

## VARIANTI GENETICHE DI DAAT

Santangelo Simona, Finamore Panaiotis, Zito Anna, Fontana Davide, Bonanni Federica, Antonelli Incalzi Raffaele, Scarlata Simone  
Area di Medicina Interna, servizio di Fisiopatologia Respiratoria, Fondazione Campus Bio Medico, Centro di Riferimento accreditato regione Lazio per la diagnosi e cura del DAAT. Roma, Italia

L'Alfa-1 antitripsina (AAT) è un inibitore delle serin proteasi (PI) codificato dal gene SERPINA 1 (1). Prodotto principalmente dagli epatociti, regola l'effetto proteolitico dell'elastasi neutrofila (EN) rilasciata durante i processi infiammatori. Se non bilanciata dall'AAT, l'EN può danneggiare e distruggere il parenchima polmonare (2). Il Deficit di AAT (DAAT) è una malattia genetica autosomica codominante a penetranza incompleta, che predispone a broncopatia cronica ostruttiva (BPCO) e malattie epatiche, ma ne è stato ipotizzato un ruolo anche in altre malattie polmonari (i.e. asma e bronchiectasie) (3,4). I nuovi database genomici, come il 1000 Genome Project (1000G) e l' NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) (5,6) hanno fornito un'analisi dettagliata dello spettro di mutazioni del gene polimorfico SERPINA 1. Delle oltre 150 varianti descritte, almeno 60 sono patogenetiche (7).

La diagnosi di DAAT si basa su una combinazione di test sia quantitativi che qualitativi, ma non esiste un algoritmo universale (8). Il sospetto nasce per diminuzione o assenza delle  $\alpha$ 1-globuline all'elettroforesi sieroproteica e/o per la ridotta concentrazione sierica dell'AAT. Mentre l'isoelettrofocalizzazione (IEF), identifica in base alla velocità di migrazione elettroforetica, l'allele PI\*M (velocità di migrazione intermedia), le varianti deficitarie come la PI\*S (lenta), F (veloce) e PI\*Z (molto lenta) e alcune rare (PI\*I, PI\*E e PI\*P), per altre è necessario il sequenziamento genico che essendo costoso e laborioso, è riservato ai casi di discrepanza tra genotipo e livelli sierici (9). Infine, l'utilizzo della tecnologia Luminex® identifica contemporaneamente le 14 più frequenti varianti deficitarie (Tabella 1), di seguito descritte più nel dettaglio (10). La descrizione delle categorie di varianti è riassunta in tabella 2.

Mutazione	Allele	sequenza del DNA
p.Arg39Cys	PI*I	c.187C>T
p.Ser53Phe	PI*Siyama	c.230C>T
p.Lys217Ter	PI*Q0bellingham	c.721A>T
p.Glu264Val	PI*S	c.863A>T
p.Pro362Profs*15	PI*Q0clayton, PI*Q0Saarbruecken	c.1156_1157insC
p.Leu41Pro	PI*Mprocida	c.194C>T
p.Tyr160Ter	PI*Q0granite falls	c.551_552delC
p.Arg223Cys	PI*F	c.739C>T
p.Glu342Lys	PI*Z	c.1096G>A
p.Pro369Leu	PI*Mheerlen	c.1178C>T
p.Phe52del	PI*Mmalton, PI*Mpalermo, PI*Mnichinan	c.226_228delTTC
c.-4p1G>T	PI*Q0west	c.647G>T
p.Asp256Val	PI*Plowell, PI*Pduarte, PI*Q0cardiff, PI*Ybarcelona	c.839A>T
p.Leu353Phefs*24	PI*Q0mattawa, PI*Q0ourem	c.1130_1131insT

*Modificata da ref. (10)*

**Tabella 1** - Descrizione delle varianti alleliche identificabili attraverso la tecnologia Luminex®

Varianti AAT	Caratteristiche fisiopatologiche
<b>Varianti normali</b>	Normali livelli sierici di AAT (circa 80-200 mg/dL alla nefelometria)
<b>Varianti deficitarie</b>	Riduzione dei livelli sierici causata da un mal ripiegamento proteico con parziale ritenzione nel reticolo endoplasmatico dell'epatocita (RE) (e.g. variante PI* Z) e concomitante diminuzione dell'attività funzionale della molecola AAT.
<b>Varianti null (Q0)</b>	Assente AAT circolante dovuta a differenti mutazioni che provocano anomalie di traduzione o trascrizione dell'mRNA che interrompono la sintesi della proteina o anomalie della conformazione proteica.
<b>Varianti disfunzionali</b>	Anomalie della funzione dell'AAT (e.g. diminuzione del legame con l'elastasi neutrofila come nelle varianti F).

**Tabella 2** - Schematizzazione delle caratteristiche fisiopatologiche delle varianti AAT



ZWrexham	I	PGaia	Q0New Hope
VMunich	MProcida	Q0Bredevoort Q0amersfoort	SMunich
M5Karlsruhe	MMalton MPalermo MNichinan	Q0Cork	King's
Q0Knowloon	Siiyama	Q0Trastevere	WBethesda
MVarallo	Q0Granite Falls	Pbrescia	Pdonauworth PSaint albans
M6Bonn	F	Q0Perugia	ZAugsburg
M6Passau	PLowell	Q0Brescia	MPittsburgh
Mmineral Springs	PDuarte	MPisa	LOffenbach
Q0Lisbon	MHerleen	Q0Cairo	São Tome
ZBristol	YBarcelona Yorzinuovi	Q0Milano	Q0Bolton
Q0Ludwigshafen	Q0Isola di Procida	Q0Gaia	Q0Porto
Q0Soest	Q0West	Q0Oliveira do Douro	XChristchurch
Q0Devon Q0Newport Znewport	Q0Mattawa Q0Ourem	IEuskadi	ETaurisano
V	Q0Bellingham	Q0Torino	Q0Dublin
M2Obernburg	Q0Clayton Q0Saarbruecken	Q0Cosenza	Q0Vila Real
Queen's		Q0Hong Kong	Q0Riedenburg
Q0Chillichote		Q0Pordenone	Q0Savannah
MWurzburg		Q0Bonny blue	
Q0Madrid, Q0Faro			

Modificata da ref. (14)

**Tabella 3** - Lista delle varianti di SERPINA 1 con frequenza <1%

Nome della variante	Cambio aminoacidico	Stato polmonare/epatico
GSaint-sorlin	Lys418 *	No
M1Brest	Tyr321Cys	No
M1Bruxelles	His39Leu	Colestasi
M1Creneau	His358Gln	No
M1Lille	His293Gln	Cirrosi
MRouen	Arg63His	No
M1Saint-rambert	Gly119Val	No
OThonon-les-bains	Asp183Asn	No
PLoyettes	Met245Thr	No
PSolaize	Met245Ile	No
SRoubaix	Ser71Arg	HCV, Cirrosi
WSaint-Avre	Glu146Lys	No
WVernaison	Leu150Arg	No
XCuris	Asn271Asp	No
Q0Casablanca	His97Metfs*7	Bronchiectasie
Q0Lille	\	Pneumotorace ricorrente
Q0Montluel	Val413	No
Q0Saint-Etienne	Lys187	No
M1Lyon	Ala308Ser	Trapianto epatico/bronchiectasie/enfisema
Q0Achicou	\	Enfisema
Q0Amiens	\	No
Q0Saint-Avoid	\	Enfisema

\*Regola di nomenclatura rule per i codoni di stop

Modificata da ref. (29)

**Tabella 4** - Caratteristiche molecolari, biologiche e cliniche di 22 nuove varianti di SERPINA 1

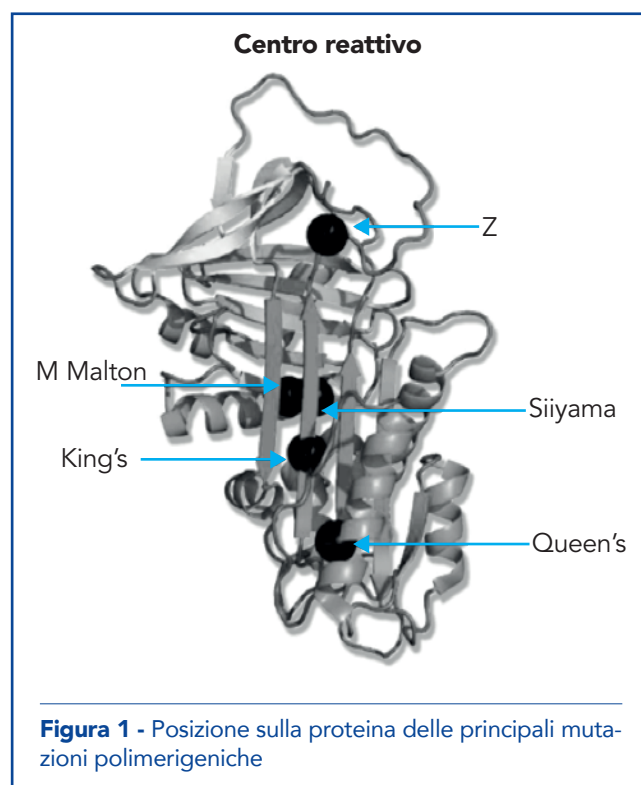


La variante PI\*Z causa polimerizzazione e accumulo della proteina nel reticolo endoplasmatico (RE) degli epatociti e quindi riduzione dei livelli sierici. Questo processo è alla base del deficit e delle inclusioni nel RE anche delle varianti PI\*Siiyama (11), PI\*King (12), PI\*ZAugsburg (13), PI\*Mmalton (Cagliari/MNichinan) e PI\*Mpalermo (14). Anche la PI\*MWurzburg, diffusa nella popolazione caucasica, dà un 80% di riduzione dei livelli sierici della proteina e inclusioni epatiche (15). Alcune varianti come la PI\*S (16), PI\*I (17), PI\*Queen's e PI\*Baghdad (18) provocano solo un'aumentata suscettibilità alla polimerizzazione, in assenza di malattie epatiche e la carenza plasmatica è lieve. Tra le varianti polimerogeniche meno gravi ricordiamo la PI\*MPisa, PI\*ETaurisano, PI\*YOrzinuovi e PI\*PBrescia (19,20). La variante PI\*Mheerlan è secreta solo al 2% della norma, ma non è trattenuta nel RE (15) come neanche la PI\*Mprocida, i cui bassi livelli sierici derivano dall'immediata degradazione intracellulare dell'80% della proteina (21). La variante PI\*Mwhitstable dovuta a una mutazione intronica che genera una proteina tronca, spesso non è diagnosticata poiché molti algoritmi includono solo l'analisi esonica. Questa mutazione conferisce bassi livelli sierici di AAT e mancata protezione del polmone dall'EN, come nella popolazione con genotipo PI\*MZ (22). Anche le varianti PI\*PLowel e PI\*PDuarte hanno effetti sul processamento intracellulare dell'AAT con aumento della degradazione intracellulare della proteina sintetizzata e livelli circolanti rispettivamente del 24% e 41% della norma, ma basso rischio di malattia epatica (23,24).

Le varianti null (Q0) originano da mutazioni non-sense o inserzioni/delezioni di nucleotidi che causano scivolamenti della cornice di lettura e comparsa di codoni di stop, alcune sono introniche, altre contenute in siti di splicing dell'mRNA (i.e. Q0 west, Q0 granite falls). Le mutazioni che causano la comparsa di codoni di stop prematuri possono dare livelli di mRNA non misurabile (Q0 granite fall, Q0 bellingham, Q0 Kowloon, Q0 west, Q0 isola di procida), ridotto (Q0 trastevere, Q0 Cairo) o normale (Q0 perugia, Q0 hong kong, Q0 Matawa, Q0 Bolton, Q0 clayton/saarbruecken) (25). Anche una singola sostituzione

aminoacidica può dare distruzione completa della struttura terziaria e degradazione intracellulare come nel caso della Q0 ludwigshafen (26). Le varianti Q0 Bonny, Q0 isola di procida e Q0 riedenburg sono dovute a delezioni. Alcune come la Q0 New hope o newport sono state definite null solo sulla base dell'IEF quando la diagnosi molecolare non era fruibile. Infine, tra le varianti disfunzionali la PI\*F, recentemente descritta come diffusa in tutto il mondo e ad alta prevalenza (27), ha una ridotta abilità di inibire l'EN ma non le proteinasi. Questo può dare un'aumentata suscettibilità al danno polmonare dell'EN ma non necessariamente enfisema. La normale secrezione epatica suggerisce che non dia inclusioni e danno epatico (28).

La conoscenza delle varianti di AAT può aiutare i clinici a migliorare il riconoscimento, la gestione e la cura del DAAT (Tabelle 3 e 4, Figura 1) (14,29,30).



#### Bibliografia

1. Long GL, Chandra T, Woo SL, Davie EW, Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry*. 1984;23:4828–37.
2. Ekeowa UI, Gooptu B, Belorgey D, Hägglöf P, Karlsson-Li S, Miranda E, et al. alpha1-Antitrypsin deficiency, chronic obstructive pulmonary disease and the serpinopathies. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116:837–50.
3. Stirpe E, Bardaro F. Alpha1-antitrypsin deficiency and asthma. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2022;92.
4. Orell SR, Mazodier P. Pathological findings in a1- antitrypsin deficiency In *Pulmonary Emphysema and Proteolysis*. Mittman C. New York; 1972;69–89.
5. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. Nature Publishing Group; 2015;526:68–74.



6. Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, Fu W, Kenny EE, Gravel S, et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science*. 2012;337:64–9.
7. Stoller JK, Aboussouan LS. A review of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:246–59.
8. Stoller JK, Brantly M. The challenge of detecting alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD*. 2013;10 Suppl 1:26–34.
9. Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Luisetti M, et al. Laboratory testing of individuals with severe  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in three European centres. *European Respiratory Journal*. 2010;35:960–8.
10. Ottaviani S, Barzon V, Buxens A, Gorrini M, Larruskain A, El Hamss R, et al. Molecular diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: A new method based on Luminex technology. *J Clin Lab Anal*. 2020;34:e23279.
11. Lomas DA, Finch JT, Seyama K, Nukiwa T, Carrell RW. Alpha 1-antitrypsin Siiyama (Ser53-->Phe). Further evidence for intracellular loop-sheet polymerization. *J Biol Chem*. 1993;268:15333–5.
12. Miranda E, Pérez J, Ekeowa UI, Hadzic N, Kalsheker N, Gooptu B, et al. A novel monoclonal antibody to characterize pathogenic polymers in liver disease associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 2010;52:1078–88.
13. Faber JP, Weidinger S, Olek K. Sequence data of the rare deficient alpha 1-antitrypsin variant PI Zaugsburg. *Am J Hum Genet*. 1990;46:1158–62.
14. Silva D, Oliveira MJ, Guimarães M, Lima R, Gomes S, Seixas S. Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) mutation spectrum: Three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal. *Respir Med*. 2016;116:8–18.
15. Poller W, Merklein F, Schneider-Rasp S, Haack A, Fechner H, Wang H, et al. Molecular characterisation of the defective alpha 1-antitrypsin alleles PI Mwurzburg (Pro369Ser), Mheerlen (Pro369Leu), and Q0lisbon (Thr68Ile). *Eur J Hum Genet*. 1999;7:321–31.
16. Elliott PR, Stein PE, Bilton D, Carrell RW, Lomas DA. Structural explanation for the deficiency of S alpha 1-antitrypsin. *Nat Struct Biol*. 1996;3:910–1.
17. Mahadeva R, Chang WS, Dafforn TR, Oakley DJ, Foreman RC, Calvin J, et al. Heteropolymerization of S, I, and Z alpha1-antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest*. 1999;103:999–1006.
18. Haq I, Irving JA, Saleh AD, Dron L, Regan-Mochrie GL, Motamedi-Shad N, et al. Deficiency Mutations of Alpha-1 Antitrypsin. Effects on Folding, Function, and Polymerization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54:71–80.
19. Fra AM, Gooptu B, Ferrarotti I, Miranda E, Scabini R, Ronzoni R, et al. Three new alpha1-antitrypsin deficiency variants help to define a C-terminal region regulating conformational change and polymerization. *PLoS One*. 2012;7:e38405.
20. Medicina D, Montani N, Fra AM, Tiberio L, Corda L, Miranda E, et al. Molecular characterization of the new defective P(brescia) alpha1-antitrypsin allele. *Hum Mutat*. 2009;30:E771-781.
21. Takahashi H, Nukiwa T, Satoh K, Ogushi F, Brantly M, Fells G, et al. Characterization of the gene and protein of the alpha 1-antitrypsin "deficiency" allele Mprocida. *J Biol Chem*. 1988;263:15528–34.
22. Ambrose HJ, Chambers SM, Mieli-Vergani G, Ferrie R, Newton CR, Robertson NH. Molecular characterization of a new alpha-1-antitrypsin M variant allele, Mwhitstable: implications for DNA-based diagnosis. *Diagn Mol Pathol*. 1999;8:205–10.
23. Holmes MD, Brantly ML, Crystal RG. Molecular analysis of the heterogeneity among the P-family of alpha-1-antitrypsin alleles. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:1185–92.
24. Hildesheim J, Kinsley G, Bissell M, Pierce J, Brantly M. Genetic diversity from a limited repertoire of mutations on different common allelic backgrounds: alpha 1-antitrypsin deficiency variant Pduarte. *Hum Mutat*. 1993;2:221–8.
25. Lee JH, Brantly M. Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles. *Respir Med*. 2000;94 Suppl C:S7-11.
26. Frazier GC, Siewertsen MA, Hofker MH, Brubacher MG, Cox DW. A null deficiency allele of alpha 1-antitrypsin, Q0ludwigshafen, with altered tertiary structure. *J Clin Invest*. 1990;86:1878–84.
27. Ferrarotti I, Wencker M, Chorostowska-Wynimko J. Rare variants in alpha 1 antitrypsin deficiency: a systematic literature review. *Orphanet J Rare Dis*. 2024;19:82.
28. Fagerhol MK, Braend M. Serum prealbumin: polymorphism in man. *Science*. 1965;149:986–7.
29. Greene CM, Marciniak SJ, Teckman J, Ferrarotti I, Brantly ML, Lomas DA, et al.  $\alpha$ 1-Antitrypsin deficiency. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16051.
30. Renoux C, Odou M-F, Tosato G, Teoli J, Abbou N, Lombard C, et al. Description of 22 new alpha-1 antitrypsin genetic variants. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13:161.

