciranjem egzona 4 AAT gena detektovano je prisustvo zamene nukleotida G u A na poziciji g.137154 (prema GenBank sekvenci broj AL132708.3) koja dovodi do aminokiselinske zamene glicina u arginin na poziciji 320 u proteinu (G320R, Gly-320[GGG] - Arg-320[AGG]). U slučaju druge promene u egonu 4 AAT gena detektovana je zamena nukleotida G u T na poziciji g.137157 (prema GenBank sekvenci broj AL132708.3) koja dovodi do aminokiselinske zamene valina fenilalaninom na poziciji 321

u proteinu (V321F, Val-321[GTC] - Phe-321[TTC]). Varijanta G320R je pronađena kod jednog ispitanika sa emfizemom i kod jednog ispitanika sa karcinomom pluća dok je varijanta V321F detektovana kod ispitanika sa emfizemom pluća.

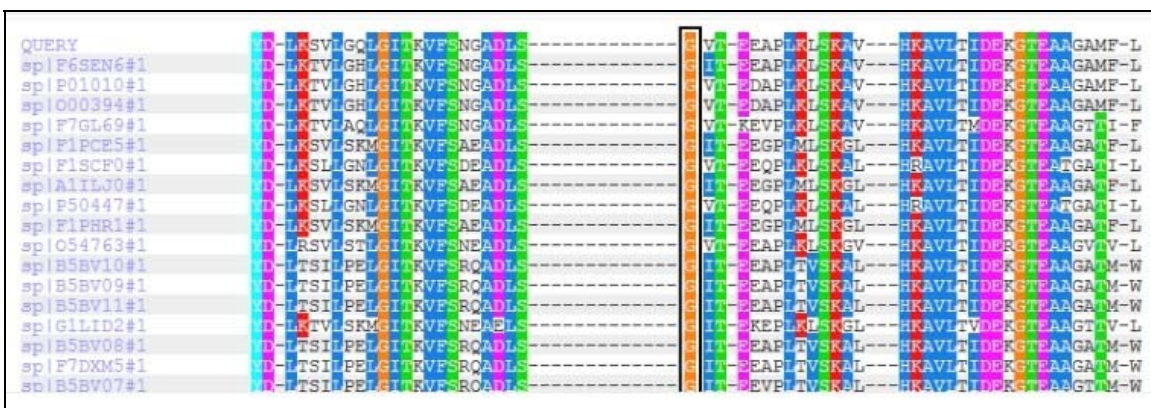
4. 3. Kompjuterska predikcija uticaja mutacija na protein

Potencijalni efekti novootkrivenih promena u egzonu 4 AAT gena na strukturu proteina testirani su analizom mutiranih varijanti proteina korišćenjem servera HOPE (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/home>). HOPE je server za analizu mutacija koji prikuplja informacije o strukturi iz različitih izvora uključujući proračune 3D strukture proteina, Uniprot baze podataka i predikcije sa DAS servera, kombinuje ove informacije i daje procenu efekta određene mutacije na strukturu proteina (Venselaar, 2010).

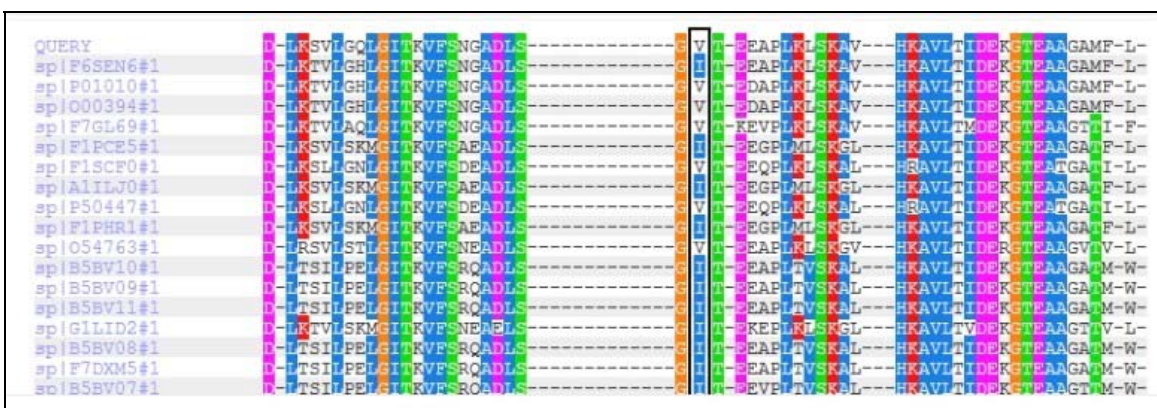
U slučaju G320R zamene originalna i mutirana aminokiselina se razlikuju u veličini i naelektrisanju. Glicin koji je mala, neutralna aminokiselina zamenjen je pozitivno naelektrisanim argininom što može imati posledice na strukturu proteina. S obzirom da je glicin mala i najfleksibilnija aminokiselina ova zamena može potencijalno imati uticaja na fleksibilnost molekula. Originalna aminokiselina je konzervirana na ovoj poziciji u proteinu ali je i mutirana aminokiselina prisutna u nekim od homologih sekvenci.

U slučaju V321F zamene i originalna i mutirana aminokiselina su nepolarne na pH 7 i razlikuju se u veličini. Obe aminokiseline su hidrofobne, pri čemu je fenilalanin znatno veći od valina i s obzirom da se nalaze u unutrašnjosti proteina veličina mutirane aminokiseline može imati posledice na strukturu proteina. Originalna aminokiselina nije konzervirana na ovoj poziciji i mutirana aminokiselina je prisutna u nekim od homologih sekvenci.

Korišćenjem PolyPhen-2 servera dobijena je predikcija da obe varijante potencijalno imaju uticaja na strukturu proteina. Poređenje sekvenci homologih alfa-1-antitripsinu dobijemo PolyPhen-2 serverom dato je na Slikama 22 i 23.



Slika 22. Poređenje sekvenci homologih alfa-1-antitripsinu, region od 75 aminokiselina u okolini mutirane aminokiseline, mutirana aminokiselina G320 je uokvirena crnim (slika generisana PolyPhen-2 serverom)

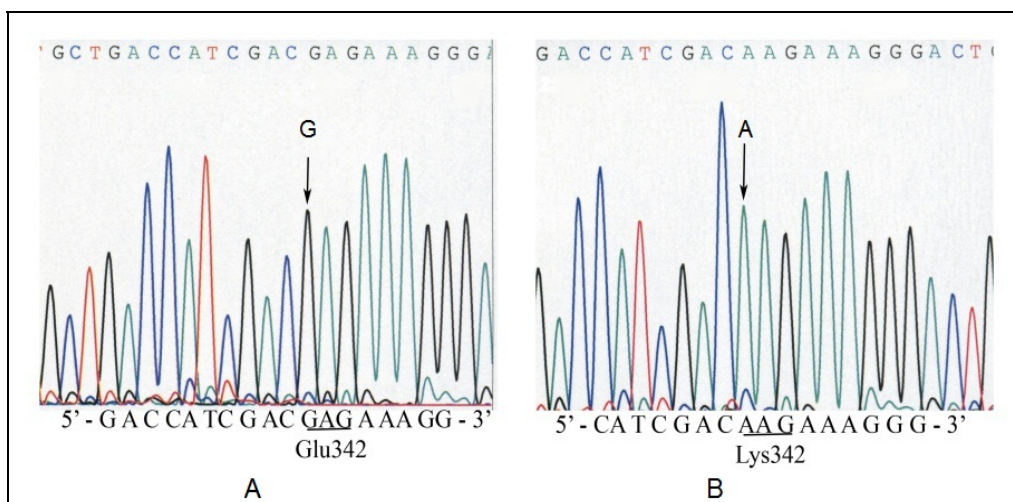


Slika 23. Poređenje sekvenci homologih alfa-1-antitripsinu, region od 75 aminokiselina u okolini mutirane aminokiseline, mutirana aminokiselina V321 je uokvirena crnim (slika generisana PolyPhen-2 serverom)

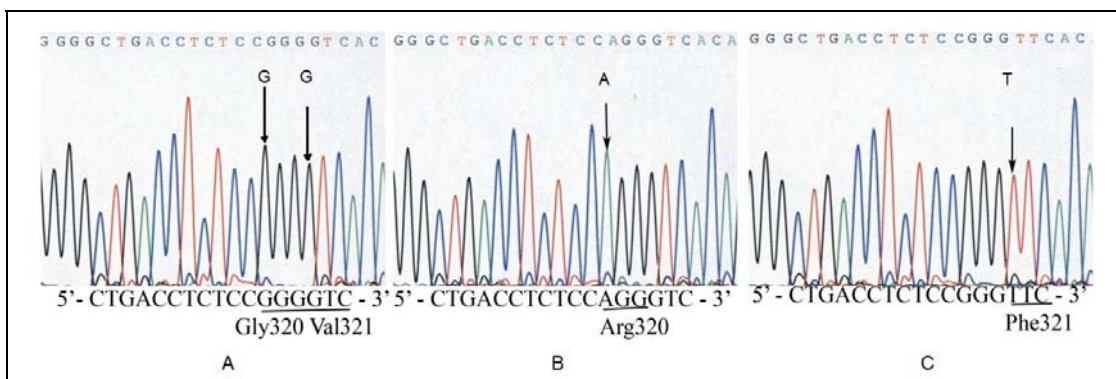
4. 4. Konstrukcija ekspresionih vektora

Za funkcionalnu karakterizaciju novootkrivenih varijanti alfa-1-antitripsina konstruisani su vektori za ekspresiju mutiranih proteina AAT G320R i AAT V321F, kao i WT proteina i Z varijante u eukariotskom i prokariotskom ekspresionom sistemu. Proteini ekspimirani u prokariotskom sistemu korišćeni su za određivanje inhibitorne aktivnosti

proteina i njegove termostabilnosti, dok su proteini eksprimirani u eukariotskom sistemu korišćeni za određivanje lokalizacije proteina u ćeliji kao i njegove sklonosti ka polimerizaciji. Za ekspresiju proteina u prokariotskom sistemu korišćen je pQE31 ekspresioni vektor, dok su za ekspresiju u eukariotskom sistemu korišćeni vektori pEGFP-N1 i pcDNA3. Za mutagenezu gena koji kodira WT protein korišćena je modifikacija uputstva kita QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). Kao matrica za mutagenezu korišćena je cDNK koja kodira WT varijantu alfa-1-antitripsina dobijena iz ćelijske linije HepG2 i uklonirana u pGEM-T Easy vektor. Amplifikacijom ukupne cDNK izolovane iz HepG2 ćelijske linije pomoću prajmera HindIII F i XhoI R umnožen je fragment za subkloniranje u pcDNA3 vektor, pomoću prajmera HindIII F i KpnI R umnožen je fragment koji je prekloniran u pQE31 vektor i pomoću prajmera HindIII F i AAT KpnI GFPN1 umnožen je fragment koji je prekloniran u pEGFP-N1 vektor. Za mutagenezu su korišćeni prajmeri G320Rmut, V321Fmut i AATZmut koji su prethodno fosforilisani na 5'OH kraju. Sekvenca plazmida sintetisanih na ovaj način proverena je sekvenciranjem čime je potvrđeno prisustvo odgovarajuće bazne zamene (Slika 24 i Slika 25).



Slika 24. Rezultati sekvenciranja plazmida sa ukloniranom AAT cDNK – region egzona 5 sa Z varijantom A) WT varijanta B) Z varijanta



Slika 25. Rezultati sekvenciranja plazmida sa ukloniranom AAT cDNK – region egzona 4
 A) WT varijanta B) G320R varijanta C) V321F varijanta

Vektor pQE-31 sadrži kodirajuću sekvencu za 6 histidina na 5' kraju regiona za kloniranje koja se nalazi u fazi sa otvorenim okvirom čitanja AAT gena, tako da eksprimirani rekombinantni protein sadrži histidinski epitop na N-terminalnom kraju. Fragmenti za ligaciju u vektor pQE31 su isecani enzimima BamHI i KpnI čime je signalni peptid alfa-1-antitripsina uklonjen tako da se nakon kloniranja u vektor pQE31 na N-terminalnom kraju proteina umesto signalne sekvence nalazi histidinski epitop. Ova manipulacija dovodi i do promene glutamina na poziciji 25 u treonin što prema podacima iz literature ne utiče na aktivnost proteina (Dufour, 2001).

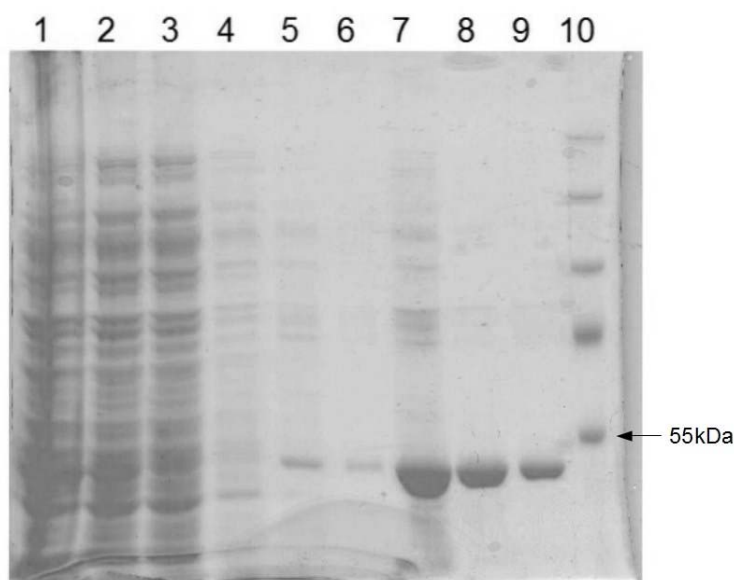
Fragmenti za ligaciju u vektor pcDNA3 su isecani enzimima HindIII i XhoI dok su fragmenti za ligaciju u vektor pEGFP-N1 isecani enzimima HindIII i KpnI.

4. 5. Ekspresija i izolacija proteina

Mutirane varijante alfa-1-antitripsina G320R i V321F, kao i WT varijanta, eksprimirani su u *E. coli* soju BL21-CodonPlus-RIL sa ekspresionog vektora pQE31. Za prečišćavanje proteina pod nativnim uslovima korišćena je afinitetna hromatografija na komercijalnom medijumu TALON (TALON Metal Affinity Resin Clontech Laboratories Inc). Prečišćavanje je, uz manje modifikacije, vršeno po uputstvu proizvođača. Ova procedura se zasniva na reverzibilnoj interakciji imobilizovanih metalnih jona kobalta sa

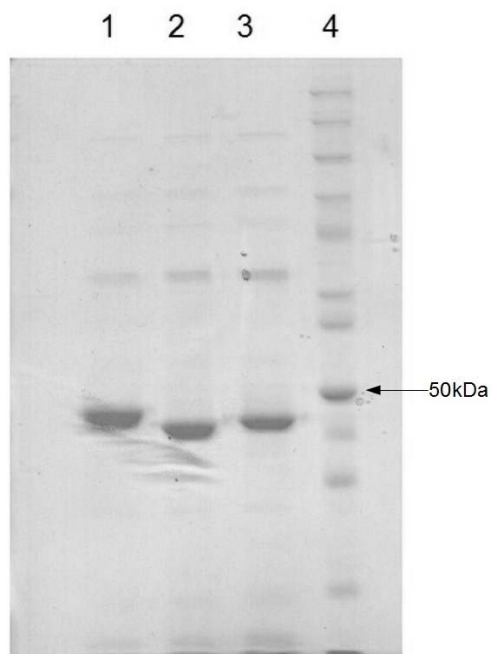
polihistidinskim repićem rekombinantnog proteina. Rekombinantni protein eluiran je imidazolom koji kompetira polihistidinskom repiću vezanom za medijum. Procedura za izolaciju proteina opisana je u poglavlju Materijal i Metode.

Nivo ekspresije i efikasnost prečišćavanja proteina provereni su elektroforezom na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (Slika 26). Koncentracija proteina je određivana metodom Bradforda (BioRad), po uputstvu proizvođača. Kako bi se izolovani protein oslobodio imidazola u puferu za eluciju a koji ometa reakciju alfa-1-antitripsina sa elastazom, propuštanjem kroz Amicon Ultra 30K kolonicu (Millipore) vršena je izmena pufera i istovremeno je vršeno i koncentrovanje proteina. Ovako ukoncentrovan protein u puferu bez imidazola korišćen je za određivanje inhibitorne aktivnosti proteina kao i za određivanje njegove stabilnosti prilikom termalne denaturacije.



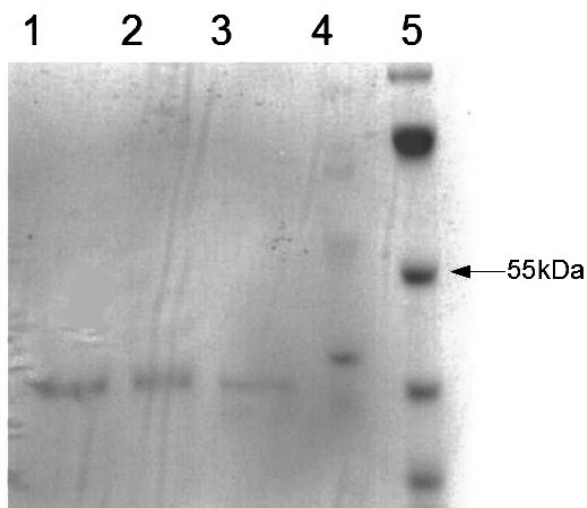
Slika 26. Elektroforetska analiza u SDS poliakrilamidnom gelu bakterijskog taloga (1), bakterijskog lizata posle sonifikacije (2), preparata posle vezivanja za medijum (3), tri pranja (4 – 6), medijum (7) i prečišćenog preparata nakon prve elucije sa medijuma (8) i druge elucije (9), marker molekulske mase (PageRule Prestained Protein Ladder, Fermentas) (10)

Prilikom elektroforeze izolovanih preparata alfa-1-antitripsina u SDS poliarilamidnom gelu primećeno je da proteinske varijante G320R i V321F alfa-1-antitripsina migriraju brže u odnosu na WT protein (Slika 27).



Slika 27. Elektroforetska analiza izolovanog preparata alfa-1-antitripsina WT varijante (1), G320R varijante (2) i V321F varijante (3), marker molekulske mase (PageRuler Unstained Protein Ladder, Ferrmentas) (4)

S obzirom da se radi o proteinu eksprimiranom u bakterijama zaključeno je da razlika u migraciji nije posledica izmenjene glikozilacije. Kako bi ispitali da li je razlika u migraciji proteina u SDS gelu posledica degradacije proteina ili različitog afiniteta proteina za vezivanje molekula SDSa, preparati izolovanog proteina su elektroforetski analizirani u 12% SDS gelu u prisustvu 5M uree kao dodatnog denaturišućeg agensa u puferu za elektroforezu i u gelu (Slika 28).

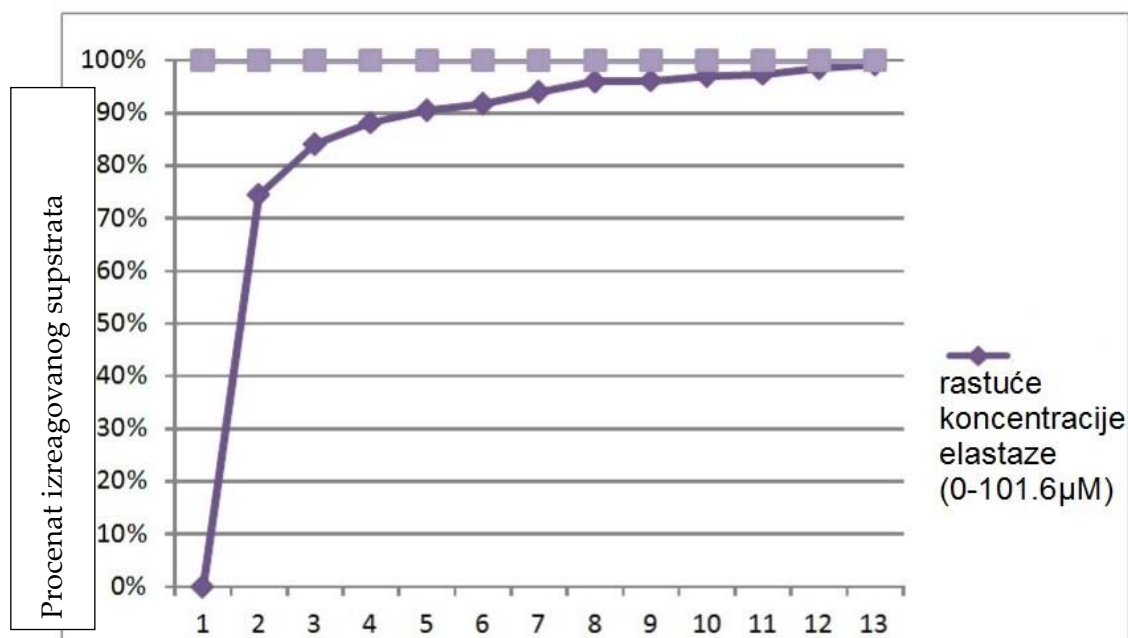


Slika 28. Elektroforetska analiza izolovanih preparata alfa-1-antitripsina u 12% SDS gelu sa 5M ureom (1) wt (2) G320R (3) V321F (4,5) markeri molekulske mase (PageRuler Unstained Protein Ladder i PageRuler Prestained Protein Ladder, Ferrmentas)

Elektroforezom izolovanih preparata proteina u SDS gelu u prisustvu uree razlika u migraciji između mutiranih proteina i WT proteina je smanjena čime je pokazano da je razlika u elektroforetskoj pokretljivosti uzrokovana promenom u naelektrisanju proteina.

4.6. Inhibitorna aktivnost rekombinantnog alfa-1-antitripsina

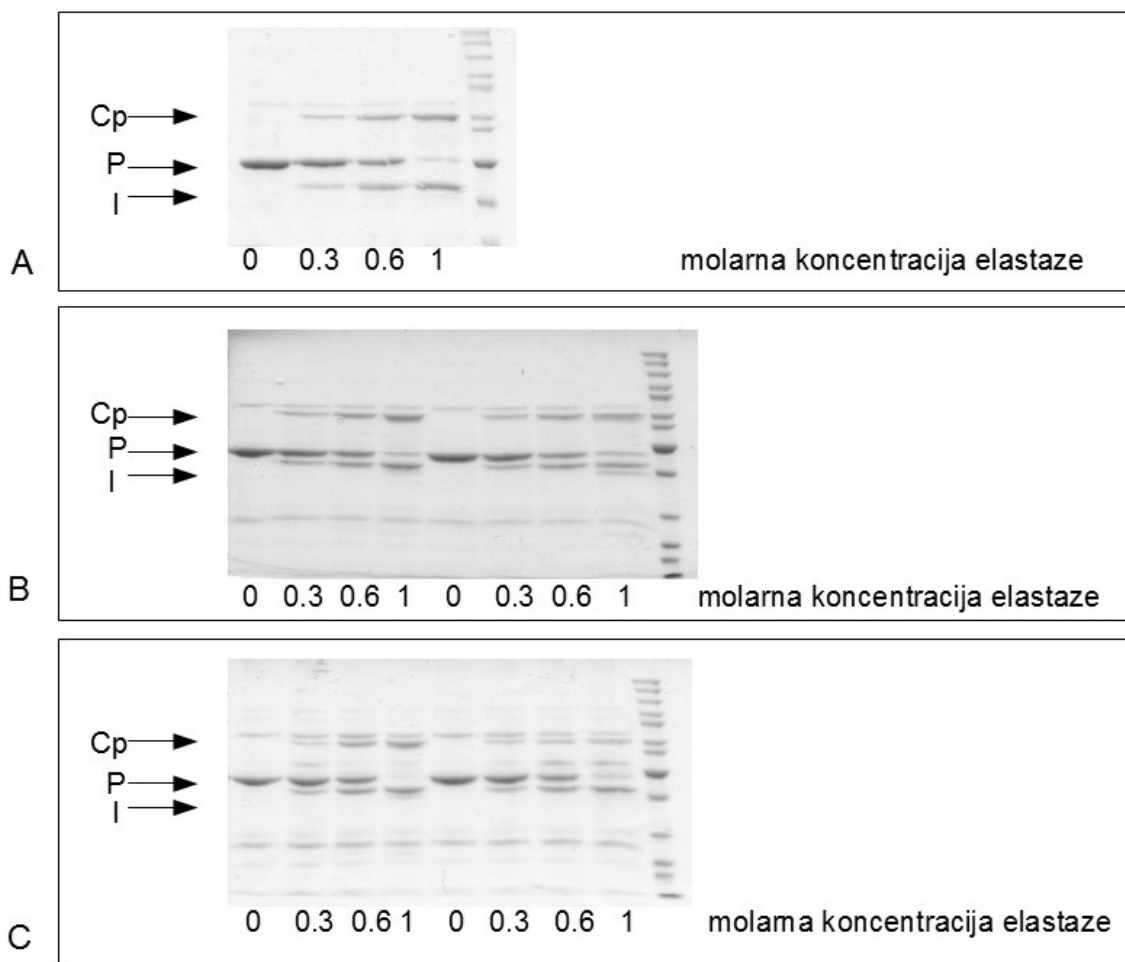
Inhibitorna aktivnost rekombinantnog alfa-1-antitripsina određivana je u reakciji sa elastazom pankreasa. Najpre je određivana aktivna koncentracija preparata elastaze titracijom sa supstratom N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide čime je određena minimalna koncentracija preparata elastaze potrebnog da izreaguje sa svim supstratom u reakciji. Reakcija titracije rađena je sa rastućim koncentracijama elastaze od 0 do 101,6 μ M i konstantnom količinom supstrata od 1mM.



Slika 29. Grafički prikaz određivanja aktivne koncentracije preparata elastaze reakcijom sa 1mM supstratom STAPNA. Koncentracija elastaze je prikazana u odnosu na procenat izreagovanog supstrata. Koncentracije elastaze: 1- 0 μM, 2 – 0,254 μM, 3 – 0,508 μM, 4 – 0,762 μM, 5 – 1,016 μM, 6 – 2,54 μM, 7 – 5,08 μM, 8 – 10,16 μM, 9 – 12,7 μM, 10 – 20,32 μM, 11 – 25,4 μM, 12 – 50,8 μM, 13 – 101,6 μM

Ovom reakcijom određeno je da minimalna količina elastaze koja reaguje sa celokupnim supstratom iznosi 10,16μM (Slika 29). Ova količina je zatim korišćena u određivanju količine proteina neophodne da inhibira celokupnu elastazu u reakciji, odnosno količina u kojoj su inhibitor proteaze i proteaza u odnosu 1:1.

Nakon određivanja stehiometrije inhibicije po 3μg alfa-1-antitripsina je inkubirano sa elastazom u molarnim odnosima 1:0.3, 1:0.6 i 1:1 u puferu za esej. Produkti reakcije između alfa-1-antitripsina i elastaze analizirani su na 10% SDS poliakrilamidnim gelovima (Slika 30).

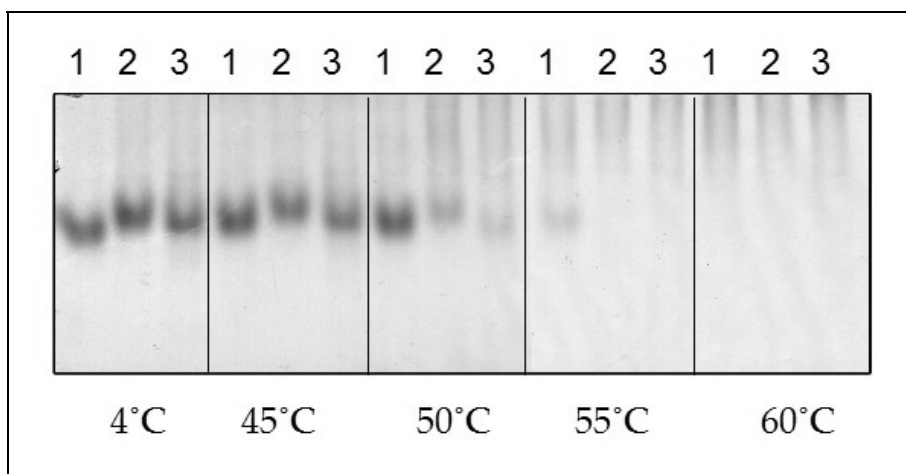


Slika 30. Elektroforetska analiza reakcije inkubacije alfa-1-antitripsina i elastaze u molarnim odnosima 1:0, 1:0.3, 1:0.6 i 1:1. A) WT protein B) G329R C) V321F; Cp – kompleks alfa-1-antitripsina i elastaze, P – nativni alfa-1-antitripsin, I –isečeni alfa-1-antitripsin

Elektroforetska analiza SDS rezistentnih kompleksa alfa-1-antitripsina i elastaze pokazala je da se varijante G320R i V321F ponašaju isto kao i WT varijanta. U reakciji gde je molarni odnos alfa-1-antitripsina prema elastazi bio 1:1 na gelu nije detektovan nativni protein na osnovu čega se može zaključiti da je sav protein izreagovao sa proteazom i da je njegova aktivnost očuvana.

4. 7. Termalna denaturacija alfa-1-antitripsina

Nativna forma alfa-1-antitripsina nije i njegova termodinamički najstabilnija forma. Stabilna konformacija molekula se može indukovati pod blago denaturišućim uslovima ili toplotnom denaturacijom pri čemu dolazi do formiranja polimera gde se reaktivna petlja jednog molekula ubacuje u A ploču drugog molekula. Određivanje stabilnosti varijanti G320R i V321F u odnosu na WT varijantu alfa-1-antitripsina prilikom zagrevanja vršeno je inkubacijom proteina 1h na sledećim temperaturama: 4°C, 40°C, 45°C, 55°C i 60°C i elektroforezom na nativnim poliakrilamidnim gelovima. Analiza ovako tretiranih preparata alfa-1-antitripsina elektroforezom u nativnim poliakrilamidnim gelovima pokazala je da mutirane varijante proteina imaju blago smanjenu termostabilnost u odnosu na WT protein, tj. opadanje stabilnosti se pojavljuje već na 50 °C dok WT protein gubi stabilnost na 60 °C (Slika 31).



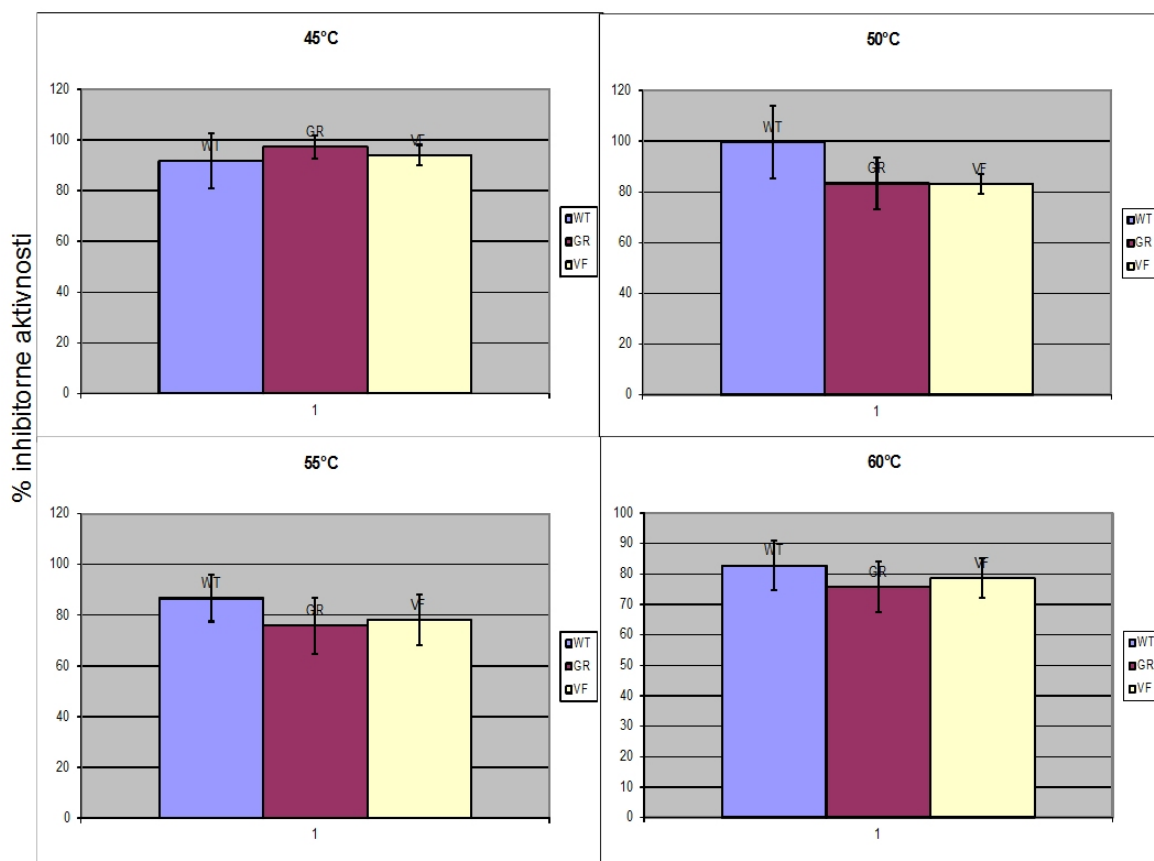
Slika 31. Termostabilnost rekombinantnog alfa-1-antitripsina inkubiranog 1h na različitim temperaturama 1) WT, 2) G320R, 3) V321F

Analiza tretiranih preparata proteina esejima inhibitorne aktivnosti sa elastazom pankreasa pokazala je iste rezultate kao i analiza elektroforezom – varijante G320R i

V321F već na 50°C pokazuju smanjenu inhibitornu aktivnost u odnosu na WT protein kao posledicu tretmana. Vrednosti za relativne inhibitorne aktivnosti varijanti alfa-1-antitripsina u odnosu na preparat inkubiran na 4°C date su u Tabeli 15 dok je histogramski prikaz ovih vrednosti dat na Slici 32.

Tabela 15. Relativne vrednosti inhibitorne aktivnosti varijanti WT, G320R I V321F alfa-1-antitripsina tretiranih inkubacijom na temperaturama 45°C, 50°C, 55°C i 60°C (vrednosti su prikazane u procentima u odnosu na aktivnost proteina inkubiranog na 4°C)

	45°C	50°C	55°C	60°C
WT	91,7±10,9	99,8±14,3	86,7±9,2	82,8±8,1
G320R	97,3±4,6	83,4±10,1	75,9±11,1	75,9±8,3
V321F	94±4	83,2±3,9	78,1±9,9	78,7±6,6

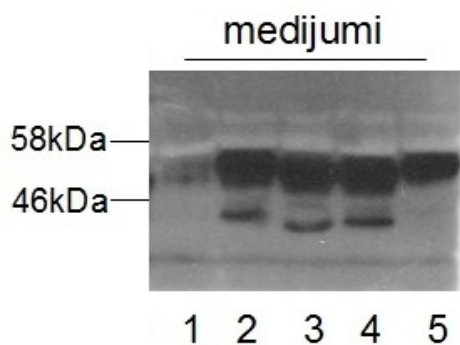


Slika 32. Histogrami relativne inhibitorne aktivnosti varijanti WT, G320R I V321F alfa-1-antitripsina tretiranih inkubacijom na temperaturama 45°C, 50°C, 55°C i 60°C (vrednosti su prikazane u procentima u odnosu na aktivnost proteina inkubiranog na 4°C)

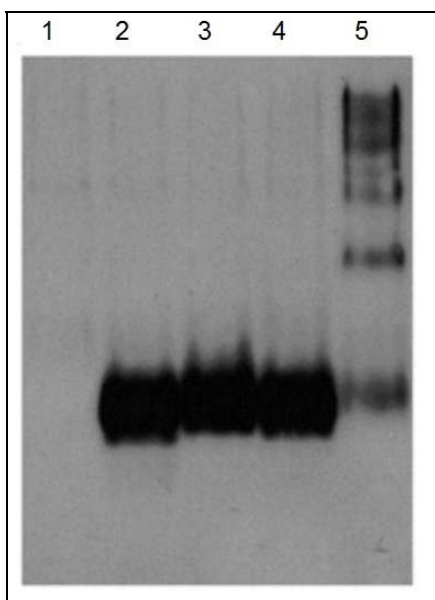
4. 8. Detekcija formiranja polimera proteina na nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima

Sklonost alfa-1-antitripsina ka formiranju polimera analizirana je i na preparatima proteina eksprimiranim u eukariotskom sistemu. Čelijska linija COS7 je transfekovana pcDNA3 vektorom sa odgovarajućim insertima, čelijski medijumi su prikupljeni 24h nakon transfekcije i koncentrovani propuštanjem kroz Amicon Ultra 30K kolonicu (Millipore). Prisustvo proteina detektovano je elektroforezom u 10% denaturišućem poliakrilamidnom gelu i Western blot analizom (Slika 33) dok je prisustvo polimera analizirano elektroforezom na 10% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu u puferu za nanošenje

uzoraka bez SDS-a i β merkptoetanolu (Slika 34). Za detekciju je kao primarno antitelo korišćeno kozje anti-alfa-1-antitripsin antitelo dok je kao sekundarno antitelo korišćeno anti-kozije HRP kuplovano antitelo.



Slika 33. Detekcija prisustva alfa-1-antitripsina u ćelijskim medijumima tranzijentno transfekovanih COS7 ćelija na 10% SDS poliakrilamidnom gelu. 1) pcDNA3 2) pcDNA3/AAT WT 3) pcDNA3/AAT G320R 4) pcDNA3/AAT V321F 5) pcDNA3/AAT Z



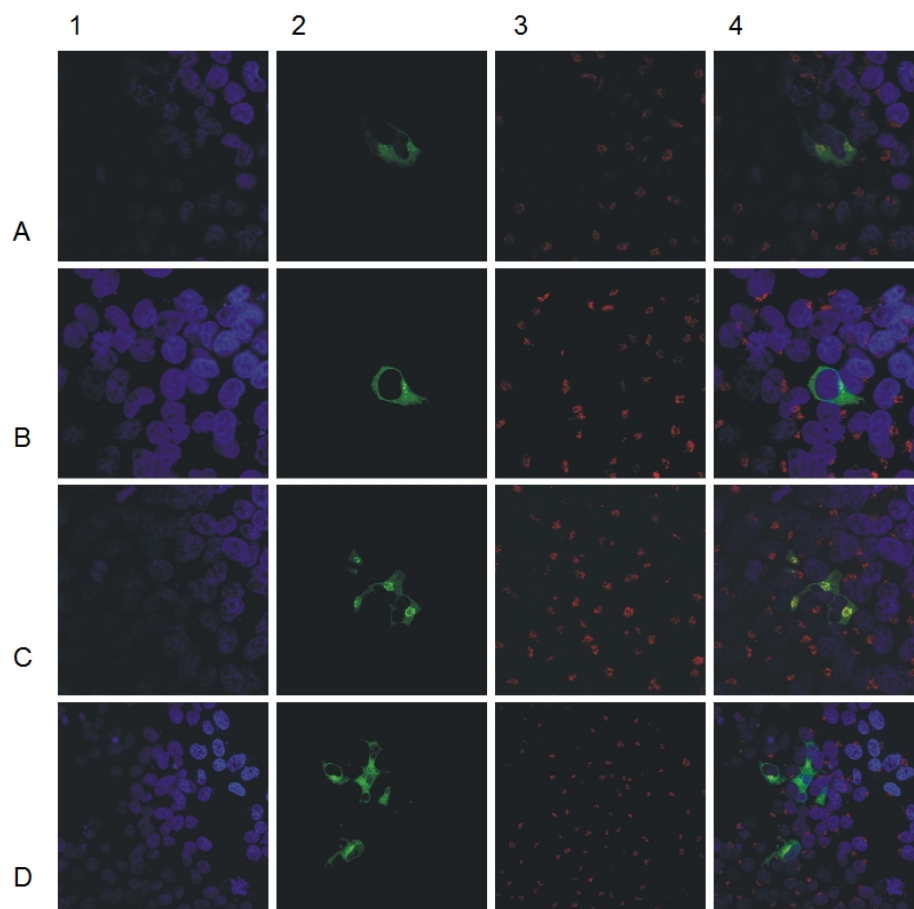
Slika 34. Detekcija prisustva polimera alfa-1-antitripsina u medijumu tranzijentno transfekovanih COS7 ćelija na 10% nenedenurišućem poliakrilamidnom gelu. 1) pcDNA3 2) pcDNA3/AAT WT 3) pcDNA3/AAT G320R 4) pcDNA3/AAT V321F 5) pcDNA3/AAT Z

Analiza mutiranih varijanti alfa-1-antitripsina na nedenedurirajućem poliakrilamidnom gelu pokazala je da varijante G320R i V321F, kao ni WT varijanta proteina, ne formiraju polimere. Prisustvo polimera kod Z varijante je bilo prisutno.

4. 9. Imunofluorescencija

Određivanje unutarćelijske lokalizacije varijanti G320R i V321F alfa-1-antitripsina vršeno je praćenjem kolokalizacije proteina obeleženih zelenim fluorescentnim proteinom (GFP) sa markerom Goldžijevog aparata (goldžin-97). Ćelijska linija COS7 je transfekovana pEGFP-N1 vektorom sa odgovarajućim insertima, ćelije su fiksirane i bojene 24h nakon transfekcije. Preparati su analizirani na fluorescentnom mikroskopu BX51 (Olympus) (Slika 35).

Analiza je pokazala da je u slučaju varijanti G320R i V321F najveći intenzitet fluorescence bio prisutan u regionu ćelije koji se preklapao sa markerom Goldžijevog aparata dok je manji intenzitet bio prisutan i perinuklearno u regionu koji po strukturi odgovara endoplazmatičnom retikulumu. Isti šablon lokalizacije je uočen i kod WT varijante proteina dok je kod ćelija koje eksprimiraju Z varijantu protein uglavnom bio lokalizovan u regionu koji odgovara endoplazmatičnom retikulumu, dok je u manjem broju ćelija fluorescenca bila najjača u regionu Goldžijevog aparata.



Slika 35. Analiza kolokalizacije varijanti A) WT, B) G320R C) V321F D) Z alfa-1-antitripsina sa markerom endoplazmatičnog retikuluma 1) DAPI bojenje jedra 2) AAT-GFP 3) marker Goldžijevog aparata goldžin-97 4) preklapanje signala

5. DISKUSIJA

Ovo istraživanje je imalo za cilj da ispita postojanje strukturnih promena u kodirajućim egzonima gena za alfa-1-antitripsin kod ispitanika sa emfizemom pluća i kod ispitanika sa karcinomom pluća, kao i da istraži funkcionalne posledice otkrivenih promena i njihov eventualni značaj u nastanku i razvoju bolesti. Poremećaji u koncentraciji i funkciji alfa-1-antitripsina rezultuju predispozicijom ka razvoju emfizema i ciroze jetre (Carrell, 2002). Povezanost genetičkih varijanti alfa-1-antitripsina pokazana je i sa kliničkim stanjima kao što su astma, bronhiektazije i karcinom pluća (Eden, 1997; King, 1996; Yang, 1999). S obzirom da je deficijencija alfa-1-antitripsina poznat faktor rizika za nastanak emfizema pluća a može predstavljati i faktor rizika u nastanku karcinoma pluća, polazna hipoteza je bila da će u ovim patološkim stanjima biti prisutne mutacije u genu za alfa-1-antitripsin.

Za strukturnu analizu gena su korišćene metode elektroforeze u gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa (DGGE) i DNK sekvenciranja. Funkcionalna analiza otkrivenih varijanti alfa-1-antitripsina vršena je određivanjem inhibitorne aktivnosti prema elastazi kao i određivanjem lokalizacije proteina u ćeliji i njegove termostabilnosti i sklonosti ka polimerizaciji.

5. 1. Strukturna analiza gena za alfa-1-antitripsin

Alfa-1-antitripsin, kao arhetipski predstavnik familije serpin proteina, predstavlja koristan model sistem za izučavanje strukture i funkcije ovih proteina. Značajne osobine ovih proteina čine mobilna reaktivna petlja i metastabilna nativna struktura. Ove karakteristike su važne za njihovu osnovnu biološku funkciju ali ga i čine podložnim ka zauzimanju nenativne, stabilnije konformacije i gubitku inhibitorne funkcije. Strukturna analiza gena za alfa-1-antitripsin je obuhvatila 27 ispitanika sa emfizemom pluća i 66 ispitanika sa karcinomom pluća. U genu za alfa-1-antitripsin do sada je opisano više od 100 varijanti sa različitim fenotipskim posledicama od čega je mali broj funkcionalno ispitan.

Emfizem je jedan od glavnih simptoma deficijencije alfa-1-antitripsina i nastaje kao posledica destrukcije zidova alveola pod dejstvom elastaze neutrofila. Snižen nivo alfa-1-antitripsina u serumu rezultuje poremećajem ravnoteže između alfa-1-antitripsina i elastaze što polako dovodi do proteolitičke destrukcije alveola i rezultuje emfizemom. Kod pacijenata sa deficijencijom alfa-1-antitripsina emfizem se obično razvija u trećoj ili četvrtoj deceniji života (Evald, 1990). Simptomi bolesti se javljaju ranije i napreduju brže ukoliko su prisutni i dodatni faktori rizika kao što su duvanski dim i izloženost aero zagađenju. Kod pacijenata sa teškom deficijencijom alfa-1-antitripsina pušenje predstavlja glavni faktor rizika za razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća (Tobin, 1983; Seersholm, 1995; Piitulainen, 1999).

Duvanski dim i hronična opstruktivna bolest pluća, uključujući emfizem i hronični bronhitis, su poznati faktori rizika za nastanak karcinoma pluća (Schottenfeld, 1996). S obzirom da je deficijencija alfa-1-antitripsina uzročnik emfizema pluća, pretpostavlja se da može biti i faktor rizika za nastanak karcinoma pluća, a mehanizam koji se najčešće uzima u obzir je poremećaj u ravnoteži između proteaze i antiproteaze. Poremećaj u ravnoteži između alfa-1-antitripsina i elastaze neutrofila nastaje ili kao posledica povišene količine elastaze neutrofila ili nedostatka alfa-1-antitripsina i dovodi do oštećenja tkiva pluća što može stvoriti povoljnu sredinu za delovanje kancerogena i napredovanje tumora. Ova ravnoteža može biti dodatno narušena prisustvom duvanskog dima koji stimuliše neutrofile da proizvode više elastaze i inaktivira alfa-1-antitripsin (Hunninghake, 1983; Hubbard, 1987). Oksidansi poreklom iz aktiviranih inflamatornih ćelija i iz duvanskog dima dovode do oksidacije metionina u alfa-1-antitripsinu u metionin sulfoksid što za posledicu ima gubitak inhibitorne funkcije. Alfa-1-antitripsin ima 9 metionina ali su oksidaciji najpodložniji metionini na pozicijama 351 i 358 i njihova oksidacija je dovoljna za potpuni gubitak inhibitorne funkcije alfa-1-antitripsina (Taggart, 2000). Skorija istraživanja su pokazala da alfa-1-antitripsin ima antiapoptotsko dejstvo na alveolarne ćelije (Greene, 2010) što može predstavljati novu protektivnu ulogu alfa-1-antitripsina u zaštiti od emfizema. S druge strane, može se pretpostaviti da antiapoptotsko dejstvo alfa-1-antitripsina na ćelije pluća može pod određenim uslovima, postati patološki mehanizam

koji vodi ka razvoju karcinoma pluća. Neke studije su pokazale da među obolelima od plućnog karcinoma ima više nosilaca deficijentnih alela nego u opštoj populaciji (Yang, 1999).

Strukturna analiza gena za alfa-1-antitripsin vršena je metodom elektroforeze u gelu sa gradijentom denaturišućih agenasa - DGGE i metodom DNK sekvenciranja. DGGE je indirektna metoda koja omogućava detekciju promena u sekvenci DNK na osnovu razlike u topljivosti fragmenata dok se DNK sekvenciranjem promene u sekvenci direktno detektuju. DGGE metoda se pokazala kao pouzdana i reproducibilna metoda koja omogućava detekciju varijanti alfa-1-antitripsina koje bi standardnom IEF metodom ostale nedetektovane (Lodewyckx, 2001; Ljubic, 2008). Obe ove metode korišćene su za analizu čitavog kodirajućeg regiona gena za alfa-1-antitripsin.

Najčešće deficijentne varijante alfa-1-antitripsina su varijante S i Z, dok su ostale, s obzirom na nisku učestalost, označene kao retke. Procenjuje da je prisustvo retke varijante uzrok deficijencije alfa-1-antitripsina u 2-4% slučajeva (Zorzetto, 2005). Standardne metode za detekciju AAT varijanti uključuju izoelektrično fokusiranje proteina seruma i detekciju čestih deficijentnih varijanti, kao što su S i Z, genotipizacijom. S obzirom da se izoelektričnim fokusiranjem vrši razdvajanje proteina na osnovu njihove izoelektrične tačke neke od varijanti proteina mogu biti pogrešno okarakterisane ili se teško detektuju (Molina, 2011). Pouzdanost rezultata dobijenih izoelektričnim fokusiranjem zavisi od količine alfa-1-antitripsina u plazmi tako da je varijante koje rezultuju niskim koncentracijama ili potpunim odsustvom proteina u plazmi nemoguće detektovati. Usled velike heterogenosti gena za alfa-1-antitripsin neke varijante mogu imati sličnu pokretljivost tokom elektroforeze. Tako je pozicija Mmalton varijante razdvojena izoelektričnim fokusiranjem bliska normalnoj M varijanti, dok je migracija I varijante slična F varijanti (Jardí, 1997). Pogrešna karakterizacija varijanti alfa-1-antitripsina moguća je i u slučaju normalne M4 varijante (Ljubic, 2008).

Metodološki problemi povezani sa rutinskom detekcijom deficijencije alfa-1-antitripsina predstavljaju problem u detekciji retkih alela tako da je moguće da je njihov broj i frekvencija veći nego što se pretpostavlja. S obzirom da različite mutacije mogu imati različite fenotipske posledice, pravilno postavljanje dijagnoze deficijencije alfa-1-

antitripsina neophodno je u proceni rizika za nastanak bolesti ali i kako bi se kod dijagnostikovanih osoba sprečila izloženost faktorima rizika sredine kao što su duvanski dim i aero zagađenje. Neke studije su pokazale da je u grupi adolescenata kojima je dijagnoza deficijencije alfa-1-antitripsina bila postavljena na rođenju učestalost pušača bila manja nego u kontrolnoj grupi iste starosti (Thelin, 1996; Wall, 1990).

Metode kojima se vrši pretraživanje mutacija u čitavom genu, kao što su indirektna genetičke metode ili DNK sekvenciranje, omogućavaju preciznu identifikaciju varijanti čime se ispunjavaju zahtevi za pravilnu dijagnostiku ali i omogućava procena prave učestalosti retkih varijanti u populaciji. U literaturi za sada postoji malo podataka o strukturnoj analizi celokupnog AAT gena (Lodewyckx, 2001; Hayes, 2003; Denden, 2009; Rodriguez-Frias, 2012).

Pristup primenjen u ovom radu omogućio je detaljniji i precizniji uvid u strukturu gena prisutnu kod patoloških stanja pluća čoveka.

Strukturnom analizom gena za alfa-1-antitripsin, osim relativno česte Z varijante, kod ispitanika sa emfizemom pluća pronađena je i M_{malton} varijanta u heterozigotnom stanju i u kombinaciji sa Z alelom, kao i S varijanta u heterozigotnom stanju kod ispitanika sa karcinomom pluća. Z alel je bio prisutan u homozigotnom stanju kod tri ispitanika sa emfizemom pluća, i u heterozigotnom stanju kod jednog ispitanika sa emfizemom i kod jednog ispitanika sa karcinomom pluća. Učestalost Z alela u ove dve grupe ispitanika je bila 6,1% dok je učestalost S alela bila 0,7%. Mala zastupljenost deficijentnog S alela u ove dve grupe ispitanika odgovara podacima da je učestalost S alela u Srbiji među najnižima u Evropi (Jelic-Ivanovic, 1994) a da je Z zastupljeniji deficijentni alel (Divac, 2004).

Kod ispitanika sa karcinomom pluća deficijentni aleli su nađeni na dva od analiziranih 132 hromozoma (1,5%) što je nešto manje od vrednosti dobijene u studiji koja je obuhvatila 186 ispitanika sa karcinomom pluća u srpskoj populaciji (2,95%) (Topic, 2006). Deficijentne varijante su bile zastupljenije u grupi ispitanika sa emfizemom pluća u odnosu na grupu ispitanika sa karcinomom pluća - deficijentni aleli su nađeni na 8 od analiziranih 54 hromozoma (14,8%).

Nijedan od ispitanika sa karcinomom pluća nije bio homozigotni nosilac deficijentnih varijanti. Odsustvo homozigota među ispitanicima sa karcinomom pluća se

može objasniti činjenicom da je karcinom pluća bolest koja se obično razvija u kasnijem životnom dobu, i to uglavnom kod pušača, a da osobe koje su homozigoti za deficijentne varijante alfa-1-antitripsina i koje su pušači imaju veću stopu smrtnosti (Larsson, 1978). Životni vek osoba sa ZZ genotipom koje su pušači je u proseku 20 godina kraći u odnosu na osobe ZZ genotipa koje su nepušači (Larsson, 1978). Homozigotni nosioci deficijentnih varijanti alfa-1-antitripsina nisu nađeni ni u studiji u SAD na grupi od 260 ispitanika (Yang, 1999), kao ni u studiji na 186 ispitanika u Srbiji (Topic, 2006). U našoj studiji 70,3% ispitanika sa emfizemom i 97% ispitanika sa karcinomom pluća su bili pušači. Jedina dva nepušača u grupi ispitanika sa karcinomom pluća su bili ženskog pola i sa dijagnozom adenokarcinoma, što odgovara podacima iz literature (Liu, 2000; Bryant, 2007).

Pored već poznatih mutacija u našoj studiji su detektovane i dve nove promene u egzonu 4 AAT gena – nukleotidna zamena G u A u kodonu na poziciji 320 (Gly-320[GGG] - Arg-320[AGG]) i nukleotidna zamena G u T u kodonu na poziciji 321 (Val-321[GTC] - Phe-321[TTC]). Ove dve varijante označene su kao G320R i V321F. Varijanta G320R je detektovana u heterozigotnom stanju kod jednog ispitanika sa emfizemom i kod jednog ispitanika sa karcinomom pluća na M1Val213 genotipu. Varijanta V321F je detektovana u heterozigotnom stanju kod ispitanika sa emfizemom pluća čiji je M genotip bio M1M3. Prema podacima iz literature varijanta G320R je takođe detektovana kod jednog od 50 025 ispitanika u retrospektivnoj studiji u SAD (Bornhorst, 2007) gde je na osnovu razdvajanja izoelektričnim fokusiranjem imenovana kao Psalt lake. Koncentracija antitripsina kod nosioca ove varijante u studiji iz SAD je iznosila 143 mg/dL, što se uklapa u referentne vrednosti za MM fenotip (100–250mg/dL). Varijanta V321F do sada nije opisana, a njen fenotip na osnovu razdvajanja izoelektričnim fokusiranjem je određen kao M2M3 (Ljujic, 2008).

Ispitanik sa emfizemom pluća, nosilac G320R varijante, je bio 31ogodišnji muškarac, nepušač, sa istorijom čestih respiratornih infekcija u detinjstvu. Ispitanik sa karcinomom pluća, nosilac G320R varijante, je bio 73ogodišnji muškarac, pušač (240 paklo godina), sa pozitivnom porodičnom istorijom hronične opstruktivne bolesti pluća i karcinoma pluća. Nijedan od ova dva ispitanika nije imao znake oboljenja jetre. Spirometrijski testovi su pokazali da je kod oba ispitanika funkcija pluća bila narušena.

Kod ispitanika sa emfizemom pluća FEV₁ vrednost je bila 29% od predviđene vrednosti a FVC 81% od predviđene vrednosti. Kod ispitanika sa karcinomom pluća FEV₁ vrednost je bila 36% od predviđene vrednosti, a FVC 59% od predviđene vrednosti (Ljubic, 2010).

Ispitanik sa emfizemom pluća, nosilac V321F varijante, je bio 60ogodišnji muškarac, pušač (52 paklo godine) kod kojeg se emfizem pluća prvi put javio u 48. godini života. Vrednost FEV₁ je bila 51% od predviđene, a FVC 91% od predviđene vrednosti.

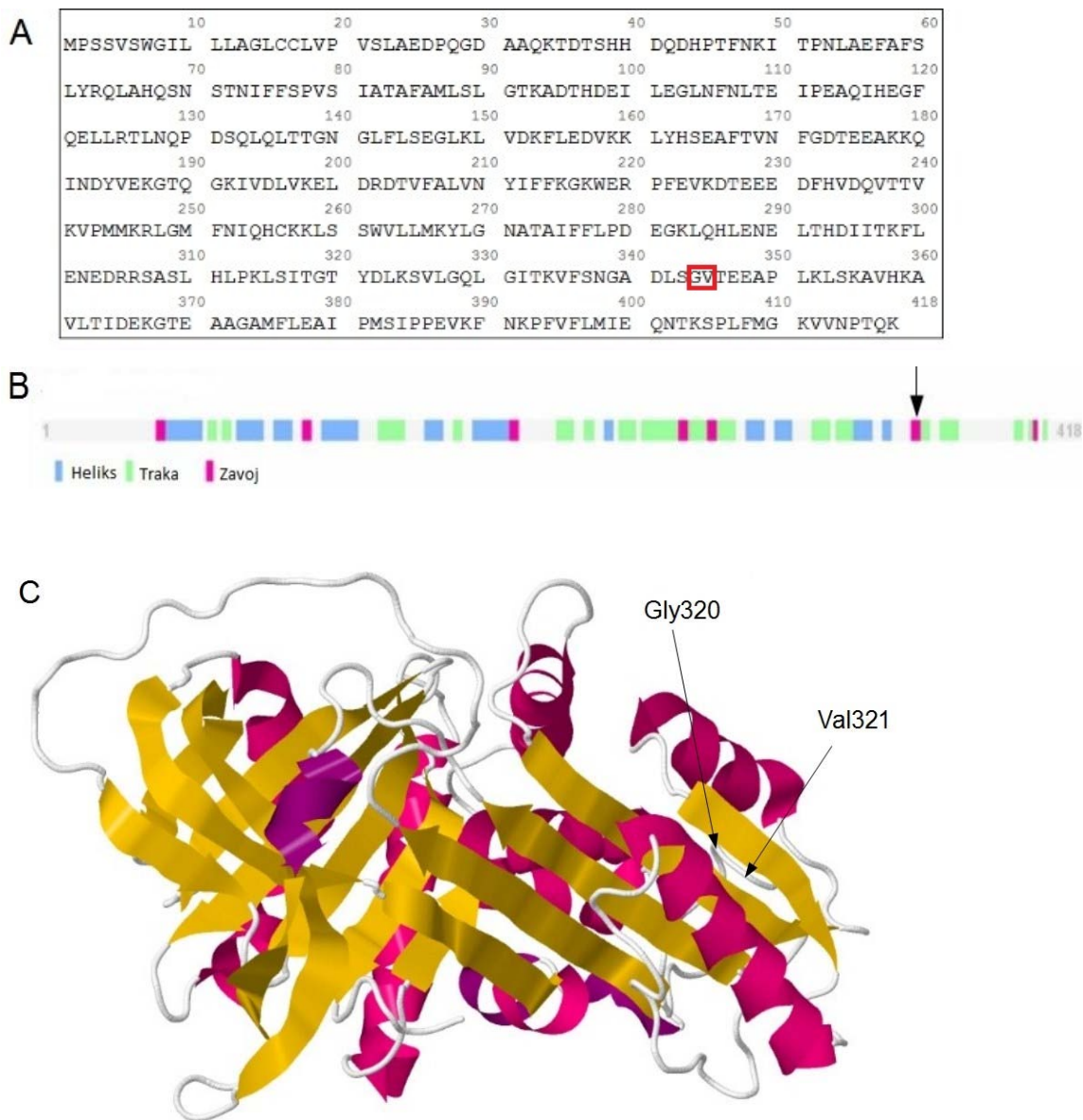
Koncentracija alfa-1-antitripsina u plazmi kod ispitanika sa V321F varijantom je bila 2,53g/L. Kod ispitanika sa emfizemom pluća, nosioca G320R varijante, koncentracija je bila 0,97g/L, dok je kod ispitanika sa karcinomom pluća bila 2,17g/L (referentne vrednosti 1,21-2,17g/L). S obzirom da je koncentracija alfa-1-antitripsina biohemijski parametar koji varira u zavisnosti od brojnih faktora ovi podaci nisu dovoljno informativni u proceni da li se radi o deficijntnim varijantama. Alfa-1-antitripsin je reaktant akutne faze i njegova koncentracija se povećava tokom inflamacije kao i u stanjima kao što su reumatoidni artritis, vaskulitis, karcinomi, povišeni nivo estrogena (Khan, 2002; Perlmutter, 2002; Ritchie, 2000). Na njegovu koncentraciju utiču i pol i godine (Ritchie, 2000) tako da nije uvek pouzdan dijagnostički parametar.

U studijama u kojima je prisutvo mutacija u genu za alfa-1-antitripsin analizirano DNK sekvenciranjem svih kodirajućih egzona kod potencijalno deficijntnih AAT osoba (Lodewyckx, 2001; Rodriguez-Frias, 2012) i obolelih od hronične opstruktivne bolesti pluća (Denden, 2009) nisu pronađene promene u egzonu 4. U studiji u kojoj je gen za alfa-1-antitripsin analiziran sekvenciranjem kod osoba sa AAT deficijncijom, sekvencirani su egzoni 2, 3 i 5, dok egzon 4 nije smatran relevantnim (Prins, 2008).

Ono što je zanimljivo je da je u našoj studiji na relativno malom broju od 186 hromozoma, čak na 3 nađena nova varijanta, što potvrđuje tezu da su mutacije u genu za alfa-1-antitripsin češće nego što se pretpostavlja i da se korišćenjem standardnih metoda u detekciji često previde. Ako se posmatra samo grupa ispitanika sa emfizemom pluća, kod kojih je deficijncija alfa-1-antitripsina dokazani faktor rizika, onda ova tvrdnja jos više dobija na značaju– nove varijante su bile nađene na 2 od 54 analizirana hromozoma. Ovi rezultati potvrđuju pretpostavku da retke varijante alfa-1-antitripsina možda i nisu toliko

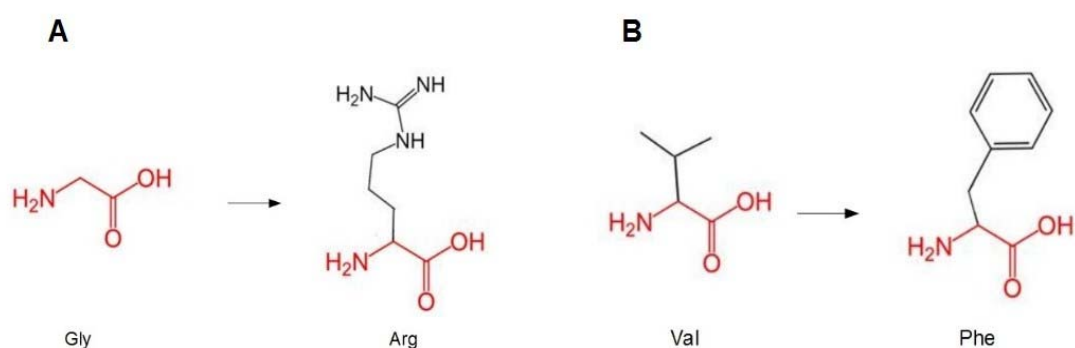
retke i ukazuju na to da su metode genotipizacije neophodne u pravilnoj detekciji alela ali i u proceni učestalosti varijanti alfa-1-antitripsina.

Potencijalni uticaj novootkrivenih mutacija na protein ispitan je kompjuterskim predikcijama korišćenjem dva servera – HOPE i PolyPhen-2. Korišćenjem PolyPhen-2 servera dobijena je predikcija da obe varijante mogu potencijalno imati uticaja na strukturu proteina. Ove dve promene nalaze se u regionu proteina koji predstavlja zavoj između α heliksa I i trake 5 β ploče A (s5A) i koji čine tri aminokiseline – Ser, Gly i Val (slika 36).



Slika 36. Primarna, sekundarna i tercijsna struktura alfa-1-antitripsina. A. Proteinska sekvenca alfa-1-antitripsina, položaj novih mutacija markiran crvenom bojom B. Shematski prikaz sekundarne strukture alfa-1-antitripsina, region novootkrivenih mutacija je obeležen strelicom (slika preuzeta sa Uniprot baze podataka) C. Tercijsna struktura alfa-1-antitripsina, slika generisana Jmol softverom (Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org>), kao unos korišćen PDB (Protein Data Bank) kod 1qlp

U slučaju G320R varijante mala i neutralna aminokiselina, glicin, zamenjena je pozitivno naelektrisanim argininom što može imati uticaja na savijanje proteina. S obzirom da je glicin najfleksibilnija aminokiselina, zamena aminokiselinom sa većim bočnim lancem (Slika 37A) može potencijalno uticati na fleksibilnost i strukturu molekula. Glicin je centralna aminokiselina u malom regionu (tri aminokiseline) koji čini prevoj u proteinu i njegovo prisustvo na toj poziciji je verovatno neophodno za fleksibilnost ovog regiona. Glicin je konzerviran na ovoj poziciji u proteinu ali je i arginin prisutan u nekim od homologih sekvenci.



Slika 37. Shematski prikaz WT (Gly) i mutirane aminokiseline (Arg) u slučaju G320R zamene (A) i prikaz WT (Val) i mutirane (Phe) aminokiseline u slučaju V321F zamene (B)

U slučaju V321F zamene i originalna i mutirana aminokiselina su nepolarne na pH 7 a razlikuju se po veličini. Obe aminokiseline su hidrofobne, pri čemu je fenilalanin znatno veći od valina (slika 37B) i s obzirom da se nalaze u unutrašnjosti proteina veličina mutirane aminokiseline može imati efekta na pravilno savijanje proteina. Originalna aminokiselina nije konzervirana na ovoj poziciji i fenilalanin je prisutan u nekim od homologih sekvenci.

Traka 5 β ploče A je deo 'shutter' regiona alfa-1-antitripsina koji je važan u kontroli i modulaciji konformacione promene tokom otvaranja ploče i insercije reaktivne petlje (Whisstock, 2000b; Irving, 2000) i mutacije prisutne u ovom regionu dovode do

poremećaja funkcije proteina (Stein, 1995). Na osnovu rezultata ovih predikcija može se pretpostaviti da otkrivene promene mogu imati uticaja na strukturu proteina pa su stoga one funkcionalno okarakterisane određivanjem inhibitorne aktivnosti prema elastazi, a takođe su određene i lokalizacija proteina u ćeliji i njegova sklonosti ka polimerizaciji.

5. 2. Funkcionalna analiza varijanti G320R i V321F alfa-1-antitripsina

Poznavanje mehanizma kojim mutacija izaziva promenu u proteinu važno je u proceni prisustva rizika za nastanak bolesti ali takođe predstavlja značajnu informaciju o strukturnim i funkcionalnim posledicama mutacija. Od velikog broja varijanti alfa-1-antitripsina relativno mali broj je funkcionalno okarakterisan. Funkcionalna karakterizacija u cilju rasvetljavanja mehanizma kojim mutacije uzrokuju bolest ispitana je za najčešće deficijentne varijante, Z i S, kao i za retke varijante, kao što su Mmalton i Siiyama, ali kod kojih je na osnovu fenotipskih efekata jasno da uzrokuju bolest. Retke varijante kod kojih nije jasna povezanost sa bolestima često ostaju funkcionalno neispitane tako da posledice njihovog prisustva ostaju nepoznate. Prilikom funkcionalne karakterizacije varijanti najčešće se vrši izučavanje njihove sposobnosti da inhibiraju proteazu i sklonosti ka formiranju polimera, s obzirom da poremećaji u ova dva mehanizma najčešće leže u osnovi bolesti pluća i jetre izazvanih AAT deficijencijom.

U ovom radu je funkcionalna analiza varijanti alfa-1-antitripsina vršena na proteinima eksprimiranim u prokariotskim ćelijama, kao i na proteinima eksprimiranim u eukariotskim ćelijama. Pored ispitivanih varijanti antitripsina, G320R i V321F, eksprimirane su i WT i Z varijante proteina što je omogućilo poređenje svojstava ispitivanih proteina sa normalnom varijantom i dobro okarakterisanom mutiranom varijantom proteina.

Ekspresija proteina u *E. Coli* soju BL21RIL omogućila je dobijanje relativno velikih količina proteina koji su korišćeni u *in vitro* esejima određivanja inhibitorne aktivnosti proteina prema elastazi kao i u određivanju njegove stabilnosti pri termalnoj denaturaciji. U bakterijskom soju BL21RIL eksprimirane su proteinske varijante WT, G320R i V321F.

U eukariotskom ekspresionom sistemu (COS7 ćelijska linija) su eksprimirane varijante WT, G320R, V321F i Z proteina koji su korišćeni za *in vivo* određivanje lokalizacije proteina u ćeliji kao i njegove sklonosti ka polimerizaciji.

5. 2. 1. Analiza migracije proteina u denaturišućim poliakrilamidnim gelovima

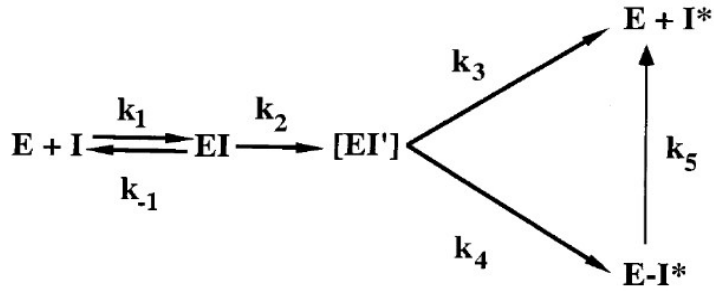
Sve tri proteinske varijante (WT, G320R i V321F) su podjednako dobro eksprimirane u bakterijskim ćelijama, a zatim prečišćene. Tokom elektroforeze prečišćenih proteina na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima primećena je razlika u brzini migracije za ova tri proteina – varijante G320R i V321F su putovale brže u odnosu na WT varijantu. S obzirom da se radi o proteinima eksprimiranim u bakterijskim ćelijama u kojima nema posttranslacionih modifikacija, isključena je mogućnost efekta promene u glikozilaciji na ovaj fenomen. Jedno od mogućih objašnjenja bilo je to da aminokiselinske zamene u proteinu utiču na drugačije vezivanje SDS molekula u odnosu na WT varijantu. Elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum dodecil sulfata (eng. sodium dodecyl sulfate - SDS) proteini se razdvajaju na osnovu svoje pokretljivosti koja zavisi od veličine proteina. U većini slučajeva vezivanje molekula SDS-a za polipeptidni lanac daje podjednaku distribuciju naelektrisanja po jedinici mase i linearizuje ga tako da se razdvajanje proteina vrši na osnovu njihove veličine. Iako kao opšte prihvaćeno važi pravilo da je broj molekula SDSa koji se vezuje za protein proporcionalan broju aminokiselina pokazano je da globularni proteini vezuju 1,5-2 grama deterdženta po gramu proteina (Tanford, 1980), dok membranski proteini u nekim slučajevima mogu vezati i dvostruko više SDSa (Grefrath, 1974; Miyake, 1978). Ovo navodi na zaključak da i struktura proteina, a ne samo broj aminokiselina, utiče na količinu SDS molekula koju protein vezuje. Rezultati od strane Rath i saradnika na fragmentima CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) proteina pokazuju da hidrofobniji mutanti vezuju više SDSa tako da imaju smanjenu elektroforetsku pokretljivost (Rath, 2009).

Kako bi proverili da li ove aminokiselinske zamene smanjuju elektroforetsku pokretljivost proteina u SDS poliakrilamidnim gelovima, proteini su analizirani u SDS gelu u prisustvu uree kao dodatnog denaturišućeg agensa. Očekuje se da urea smanji efekat

naelektrisanja i konformacije na elektroforetsku pokretljivost proteina (Jarolim, 1992). Elektrofoteza proteina u prisustvu 5M uree je poništala efekat razlike u pokretljivosti između WT i mutiranih varijanti proteina. Ovi rezultati ukazuju na to da ove dve aminokiselinske zamene dovode do toga da protein vezuje manje SDS molekula u odnosu na WT varijantu. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da one smanjuju hidrofobnost proteina, a s obzirom da se nalaze u unutrašnjosti molekula, moguće su i implikacije na strukturu proteina. Detaljniji uticaj ovih aminokiselinskih zamena na strukturu proteina trebalo bi ispitati metodom cirkularnog dihiroizma kojim bi se utvrdilo da li ove promene menjaju sekundarnu strukturu proteina ili utiču i na njegovu tercijsku strukturu. Analiza Z varijante metodom cirkularnog dihiroizma pokazuje da postoje male razlike u sekundarnoj strukturi između Z i WT varijante, ali su zato prisutne razlike u tercijskoj strukturi (Knaupp, 2010).

5. 2. 2. Inhibitorna aktivnost novootkrivenih varijanti alfa-1-antitripsina

Osnovna biološka uloga alfa-1-antitripsina je inhibicija serin proteaza kao što su elastaza neutrofila, katepin G, trombin, plazmin i elastaza pankreasa i odigrava se po mehanizmu kovalentne enzimske inhibicije. Proteaza (E) prepoznaje aktivno mesto antiproteaze (I) kao potencijalni supstrat što dovodi do formiranja inicijalnog nekovalentnog intermedijernog kompleksa. Nakon formiranja ovog kompleksa reakcija može krenuti u dva pravca – ili ka proteolitičkoj reakciji koja kao rezultat daje hidrolizovanu formu antiproteaze (I*) ili ka formiranju kompleksa sa rezultujućom konformacionom promenom serpina (E-I*) (slika 38).



Slika 38. Mehanizam reakcije između proteaze (elastaza) i antiproteaze (serpin). I (inhibitor enzima)-serpin, E (enzim)-proteaza. Inicijalna reakcija je formiranje nekovalentnog kompleksa (EI) sa konstantom brzine k_1 i ova reakcija je reverzibilna. Ovaj kompleks prelazi u intermedijer EI' sa konstantom brzine k_2 . Od ovog trenutka reakcija ili ide u pravcu formiranja kompleksa E-I*, sa konstantom brzine k_4 , ili u pravcu reakcije gde je serpin supstrat proteazi, sa konstantom brzine k_3 , gde se kao produkt reakcije dobija hidrolizovani serpin I*. Serpin iz kompleksa može podleći hidrolizi, ali je konstanta brzine ove reakcije, k_5 , značajno niža od k_3 (slika preuzeta iz Gettins, 2002)

Stehiometrija inhibicije (SI – broj molova inhibitora neophodnih da kompletno inhibiraju 1 mol ciljne proteaze) je data formulom

$$SI = (k_3 + k_4) / k_4$$

gde je k_3 konstanta brzine za reakciju formiranja hidrolizovanog serpina dok je k_4 konstanta brzine inhibitorne reakcije u kojoj se formira kompleks serpin-proteaza. Formiranje kompleksa između serpin proteina i proteaze se označava i kao suicidalni mehanizam s obzirom da promena konformacije tokom ove interakcije inaktivira i proteazu i antiproteazu. Reakcija između većine serpin molekula i ciljnih proteaza se odvija u pravcu formiranja kompleksa E-I*, tako da se smatra da je SI vrednost reakcije 1. Povećanje vrednosti SI je uglavnom povezano sa smanjenjem brzine insercije reaktivne petlje molekula u β ploču što dovodi do toga da se favorizuje reakcija u kojoj je alfa-1-antitripsin supstrat, a ne inhibitor u odnosu na reakciju sa proteazom. S obzirom da u ovakvoj reakciji funkcija proteaze biva očuvana proteini sa SI vrednošću većom od 1 nisu efikasni inhibitori proteaza. Na povećanje SI vrednosti mogu uticati mutacije, kao i promena temperature i pH

(Gettins, 2002). Kovalentni kompleksi serpin-proteaza su SDS stabilni, i *in vitro* mogu opstati čak i mesecima (Olson, 1995).

Uticaj aminokiselinskih zamena na inhibitornu aktivnost proteina ispitivali smo u reakciji sa elastazom pankreasa. Analiza formiranja kompleksa između alfa-1-antitripsina i elastaze pankreasa vršena je inkubacijom alfa-1-antritripsina i elastaze u različitim molarnim odnosima na 37°C i njihovom elektroforezom na SDS poliakrilamidnim gelovima. Kod varijanti koje imaju smanjenu inhibitornu aktivnost, favorizuje se reakcija u kojoj je alfa-1-antitripsin supstrat. SI vrednosti Z varijante alfa-1-antitripsina za 30-40% veće u odnosu na WT varijantu (Levina, 2009; Ogushi, 1987) tako da se prilikom interakcije sa proteazom favorizuje reakcija gde je alfa-1-antitripsin supstrat za proteazu. Smanjenje inhibitorne aktivnosti Z varijante objašnjava se prisustvom mutacije koja usporava konformacionu promenu neophodnu pri inhibiciji elastaze. Deficijentna varijanta Siiyama ne formira kovalentne komplekse sa elastazom (Ray, 2005; Kim, 2006), tako da se ova varijanta osim sklonosti ka polimerizaciji odlikuje i odsustvom inhibitorne aktivnosti. Varijanta S ima smanjenu inhibitornu aktivnost u odnosu na WT varijantu i manji udeo proteina je prisutan u kovalentnom kompleksu nego što je to slučaj kod WT varijante (Kim, 2006).

Elektroforetska analiza SDS rezistentnih kompleksa alfa-1-antitripsina i elastaze pankreasa pokazala je da se varijante G320R i V321F ponašaju poput WT varijante - odnosi između formiranja kompleksa i hidrolizovanog alfa-1-antitripsina bili su isti za sve tri varijante proteina. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je inhibitorna aktivnost ove dve varijante očuvana. Radovi u kojima je funkcionalna aktivnost antitripsina ispitivana inkubacijom paralelno i sa elastazom neutrofila i sa elastazom pankreasa pokazali su da se reakcija sa elastazom pankreasa dominantno odvijala prema hidrolizi alfa-1-antitripsina za razliku od reakcije sa elastazom neutrofila koja je bila usmerena ka formiranju kompleksa (Jung, 2004; Lee, 1998; Im, 2000). Prisustvo hidrolizovanog alfa-1-antitripsina se može smatrati posledicom smanjenog afiniteta alfa-1-antitripsina prema elastazi pankreasa u odnosu na elastazu neutrofila (Beatty, 1980).

5. 2. 3. Formiranje polimera i unutarćelijska lokalizacija

Nativna forma inhibitornih serpin proteina ne predstavlja istovremeno i termodinamički najstabilniju formu, što je od ključnog značaja za konformacionu promenu koja se dešava tokom inhibicije proteaze. Latentna forma proteina je stabilnija od nativne, dok je hidrolizovana forma stabilnija od latentne. Inkubacijom nativnog proteina pod blago denaturišućim uslovima ili termalnom denaturacijom indukuje se stvaranje oligomera i polimera procesom *loop sheet* polimerizacije (Lomas, 1993a). Formiranjem polimera protein gubi svoju inhibitornu aktivnost. Mutacije u regionima važnim za konformacionu promenu tokom inhibicije supstrata takođe čine da protein postane podložan polimerizaciji. Pokazano je da Z varijanta alfa-1-antitripsina formira polimere na fiziološkoj temperaturi od 37°C na kojoj M varijanta proteina ne polimerizuje (Lomas, 1992; Lomas, 1993a; Levina, 2009). Brzina polimerizacije Z proteina se povećava sa porastom temperature i koncentracije proteina (Lomas, 1992). Sklonost varijanti alfa-1-antitripsina ka formiranju polimera ispitivali smo termalnom denaturacijom proteina eksprimiranih u *E. Coli* kao i detekcijom polimera kod proteina eksprimiranih u COS7 ćelijskoj liniji.

Termalna stabilnost varijanti G320R i V321F alfa-1-antitripsina ispitivana je elektroforezom na neddenaturišućim poliakrilamidnim gelovima i određivanjem inhibitorne aktivnosti proteina nakon njegove inkubacije 1h na temperaturama od 45-60°C.

Analiza ovako tretiranih preparata alfa-1-antitripsina elektroforezom u nativnim poliakrilamidnim gelovima pokazala je da mutirane varijante proteina imaju blago smanjenu termostabilnost u odnosu na WT protein – stabilnost počinje da opada već na 50°C dok WT protein gubi stabilnost na 60°C. Smanjenje stabilnosti proteina potvrđeno je i određivanjem inhibitorne aktivnosti tretiranih preparata proteina sa elastazom pankreasa. Varijante G320R i V321F već na 50°C pokazuju smanjenje inhibitorne aktivnosti kakvo WT protein pokazuje nakon tretmana na 60°C. Ovi rezultati ukazuju na to da su varijante G320R i V321F antitripsina manje stabilne u odnosu na WT varijantu proteina i da gube aktivnost pri blažim denaturišućim uslovima. Redukovana termostabilnost alfa-1-antitripsina pospešuje njegovu polimerizaciju, naročito u uslovima povišene temperature tokom inflamacije što i dovodi do kliničkih simptoma AAT deficijencije (Lomas, 1992). S

obzirom da se kod varijanti G320R i V321F polimerizacija indukuje tek na 50°C, što je daleko od fiziološke temperature, vrlo je verovatno da ove varijante u fiziološkim uslovima nemaju patološki efekat i da je dejstvo ovih promena blago destabilišuće. Polimerizacija na fiziološkoj temperaturi pokazana je za Z varijantu proteina (Levina, 2009) ali i za Siiyama varijantu koja na fiziološkoj temperaturi nije ni prisutna u formi monomera (Kim, 2006). Obe ove varijante se odlikuju zadržavanjem u endoplazmatičnom retikulumu i povezane su sa bolestima jetre. Varijante Heerlen (P369L) i Wurzburg (P369S) koje se karakterišu zadržavanjem proteina u endoplazmatičnom retikulumu (Poller, 1999) su takođe sklone polimerizaciji. Varijanta Heerlen formira polimere na temperaturi od 40°C na kojoj polimeriše i S (E264V) varijanta, dok varijanta Wurzburg formira polimere na 50°C (Kim, 2006). Formiranje polimera kod varijanti Heerlen i Wurzburg se može objasniti pozicijom mutacije koja je između aminokiselina Glu342 i Lys387 i koja ometa formiranje ove intramolekulske veze i time narušava konformaciju proteina (Poller, 1999). U slučaju S varijante narušena je elektrostatička interakcija između Glu264 i Lys387 što ima destabilišući efekat na protein i dovodi do smanjene sekrecije i zadržavanja proteina u endoplazmatičnom retikulumu, ali u znatno manjoj meri nego u slučaju Z varijante (Teckman, 1996).

Sklonost varijanti G320R i V321F alfa-1-antitripsina ka formiranju polimera u fiziološkim uslovima analizirana je na proteinima eksprimiranim u COS7 ćelijskoj liniji. Elektroforeza proteina eksprimiranih u COS7 ćelijskoj liniji na nedenedurirajućem poliakrilamidnom gelu pokazala je da su varijante G320R i V321F, kao i WT varijanta proteina, prisutni isključivo u formi monomera, dok je Z varijanta proteina bila prisutna u formi polimera. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da dve ispitivane mutacije ne dovode do formiranja polimera *in vivo*.

Alfa-1-antitripsin je sekretorni protein i njegov normalan put sinteze podrazumeva sintezu u endoplazmatičnom retikulumu, post-translacionu obradu u Goldžijevom aparatu i sekreciju van ćelije. Pojedine mutirane varijante proteina se karakterišu produženim zadržavanjem (Nullsaa) ili formiranjem polimera u endoplazmatičnom retikulumu (Z) čime dovode ili do deficijencije proteina ili do deficijencije i citotoksičnosti. Produženo

zadržavanje u endoplazmatičnom retikulumu karakteristično je za varijante proteina koje formiraju polimere, kao što su to Z, Siiyama i Malton, ali i za varijante koje ne formiraju polimere ali su skraćene na C terminalnom kraju. U ovom radu za praćenje lokalizacije proteina u ćeliji primenjena je metoda imunofluorescence. Praćenje lokalizacije proteina eksprimiranih u COS7 ćelijama vršeno je određivanjem kolokalizacije GFP obeleženog proteina sa markerom Goldžijevog aparata – proteinom goldžin-97. Kod ćelija tranfekovanih WT, G320R I V321F varijantama antitripsina najveći intenzitet fluorescence bio je prisutan u regionu ćelije koji se preklapao sa markerom Goldžijevog aparata. Manji intenzitet je bio prisutan i perinuklearno u regionu koji po strukturi odgovara endoplazmatičnom retikulumu. U ćelijama transfekovanim Z varijantom, situacija je bila obrnuta – protein je uglavnom bio lokalizivan u regionu koji odgovara endoplazmatičnom retikulumu, dok je u manjem broju ćelija fluorescencija bila najjača u regionu Goldžijevog aparata. Ovi rezultati su konzistentni sa time da se WT varijanta efikasno sekretuje iz ćelije a da se Z varijanta zadržava u ćeliji i ukazuju na to da se i varijante G320R i V321F efikasno sekretuju iz ćelije. Efikasnost sekrecije proteina iz ćelije bi trebalo ispitati i nakon inkubacije ćelija na nešto višoj temperaturi od 37°C, čime bi se simulirali uslovi povišene telesne temperature koji su prisutni pri inflamaciji.

Na osnovu rezultata ove sudije može se pretpostaviti da varijante G320R i V321F nemaju značajnu ulogu u patologiji bolesti pluća čoveka. Funkcionalna karakterizacija je pokazala da ove varijante ne pokazuju efekte polimerizacije i zadržavanja unutar ćelije kao što je to slučaj sa Z varijantom proteina. Inhibitorna aktivnost ovih varijanti je takođe bila očuvana. Postoji mogućnost da ove mutacije imaju efekta na promenu strukture proteina i da je to razlog njihove smanjene termalne stabilnosti u odnosu na WT protein. Ovi rezultati ukazuju na to da ove dve varijante nemaju efekat na funkciju proteina, ali ne isključuju mogućnost da suptilne promene u strukturi, pod određenim uslovima, smanjuju njegovu funkciju, što eventualno može imati značaja kada se nalaze u kombinaciji sa nekom drugom mutacijom ili nekim drugim genetičkim i sredinskim faktorima. Model sistem humanih fibroblasta kože osoba obolelih od AAT deficijencije sa oboljenjima jetre kao posledicom može poslužiti kao sistem za izučavanje unutarćelijske sudbine ispitivanih varijanti u prisustvu drugih modifikujućih promena koje čine osobe podložnim bolestima jetre (Wu,

1994; Teckmann, 1996). Ove ćelije ne eksprimiraju endogeni alfa-1-antitripsin ali poseduju sve mehanizme neophodne za pravilnu sintezu ekstracelularnih proteina ali i smanjenu sposobnost degradacije nepravilno savijenih proteina za koju se pretpostavlja da dovodi do akumulacije proteina u ćeliji. Na primeru ovih ćelija je pokazano da se i S varijanta antitripsina odlikuje zadržavanjem u endoplazmatičnom retikulumu, ali u mnogo manjoj meri nego Z varijanta. Dalje analize varijanti G320R i V321F, koje bi uključile i cirkularni dihydroizam i *pulse chase* analizu, dale bi detaljniji uvid u strukturne i funkcionalne implikacije ovih promena.

Funkcionalne analize mutiranih varijanti proteina pružaju uvid u razumevanje efekta mutacije u pojedinim regionima proteina na njegovu funkciju i stabilnost. Za sada ne postoje podaci u literaturi o funkcionalnoj analizi regiona alfa-1-antitripsina koji je analiziran u ovom radu. Rezultati ovog rada ukazuju da su fleksibilnost i veličina bočnog lanca aminokiselina prisutnih u ovom regionu važni faktori u njegovoj stabilizaciji. Podaci dobijeni ovakvom analizom mogu potencijalno doprineti razvoju novih lekova u vidu malih molekula koji bi stabilisali protein i učinili ga manje podložnim polimerizaciji bez uticaja na njegovu inhibitornu funkciju. S obzirom na to da najnovija istraživanja pokazuju da alfa-1-antitripsin ima i inhibitornu ulogu prema efektornim kaspazama bilo bi interesantno ispitati i korelaciju između stabilnosti proteina i njegove inhibitorne aktivnosti prema proteazama sa inhibitornom aktivnosti prema kaspazama i njegovom antiapoptotskom ulogom. Nova svojstva alfa-1-antitripsina i njegov antiapoptotski efekat ukazuju i da je njegova uloga u patogenezi emfizema kompleksnija od inhibitorne uloge prema proteazama, ali i na njegovu moguću ulogu u sistemskim bolestima koja se odlikuju inflamacijom, oksidativnim stresom i apoptozom, poput kancera.

6. ZAKLJUČCI

1. Strukturnom analizom gena za alfa-1-antitripsin u bolestima pluća čoveka detektovane su deficitne varijante Z, S i Mmalton. Učestalost deficitnih alela je veća u grupi ispitanika sa emfizemom pluća (14,8%) nego u grupi ispitanika sa karcinomom pluća (1,5%)
2. Nijedan od ispitanika sa karcinomom pluća nije nosilac deficitnih varijanti alfa-1-antitripsina u homozigotnom stanju.
3. Strukturnom analizom gena za alfa-1-antitripsin u bolestima pluća čoveka identifikovane su dve nove promene u egzonu 4 koje rezultuju aminokiselinskim zamenama u proteinu – G320R i V321F. Varijanta G320R je detektovana u heterozigotnom stanju kod jednog ispitanika sa emfizemom i kod jednog ispitanika sa karcinomom pluća. Varijanta V321F je detektovana u heterozigotnom stanju kod ispitanika sa emfizemom pluća.
4. Kompjuterska predikcija korišćenjem servera Poly-Phen 2 i HOPE pokazala je da aminokiselinske zamene G320R i V321F mogu imati uticaja na strukturu proteina.
5. Analiza proteinskih varijanti G320R i V321F alfa-1-antitripsina u denaturišućem poliakrilamidnom gelu pokazala je da ove dve varijante migriraju brže u odnosu na WT varijantu proteina.
6. Elektroforeza proteina u denaturišućem poliakrilamidnom gelu sa ureom je pokazala da aminokiselinske zamene G320R i V321F u alfa-1-antitripsinu verovatno smanjuju hidrofobnost regiona u kojem se nalaze što može imati implikacije na strukturu proteina.

7. Inhibitorna aktivnost varijanti G320R i V321F prema elastazi pankreasa nije izmenjena u odnosu na inhibirornu aktivnost WT varijante proteina.
8. Termalna stabilnost varijanti G320R i V321F alfa-1-antitripsina je blago narušena u odnosu na WT varijantu alfa-1-antitripsina. Varijante G320R i V321F su već na 50°C pokazivale smanjenje inhibitorne aktivnost kakvo je WT protein pokazao nakon tretmana na 60°C.
9. Varijante G320R i V321F ne formiraju polimere u fiziološkim uslovima u kojima to čini Z varijanta alfa-1-antitripsina.
10. Analiza lokalizacije varijanti G320R i V321F unutar ćelije je pokazala da ove dve varijante, kao i WT varijanta proteina, kolokalizuju sa markerom Goldžijevog aparata i da se ne zadržavaju u endoplazmatičnom retikulumu.

7. LITERATURA

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7(4):248-249

Aertgeerts K, De Bondt HL, De Ranter CJ, Declerck PJ (1995) Mechanisms contributing to the conformational and functional flexibility of plasminogen activator inhibitor-1. *Nat Struct Biol* 2(10): 891–897

Allgayer H, Babic R, Grützner KU, Beyer BC, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM (1998) Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns. *Clin Exp Metastasis* 16(1):62-73

American Thoracic Society, European Respiratory Society (2003) American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 168(7): 818-900

Baek JH, Im H, Kang UB, Seong KM, Lee C, Kim J, Yu MH (2007) Probing the local conformational change of alpha1-antitrypsin. *Protein Sci* 16(9):1842-50

Beatty K, Bieth J, Travis J (1980) Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *J Biol Chem* 255(9):3931-4

Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, Shapiro SD (1998) Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med* 4(5):615-8

Bornhorst JA, Calderon FR, Procter M, Tang W, Ashwood ER, Mao R (2007) Genotypes and serum concentrations of human alpha-1-antitrypsin "P" protein variants in a clinical population. *J Clin Pathol* 60(10):1124-8

Boutten A, Venembre P, Seta N, Hamelin J, Aubier M, Durand G, Dehoux MS (1998) Oncostatin M is a potent stimulator of alpha1-antitrypsin secretion in lung epithelial cells: modulation by transforming growth factor-beta and interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(4):511-20

Brantly M (2006) Efficient and accurate approaches to the laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: The promise of early diagnosis and intervention. *Clin Chem* 52(12):2180-1

Brantly M L, Wittes JT, Vogelmeier CF, Hubbard R C, Fells GA, Crystal RG (1991) Use of a highly purified alpha 1-antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficient alpha 1-antitrypsin phenotypes. *Chest* 100(3): 703–708

Brantly M, Lee JH, Hildesheim J, Uhm CS, Prakash UB, Staats BA, Crystal RG, Hildesheim J (1997) Alpha1-antitrypsin gene mutation hot spot associated with the formation of a retained and degraded null variant. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16(3):225-31

Brantly M, Nukiwa T, Crystal RG (1988) Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Med* 84(6A):13-31

Bryant A, Cerfolio RJ (2007) Differences in epidemiology, histology, and survival between cigarette smokers and never-smokers who develop non-small cell lung cancer. *Chest* 132(1):185-92

Cancer research UK - cancerresearchuk.org

Carrell RW, Lomas DA (2002) Alpha1-antitrypsin deficiency - a model for conformational diseases. *N Engl J Med* 346(1):45-53

Carrell RW, Owen M (1985) Plakalbumin, alpha1-antitrypsin, antithrombin and the mechanism of inflammatory thrombosis. *Nature* 317 (6039):730–732

Chappell S, Guetta-Baranés T, Batowski K, Yiannakis E, Morgan K, O'Connor C, MacNee W, Kalsheker N (2004) Haplotypes of the alpha-1 antitrypsin gene in healthy controls and Z deficiency patients. *Hum Mutat* 24(6):535-6

Chappell S, Hadzic N, Stockley R, Guetta-Baranes T, Morgan K, Kalsheker NA (2008) Polymorphism of the alpha1-antitrypsin gene represents a risk factor for liver disease. *Hepatology* 47(1):127-32

Chua F, Laurent GJ (2006) Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. *Proc Am Thorac Soc* 3(5):424-7

Cooper DN (2005) *The Molecular Genetics of Lung Cancer*. Springer ISBN 978-3-540-22985-8

Crowther DC, Belorgey D, Miranda E, Kinghorn KJ, Sharp LK, Lomas DA (2004) Practical genetics: alpha-1-antitrypsin deficiency and the serpinopathies *Eur J Hum Genet* 12(3):167-172

Crystal R (1990) Alpha1-antitrypsin deficiency, emphysema and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy. *J Clin Invest* 85(5): 1343-1352

Curiel DT, Chytil A, Courtney M, Crystal RG (1989) Serum alpha 1-antitrypsin deficiency associated with the common S-type (Glu264 Val) mutation results from intracellular degradation of alpha 1-antitrypsin prior to secretion. *J Biol Chem* 264(18):10477-86

Daemen MA, Heemskerk VH, van't Veer C, Denecker G, Wolfs TG, Vandenabeele P, Buurman WA (2000) Functional protection by acute phase proteins alpha(1)-acid glycoprotein and alpha(1)-antitrypsin against ischemia/reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation. *Circulation* 102(12):1420-6

de Sá SV, Corrêa-Giannella ML, Machado MC, Krogh K, de Almeida MQ, Albergaria Pereira MA, Coelho Siqueira SA, Patzina RA, Ibuki FS, Sogayar MC, Machado MC, Giannella-Neto D (2007) Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 as a potential marker for malignancy in insulinomas. *Clin Cancer Res* 13(18 Pt1):5322-30

de Serres FJ (2002) Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest* 122(5):1818-29

De Simone V, Ciliberto G, Hardon E, Paonessa G, Palla F, Lundberg L, Cortese R (1987) Cis- and trans-acting elements responsible for the cell-specific expression of the human alpha 1-antitrypsin gene. *EMBO J* 6(9):2759-66

DeMeo DL, Silverman EK (2004) α 1-Antitrypsin deficiency 2: Genetic aspects of α 1-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax* 59(3): 259-264

Denden S, Zorzetto M, Amri F, Knani J, Ottaviani S, Scabini R, Gorrini M, Ferrarotti I, Campo I, Chibani JB, Khelil AH, Luisetti M (2009) Screening for Alpha 1 antitrypsin deficiency in Tunisian subjects with obstructive lung disease: a feasibility report. *Orphanet J Rare Dis* 4:12.

Divac A, Nikolić A, Petrović-Stanojević N, Dopuđa-Pantić V, Radojković D (2004) The frequency of Z and S alleles of the alpha-1-antitrypsin gene in Serbian general population. *Zvezdara Clin Proc* 5(1-2):7-9

Dufour EK, Denault JB, Bissonnette L, Hopkins PC, Lavigne P, Leduc R (2001) The contribution of arginine residues within the P6-P1 region of alpha 1-antitrypsin to its reaction with furin. *J Biol Chem* 276(42):38971-9

Duplantier MM, Lamant L, Sabourdy F, de Reynies A, Delsol G, Espinos E (2006) Serpin A1 is overexpressed in ALK+ anaplastic large cell lymphoma and its expression correlates with extranodal dissemination. *Leukemia* 20(10):1848-54

Eden E, Mitchell D, Mehlman B, Khouli H, Nejat M, Grieco MH, Turino GM (1997) Atopy, asthma, and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 156(1):68-74

Elliott PR, Bilton D, Lomas DA (1998) Lung polymers in Z alpha1-antitrypsin deficiency-related emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(5):670-4

Eriksson S, Carlson J, Velez R (1986) Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 314(12):736–739

Evald T, Dirksen A, Keittelmann S, Viskum K, Kok-Jensen A (1990) Decline in pulmonary function in patients with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lung* 168 Suppl:579-85

Ferrarotti I, Baccheschi J, Zorzetto M, Tinelli C, Corda L, Balbi B, Campo I, Pozzi E, Faa G, Coni P, Massi G, Stella G, Luisetti M (2005): Prevalence and phenotype of subjects carrying rare variants in the Italian registry for alpha1-antitrypsin deficiency. *J Med Genet* 42(3):282-287

- Filipović M, Đinđić B, Cekić S (2006) Patogeneza hronične opstruktivne bolesti pluća. *Acta Med Median* 45(1):73-81
- Franceschi S, Bidoli E (1999) The epidemiology of lung cancer. *Ann Oncol* 10 (Suppl 5): S3-6
- Gadek JE, Fells GA, Zimmerman RL, Rennard SI, Crystal RG (1981) Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema. *J Clin Invest* 68(4):889-98
- Gettins PG (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 102(12):4751-4803
- GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) (2006) Pocket Guide to COPD Diagnosis, Management and Prevention. A Guide for Health Care Professionals
- Gooptu B, Hazes B, Chang W-SW, Dafforn TR, Carrell RW, Read RJ, Lomas DA (2000) 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* 97(1):67-72
- Gooptu B, Lomas DA (2008) Polymers and inflammation: disease mechanisms of the serpinopathies. *J Exp Med* 205(7):1529–1534
- Greene CM, Miller SD, Carroll TP, Oglesby IK, Ahmed F, O'Mahony M, Taggart CC, McElvaney NG, O'Neill SJ (2010) Anti-apoptotic effects of Z alpha1-antitrypsin in human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 35(5):1155-1163
- Grefrath SP, Reynolds JA (1974) The molecular weight of the major glycoprotein from the human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(10):3913-6
- Greten FR, Eckman L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M (2004) IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118(3):285–296

Hafeez W, Ciliberto G, Perimutter D H (1992) Constitutive and modulated expression of the human alpha 1 antitrypsin gene. Different transcriptional initiation sites used in three different cell types. *J Clin Invest* 89(4):1214-1222

Hayes V (2003) Genetic Diversity of the alpha-1-antitrypsin gene in Africans identified using a novel genotyping assay. *Hum Mutat* 22(1): 59-66

Hidvegi T, Schmidt BZ, Hale P, Perlmutter DH (2005) Accumulation of mutant alpha1-antitrypsin Z in the endoplasmic reticulum activates caspases-4 and -12, NFkappaB, and BAP31 but not the unfolded protein response. *J Biol Chem* 280(47):39002-15

Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Tateishi R (1992) An evaluation of the prognostic significance of alpha-1-antitrypsin expression in adenocarcinomas of the lung: an immunohistochemical analysis. *Br J Cancer* 65(2):300-2

Hopkins PC, Carrell RW, Stone SR (1993) Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry*. 32(30):7650-7

Hubbard RC, Fells G, Gadek J, Pacholok S, Humes J, Crystal RG (1991) Neutrophil accumulation in the lung in alpha 1-antitrypsin deficiency: spontaneous release of leukotriene B4 by alveolar macrophages. *J Clin Invest* 88(3):891-7

Hubbard RC, Ogushi F, Fells GA, Cantin AM, Jallat S, Courtney M, Crystal RG (1987) Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 80(5):1289-95.

Hunninghake GW, Crystal RG (1983) Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 128(5): 833-38.

Huntington JA, Fan B, Karlsson KE, Deinum J, Lawrence DA, Gettins PG (1997) Serpin conformational change in ovalbumin. Enhanced reactive center loop insertion through hinge region mutations. *Biochemistry* 36(18):5432-5440

Huntington JA, Read RJ, Carrell R W (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407(6806): 923–926

Huntington JA (2006) Shape-shifting serpins - advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem Sci* 31(8):427-35

Ikari Y, Mulvihill E, Schwartz SM (2001) Alpha 1-Proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and alpha 2-macroglobulin are the antiapoptotic factors of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 276(15):11798-803

Ikebe N, Akaike T, Miyamoto Y, Hayashida K, Yoshitake J, Ogawa M, Maeda H (2000) Protective effect of S-nitrosylated alpha(1)-protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 295(3):904-11

Im H, Yu MH (2000) Role of Lys335 in the metastability and function of inhibitory serpins. *Protein Sci* 9(5):934-41

Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC (2000) Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res* 10(12):1845-64

Jardí R, Rodríguez-Frías F, Casas F, Cotrina M, Vidal R, Miravittles M, Pascual C (1997) Molecular characterization of two variants of alpha-1-antitrypsin deficiency: PI Mpalermo and PI Plovel. *Med Clin (Barc)*. 109(12):463-6

Jarolim P, Rubin HL, Zhai S, Sahr KE, Liu SC, Mueller TJ, Palek J (1992) Band 3 Memphis: a widespread polymorphism with abnormal electrophoretic mobility of erythrocyte band 3 protein caused by substitution AAG→GAG (Lys→Glu) in codon 56. *Blood* 80(6):1592-8

Jelic-Ivanovic Z, Kalimanovska-Spasojevic V, Topic A, Spasic S, Petrovic V (1994) Alpha-1-antitrypsin (Pi) polymorphism in Serbia. Deviation of Pi M subtype distribution from the Hardy-Weinberg equilibrium. *Gene Geogr* 8(2): 129-135

Jung C-H, Chae Y, Im H (2004) Suppression of the facile latency transition of α 1-antitrypsin variant M_{malton} by stabilizing mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 325(3):744-750

Kalsheker N, Morley S, Morgan K (2002) Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochem Soc Trans* 30(2):93-8

Kalsheker NA, Morgan K (1994) Regulation of the alpha 1-antitrypsin gene and a disease-associated mutation in a related enhancer sequence. *Am J Respir Crit Care Med* 150(6 Pt2):S183-9

Kamimoto T, Shoji S, Hidvegi T, Mizushima N, Umebayashi K, Perlmutter DH, Yoshimori T (2006) Intracellular inclusions containing mutant alpha1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity. *J Biol Chem* 281(7):4467-76

Karashima S, Kataoka H, Itoh H, Maruyama R, Koono M (1990) Prognostic significance of alpha-1-antitrypsin in early stage of colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 45(2):244-50

Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF (2000) Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 106(11):1311-9

Kataoka H, Uchino H, Iwamura T, Seiki M, Nabeshima K, Koono M (1999) Enhanced tumor growth and invasiveness in vivo by a carboxyl-terminal fragment of alpha1-proteinase inhibitor generated by matrix metalloproteinases: a possible modulatory role in natural killer cytotoxicity. *Am J Pathol* 154(2):457-68

Khan H, Salman KA, Ahmed S (2002) Alpha-1 antitrypsin deficiency in emphysema. *J Assoc Physicians India* 50:579– 82

Kim MJ, Jung CH, Im H (2006) Characterization and suppression of dysfunctional human alpha1-antitrypsin variants. *Biochem Biophys Res Commun* 343(1):295-302

King MA, Stone JA, Diaz PT, Mueller CF, Becker WJ, Gadek JE (1996) Alpha 1-antitrypsin deficiency: evaluation of bronchiectasis with CT. *Radiology* 199(1):137-41

Knaupp AS, Levina V, Robertson AL, Pearce MC, Bottomley SP (2010) Kinetic instability of the serpin Z alpha1-antitrypsin promotes aggregation. *J Mol Biol* 396(2):375-83

Knoell DL, Ralston DR, Coulter KR, Wewers MD (1998) Alpha 1-antitrypsin and protease complexation is induced by lipopolysaccharide, interleukin-1b, and tumor necrosis factor in monocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 157(1):246–255

Koulmanda M, Bhasin M, Hoffman L, Fan Z, Qipo A, Shi H, Bonner-Weir S, Putheti P, Degauque N, Libermann TA, Auchincloss H Jr, Flier JS, Strom TB (2008) Curative and beta cell regenerative effects of alpha1-antitrypsin treatment in autoimmune diabetic NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(42):16242-7

Krem MM, Di Cera E (2003) Conserved Ser residues, the shutter region, and speciation in serpin evolution. *J Biol Chem* 278(39):37810-4

Kruse KB, Brodsky JL, McCracken AA (2006) Characterization of an ERAD gene as VPS30/ATG6 reveals two alternative and functionally distinct protein quality control pathways: one for soluble Z variant of human alpha-1 proteinase inhibitor (A1PiZ) and another for aggregates of A1PiZ. *Mol Biol Cell* 17(1):203-12

Larsson C (1978) Natural history and life expectancy in severe a1-antitrypsin deficiency, Pi Z. *Acta Med Scand* 204(5):345–351

Laurell CB, Eriksson S (1963) The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 15:132-140

Lee KN, Im H, Kang SW, Yu MH (1998) Characterization of a human alpha1-antitrypsin variant that is as stable as ovalbumin. *J Biol Chem* 273(5):2509-16

Lee W L, Downey G P (2001) Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 164(5): 896–904

Levina V, Dai W, Knaupp AS, Kaiserman D, Pearce MC, Cabrita LD, Bird PI, Bottomley SP (2009) Expression, purification and characterization of recombinant Z alpha(1)-

antitrypsin--the most common cause of alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Protein Expr Purif* 68(2):226-32

Lewis EC, Shapiro L, Bowers OJ, Dinarello CA (2005) Alpha1-antitrypsin monotherapy prolongs islet allograft survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(34):12153-8

Li Y, Zhou L, Twining SS, Sugar J, Yue BY (1998) Involvement of Sp1 elements in the promoter activity of the alpha1-proteinase inhibitor gene. *J Biol Chem* 273(16):9959-65

Lin L, Schmidt B, Teckman J, Perlmutter DH (2001) A naturally occurring nonpolymerogenic mutant of alpha 1-antitrypsin characterized by prolonged retention in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276(36):33893-8

Liu NS, Spitz MR, Kemp BL, Cooksley C, Fossella FV, Lee JS, Hong WK, Khuri FR (2000) Adenocarcinoma of the lung in young patients: the MD Anderson experience. *Cancer* 88(8):1837-1841

Lockett AD, Van Demark M, Gu Y, Schweitzer KS, Sigua N, Kamocki K, Fijalkowska I, Garrison J, Fisher AJ, Serban K, Wise RA, Flotte TR, Mueller C, Presson RG, Petrache HI, Tudor RM, Petrache I (2012) Effect of cigarette smoke exposure and structural modifications on the alpha-1 antitrypsin interaction with caspases. *Mol Med*. doi: 10.2119/molmed.2011.00207.

Lodewyckx L, Vandevyver C, Vandervorst C, Van Steenberghe W, Raus J, Michiels L (2001) Mutation detection in the alpha-1-antitrypsin gene (PI) using denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 18(3):243-250

Loebermann H, Tokuoka R, Deisenhofer J, Huber R (1984) Human alpha 1-proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J Mol Biol* 177(3):531-57

Lomas DA, Elliott PR, Sidhar SK, Foreman RC, Finch JT, Cox DW, Whisstock JC, Carrell RW (1995) Alpha1-antitrypsin M_{malton} (Phe⁵²- deleted) forms loop-sheet polymers in vivo. *J Biol Chem* 270(28):16964-16870

- Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW (1992) The mechanism of Z alpha-1 antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357(6379):605–607
- Lomas DA, Evans DL, Stone SR, Chang WS, Carrell RW (1993a) Effect of the Z mutation on the physical and inhibitory properties of alpha 1-antitrypsin. *Biochemistry* 32(2):500-508
- Lomas DA, Finch JT, Seyama K, Nukiwa T, Carrell RW (1993b) Alpha-1 antitrypsin Siiyama (Ser53→Phe): further evidence for intracellular loop-sheet polymerization. *J Biol Chem* 268(21):15333–15335
- Lomas DA, Mahadeva R (2002) Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest* 110(11):1585-1590
- Lomas DA (2006) The selective advantage of alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 173(10):1072-7
- Luisetti M, Seersholm N (2004) Alpha1-antitrypsin deficiency 1: Epidemiology of alpha1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 59(2):164-169
- Lukacs CM, Zhong JQ, Plotnick MI, Rubin H, Cooperman BS, Christianson DW (1996) Arginine substitutions in the hinge region of antichymotrypsin affect serpin beta-sheet rearrangement. *Nat Struct Biol* 3(10):888–893
- Ljubic M, Nikolic A, Divac A, Djordjevic V, Radojkovic D (2006) Screening of alpha-1-antitrypsin gene by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *J Biochem Biophys Methods* 68(3):167-73
- Ljubic M, Topic A, Divac A, Nikolic A, Petrovic-Stanojevic N, Surlan M, Mitic-Milikic M, Radojkovic D (2008) Isoelectric focusing phenotyping and denaturing gradient gel electrophoresis genotyping: a comparison of two methods in detection of alpha-1-antitrypsin variants. *Transl Res* 151(5):255-9

Ljujic M, Topic A, Nikolic A, Divac A, Grujic M, Mitic-Milikic M, Radojkovic D (2010) Identification of a rare p.G320R alpha-1-antitrypsin variant in emphysema and lung cancer patients. *Genet Mol Biol* 33(1):5-8

Maeda S, Kamata H, Luo J-L, Leffert H, Karin M (2005) IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 121(7):977-90

Mahadeva R, Atkinson C, Li Z, Stewart S, Janciauskiene S, Kelley DG, Parmar J, Pitman R, Shapiro SD, Lomas DA (2005) Polymers of Z alpha-1 -antitrypsin co-localise with neutrophils in emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo. *Am J Pathol* 166(2):377– 386

Mahadeva R, Chang WS, Dafforn TR, Oakley DJ, Foreman RC, Calvin J, Wight DG, Lomas DA (1999) Heteropolymerization of S, I, and Z alpha1-antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest* 103(7):999-1006

Marsden MD, Fournier RE (2003) Chromosomal elements regulate gene activity and chromatin structure of the human serpin gene cluster at 14q32.1. *Mol Cell Biol* 23(10):3516-26

Miyake J, Ochiai-Yanagi S, Kasumi T, Takagi T (1978) Isolation of a membrane protein from *R rubrum* chromatophores and its abnormal behavior in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis due to a high binding capacity for SDS. *J Biochem* 83(6):1679-86

Molina J, Flor X, García R, Timiraos R, Tirado-Conde G, Miravittles M (2011) The IDDEA project: a strategy for the detection of alpha-1 antitrypsin deficiency in COPD patients in the primary care setting. *Ther Adv Respir Dis* 5(4): 237–243

Morgan K, Kalsheker NA (1997) Regulation of the serine proteinase inhibitor (SERPIN) gene alpha 1-antitrypsin: a paradigm for other SERPINs. *Int J Biochem Cell Biol* 29(12):1501-11

Morgan K, Marsters P, Morley S, van Gent D, Hejazi A, Backx M, Thorpe ER, Kalsheker N (2002) Oncostatin M induced alpha1-antitrypsin (AAT) gene expression in Hep G2 cells is mediated by a 3' enhancer. *Biochem J* 365(Pt 2):555-60

Mornex J F, Chytil-Wier A, Martinet Y, Courtney M, LeCocq J P, Crystal R (1986) Expression of the alpha1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha1-antitrypsin-deficient individuals. *J Clin Invest* 77(6):1952-1961

Mulgrew AT, Taggart CC, Lawless MW, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, McElvaney NG (2004) Z Alpha 1 -antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest* 125(5):1952 –1957

Mulgrew AT, Taggart CC, McElvaney NG (2007) Alpha-1-antitrypsin deficiency: current concepts. *Lung* 185(4):191-201

Ogushi F, Fells GA, Hubbard RC, Straus SD, Crystal RG (1987) Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 80(5):1366–1374

Olson ST, Bock PE, Kvassman J, Shore JD, Lawrence DA, Ginsburg D, Björk I (1995) Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes. *J Biol Chem* 270(50):30007-17

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999) Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 80(6):827-841

Parmar JS, Mahadeva R, Reed BJ, Farahi N, Cadwallader KA, Keogan MT, Bilton D, Chilvers ER, Lomas DA (2002) Polymers of alpha(1)-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(6):723-30

Pei D, Majmudar G, Weiss SJ (1994) Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J Biol Chem* 269(41):25849–25855

- Perlino E, Cortese R, Ciliberto G (1987) The human alpha 1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. *EMBO J* 6(9):2767-71
- Perlmutter DH, Daniels JD, Auerbach HS, De Schryver-Keckskemeti K, Winter HS, Alpers DH (1989) The alpha 1-antitrypsin gene is expressed in a human intestinal epithelial cell line. *J Biol Chem* 264(16):9485-90
- Perlmutter DH (2002) Liver injury in alpha1-antitrypsin deficiency: an aggregated protein induces mitochondrial injury. *J Clin Invest* 110(11):1579– 83
- Petrache I, Fijalkowska I, Medler TR, Skirball J, Cruz P, Zhen L, Petrache HI, Flotte TR, Tudor RM (2006a) alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-3 activity, preventing lung endothelial cell apoptosis. *Am J Pathol* 169(4):1155-66
- Petrache I, Fijalkowska I, Zhen L, Medler TR, Brown E, Cruz P, Choe KH, Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Shapiro L, Zhang B, Song S, Hicklin D, Voelkel NF, Flotte T, Tudor RM (2006b) A novel antiapoptotic role for alpha1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 173(11):1222-8
- Piitulainen E, Eriksson S (1999) Decline in FEV1 related to smoking status in individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Eur Respir J* 13(2): 247–251
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y (2004) NF κ B functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431(7007):461–466
- Poller W, Merklein F, Schneider-Rasp S, Haack A, Fechner H, Wang H, Anagnostopoulos I, Weidinger S (1999) Molecular characterisation of the defective alpha 1-antitrypsin alleles PI Mwurzburg (Pro369Ser), Mheerlen (Pro369Leu), and Q0lisbon (Thr68Ile). *Eur J Hum Genet* 7(3):321-31
- Prins J, van der Meijden BB, Kraaijenhagen RJ, Wielders JP (2008) Inherited chronic obstructive pulmonary disease: new selective-sequencing workup for alpha1-antitrypsin deficiency identifies 2 previously unidentified null alleles. *Clin Chem* 54(1):101-7

Qu D, Teckman JH, Omura S, Perlmutter DH (1996) Degradation of a mutant secretory protein, alpha1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J Biol Chem* 271(37):22791-5

Radojkovic D, Kusic J (2000) Silver staining of DGGE gels. *Clin Chem* 46:883-884

Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM (2009) Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6):1760-5

Ray S, Mickleborough TD, Brown JL (2005) Comparison of the properties of rare variants of alpha1-proteinase inhibitor expressed in COS-1 cells and assessment of their potential as risk factors in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1740(3):390-402

Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O (2000) Reference distributions for the positive acute phase serum proteins, alpha1-acid glycoprotein (orosomuroid), alpha1-antitrypsin, and haptoglobin: a comparison of a large cohort to the world's literature. *J Clin Lab Anal* 14(6):265-70

Rodriguez-Frias F, Miravittles M, Vidal R, Camos S, Jardi R (2012) Rare alpha-1-antitrypsin variants: are they really so rare? *Ther Adv Respir Dis*. 6(2):79-85

Rogers J, Kalsheker N, Wallis S, Speer A, Coutelle CH, Woods D, Humphries SE (1983) The isolation of a clone for human alpha 1-antitrypsin and the detection of alpha 1-antitrypsin in mRNA from liver and leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 116(2):375-82

Sallenave JM, Tremblay GM, Gauldie J, Richards CD (1997) Oncostatin M, but not interleukin-6 or leukemia inhibitory factor, stimulates expression of alpha1-proteinase inhibitor in A549 human alveolar epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res* 17(6):337-46

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12):5463-7

- Sarkar A, Wintrobe PL (2011) Effects of glycosylation on the stability and flexibility of a metastable protein: the human serpin $\alpha(1)$ -antitrypsin. *Int J Mass Spectrom* 302(1-3):69-75
- Satoh K, Nukiwa T, Brantly M, Garver RI Jr, Hofker M, Courtney M, Crystal RG (1988) Emphysema associated with complete absence of alpha 1- antitrypsin in serum and the homozygous inheritance [corrected] of a stop codon in an alpha 1-antitrypsin-coding exon. *Am J Hum Genet* 42(1):77-83
- Schechter I, Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27(2):157–162
- Schottenfeld D (1996) Epidemiology of lung cancer. In: H. I. Pass, J. B. Mitchell, D. H. Johnson, and A. T. Turrisi (eds.), *Lung Cancer Principles and Practice*, pp. 305–321. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers
- Scott C F, Carrell R W, Glaser C B, Kueppers F, Lewis J H, Colman R W (1986) Alpha-1-antitrypsin-Pittsburgh. A potent inhibitor of human plasma factor XIa, kallikrein, and factor XIIa. *J Clin Invest* 77(2):631–634
- Seersholm N, Kok-Jensen A, Dirksen A (1995) Decline in FEV1 among patients with severe hereditary alpha 1-antitrypsin deficiency type PiZ. *Am J Respir Crit Care Med* 152(6 Pt 1):1922–1925
- Seixas S, Garcia O, Trovada MJ, Santos MT, Amorim A, Rocha J (2001) Patterns of haplotype diversity within the serpin gene cluster at 14q32.1: insight into the natural history of the $\alpha 1$ -antitrypsin polymorphism. *Hum Genet* 108(1):20-30
- Seyama K, Nukiwa T, Souma S, Shimizu K, Kira S (1995) Alpha 1-antitrypsin-deficient variant Siiyama (Ser53[TCC] to Phe53[TTC]) is prevalent in Japan. Status of alpha 1-antitrypsin deficiency in Japan. *Am J Respir Crit Care Med* 152(6 Pt 1):2119-26
- Sifers RN, Brashears-Macatee S, Kidd VJ, Muensch H, Woo SL (1988) A frameshift mutation results in a truncated alpha 1-antitrypsin that is retained within the rough endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263(15):7330-5

- Sires UI, Murphy G, Baragi VM, Fliszar CJ, Welgus HG, Senior RM (1994) Matrilysin is much more efficient than other matrix metalloproteinases in the proteolytic inactivation of alpha1-antitrypsin. *Biochem Biophys Res Commun* 204(2):613–620
- Snyder MR, Katzmann JA, Butz ML, Wiley C, Yang P, Dawson DB, Halling KC, Highsmith WE, Thibodeau SN (2006) Diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency: An algorithm of quantification, genotyping, and phenotyping. *Clin Chem* 52(12):2236-42
- Spencer LT, Paone G, Krein PM, Rouhani FN, Rivera-Nieves J, Brantly ML (2004) Role of human neutrophil peptides in lung inflammation associated with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(3):L514–L520
- Spira A, Ettinger DS (2004) Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med* 350(4):379-92
- Stein PE, Carrell RW (1995) What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nat Struct Biol* 2(2):96-113
- Stein PE, Chothia C (1991) Serpin tertiary structure transformation. *J Mol Biol* 221:615–621
- Stoller JK, Aboussouan LS (2012) A review of α 1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 185(3):246-59
- Sun Z, Yang P (2004) Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol* 5(3):182-90
- Sveger T, Eriksson S (1995) The liver in adolescents with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* 22(2):514–517
- Sveger T (1976) Liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. *N Engl J Med* 294(24):1316–1321
- Sveger T (1978) Alpha 1-antitrypsin deficiency in early childhood. *Pediatrics* 62: 22–25

Sveger T (1988) The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr Scand* 77(6):847-851

Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, Levine RL (2000) Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem* 275(35):27258-65

Taggart CC, Greene CM, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG (2005) Elastolytic proteases: Inflammation resolution and dysregulation in chronic infective lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 171(10):1070–1076

Takahashi H, R G Crystal (1990) Alpha 1-antitrypsin Null(isola di procida): an alpha 1-antitrypsin deficiency allele caused by deletion of all alpha 1-antitrypsin coding exons. *Am J Hum Genet* 47(3): 403–413

Tanford C (1980) in *The hydrophobic effect: Formation of micelle and biological membranes* (Willey, New York) 2nd Ed

Teckman JH, Gilmore R, Perlmutter DH (2000) Role of ubiquitin in proteasomal degradation of mutant alpha(1)-antitrypsin Z in the endoplasmic reticulum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(1):G39-48

Teckman JH, Perlmutter DH (1996) The endoplasmic reticulum degradation pathway for mutant secretory proteins alpha1- antitrypsin Z and S is distinct from that for an unassembled membrane protein. *J Biol Chem* 271(22):13215–20

Thelin T, Sveger T, McNeil TF (1996) Primary prevention in a high-risk group: smoking habits in adolescents with homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency (ATD). *Acta Paediatr* 85(10):1207–1212

Tobin MJ, Cook PJ, Hutchison DC (1983) Alpha 1 antitrypsin deficiency: the clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subjects homozygous for Pi type Z. A survey by the British Thoracic Association. *Br J Dis Chest* 77(1):14-27

Topic AS, Jelic-Ivanovic ZD, Spasojevic-Kalimanovska VV, Spasic SM (2006) Association of moderate alpha-1 antitrypsin deficiency with lung cancer in the Serbian population. *Arch Med Res* 37(7):866-70

Travis J, Salvesen GS (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* 52:655–709.

Twining SS, Fukuchi T, Yue BY, Wilson PM, Boskovic G (1994) Corneal synthesis of alpha 1-proteinase inhibitor (alpha 1-antitrypsin). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(2):458-62

Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G (2010) Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics*. 11:548

Vidaud D, Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Yvart J, Fiessinger JN, Aiach M (1992) Met 358 to Arg mutation of alpha1-antitrypsin associated with protein C deficiency in a patient with mild bleeding tendency. *J Clin Invest* 89(5):1537-43

Wall M, Moe E, Eisenberg J, Powers M, Buist N, Buist AS (1990) Long-term follow-up of a cohort of children with alpha-1-antitrypsin deficiency. *J Pediatr* 116(2):248–251

Wallis Y (2002) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in PCR Mutation Detection Protocols, Springer Methods in Molecular Biology Volume 187, 125-135, DOI: 10.1385/1-59259-273-2:125

Walsh DE, Greene CM, Carroll TP, Taggart CC, Gallagher PM, O'Neill SJ, McElvaney NG (2001) IL-8 up-regulation by neutrophil elastase is mediated by MyD88/IRAK/TRAF-6 in human bronchial epithelium. *J Biol Chem* 276(38):35494–35499

Wewers MD, Casolaro MA, Sellers SE, Swayze SC, McPhaul KM, Wittes JT, Crystal RG (1987) Replacement therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency associated with emphysema. *N Engl J Med* 316(17):1055-62

Whisstock JC, Pike RN, Jin L, Skinner R, Pei X-Y, Carrell RW, Lesk AM (2000a) Conformational changes in serpins. II. The mechanism of activation of antithrombin by heparin. *J Mol Biol* 301(5):1287–1305

Whisstock JC, Skinner R, Carrell RW, Lesk AM (2000b) Conformational changes in serpins. I. The native and cleaved conformations of α_1 -antitrypsin. *J Mol Biol* 296(2):685–699.

Whisstock JC, Skinner R, Lesk AM (1998) An atlas of serpin conformations. *Trends Biochem Sci* 23(2):63–67

Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA (2002) Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of alpha-1 antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B(4) and interleukin 8. *Thorax* 57(8):709-14

Wright HT, Scarsdale JN (1995) Structural basis for serpin inhibitor activity. *Proteins* 22(3):210-25

Wu Y, Whitman I, Molmenti E, Moore K, Hippenmeyer P, Perlmutter DH (1994) A lag in intracellular degradation of mutant α_1 -antitrypsin correlates with liver disease phenotype in homozygous PiZZ alpha1-antitrypsin deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(19):9014–8

Yamasaki M, Sendall TJ, Harris LE, Lewis GM, Huntington JA (2010) Loop-sheet mechanism of serpin polymerization tested by reactive center loop mutations. *J Biol Chem* 285(40):30752-8

Yang P, Wentzlaff KA, Katzmann JA, Marks RS, Allen MS, Lesnick TG, Lindor NM, Myers JL, Wiegert E, Midthun DE, Thibodeau SN, Krowka MJ (1999) Alpha1-antitrypsin deficiency allele carriers among LC patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(5):461–465

Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A (2004) Increased Levels of Cell Death and Proliferation in Alveolar Wall Cells in Patients With Pulmonary Emphysema. *Chest* 125(2):626-632

Yu MH, Lee KN, Kim J (1995) The Z type variation of human alpha 1-antitrypsin causes a protein folding defect. *Nat Struct Biol* 2(5):363-7

Zelvyte I, Lindgren S, Janciauskiene S (2003) Multiple effects of alpha1-antitrypsin on breast carcinoma MDA-MB 468 cell growth and invasiveness. *Eur J Cancer Prev* 12(2):117-24

Zhang B, Lu Y, Campbell-Thompson M, Spencer T, Wasserfall C, Atkinson M, Song S (2007) Alpha1-antitrypsin protects beta-cells from apoptosis. *Diabetes* 56(5):1316-23

Zhang Z, Winyard PG, Chidwick K, Murphy G, Wardell M, Carrell RW, Blake DR (1994) Proteolysis of human native and oxidised a1-proteinase inhibitor by matrilysin and stromelysin. *Biochim Biophys Acta* 1199(2):224–228

Zhao H, Friedman RD, Fournier RE (2007) The locus control region activates serpin gene expression through recruitment of liver-specific transcription factors and RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 27(15):5286-95

Zorzetto M, Ferrarotti I, Campo I, Balestrino A, Nava S, Gorrini M, Scabini R, Mazzola P, Luisetti M. (2005) Identification of a novel alpha1-antitrypsin null variant (Q0Cairo). *Diagn Mol Pathol* 14(2):121–124

BIOGRAFIJA

Mila Ljujić je rođena 09. aprila 1980. godine u Beogradu. Diplomirala je na grupi za Molekularnu biologiju i fiziologiju, smer Eksperimentalna biomedicina Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2005. godine. Od 2006. do 2007. godine bila je stipendista Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, a od 2007. godine zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu Univerziteta u Beogradu. 2006. godine je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu, smer Molekularna biologija. Ima devet objavljenih radova u časopisima međunarodnog značaja, jedan rad u časopisu domaćeg značaja, kao i devet kongresnih saopštenja. Iz doktorske teze je objavila sledeće radove:

Ljujić M, Nikolic A, Divac A, Djordjevic V, Radojkovic D Screening of alpha-1-antitrypsin gene by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *J Biochem Biophys Methods*. 2006: 68(3):167-173

Ljujić M, Topic A, Divac A, Nikolic A, Petrovic-Stanojevic N, Surlan M, Mitic-Milicic M, Radojkovic D. Isoelectric focusing phenotyping and denaturing gradient gel electrophoresis genotyping: a comparison of two methods in detection of alpha-1-antitrypsin variants. *Transl Res*. 2008: 151(5):255-259

Zaimidou S, van Baal S, Smith TD, Mitropoulos K, **Ljujić M**, Radojkovic D, Cotton RG, Patrinos GP. A(1)ATVar: a relational database of human SERPINA1 gene variants leading to alpha(1)-antitrypsin deficiency and application of the VariVis software. *Hum Mutat*. 2009: 30(3):308-13

Ljujić M, Topic A, Nikolic A, Divac A, Grujic M, Mitic-Milicic M, Radojkovic D. Identification of a rare p.G320R alpha-1-antitrypsin variant in emphysema and lung cancer patients. *Genet Mol Bio* 2010: 33 (1): 5-8

Topic A, **Ljujić M**, Nikolic A, Petrovic-Stanojevic N, Dopudja-Pantic V, Mitic-Milicic M, Radojkovic D. Alpha-1-antitrypsin phenotypes and neutrophil elastase gene promoter polymorphisms in lung cancer. *Pathol Oncol Res*. 2011;17:75–80

Tokom svog rada bila je uključena u tri nacionalna i jedan međunarodni projekat. Član je Biohemijskog društva Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Мила В. Љујић

број индекса ю060039

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Структурна и функционална анализа гена за алфа-1-антитрипсин у болестима плућа човека

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 21.05.2012.

Потпис докторанда

Мила Љујић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мила В. Љујић

Број индекса 10060039

Студијски програм молекуларна биологија

Наслов рада Структурна и функционална анализа гена за алфа-1-
антитрипсин у болестима плућа човека

Ментор др Драгица Радојковић и др Гордана Матић

Потписани/а Мила В. Љујић

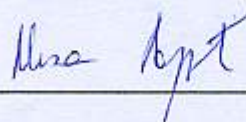
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 21.05.2012.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Структурна и функционална анализа гена за алфа-1-антитрипсин у болестима плућа човека

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 21.05.2012.

