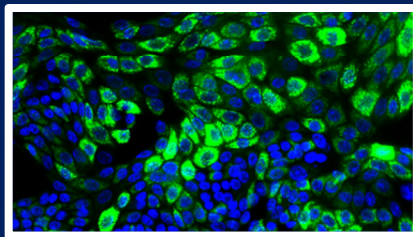
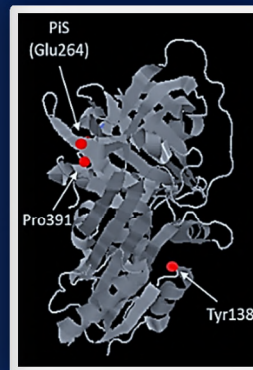
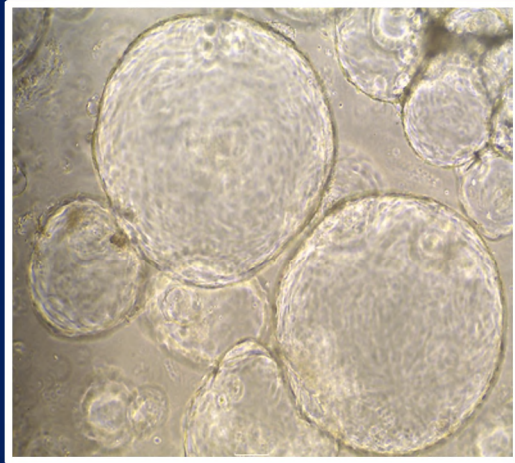


DÉFICIT DE ALFA 1 ANTITRIPSINA

IMPLICACIONES DE NUEVAS VARIANTES GENÉTICAS Y DESARROLLO DE ORGANOIDES DE HÍGADO COMO MODELO DE ENFERMEDAD



Tesis doctoral

Gema Gómez Mariano

Directora Tesis doctoral
Beatriz Martínez Delgado

Universidad Autónoma de Madrid
Programa de doctorado en Biología

DEFICIT DE ALFA 1 ANTITRIPSINA
IMPLICACIONES DE NUEVAS VARIANTES GENÉTICAS Y
DESARROLLO DE ORGANOIDES DE HÍGADO
COMO MODELO DE ENFERMEDAD

Tesis doctoral
Gema Gómez Mariano

Madrid, 2020

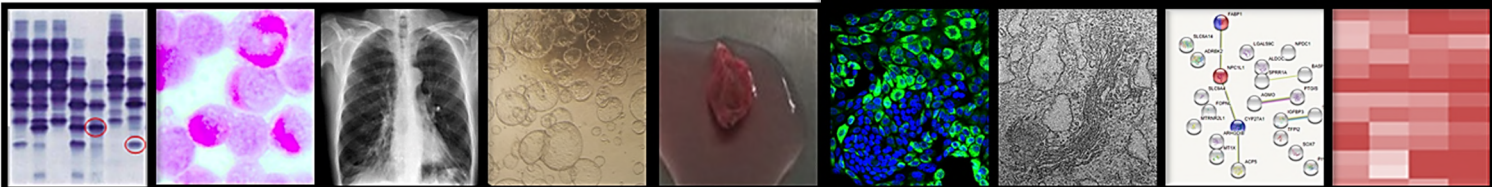


Fdo. Beatriz Martínez Delgado
Directora tesis doctoral

Tutor académico UAM
Carlos Francisco Sentís Castaño

A mi madre y a Temis

Agradecimientos



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi directora de tesis, Beatriz Martínez, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación bajo su dirección. Me ha enseñado muchas cosas, orientado y ayudado a resolver problemas, y sobre todo quiero agradecerle su confianza en mi trabajo y su disposición. Ha sido un verdadero placer trabajar con Bea por su cercanía, cariño y respeto que me ha mostrado en cada momento.

Además, agradecer a Manuel Posada su confianza y ayuda para continuar mi trabajo en el IIER, esto ha hecho posible realizar esta tesis y que mi trabajo sea más interesante cada día.

Agradecer a los médicos del Hospital Doce de Octubre de Madrid y en especial a Iago Justo, su colaboración con las biopsias de hígado y su disposición en todo momento, ha sido vital en el desarrollo de esta tesis.

Dar las gracias a Meritxell Huch por su cooperación en el desarrollo de cultivos de organoides y a José Antonio Pérez por su ayuda en algunos de los ensayos de identificación de las nuevas variantes.

No puedo dejar de dar las gracias al REDAAT por la confianza que ha depositado en nuestro grupo para el diagnóstico de pacientes españoles con el déficit de Alfa 1 Antitripsina, así como a todos los profesionales que han colaborado en el circuito de diagnóstico y a los pacientes.

Agradecer a mis compañeras de laboratorio Selene y Nerea, que han estado conmigo en esta andadura, su cariño y el trabajo que han desarrollado para que esta tesis salga adelante. Tengo que hacer una mención especial a Selene porque ha sido un respaldo enorme para mí, tanto en el trabajo como en lo personal, además de ser un técnico excelente es una gran persona y una amiga que tendré siempre, “Que cantidad de horas en cultivos con los organoides y que bien lo hemos pasado”, cuanto te echo de menos.

Igualmente quiero dar las gracias a Bea Baladrón mi compi de laboratorio, cuantos desayunos, comidas y risas hemos compartido en el presente y en el pasado, sé que puedo contar contigo para lo que sea, eres un gran apoyo.

También quiero dar las gracias a todos los compañeros del Área de Genética Humana, y del Servicio de Diagnóstico Genético, a los que están y a los que se marcharon que son muchos, Patricia, Leticia, Flor, Alejandra, Virginia, Sheila, Irene, Ana , Anca, Leo, Laura G, Laura Gon, Isa, Lorena, Alberto, Borja, Javier GC, Iñaki, Vanesa, Carolina, Paloma, Fernando y a mis compañeros de Sinesio que, aunque están lejos también han estado ahí, sobre todo Ana y Eva.

No me puedo olvidar de Saint y Cristina mis compañeros del laboratorio de al lado, siempre cerca, sois unos de mis apoyos en el ISCIII. A mi compañera de pared de despacho, Sonsoles

quiero darle las gracias por su cariño, nuestros ratos de pasillo y sus consejos, no solo de los males de los mareos cervicales, que también. Alfonso, gracias por tú apoyo y no solo por nuestra colaboración con los congeladores, o tú ayuda con el microscopio de fluorescencia, siempre es agradable hablar contigo porque al final siempre me sacas una sonrisa.

Tengo que acordarme de muchas personas en el ISCIII de los servicios centrales que han colaborado para que esta tesis sea una realidad. A Sara e Isabel de bioinformática por ayudarnos con los RNASeq, a la unidad de genómica y de histología, y por supuesto a Carmen y Daniel del servicio de microscopía electrónica que nos han ayudado mucho con nuestros ensayos. Carmen quiero darte especialmente las gracias porque siempre has estado disponible, entramos al mismo tiempo al ISCIII y después de 9 años nos hemos encontrado en el trabajo, la verdad es que ha sido una satisfacción trabajar contigo, madre mía que cantidad de fotos llegaríamos a hacer y las que nos quedan....

Agradecer a Esteban Domingo, la primera persona que me dio una oportunidad de trabajar en ciencia y a quien recuerdo con cariño por lo buen jefe que fue, y que tiene toda mi admiración y respeto.

Dar las gracias a mis amigas de padel, Carmen y Carmen, a Temis, mi madre y mi hijo Adrián por pasarlo tan bien en esos partidos y ayudarme a calmar el estrés.

Gracias a mi abuela Rita, que aunque ya no está conmigo, me acuerdo de ella muchísimo por sus risas, ternura y buenos consejos, que llevo a la práctica en mí día a día. Te echo de menos. A Reyes, Rita, Jesús y Conchi por su cariño siempre.

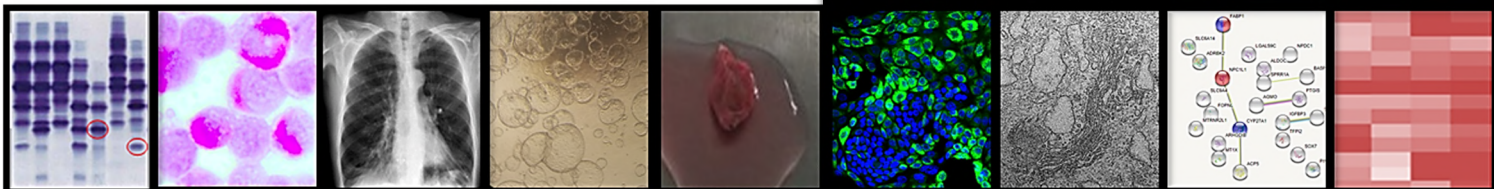
Agradecer a mis segovianos Tere, Temis, Mari, Minerva, Jesica, Obdulio, Pablo y Carmen lo que me quieren y que hacen que mi vida sea más feliz por su afecto.

Quiero dar las gracias especialmente a mi madre, que además de quererme, me ha enseñado a luchar con su ejemplo, siempre está conmigo en todo lo que hago, apoyándome y dándome fuerzas. Soy lo que soy gracias a ella. A mi padre, por quererme y confiar en mí.

A Temis, que hace que cada día sea mejor persona, me ha enseñado a amar, y me demuestra cada día que siempre va a estar conmigo, sin su apoyo mi carrera profesional no hubiera sido la misma. También a mis hijos Belén y Adrián, por aguantar la cantidad de horas de trabajo que he dedicado a esta tesis y no he podido estar con ellos, he sentido su apoyo y que están orgullosos de mí.

A todos vosotros y a los que no menciono, ¡¡¡Muchas Gracias!!!

Resumen



RESUMEN

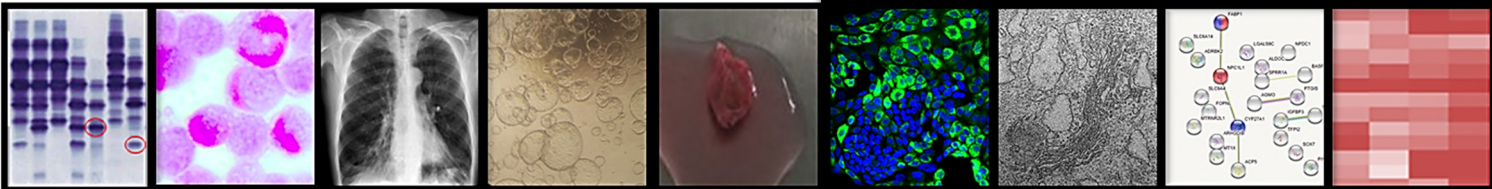
El déficit de alfa 1 antitripsina es una enfermedad rara causada por variantes en el gen *SERPINA1* que predispone al desarrollo de enfisema pulmonar, por ausencia de la proteína en pulmón, y a hepatopatías por acumulación de la proteína en hígado. Dada la variabilidad en las manifestaciones fenotípicas de la enfermedad en los pacientes, y a la controversia existente en muchos casos entre el genotipo y fenotipo, es necesario estudiar los mecanismos moleculares que llevan a la pérdida y ganancia de función de la proteína en los pacientes. El objetivo de esta tesis doctoral ha sido contribuir al conocimiento de estos mecanismos responsables del desarrollo del déficit de alfa 1 antitripsina.

El primer objetivo consistió en identificar factores genéticos responsables de las discrepancias entre el genotipo inicial y el fenotipo de pacientes con el déficit. Para ello hemos investigado la patogenicidad de dos nuevas variantes no descritas con anterioridad en el gen *SERPINA1*. Ambas variantes aparecen en fase con la variante S, que hace que este alelo adquiera características más graves comportándose como alelos nulos, dando explicación a los bajos niveles de AAT en sangre de los pacientes portadores de estos alelos, que hemos llamado alelos S-Plus. Esto nos ha permitido proponer un nuevo algoritmo diagnóstico en el que considerar la fase en la que se encuentran las variantes detectadas cuando estas no permiten explicar el fenotipo, es importante para establecer bien el diagnóstico y mejorar el seguimiento de los pacientes.

Dado que la enfermedad hepática en el déficit está poco estudiada, nuestro segundo objetivo, ha sido desarrollar un modelo de organoides que nos ha permitido, por un lado, demostrar que los organoides reproducen las características funcionales de la enfermedad hepática y por otro, conocer mediante análisis de expresión génica los procesos celulares alterados (metabolismo lipídico, transporte de moléculas, autofagia, etc), así como los cambios en la expresión del gen *SERPINA1* en presencia de estímulos inflamatorios.

Con los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir, por un lado, que la caracterización de las variantes genéticas en el gen *SERPINA1* es importante para definir nuevos alelos, como los alelos S-plus, para mejorar el diagnóstico genético y el manejo clínico de los pacientes. Por otro, hemos abierto una puerta al estudio en un futuro de la enfermedad hepática gracias al desarrollo del modelo de organoides y a la identificación de cambios de expresión de determinados genes que alteran procesos celulares que pueden estar implicados en el desarrollo del déficit de alfa 1 antitripsina..

Índice

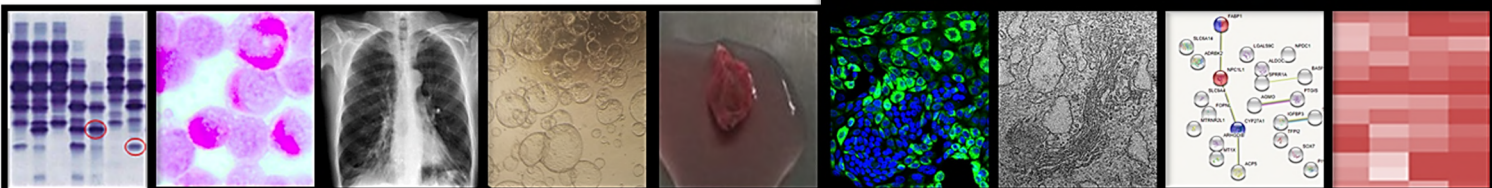


ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Epidemiología.....	7
2. Manifestaciones clínicas. Fisiopatología de la enfermedad pulmonar y hepática.	10
3. Otras manifestaciones clínicas.....	14
4. Tratamiento del déficit de AAT	15
5. Genética y regulación de la expresión del gen <i>SERPINA1</i>	20
6. Alfa-1 Antitripsina	24
7. Diagnóstico DAAT.....	26
8. Modelos para estudio de enfermedad en el DAAT.....	29
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Pacientes y genotipado	43
2. PCR alelo específica.....	44
3. Frecuencia alélica y predicción funcional de variantes S-Plus (E264V, Y138C Y P391T).....	45
4. Mutagénesis dirigida y expresión in vitro de AAT mutante.....	45
5. Establecimiento y cultivo de organoides de hígado humanos	46
6. Identificación de agregados AAT usando tinción PAS-Diastasa.....	47
7. Análisis por Western blot de AAT	47
8. Detección de AAT intracelular por inmunofluorescencia.....	47
9. Análisis transcriptómico de organoides de hígado (RNASeq).....	48
10. Validación de marcadores de diferenciación y de genes diferencialmente expresados por QT-PCR	49
11. Análisis de expresión de los transcritos del gen <i>SERPINA1</i>	50
12. Estimulación con OSM, IL6 y LPS en organoides.....	50
13. Análisis ultraestructural de organoides de hígado mediante microscopia electrónica de transmisión.....	51
RESULTADOS.....	55
1.MECANISMOS DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN EN EL DAAT. NUEVAS VARIANTES	
GENÉTICAS	55
1.1 Identificación de nuevas variantes no descritas	55
1.2 Fenotipo proteico.....	56
1.3 Haplotipo de las nuevas variantes. Localización en cis con la variante S.....	57
1.4 Efecto de las nuevas variantes Tyr138Cys y Pro391Thr <i>in silico</i>	58
1.5 Polimerización y disminución de la secreción de AAT de las nuevas variantes S.....	59

2.MECANISMOS DE GANANCIA DE FUNCIÓN EN EL DAAT. ORGANOIDES DE HÍGADO	61
2.1 Establecimiento de cultivos tridimensionales de organoides hepáticos.....	62
2.2 Expresión de marcadores de hepatocitos en organoides diferenciados.....	62
2.3 Perfil de expresión en organoides hepáticos.....	63
2.4 Expresión de transcritos del gen <i>SERPINA1</i> en organoides de hígado en condiciones de expansión (EM) y diferenciación (DM).....	65
2.5 Respuesta de los transcritos del gen <i>SERPINA1</i> al tratamiento con Oncostatina M, Interleuquina 6 y Lipopolisacárido.....	66
2.6 Detección de polímeros de AAT en organoides de hígado.....	68
2.7 Rutas de señalización alteradas en organoides hepáticos MZ y ZZ.....	71
2.8 Análisis estructural de organoides mediante microscopía electrónica de transmisión.....	78
DISCUSIÓN	85
1.NUEVAS VARIANTES EN EL DAAT	85
1.1 Dos nuevas variantes (Tyr138Cys y Pro391Thr) en configuración cis con el alelo S. Nuevos alelos S-Plus.....	85
1.2 Aumento de la polimerización y ausencia de secreción de AAT de los dos nuevos variantes S-Plus	86
1.3 Variantes S-Plus podrían contribuir a la variabilidad fenotípica de pacientes portadores del alelo S	87
2.ORGANOIDES DE HIGADO EN EL DAAT	90
2.1 Los Organoides como un nuevo modelo de cultivo celular 3D para el estudio del DAAT.....	90
2.2 Los organoides diferenciados expresan marcadores típicos de hepatocitos.....	91
2.3 Los organoides de hígado reproducen las características de la enfermedad hepática del DAAT.....	92
2.4 Inducción del gen <i>SERPINA1</i> mediante OSM, IL6 y LPS en organoides	94
CONCLUSIONES.....	99
BIBLIOGRAFÍA	103
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	121
PUBLICACIONES, PONENCIAS ORALES Y POSTERS	137

Abreviaturas

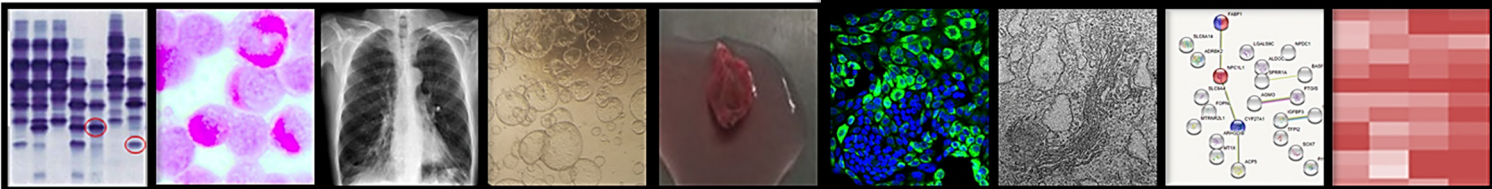


ABREVIATURAS

A83-01	Inhibidor de ALK5, ALK4, y ALK7
AAT	Alfa 1 Antitripsina
AdSCs	Células Stem Adultas
AGEs	Productos finales del estrés nitro-oxidativo
AKR1B10	Enzima Aldo-ceto reductasa B10
ALB	Albumina
ANCA +	Vasculitis con Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos
APOB	Apolipoproteína B
APOC3	Apolipoproteína C3
AS-PCR	PCR alelo específica
B9	Anticuerpo específico de AAT total
BE	Broncoectasia
BME2	Matriz extracelular tipo 2
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	DNA complementario a mRNA
CNVs	Variaciones en número de copias
CYP3A4	Citocromo P450 familia 3 subfamilia A miembro 4
D11	Anticuerpo específico de polímeros AAT
DAAT	Déficit Alfa 1 Antitripsina
DAPI	4', 6-Diamidino-2- Phenylindole
DAPT	γ -secretase inhibitor
dbSNP	Base de datos de polimorfismo de nucleótido único
DDCt	Método Delta Delta Ct
DEG	Genes de expresión diferencial
DM	Medio de diferenciación
DMEM	Medio Dulbecco's Eagle modificado
DNasa I	Desoxiribonucleasa I
EBSS	Solución salina Earle's equilibrada
EGF	Factor de crecimiento epidémico
EM	Medio de expansión
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERAD	Degradación de proteínas asociada a retículo endoplásmico
ES	Células Stem embrionarias
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Food and Drug Administration
FDR	Valor p ajustado por FDR del test estadístico
FEV1	Volumen espiratorio forzado del primer segundo
FGF10	Factor de crecimiento de fibroblastos
FVC	Capacidad vital forzada
gDNA	DNA genómico
GW	Granulomatosis de Wegener
HEK293T	Células embrionarias de riñón humano 293
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HSP90	Chaperona de 90 kDa
IEF	Isoelectroenfoque
IL6	Interleukina 6
iPSC	Células pluripotentes inducidas
KRT19	Keratina 19
LGR5	<i>Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5</i>
LPS	Lipopolisacárido bacteriano

MI	Genotipo heterocigoto para alelo mutante I
MM	Genotipo homocigoto para alelo normal M
mRNA	RNA mensajero
MS	Genotipo heterocigoto para alelo mutante S
MZ	Genotipo heterocigoto para alelo mutante Z
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OSM	Oncostatina M
PAS	<i>Acid Periodic de Shiff</i>
PAS-D	<i>Acid Periodic de Shiff-Diastase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pCMV6	Vector de expresión
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Inhibidor de proteasas
PVDF	Membrana Polyvinylidene difluoride
QO	Alelo nulo
QT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RE	Retículo Endoplásmico
REDAAT	Registro español de pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina
RIPA	Buffer para lisar células y tejidos
RNA-Seq	Secuenciación RNA
RT-qPCR	Trascrición reversa-PCR cuantitativa
S	Alelo Pi*S
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato Sódico PAGE
SS	Genotipo homocigoto para alelo mutante S
ST1C4	Tráncrito ST1C4 del gen <i>SERPINA1</i> (ST1C4-AAT)
ST1C5	Tráncrito ST1C5 del gen <i>SERPINA1</i> (ST1C5-AAT)
STAT3	Factor de transcripción 3
SZ	Genotipo heterocigoto para alelo mutante S/Z
UPL	Biblioteca de sondas universal
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
Y-27632	Inhibidor de Rock
Z	Alelo Pi*Z
Z-AAT	Mutante Z -Alfa 1 Antitripsina
ZZ	Genotipo homocigoto para alelo mutante Z
1A	Tráncrito 1A del gen <i>SERPINA1</i> (1A-AAT)
1B	Tráncrito 1B del gen <i>SERPINA1</i> (1B-AAT)
1C	Tráncrito 1C del gen <i>SERPINA1</i> (1C-AAT)
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
3'UTR	Región 3'no traducida

Introducción



INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología

El déficit de Alfa 1 Antitripsina (DAAT) fue descrito en 1963 por Laurell y Erikson, es un desorden raro hereditario con prevalencia aproximada de 1 por cada 2.000-5.000 nacidos en América del Norte y Europa. Es una condición genética que está asociada con el desarrollo temprano de enfermedad pulmonar (enfisema) y/o daño hepático (cirrosis). En las décadas siguientes, numerosos estudios han permitido conocer el patrón de herencia, la identificación de numerosas deficiencias y variantes nulas, y la contribución de estas variantes a la enfermedad pulmonar y hepática. La variante genética más común del DAAT es el llamado alelo Z, y se estima que 250.000 individuos en todo el mundo son homocigotos para este alelo deletéreo (Pi*ZZ) (Hobbs et al. 2019). Estudios de prevalencia del alelo Z en el mundo muestran que en Europa es donde este alelo es más frecuente. Hay que tener en cuenta que Europa es uno de los lugares donde más se estudia el DAAT, en contraposición al resto del mundo donde los estudios son más escasos. Esta falta de estudios da lugar a que los datos de frecuencia del alelo Z sean menos fiables en estas zonas (**Figura 1**) (Perez-Rubio et al. 2015).

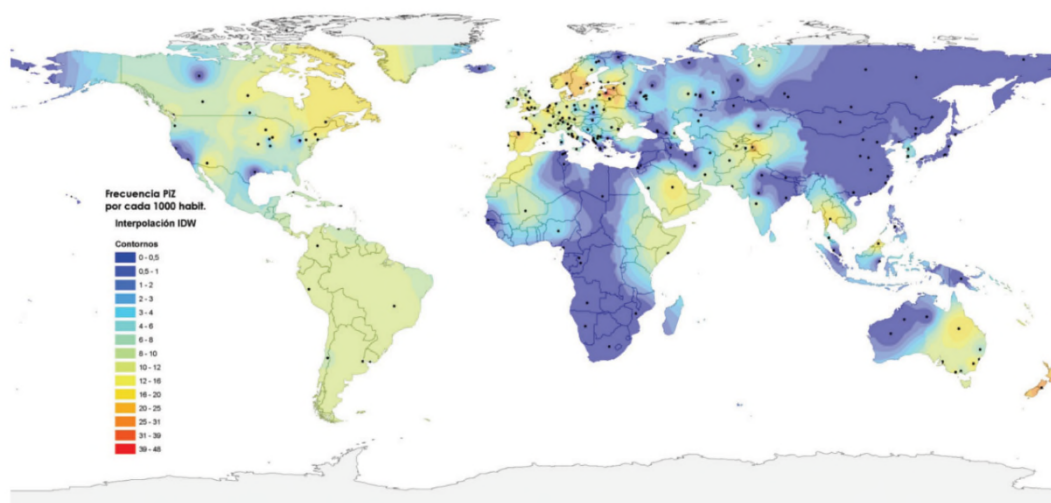


Figura 1. Mapa de frecuencias del alelo Z en el mundo (Autor: Antonio García Roque. 2008). Los puntos representan los lugares donde se realizan estudios de DAAT (Blanco et al. 2012).

En Europa puede haber alrededor de 80.000 individuos portadores de genotipos Z, la mayoría de ellos en la Península Ibérica con casi 16.500 (12.000 en España y 4.500 en Portugal). El 72% de estos genotipos se encuentran en países de Europa occidental y central, el 21% en el norte de Europa y el 7% restante en el este de Europa (**Figura 2**) (de Serres et al. 2012).

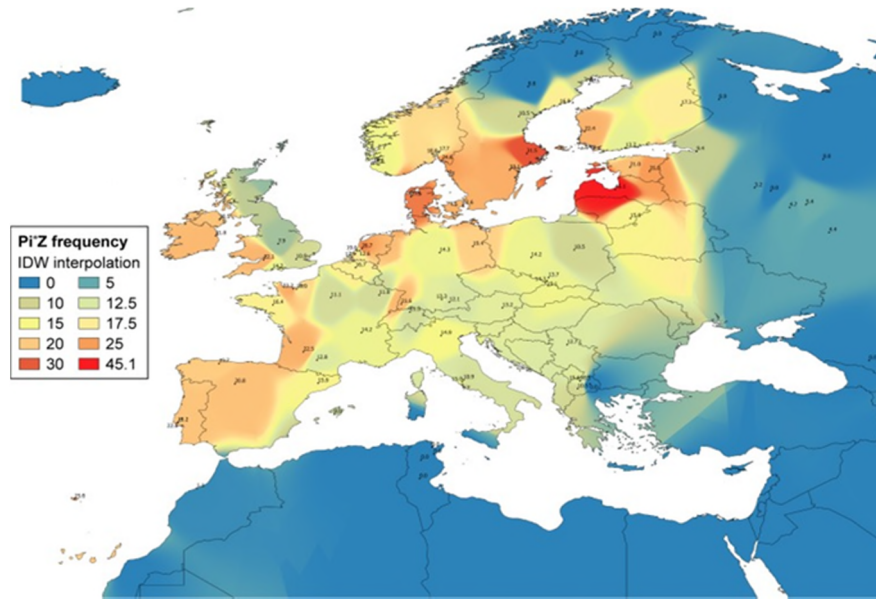


Figura 2. Número aproximado y distribución del alelo Z en Europa (Blanco et al. 2017).

Otra de las variantes genéticas más frecuentes descritas para el DAAT es el llamado alelo S. El estudio de la distribución de frecuencias del alelo S en el mundo indica que este alelo pudo haberse originado en la Península Ibérica hace entre 9.000-13.500 años (Seixas et al. 2001) (Figura 3).

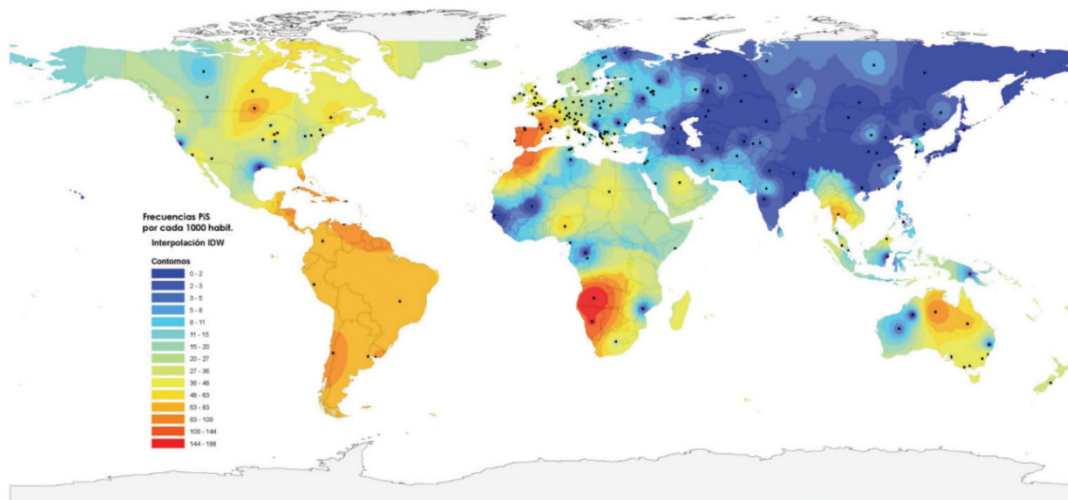


Figura 3. Mapa de frecuencias del alelo S en el mundo (Blanco et al. 2012).

Las frecuencias más altas del alelo S se han detectado en el sur de Europa y algunas regiones africanas del sur como Angola, Namibia, Botswana y Sudáfrica. En la **Figura 4** se observa que en

Europa la frecuencia mayor está en la Península Ibérica y el suroeste de Francia disminuyendo progresivamente hacia el norte y el este del continente europeo.

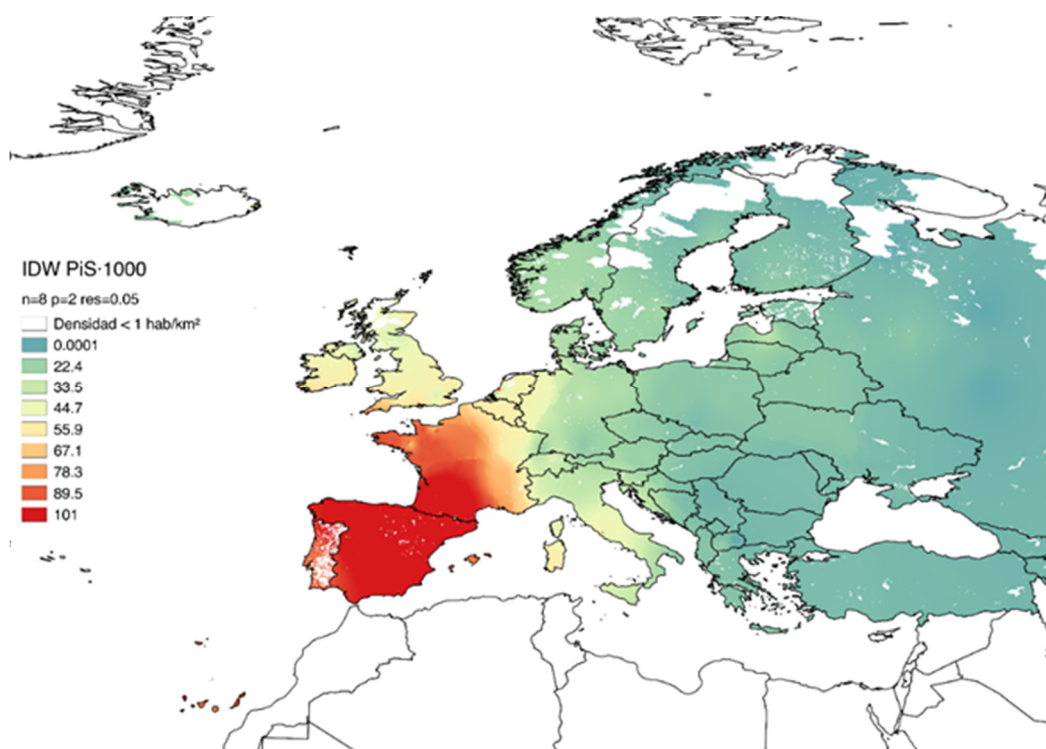


Figura 4. Mapa de frecuencias del alelo S en Europa (interpolación IDW). Las regiones geográficas han sido coloreadas con una escala cromática ascendente “azul-rojo” de 9 colores, que representan valores numéricos continuos de 0 a ≥ 100 por mil. Se observa la frecuencia más alta, indicada con rojo intenso, en la península Ibérica y sur de Francia y la frecuencia más baja, indicadas en azules y blanco, en el norte, este y centro del continente donde existen regiones en las que el alelo S es prácticamente inexistente. (Datos cedidos por el Dr. Ignacio Blanco).

El alelo S no tiene efectos significativos en los pacientes excepto que vaya acompañado de alelos deficientes Z, alelos raros o nulos. Se estima que aproximadamente existen 1.300.000 portadores de genotipos SZ en los 97 países del mundo donde ha sido estudiado el DAAT, de ellos un 50% están en Europa, sobre todo en España, Francia y Portugal. Se han identificado un 10% de portadores SZ con niveles séricos de AAT por debajo del valor de protección de $11 \mu\text{M}$ que presentan un riesgo potencial de desarrollar enfermedades asociadas con el déficit grave de AAT (de Serres et al. 2012; de Serres et al. 2014) (**Figura 4**).

2. Manifestaciones clínicas. Fisiopatología de la enfermedad pulmonar y hepática.

Las manifestaciones clínicas del déficit de AAT incluyen enfermedades pulmonares principalmente la enfermedad pulmonar obstructiva crónica EPOC (por ausencia de niveles protectores de AAT funcional) y hepáticas (por retención intracelular de AAT agregada que resiste la degradación), y con menor frecuencia enfermedades de la piel como paniculitis o vasculitis ANCA +.

El DAAT es uno de los principales factores de riesgo de la EPOC, y se estima que entre el 2–3% de todos los casos de EPOC son déficits de AAT. Sin embargo, el DAAT permanece sin diagnosticar en un gran número de individuos, debido en parte a la penetrancia incompleta de la enfermedad y al desconocimiento que hay de ella entre los profesionales. La llegada de estudios genéticos a gran escala, que incluyen estudios de secuenciación, y biobancos pueden ayudar a dilucidar el impacto de las variantes del gen *SERPINA1* que codifica para la proteína AAT y por otro lado a identificar factores genéticos modificadores de la enfermedad (Hobbs et al. 2019).

De forma general, las mutaciones de cambio de aminoácido del gen *SERPINA1* dan como resultado un plegamiento alterado y diversos grados de polimerización y retención de la proteína AAT. Estas variantes deficientes pueden causar tanto enfisema pulmonar como enfermedad hepática. Las mutaciones sin sentido o mutaciones nulas, que generalmente resultan en codones de parada prematuros con ausencia de producción de proteína, se asocian con desarrollo de enfisema severo, pero no enfermedad hepática.

- **Fisiopatología de la enfermedad pulmonar**

El DAAT es uno de los factores que mejor se han asociado con el desarrollo de EPOC. Teniendo en cuenta la penetrancia de afectados por EPOC, se estima que entre un 2 - 3% de ellos estarían afectados por déficit grave de AAT (American Thoracic Society 2003).

El enfisema pulmonar en pacientes con DAAT es causado por mutaciones deficientes en el gen *SERPINA1* o por alelos nulos. En individuos deficientes, se reduce la presencia de la proteína hasta 6-8 veces en suero, siendo la más frecuente la mutación "Z". Los alelos nulos dan lugar a la ausencia total de proteína en suero.

Este déficit o ausencia de la proteína en los órganos diana, desencadena una serie de alteraciones ocasionadas por la falta de actividad antiproteasa proporcionada por la AAT. El desarrollo de enfisema se ha relacionado desde hace tiempo con el desequilibrio entre proteasas y antiproteasas en el pulmón en los pacientes con déficit grave. La principal proteasa en el

pulmón es la elastasa del neutrófilo, la cual se libera para facilitar la eliminación de los productos de degradación tisular que se originan en los focos inflamatorios generados por reacción a elementos tóxicos como el tabaco, infecciones u otros procesos. Cuando, por la carencia de AAT, no está adecuadamente regulada, la elastasa se vuelve perjudicial degradando la matriz extracelular y el tejido epitelial alveolar y con ello, induce el desarrollo de enfisema. Por otro lado, en sujetos homocigotos para la mutación Z se puede generar altos niveles de polímeros AAT que alcanzan el tejido pulmonar y podrían agravar esta situación, induciendo estrés en el retículo endoplásmico, y debido a su potencial efecto proinflamatorio y quimiotáctico para los neutrófilos, generaría un círculo vicioso de respuesta inflamatoria neutrofílica. (Saltini et al. 2019).

Aunque los mecanismos moleculares del enfisema pulmonar en el DAAT no son totalmente conocidos, se acepta que el primer evento fisiopatológico es la retención de Z-AAT en el hígado. Esto da lugar a una disminución de los niveles de la proteína en plasma y en los tejidos reduciéndose significativamente la capacidad de inhibir la elastasa del neutrófilo libre en el pulmón. El exceso de elastasa provoca el inicio, desarrollo y mantenimiento de un proceso crónico de inflamación que conduce a la destrucción de los alveolos pulmonares, dando lugar al enfisema pulmonar (**Figura 5**).



Figura 5. Radiografía simple de tórax de un paciente con déficit de alfa-1 antitripsina que presenta enfisema pulmonar. Se observan en ambas proyecciones (postero-anterior y lateral) datos de atrapamiento aéreo, con hiperclaridad pulmonar, aplanamiento de los diafragmas, y aumento del espacio retroesternal (Gishen et al. 1982).

- **Fisiopatología de la enfermedad hepática**

Existe un gran espectro de expresión de la enfermedad hepática en el DAAT, que va desde un estado asintomático a hepatitis crónica, fallo hepático y un incremento del riesgo de hepatocarcinoma. Esta gran variabilidad en la manifestación de la enfermedad sugiere que factores genéticos y/o ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la misma. Sin embargo, estos factores no han sido todavía identificados y actualmente no es posible predecir si un paciente desarrollará enfermedad hepática ni su severidad. Algunos mutantes AAT son

incapaces de secretarse de manera eficiente al torrente sanguíneo, formando polímeros que se acumulan en el retículo endoplásmico de hepatocitos causando así daño hepático. Varias vías de señalización intracelulares se ven afectadas por la acumulación de polímeros de AAT, pero los mecanismos que los originan están pendientes de ser dilucidados. Es importante desarrollar estrategias específicas para la prevención y tratamiento de la enfermedad con un mejor conocimiento de los factores genéticos y ambientales (Piccolo et al. 2019).

El hígado es el principal órgano productor de AAT y de ahí se secreta a la sangre para distribuirse por el organismo. Cuando esta proteína está mutada se producen cambios conformacionales que hacen que se agregue en forma de polímeros para ganar estabilidad, de forma que queda retenida en el interior de los hepatocitos, secretándose en mucha menos proporción (**Figura 6**). La acumulación de polímeros a nivel intracelular desencadena estrés celular, fundamentalmente del retículo endoplásmico, por agotamiento de los mecanismos de degradación de la proteína anormal, lo que puede llevar a la muerte celular (Strnad et al. 2019b). Los mecanismos fisiopatológicos de formación de polímeros no se conocen con exactitud, aunque son de gran interés en investigación para buscar soluciones a diversas enfermedades caracterizadas por acúmulos de proteínas mal plegadas en diversos tejidos como amiloidosis, Alzheimer y otras serpinopatías.

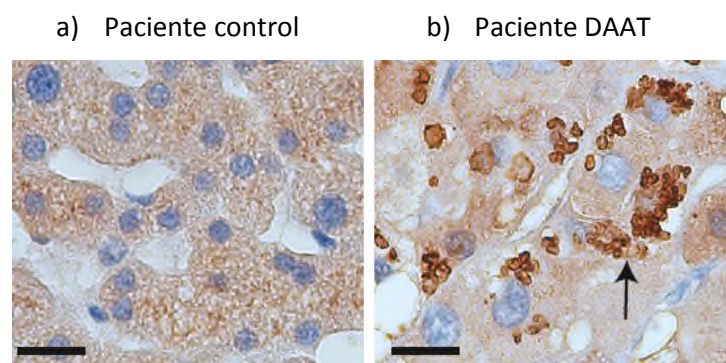


Figura 6. Inmunohistoquímica de tejido hepático con anticuerpo específico para la variante Z de AAT: a) paciente control b) paciente DAAT con una sustitución homocigótica Glu342Lys (genotipo ZZ). La flecha resalta la ubicación de agregados de AAT. Barras de escala de 20 μ m. Modificado de referencia (Huch et al. 2015a).

En el déficit de AAT, la proteína mutante Z-AAT presenta una sustitución de glutámico por lisina en la posición 342 (p.Glu342Lys) (Lomas et al. 1992). La proteína Z-AAT se pliega incorrectamente dando lugar a dímeros, y estos a su vez a polímeros que son detectados por el control de calidad en el retículo endoplásmico (RE). Ha sido demostrado que los polímeros interactúan con chaperonas como Grp78/Bip, Grp94, Grp170 y calnexina, contribuyendo a su retención en el RE (Schmidt et al. 2005). La proteína se retiene en el interior del RE en dos formas,

soluble y agregada, entrando en dos vías de degradación: el sistema ERAD/ubiquitin proteosoma para las formas solubles y la autofagia para las formas agregadas. La retención y acumulación de estas proteínas mutantes en el RE da lugar a un efecto tóxico en los hepatocitos que puede generar muerte celular, necrosis, fibrosis, cirrosis del hígado e incluso el desarrollo de tumores. Es muy probable que la enfermedad hepática sea causada por los efectos proteotóxicos de la acumulación intracelular de proteínas mal plegadas (**Figura 7**).

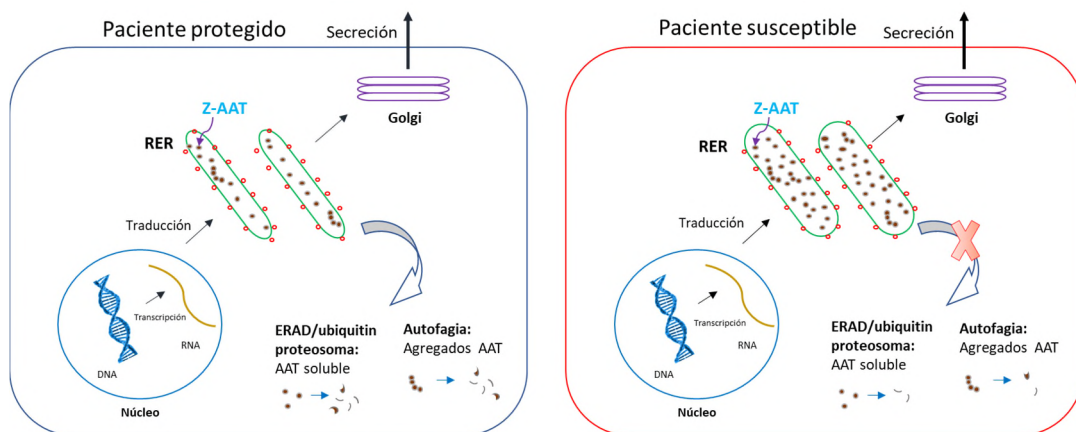


Figura 7. Modelo de proteotoxicidad en el DAAT. Las células hepáticas de un supuesto paciente protegido (izquierda) pueden mitigar la proteotoxicidad mediante la acción de las vías de degradación RE (abajo a la izquierda) o las vías de respuesta celular (autofagia) (abajo a la derecha). En las células de un paciente susceptible (derecha), un bloqueo sutil (cruz roja) en las vías de degradación RE y/o en las vías de respuesta celular conduce a una mayor acumulación/proteotoxicidad y enfermedad hepática crónica.

Existe un alto grado de variación en el fenotipo hepático entre los homocigotos ZZ afectados lo que se ha atribuido, hipotéticamente, a modificadores genéticos y ambientales que alteran las respuestas de la proteostasis (Teckman et al. 1996). Se han observado cambios estructurales como la dilatación y expansión del RE, en biopsias hepáticas de homocigotos y en células hepáticas derivadas de iPSC de individuos con DAAT, siendo menores en homocigotos que no tienen enfermedad hepática clínicamente significativa, lo que indica que los cambios en el RE varían directamente con el fenotipo hepático (Perlmutter 2016).

Por otro lado, en modelos animales que expresan la variante Z-AAT, se han observado cambios funcionales en las vías de señalización proteolítica consistentes en una activación de la autofagia y la vía NFκB. Todavía no se conoce bien como estos cambios estructurales y funcionales se relacionan con la variación en el fenotipo de homocigotos (Perlmutter 2016). Además de la variante Z existen otros mutantes AAT más raros como Mmalton (Phe51/52del) y Siiyama

(Ser53Phe) que son capaces de producir también enfermedad hepática por acumulación de polímeros (Lomas et al. 1993; Lomas et al. 1995).

El daño hepático relacionado con el déficit de AAT puede ocurrir a cualquier edad, aunque presenta una distribución bimodal con un pico en la etapa neonatal y otro en la edad adulta alrededor de los 50 años. Se estima que aproximadamente el 10% de los homocigotos ZZ desarrollan ictericia neonatal, y un tercio de los adultos desarrollan alguna patología hepática. En adultos, el daño hepático puede manifestarse por fibrosis, cirrosis hepática y hepatocarcinoma (American Thoracic Society 2003; Fairbanks et al. 2008). Los estudios clínicos han demostrado que los niños que progresaron a la etapa final de la enfermedad hepática tenían anomalías más graves en la infancia, como la ictericia, y que permanecieron durante más de 6 semanas presentando hepatomegalia, transaminasas más altas y cambios severos en la biopsia, incluida la reduplicación del conducto biliar, fibrosis y cirrosis (Sveger 1988). Actualmente, sin embargo, no hay características/marcadores distinguibles que permitan predecir qué niño desarrollará una disminución rápida de la función hepática, lo que requerirá trasplante hepático, o se recuperará sin secuelas de enfermedad hepática crónica. Cabe destacar que no todos los portadores de deficiencia Z-AAT (ZZ) desarrollan afectación hepática y algunos pueden permanecer clínicamente sanos hasta la edad adulta.

Esta variabilidad en la presentación clínica sugiere que, además de la anomalía hereditaria en la proteína AAT, son necesarios otros factores ambientales, genéticos y epigenéticos para promover el desarrollo de la enfermedad hepática relacionada con la deficiencia de AAT. Por tanto, una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes de la enfermedad hepática relacionada con el déficit de Z-AAT es de gran importancia para el diagnóstico, el seguimiento de los pacientes y el desarrollo de terapias específicas y personalizadas.

3. Otras manifestaciones clínicas

El déficit de AAT se considera una enfermedad sistémica, y se caracteriza por presentar una marcada variabilidad en su presentación clínica. Los pacientes pueden desarrollar además de enfisema pulmonar y/o cirrosis hepática otras manifestaciones clínicas como paniculitis neutrofílica, vasculitis u otras patologías menos típicas, mientras que más de la tercera parte de los deficientes no presenta ninguna sintomatología clínica durante toda su vida, especialmente si no fuman (American Thoracic Society 2003; Blanco et al. 2016a).

- **Paniculitis y Granulomatosis de Wegener**

Entre 1971 y 1972 tres dermatólogos franceses (Warter, Grosshans y Storck) diagnosticaron el primer caso de paniculitis en un paciente con déficit de AAT, una enfermedad que actualmente

se denomina paniculitis neutrofílica (Warter et al. 1972). Es una enfermedad extremadamente rara, que puede manifestarse sola, o bien acompañar o preceder a los síntomas respiratorios o hepáticos típicos del DAAT. La enfermedad se caracteriza por una necrosis inflamatoria del tejido subcutáneo mediada por neutrófilos que se ve favorecida por bajas concentraciones de AAT y exceso de elastasa libre (Stoller JK 2008). No obstante, la patogénesis de la vasculitis no es bien conocida, se postula que su causa es debida a múltiples factores donde el DAAT juega un papel fundamental como factor patogénico.

La granulomatosis de Wegener (GW), es una enfermedad rara, sistémica, definida como una vasculitis necrosante y generalizada, que afecta predominantemente a pequeños y medianos vasos produciendo su inflamación. La forma clásica es una vasculitis sistémica que afecta principalmente al tracto superior e inferior y los riñones, y la forma limitada afecta únicamente al tracto respiratorio superior o el pulmón. En el 80-90% de los casos con vasculitis de Wegener se identifica la producción de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA). Entre un 5-27% de pacientes con DAAT que presentan el alelo Z, padecen GW lo que sugiere que el DAAT es un factor que favorece el desarrollo de este tipo de vasculitis (Mahr et al. 2010).

- **Miscelánea**

Además de las patologías descritas anteriormente, existe un gran número de enfermedades que se asocian con el DAAT, pero estas asociaciones no están completamente probadas. Algunas de estas enfermedades sistémicas son las siguientes: artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, fibromialgia, fatiga crónica, aneurismas y disecciones arteriales, psoriasis, urticaria crónica, pancreatitis, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, diversos tipos de neoplasias (pulmón, vesícula biliar, hígado, vejiga, páncreas, linfomas, colon), y otras enfermedades inflamatorias (de Serres et al. 2014; Stone et al. 2014) .

4. Tratamiento del déficit de AAT

Los pacientes con DAAT diagnosticados de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) manifiestan más temprano y de forma más severa los síntomas de enfermedad que los pacientes solo con EPOC (Ellis et al. 2019). Las recomendaciones para los pacientes DAAT asintomáticos son evitar la exposición al humo de tabaco y otros contaminantes ambientales, así como realizar un seguimiento clínico y de la función pulmonar. En el caso de pacientes DAAT con EPOC se inicia el tratamiento con las terapias inhaladas propias de cualquier EPOC y con la recomendación de dejar de fumar, en el caso de pacientes fumadores. El tratamiento de la enfermedad durante periodos de estabilidad clínica debe ser progresivo en función de los síntomas, la frecuencia de exacerbaciones y el grado de obstrucción pulmonar. Se recomienda un tratamiento con

broncodilatadores, corticoides orales y antibióticos cuando se observen cambios en las purulencias y en la cantidad de expectoración. Cuando existe alteración funcional se recomienda rehabilitación respiratoria con oxigenoterapia y en los casos muy graves puede ser necesario el trasplante pulmonar (American Thoracic Society 2003). El 8% de los trasplantes de pulmón, según el registro de la *International Society for Heart and Lung Transplantation*, se realizan en pacientes con un déficit grave de AAT (Trulock et al. 2007).

- **Terapia sustitutiva**

El único tratamiento específico disponible para modificar la progresión del enfisema pulmonar en pacientes con DAAT es la administración intravenosa de AAT purificada de plasma humano de donantes. En España disponemos de tres preparados de AAT, *Prolastina* y *Trypsone* de *Grifols* y *Zemaira* de *CSL Behring* que deben administrarse en centros hospitalarios ya que una vez reconstituidos se inactivan a las 3-4 horas. En 1987 la *Food and Drug Administration* (FDA, EE. UU) aprobó la administración a una dosis de 60 mg/kg peso/7 días para el tratamiento de enfisema pulmonar en pacientes con DAAT grave. Este tratamiento está indicado en pacientes con déficit grave de AAT (definido como concentraciones de AAT iguales o inferiores a 50 mg/dL medidos por nefelometría), no-fumadores o ex-fumadores, con diagnóstico de EPOC y función pulmonar deteriorada (FEV1<80% del valor predicho) en los que se ha observado pérdida de función pulmonar o progresión del enfisema, a pesar del tratamiento farmacológico y no farmacológico administrado a los pacientes con EPOC.

La administración de alfa-1-antitripsina exógena permite aumentar el nivel de AAT en suero. Ello conlleva incrementos en las concentraciones pulmonares y la restauración del equilibrio proteasa-antiproteasa, lo que previene o desacelera la destrucción del tejido pulmonar.

La eficacia de este tratamiento se define en base a criterios bioquímicos y clínicos. La eficacia bioquímica tiene en cuenta si el tratamiento sustitutivo eleva los niveles séricos de AAT por encima de 50 mg/dl (medido por nefelometría). Estas concentraciones son consideradas protectoras, y pacientes con niveles inferiores tienen riesgo a desarrollar enfisema (Wewers et al. 1987). Diferentes estudios han demostrado la eficacia clínica del tratamiento sustitutivo con AAT. Algunos de ellos muestran una disminución significativa en la caída de FEV1, es decir, del volumen espiratorio forzado del primer segundo (Gotzsche et al. 2010; The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group 1998). En pacientes con un FEV1 entre el 30-65% tratados con AAT se ha observado una reducción en la frecuencia de infecciones respiratorias (Lieberman 2000), o disminución de las exacerbaciones (Needham et al. 2005). Uno de los estudios más significativos es un ensayo multicéntrico, multinacional, aleatorizado y controlado con pacientes ZZ-DAAT. Fueron tratados con terapia de reemplazo AAT (*Zemaira*, *CSL Behring*) por vía

intravenosa de 60 mg/kg semanal o placebo durante 2 años, donde se midió la densidad pulmonar por tomografía computerizada (CT scan) en intervalos regulares (estudio RAPID) (Chapman et al. 2015). Este estudio evaluó a 180 sujetos durante el período de 2 años y fue seguido con un estudio de extensión en la que todos los participantes del estudio recibieron el fármaco activo. Los resultados mostraron que el tratamiento redujo la progresión del enfisema por la disminución de la pérdida de densidad pulmonar, demostrando de manera concluyente la eficacia clínica de la terapia sustitutiva.

En los casos donde ya se haya desarrollado el enfisema puede ser recomendable la intervención quirúrgica mediante reducción del volumen pulmonar del área afectada, en espera de un trasplante de pulmón.

- **Nuevas terapias**

En la actualidad, se sigue investigando en nuevas estrategias de tratamiento de DAAT. Una de ellas trata de la administración de la AAT aerosolizada en lugar de forma intravenosa. Varios estudios piloto han demostrado que la AAT en aerosol es capaz de inhibir la elastasa del neutrófilo, así como de disminuir la concentración de IL8 en el fluido alveolar y el número de neutrófilos en el esputo (Sandhaus 2004). Sin embargo, el depósito pulmonar de AAT es variable en los pacientes estando estrechamente relacionado con el grado obstrucción bronquial, cuando ésta es grave se ha observado menor deposición de AAT. Recientemente, se ha realizado un estudio en una cohorte de 168 con ZZ-DAAT y EPOC grave en el que se postulaba que la inhalación de AAT aerosolizada podría suponer un tratamiento efectivo para el control de las exacerbaciones. Las exacerbaciones se deben a infecciones bacterianas y virales, factores ambientales u otras enfermedades pulmonares que favorecen la progresión de la enfermedad en pacientes con EPOC. Los resultados de este estudio concluyeron que la inhalación de AAT (80 mg de AAT 2 veces al día) durante 50 semanas no mostró ningún efecto en el tiempo hasta la primera exacerbación (Stolk et al. 2019).

Por otro lado, se ha demostrado por algunos autores que la administración de N-acetilcisteína en ratas con enfisema pulmonar disminuye las lesiones producidas por la elastasa (Rubio et al. 2004). Otro posible fármaco a incluir en el tratamiento de pacientes con EPOC es el reserveratrol que induce la producción de glutatión vía Nrf2 protegiendo del estrés oxidativo producido por el humo de cigarrillos en células epiteliales humanas de pulmón (Kode et al. 2008).

El uso de la terapia génica es una perspectiva emocionante en el tratamiento de la enfermedad pulmonar relacionada con el déficit de AAT presentándose como una alternativa a la administración exógena de AAT. Se puede aumentar la secreción endógena usando terapia génica, mediante reemplazo o inserción de genes capaces de producir AAT funcional. El gen

SERPINA1, que codifica para la proteína AAT, es una secuencia relativamente corta que puede ser transportado por vectores virales o liposomales (Ellis et al. 2019). En la actualidad, están en marcha ensayos clínicos en humanos mediante vectores recombinantes de adenovirus que aunque modestos ofrecen resultados prometedores, ya que demuestran un aumento del 3-5% en la concentración de AAT en suero (Mueller et al. 2013).

Actualmente, no existe un tratamiento específico para la enfermedad hepática asociada al DAAT, aparte del cuidado estándar de soporte hepático, con el ácido ursodesoxicólico. En general, el tratamiento de la enfermedad se centra en prevenir las complicaciones de la enfermedad hepática crónica. En casos severos de DAAT, cuando se desarrolla una enfermedad hepática potencialmente mortal, el trasplante de hígado se realiza con excelentes tasas de éxito. Después del trasplante de hígado, los niveles séricos de AAT vuelven a la normalidad (Teckman 2013).

Para superar la ausencia de tratamientos específicos, se han empleado varias estrategias terapéuticas consistentes en interferir en las diferentes vías en las que está involucrada la variante Z como son, la reducción de la cantidad de agregados Z-AAT, incrementar las vías de degradación, mejorar el plegamiento proteico para inhibir la polimerización y reducir el estrés oxidativo (**Tabla 1**).

En cuanto al tratamiento de la enfermedad hepática mediante el bloqueo de la formación de polímeros intrahepáticos, cabe destacar que algunos de ellos como la utilización de chaperonas, aunque fueron efectivas in vitro y en modelos animales, en humanos no consiguieron aumentar los niveles de AAT y los efectos adversos fueron intolerables. Por otro lado, se ha estudiado la generación de péptidos análogos al bucle del sitio activo y de pequeñas moléculas que bloquean cavidades de la superficie de la AAT que evidencian una disminución de agregados Z-AAT. La utilización de fármacos favorecedores de la autofagia como la Rapamicina un potente inmunosupresor que se ha utilizado para prevenir el rechazo en los trasplantes y la Carbamazepina un fármaco anticonvulsionante y antiplaquetario que en modelos de ratón disminuyeron la carga de polímeros Z-AAT y la fibrosis hepática (Hidvegi et al. 2010; Kaushal et al. 2010).

El estrés oxidativo se ha asociado con daño hepático DAAT por lo que podría ser interesante evaluar la utilización de una terapia antioxidante mediante la utilización de vitaminas A, C, E y N-acetilcisteína. Un estudio realizado en niños con DAAT demuestra una reducción significativa de la defensa antioxidante (glutatión y catalasa) y un aumento de biomarcadores de estrés oxidativo en niños con genotipo ZZ, observándose en menor medida en MZ y SZ. Estos hallazgos apoyan la utilización de terapias antioxidantes que permitan reducir el estrés y contribuir a una mejora del daño pulmonar y hepático en pacientes con déficit. (Escribano et al. 2015). Como se

ha mencionado anteriormente el tratamiento con N-acetilcisteína en ratas reduce la progresión de enfisema pulmonar.

Tabla 1. Estrategias terapéuticas para enfermedad hepática en el déficit de AAT.

	NOMBRE	MECANISMOS	MODELO DE ENFERMEDAD	ESTADO DE DESARROLLO
Investigación genética (Bjursell et al. 2018; Guo et al. 2014; Song et al. 2018)	siRNA	Dirigirse a mRNA que codifica AAT humano; reduciendo la acumulación de AAT en hepatocitos y fibrosis hepática; reduciendo la formación de cuerpos de inclusión	Modelo de ratón y primates no humanos	Ensayos clínicos
	CRISPR/Cas9	Edición génica para la reducción de agregados de proteína, proliferación hepatocelular y fibrosis hepática	Modelo de ratón	Ensayos clínicos
Autofagia (Kaushal et al. 2010)	Fármacos: carbamazepina, rapamicina, flufenazina, pimozida Terapia génica: factor de transcripción EB	Agentes inductores de la autofagia que inducen la eliminación autofágica de agregados Z-AAT disminuyendo los agregados hepáticos, la inflamación y la fibrosis	Caenorhabditis elegans; líneas celulares de mamíferos; modelo de ratón	Ensayos clínicos con compuestos de carbamazepina
Chaperonas (Burrows et al. 2000)	Ácido 4-fenilbutírico; ácido hidroxámico de suberoilanolida	Inhibidores de histona desacetilasa; aumentar la secreción de Z-AAT	Líneas celulares de mamíferos; modelo de ratón; humano	El ensayo aleatorizado en humanos falló
Bloqueantes de agregación (Ordonez et al. 2015)	Drogas basadas en estructuras; anticuerpo monoclonal: mAb4B12	Medicamentos basados en la estructura que se dirigen al bolsillo hidrofóbico y al bucle central reactivo de Z-AAT. El anticuerpo interactúa con la región rica en hélice que abarca las hélices A, C, G, H e I. Estos agentes reducen la agregación de Z-AAT	Cribado in silico; in vitro líneas celulares de mamíferos	Estos agentes no han sido probados en modelos animales.

Por otro lado, con los avances actuales de edición génica también podría considerarse una terapia de trasplante con células para el tratamiento del déficit. Algunos estudios (Ding et al. 2011) demostraron que los hepatocitos de donantes sanos podrían repoblar casi por completo el hígado de un modelo de ratón con DAAT. Además, se logró una corrección bialélica de la mutación puntual Z-AAT (Glu342Lys) en iPSC humanas (de un paciente homocigoto ZZ) mediante una combinación de las nucleasas de dedo de zinc y la tecnología piggyBac (Yusa et al. 2011). Posteriormente, estas células se injertaron en el hígado de un modelo de ratón transgénico, que fueron capaces de colonizar el hígado in vivo y mostrar actividades funcionales. Esta emocionante estrategia podría proteger contra la EPOC y el daño hepático asociado con DAAT.

5. Genética y regulación de la expresión del gen *SERPINA1*

La AAT es codificada por el gen *SERPINA1* el cual está compuesto por 7 exones y 6 intrones. Se encuentra ubicado en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 14 (14q32.1). El gen *SERPINA1* comparte locus con otros genes que codifican otras serpinas como la alfa-1 antitripsina y la globulina transportadora de cortisona (**Figura 8**).

El sitio de inicio de la traducción en el gen *SERPINA1* se localiza en el exón 2 dando lugar a 418 aminoácidos de los cuales los 24 primeros constituyen el péptido señal (Kalsheker et al. 2002) que no está presente en la proteína madura. Éste péptido señal es el que promueve el direccionamiento de la proteína hacia el retículo endoplásmico donde adquiere tres cadenas de N-glicosilación en las posiciones y adquiere la forma nativa en el Golgi para ser secretada al torrente sanguíneo.

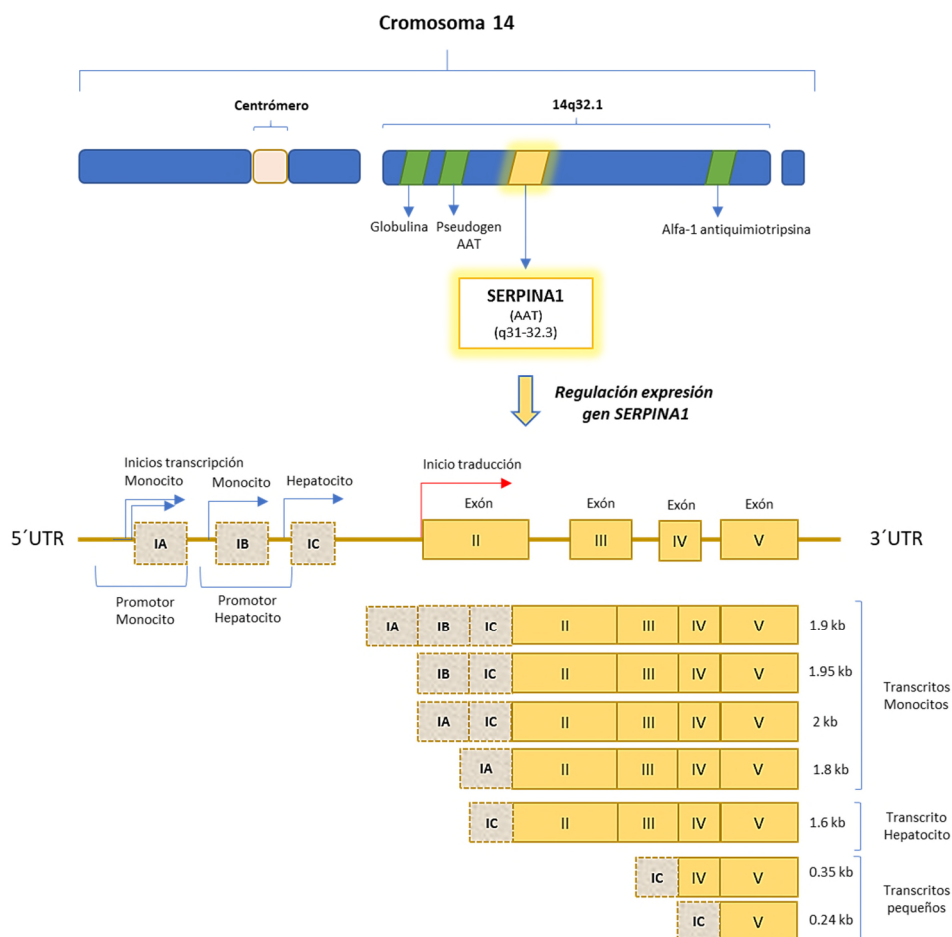


Figura 8. Locus del gen alfa-1 antitripsina (*SERPINA1*) y regulación de la expresión. El inicio de la transcripción en monocitos y macrófagos se localiza en el promotor donde se sitúan los exones 1A y 1B, y el de hepatocitos en el promotor del exón 1C.

- **Regulación de la expresión del gen *SERPINA1***

La regulación de la expresión del gen *SERPINA1* está dirigida por un lado por los promotores en la región reguladora 5'UTR los cuales dirigen la expresión de AAT en diferentes células y tejidos, y por otro por la existencia de *splicing* (corte y empalme) alternativo dependiente de tejido entre los exones no codificantes (1A, 1B, 1C). Estos fenómenos remarcan la importancia de esta región promotora para la regulación de la expresión del gen. Por un lado, contiene un promotor específico de monocitos y macrófagos con diferentes sitios de inicios de transcripción en los exones 1A y 1B que dan lugar mayoritariamente a 4 transcritos alternativos de 1.8, 1.9, 1.95 y 2 kb y, por otro lado, un promotor específico de hepatocitos con el inicio de la transcripción en el exón 1C que da lugar a un transcrito de 1.6 kb de menor tamaño que los anteriores (**Figura 8**). Además, se han descrito transcritos de pequeño tamaño generados por *splicing* alternativo entre alguno de los exones no codificantes y los últimos exones codificantes del gen (exones 4 y 5). Su expresión es dependiente de tejido y su función biológica está aún por esclarecer (Matamala et al. 2017).

La transcripción del gen *SERPINA1* es estimulada por factores exógenos que activan diversas vías intracelulares de transcripción a través de su unión a receptores localizados en la superficie celular (**Figura 9**).

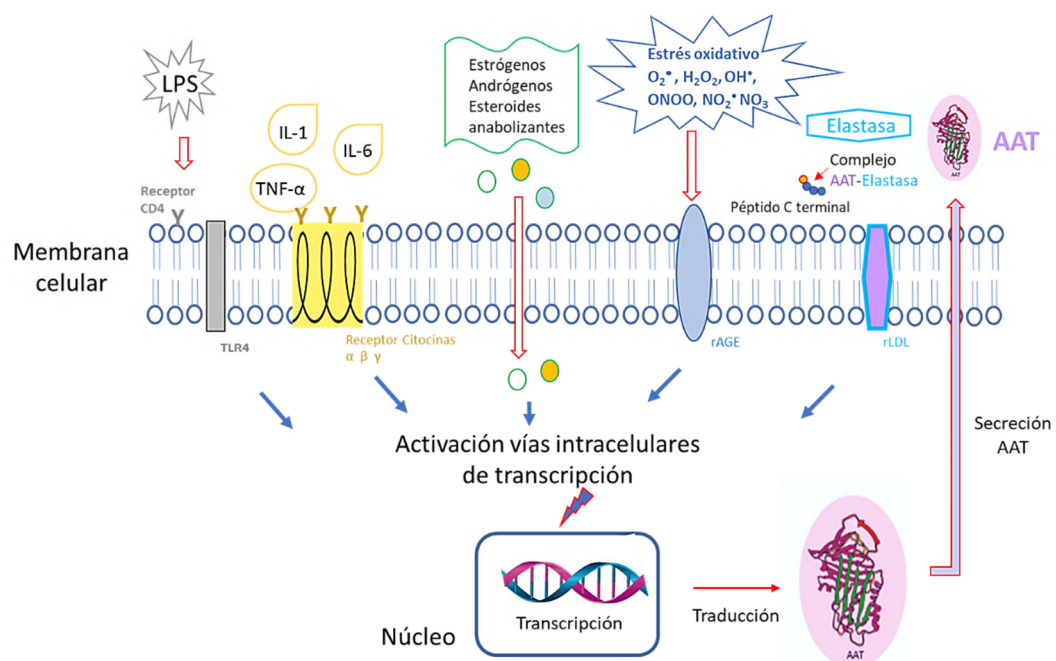


Figura 9. Factores que activan las vías intracelulares para la estimulación de la transcripción del gen *SERPINA1*. Modificado de referencia (Blanco et al. 2016b).

Están fundamentalmente implicados factores generados en procesos infecciosos o inflamatorios, como la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido (LPS) (Knoell et al. 1998), el interferón β , las citoquinas IL-1, IL-6, IL-7, TNF- α (Kalsheker et al. 2002), así como productos finales del estrés nitro-oxidativo (AGEs) (Kalsheker et al. 1994). Además, están descritos mecanismos de autoregulación del gen, para mantener el equilibrio proteasa-antiproteasa, a través de los complejos AAT-elastasa, las serinproteasas y los péptidos carboxi-terminales que se desprenden en la hidrólisis de los complejos AAT-elastasa (Perlmutter et al. 1988). La activación de las vías intracelulares de transcripción del gen *SERPINA1* se produce tras la interacción de estos factores con receptores de membrana tales como los TLRs, receptores transmembrana acoplados a proteínas G, receptores de inmunoglobulinas (rAGE) y receptores LDL-like de lipoproteínas. Por otro lado, aunque no está bien referenciado, se cree que determinadas hormonas sexuales (estrógenos, andrógenos y esteroides anabolizantes) podrían estimular el gen atravesando la membrana celular y tras reconocer receptores citosólicos, dimerizar y translocarse al núcleo, activando elementos de respuesta a hormonas.

- **Variantes genéticas**

Como se ha mencionado previamente, el déficit es causado por mutaciones en el gen *SERPINA1* que predisponen no solamente al daño pulmonar sino también al hepático. El gen *SERPINA1* es muy polimórfico y han sido descritas hasta el momento más de 100 mutaciones relacionadas con el DAAT. Las variantes del gen *SERPINA1* se clasifican en varios grupos dependiendo de la funcionalidad del alelo que generan. Los alelos normales, son los que no alteran la función de la proteína. Se denominan tradicionalmente como alelos M siendo los más comunes M1 (Val213Ala), M2 (Arg101His) y M3 (Glu376Asp). La frecuencia alélica de estos varía entre poblaciones siendo M1 (24%), M2 (13%) y M3 (23%) (1000 Genomes). En contraste con los alelos normales tenemos 2 categorías de variantes genéticas que causan déficit de AAT: alelos deficientes y alelos nulos. Los alelos deficientes son los que dan lugar a niveles bajos de la proteína en plasma y son generados por mutaciones puntuales o pequeñas deleciones. De estos los más comunes son el alelo S (Glu264Val) y el alelo Z (Glu342Lys). Su frecuencia alélica en población caucásica está entre el 5-10% para el alelo S (3%, 1000Genomes) y entre el 1-3% (0.7%, 1000 Genomes) para el alelo Z. Los alelos nulos, son aquellos que dan lugar a ausencia de proteína AAT en plasma y se generan por mutaciones nonsense o frameshifts generando codones de parada prematuros y proteínas no funcionales (Greene et al. 2016). Por último, aunque mucho más raros hay alelos disfuncionales, que no disminuyen los niveles de proteína, pero adquieren una función alterada. El ejemplo más típico es el alelo PI Pittsburgh, en el cual la sustitución de la Met358 hace que adquiera una función antitrombina alterando la coagulación (Owen et al. 1983).

El gen típico de *SERPINA1* consta de dos alelos M presentes en el 85-90% de los individuos y que se transmiten de padres a hijos por herencia mendeliana simple, autosómica y codominante. Estos son responsables de la síntesis de la AAT cuantitativa y cualitativamente normal. Los alelos deficientes más frecuentes son los llamados **S** (Glu264Val) y **Z** (Glu342Lys), y se encuentran en el 10% y 2% de la población española, respectivamente. Ambos dan lugar a proteínas mal plegadas.

Las combinaciones de los alelos M, S y Z dan lugar a los diferentes genotipos MM, SS, MZ, SZ y ZZ. Los genotipos MM expresan un 100% de AAT en sangre, mientras que los MS, SS, MZ, SZ y ZZ expresan el 80%, 60%, 55%, 40% y 15%, respectivamente (**Figura 10**).

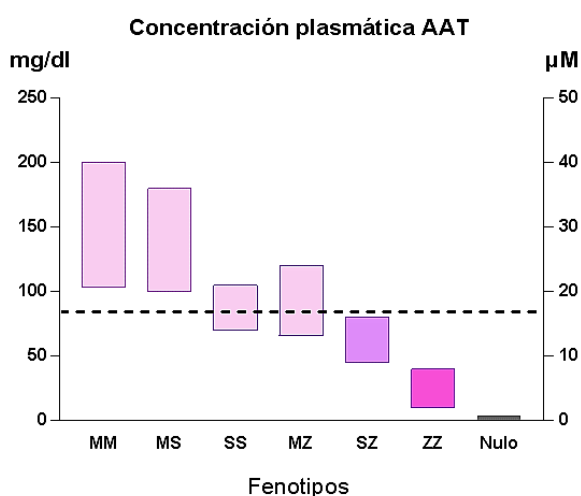


Figura 10. Concentración plasmática de AAT en los distintos fenotipos (MM, MS, SS, MZ, SZ, ZZ, Nulo). Los valores se han obtenido por nefelometría. Un nivel de AAT inferior a 80 mg/dl se asocia a un riesgo incrementado de padecer enfisema pulmonar (línea punteada horizontal). Valores de referencia según (Rodríguez Frías et al. 2016).

El genotipo ZZ da como resultado una reducción de aproximadamente el 90% de los niveles de proteína AAT en circulación y es clínicamente el más relevante. Esta deficiencia en AAT se produce debido al plegamiento aberrante de la Z-AAT causando su polimerización y acumulación intracelular. En la práctica clínica el 96% de las patologías asociadas al déficit de AAT ocurren en homocigotos ZZ, y el 4% restante en heterocigotos SZ, MZ y en los extremadamente infrecuentes genotipos raros y nulos.

Entre los alelos deficientes, además de los alelos S y Z, se han descrito alelos raros que dan lugar a polímeros de AAT dentro del hígado de forma similar a como lo hacen los Z dando lugar a niveles séricos bajos de AAT. Aunque el número de alelos deficientes y nulos descritos asociados al DAAT es muy numeroso, en la **Tabla 2** se muestran los principales alelos “raros” causantes del déficit de AAT encontrados en España como parte de la actividad del circuito de diagnóstico del

Registro español de pacientes con déficit de alfa 1 antitripsina, REDAAT. Aparte de las variantes raras ya conocidas, en España en los últimos años, se han identificado 10 variantes nuevas previamente no descritas en pacientes con déficit de AAT, 7 de ellas identificadas en nuestro laboratorio (Matamala et al. 2018), que prueban el gran polimorfismo genético del gen *SERPINA1*.

Tabla 2. Alelos "raros" deficientes y nulos causantes del déficit de AAT.

ALELOS "raros"	EXÓN	MUTACIÓN	REFERENCIAS
Mmalton	II	Delección de 3 pb 52Phe (M2)	(Fraizer et al. 1989)
Mprocida	II	Leu41Pro	(Takahashi et al. 1988)
Plowell	III	Asp256Val (M3)	(Jardi et al. 1997)
Mheerlen	V	Pro369Leu	(Poller et al. 1999)
F	III	Arg223Cis	(Okayama et al. 1991)
I	II	Arg39Cis	(Akbas et al. 2016)
Wurzburg	V	Pro369Ser	(Poller et al. 1999)
QO mattawa	V	Leu353Phe (M1): genera un codón de parada en 376	(Curiel et al. 1989)
QO porto	IA	Ausencia de empalme entre exón IA y el exón II	(Seixas et al. 2002)

En este contexto, cabe destacar la descripción de un nuevo alelo QO en España, en una familia de Madrid que se denominó QOmadrid (Lara et al. 2014). La variante consiste en la duplicación de una timina (T) en la posición +2 del sitio donador de *splicing* en el exón 1C (+2dupT) que se identificó en heterocigosis en combinación con otra variante nula descrita anteriormente, QOporto. (Seixas et al. 2002). Esta mutación localizada en una región no codificante del gen *SERPINA1* destaca la importancia de las regiones reguladoras en la enfermedad.

Según el laboratorio de referencia del Registro Español de Déficit AAT (REDAAT), en España el número de alelos raros y nulos detectados se ha incrementado de forma significativa debido principalmente a una mejora en el diagnóstico clínico y genético de los pacientes.

6. Alfa-1 Antitripsina

La alfa 1 antitripsina, también denominada alfa-1 proteínasa inhibidor (α 1-Pi) y *SERPINA1*, es una glucoproteína circulante de tamaño medio (6.7 x 3.2 nm), hidrosoluble y difusible en tejidos, con un peso molecular de 52-kDa y una vida media en sangre de unos 5 días. Es el más abundante inhibidor de proteasas en plasma y es producida y secretada principalmente por hepatocitos. Sin embargo, otras células como neutrófilos, macrófagos, monocitos y células epiteliales también la producen en menor cantidad. La concentración en plasma varía desde 0.9-2.0 g/L activándose

en respuesta a diferentes señales de estrés e inflamatorias, por lo que se describe como una proteína reactante de fase aguda. Durante los procesos inflamatorios los niveles de AAT aumentan rápidamente entre 3-4 veces.

La proteína AAT es el principal inhibidor de proteasas del organismo e inhibe un gran número de proteasas pro-inflamatorias como la elastasa del neutrófilo y la proteinasa 3. Hasta hace poco tiempo se pensaba que esta era la función principal de la AAT, pero estudios recientes demuestran que la AAT inhibe un gran número de proteasas intracelulares y de la superficie celular. Entre ellas se encuentran la matriptasa que participa en el transporte de sodio en células epiteliales y la caspasa 3 que participa en la apoptosis celular (Janciauskiene et al. 2011).

La proteína madura está constituida de una cadena de 394 aminoácidos y 3 cadenas de carbohidratos unidas a la proteína en tres residuos de asparagina (Asn 46, 83 y 247). El centro activo está compuesto por los residuos de metionina y serina (Met358 y Ser359). Esta cadena de aminoácidos y los glúcidos se organizan estructuralmente en 9 hélices α (denominadas de la A a la I) y 15 láminas β , de las cuales 9 se agrupan en las bandas A (formadas por 5 bandas verticales), B (formada por 6 bandas horizontales situadas en el centro) y la C (formada por 4 bandas inclinadas). Las láminas y hélices forman un esqueleto que sostiene 20 residuos en cuya parte central se ubica el centro activo. En el tronco de la molécula se han identificado dos zonas hendidas, denominadas breach y shutter (brecha y postigo), en las que se sitúan muchos de los cambios conformacionales, fisiológicos o mutacionales, que ocurren en la AAT y modifican las propiedades de la misma dando lugar a la formación de polímeros de AAT responsables del déficit (**Figura 11**).

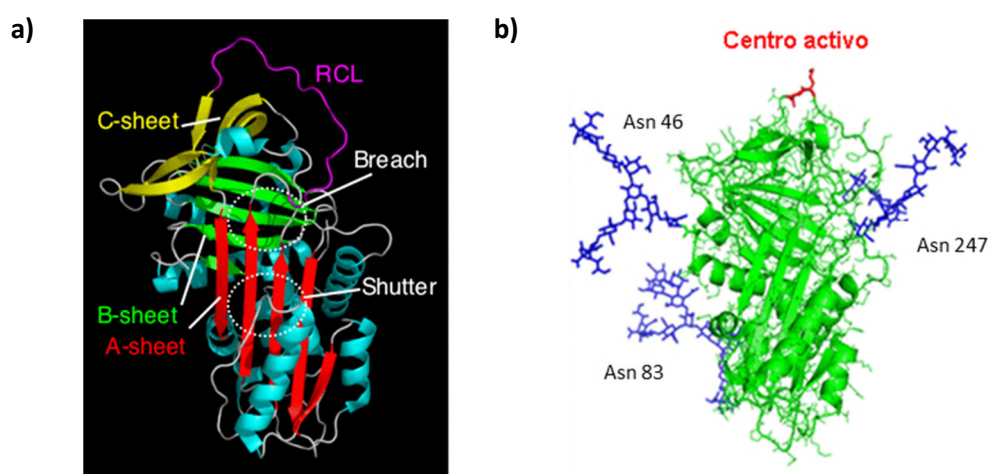


Figura 11. a) Estructura tridimensional de la AAT (Gupta et al. 2014); b) Estructura tridimensional con los puntos de inserción de las tres cadenas de carbohidratos.

Mutaciones puntuales en la proteína AAT dan lugar a cambios conformacionales que generan polímeros y formas latentes de la proteína. Esto da lugar a la formación de agregados en el interior del hepatocito con la consecuente falta de secreción de la proteína al torrente sanguíneo y la pérdida de la capacidad inhibitoria de las proteasas. En la **Figura 12** se propone un modelo de polimerización de Z-AAT (Lomas et al. 2019)

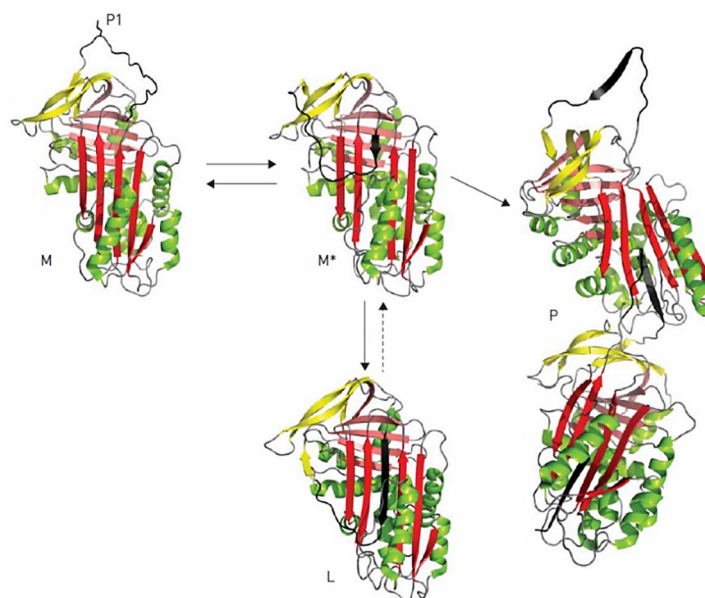


Figura 12. Se muestra un modelo de polimerización de AAT-Z. El Glu342Lys (Z) y las mutaciones de la región del cierre abren la parte inferior de la lámina β A (rojo) y forman un intermediario inestable (M *). La lámina β A puede aceptar el bucle de otra molécula (negro) para formar un dímero que luego se extiende en polímeros (P), o su propio bucle para formar una conformación latente (L) (Lomas et al. 2019).

7. Diagnóstico DAAT

El DAAT es un desorden genético hereditario infra diagnosticado. Su diagnóstico se realiza mediante la combinación de análisis bioquímicos y genéticos. Con los análisis bioquímicos se evalúa la deficiencia de la proteína en suero (principalmente por nefelometría), y tradicionalmente se continúa con el análisis del fenotipo proteico y las anomalías electroforéticas de la proteína mediante isoelectroenfoque. Finalmente se realiza el análisis genético para identificar variantes en el gen *SERPINA1* responsables del déficit proteico. La completa identificación de las formas de DAAT genotipo/fenotipo son las bases para el establecimiento de las decisiones clínicas respecto a un posible tratamiento para los pacientes, incluyendo una terapia argumentada (Ferrarotti et al. 2019).

Actualmente, dado el amplio desconocimiento de la enfermedad, solo se detectan una minoría de los individuos afectados por DAAT, lo que da lugar a un largo camino entre los síntomas

iniciales y el diagnóstico. Es importante el diagnóstico temprano para tomar las medidas terapéuticas apropiadas. La correcta identificación de fenotipos severos o intermedios permite establecer medidas preventivas, evitando el consumo de tabaco o la exposición ambiental contaminada de los pacientes.

La identificación de los mecanismos moleculares que subyacen al déficit ha ayudado a definir los diferentes niveles de riesgo de enfermedad pulmonar y hepática, en función de los diferentes genotipos. La identificación de alelos asociados con un alto grado de polimerización de AAT, como Z o Malton, deberían indicar una mayor evaluación hepática, mientras que los alelos nulos deben considerarse un subgrupo dentro de DAAT con un alto riesgo de enfisema pulmonar y no de enfermedad hepática.

Los diferentes test utilizados en el diagnóstico de DAAT pueden ser categorizados en tres grupos:

- a) **Test cuantitativos** que tienen como objetivo evaluar la concentración de AAT en sangre y se realizan principalmente por nefelometría (medición de la intensidad de luz que se dispersa en función de la concentración). Es importante tener en cuenta que los niveles de AAT en sangre pueden variar en situaciones de inflamación, infección o enfermedad debido a que es una proteína reactante de fase aguda (**Tabla 3**).
- b) **Test cuantitativo para diagnóstico del déficit Z de AAT en el consultorio médico.** El test Alpha Kit Quick Screen diseñado por Grifols S.A en 2013, puede ser utilizado por los médicos en consulta para el diagnóstico rápido y sencillo del déficit Z de AAT. El test es un dispositivo portátil y de fácil uso que se realiza a partir de una gota de sangre del paciente. Los resultados se obtienen en 15- 20 minutos mediante la visualización en los casos positivos de una banda de color naranja (**Figura13**).

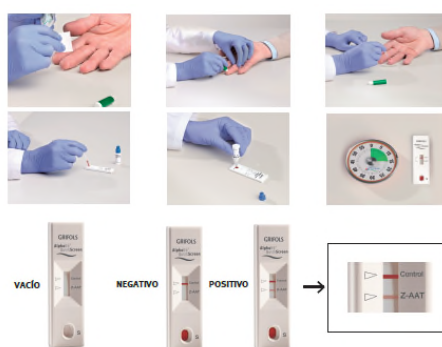


Figura 13. Test cuantitativo rápido para diagnóstico del déficit Z de AAT (Imágenes cedidas por Grifols).

Lo que se detecta mediante la utilización de este test diagnóstico es la presencia de la proteína Z, por lo que el test no permite distinguir entre pacientes homocigotos ZZ y heterocigotos MZ o SZ. Es utilizado por los médicos como método rápido de screening de

pacientes portadores del alelo Z, el alelo más grave. Para determinar el genotipo exacto del paciente es necesario utilizar las técnicas tradicionales de biología molecular (determinación de alelos S y Z o mediante secuenciación completa del gen).

Tabla 3. Concentraciones plasmáticas y el riesgo de padecer enfermedad pulmonar y/o hepática.

FENOTIPO	CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA AAT		RIESGO ENFERMEDAD	
	μM^*	mg/dl*	Enfisema pulmonar	Hepatopatía
MM	20-39	103-200	Sin aumento	Sin aumento
MS	19-35	100-180	Sin aumento	Sin aumento
SS	14-20	70-105	Sin aumento	Sin aumento
MZ	13-23	66-120	Posible ligero aumento	Ligero aumento
SZ	9-15	45-80	Ligero aumento (20-50%)	Ligero aumento
ZZ	2-8	10-40	Alto riesgo (80-100%)	Alto riesgo
Z-Raro/Raro-Raro	2.5-7	10-40	Alto riesgo/	Alto riesgo/
Z-Nulo/Raro-Nulo	2-3	10-15	Alto riesgo	Desconocido
Nulo-Nulo	0	0	Alto riesgo	No

*Valores obtenidos por nefelometría. Modificado según referencia (Vidal et al. 2006).

- c) **Test cualitativos.** Se emplean para identificar alelos mutados que producen cambios estructurales en la proteína y causan el déficit. Por un lado, está la determinación del fenotipo mediante isoelectroenfoque (IEF: separación de las proteínas basado en su carga en un gradiente de PH en un gel de acrilamida) (**Figura 14a**) y por otro las técnicas de genotipado basadas en PCR y secuenciación del gen *SERPINA1* completo. La técnica de PCR más utilizada es la detección de los alelos S y Z mediante sondas TaqMan marcado con fluorescencia específica y análisis de sondas de *melting* (desnaturalización) en máquinas de PCR a tiempo real (**Figura 14b**).

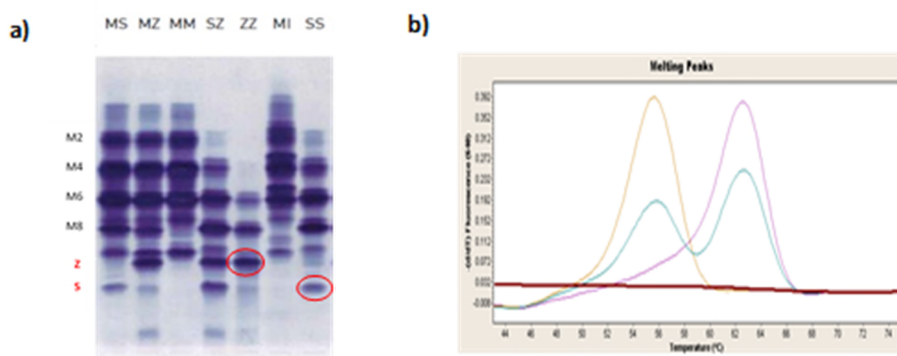


Figura 14. a) Enfoque isoelectrico en plasma de diferentes fenotipos AAT. Bandas mayores y menores de un alelo normal (Variante M) se muestran como M2, M4, M6, M7 y M8. Se muestran bandas específicas de alelo S y alelo Z. b) Fluorescencia picos de melting, en amarillo las muestras wild type, en morado las homocigotas y en verde las heterocigotas para el alelo (S o Z).

La prueba de genotipado más reciente (A1AT Genotyping Test; Progenika, Grifols, Derio, España) permite la identificación y genotipado simultáneo de los alelos S, Z y otras 12 variantes de deficiencia del gen *SERPINA1* (I, Mprocida, Mmalton, Siyama, Q0granite falls, Q0west, Q0bellingham, F, Plowell, Q0mattawa, Q0clayton, Mheerlen) está basado en la tecnología Luminex.

El uso del método de secuenciación Sanger está indicado para casos en los que el nivel sérico está por debajo del punto de corte establecido para los distintos fenotipos, y además este hallazgo no puede explicarse mediante PCR o IEF (**Figura 15**). El análisis de secuencia es capaz de detectar mutaciones causadas por una variedad de mecanismos diferentes, incluidas las deleciones, inserciones, mutaciones puntuales (silenciosas, con sentido y sin sentido) y mutaciones que rompen el marco de lectura. Además, permite la identificación de variantes nuevas y realizar la predicción de su patogenicidad mediante el uso de herramientas computacionales. Recientemente se están implementando técnicas de Next Generation Sequencing (NGS) para su identificación.

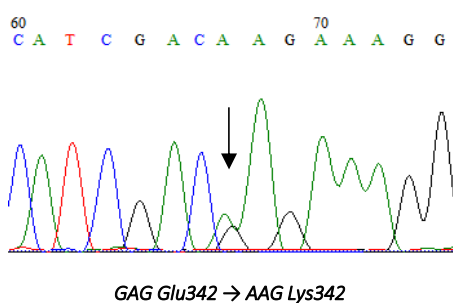


Figura 15. Cromatograma de secuencia genómica de una variante MZ (p. Glu342Lys) en el gen *SERPINA1*.

8. Modelos para estudio de enfermedad en el DAAT

La investigación en profundidad de los mecanismos fisiopatológicos de una enfermedad requiere un modelo animal o celular donde estudiarlos. En el DAAT estos mecanismos han sido mucho más estudiados en la enfermedad pulmonar que en la enfermedad hepática provocada por el déficit. Esto se debe principalmente al difícil acceso de las muestras de hígado y a la dificultad de cultivar células hepáticas, lo que conlleva a que la enfermedad hepática permanezca ampliamente desconocida.

Actualmente existen distintos modelos que nos han permitido tener un conocimiento de los mecanismos moleculares y fisiopatológicos de enfermedad: como son las líneas celulares inmortalizadas, las células progenitoras inducidas (iPSC), los modelos animales y más recientemente los cultivos tridimensionales (3D) de organoides (**Figura 16**).

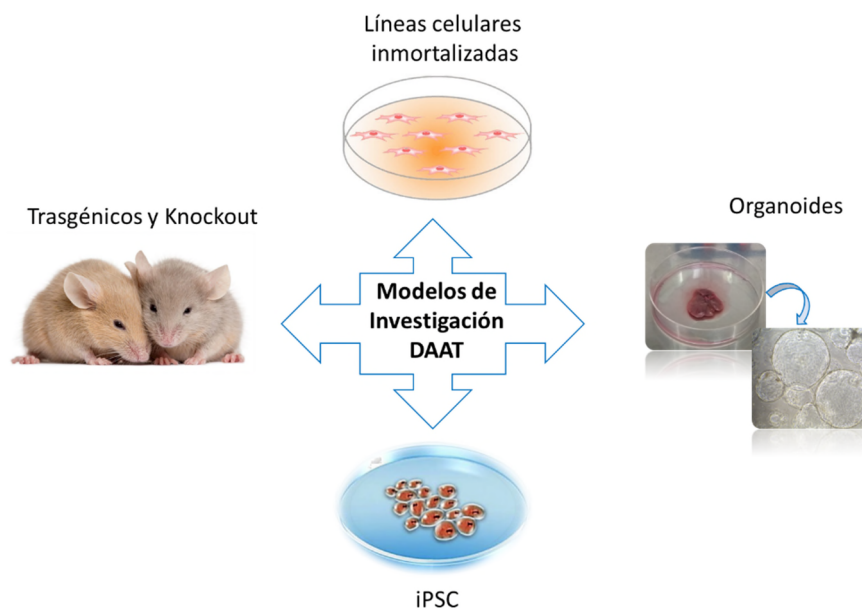


Figura 16. Modelos de investigación en DAAT: Líneas celulares inmortalizadas, ratones transgénicos y knockout, iPSC y organoides.

- **Líneas celulares inmortalizadas**

Las líneas celulares inmortalizadas más utilizadas en investigación para la sobreexpresión del gen *SERPINA1* y el estudio del DAAT son células de riñón embrionario humano HEK-293T (Matamala et al. 2018), células 1-6 de hepatoma murino Hepa (Ronzoni et al. 2016) y células HepG2 humanas. Este modelo es utilizado por muchos grupos de investigación, incluido nuestro grupo que, en los últimos años, ha empleado células HEK-293T como modelo para el análisis funcional de nuevas variantes missense del gen *SERPINA1*.

- **Modelos animales**

Los modelos animales de ratón más utilizados para el estudio del DAAT son el ratón transgénico con el gen *SERPINA1* humano con la mutación Z y el recientemente conseguido ratón knockout.

Los ratones transgénicos Z presentan características fisiopatológicas de la enfermedad con bajos niveles en plasma y acumulación de agregados de AAT humana en hepatocitos del ratón por lo que son de gran utilidad para el estudio de la enfermedad hepática en adultos ZZ (Ali et al. 1994).

En humanos solo hay un gen *SERPINA1* que codifica para la proteína AAT, pero en ratón hay hasta seis genes, lo que ha hecho imposible durante décadas crear un modelo de ratón knockout completo para su estudio. Recientemente se ha generado mediante tecnología CRISPR/Cas9 un

ratón Knockout para cinco genes *Serpina1a-e* de ratón que desarrolla espontáneamente enfermedad pulmonar y recapitula muchos aspectos de la enfermedad humana (Borel et al. 2018). La generación de este modelo va a permitir obtener en un futuro un mayor conocimiento de la biología del enfisema.

La enfermedad pulmonar ha sido estudiada en modelos animales aportando conocimientos sobre los mecanismos del desarrollo de enfisema pulmonar en pacientes con EPOC y DAAT. Estos modelos experimentales in vivo replican, al menos en parte, los fenotipos clínicos humanos lo que ha conducido a un rápido progreso en la comprensión de la patogénesis del enfisema en individuos con déficit grave y moderado de AAT. Estos conocimientos han permitido introducir mejoras en la terapia de suplementación de AAT, modular las inflamaciones crónicas y la respuesta inmune (Ni et al. 2016).

- **Células pluripotentes inducidas (iPSC)**

Gran parte de la comprensión de la patogénesis molecular del DAAT se basa en estudios que emplean ratones transgénicos que expresan el alelo Z humano o líneas inmortalizadas transducidas que sobreexpresan Z-AAT. No obstante, estos modelos no capturan la variabilidad fenotípica existente entre los pacientes y se nos plantea la cuestión de si otros modelos alternativos existentes, como las células madre inducidas (iPSC) son un modelo potencial para la comprensión de la enfermedad hepática asociada al DAAT (Kaserman et al. 2018).

Kaserman y otros investigadores han demostrado que células iPSC hepáticas de pacientes DAAT recapitulan las características de la enfermedad hepática: aumento de retención de AAT en células iPSC hepáticas de pacientes, activación de las vías de degradación intracelular ERAD y autofagia, así como una disminución de la secreción de AAT (Wilson et al. 2015; Rashid et al. 2010). Segeritz y colaboradores, analizaron los procesos de ausencia de plegamiento proteico e inflamación en el DAAT identificando mediante estudios comparativos de proteómica y transcriptómica cambios de expresión de proteínas que participan en el proceso inflamatorio (IL-1, IL-18, Caspase-4, TNF), en la respuesta al plegamiento proteico (HSP90, Calreticulin, Calnexin) (Cameron et al. 2009; Ramos et al. 2007), así como de biomarcadores de malignidad (AKR 1B 10) que explicarían el mayor riesgo de hepatocarcinoma en pacientes con el DAAT (Granell et al. 2008; Smith et al. 2011). Este modelo de iPSC de hepatocitos es una herramienta útil para el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad hepática (Segeritz et al. 2018).

Además, las células iPSC hepáticas de pacientes con DAAT nos ofrecen una herramienta para el screening de drogas tanto para estudiar su eficacia como su toxicidad, determinar el riesgo de

padecer enfermedad hepática y la producción de células que pueden ser editadas genéticamente y trasplantadas.

Hay que destacar, que existen algunos obstáculos para la utilización de esta estrategia como son posibles efectos adversos de la edición del genoma y el riesgo de trasplante de células pluripotentes. No obstante, estudios recientes demuestran que la edición génica de hepatocitos humanos Z-AAT, podría representar una posible terapia para los pacientes DAAT (Borel et al. 2017). Por otro lado, un grupo japonés ha demostrado que el trasplante de iPSC diferenciadas de pacientes, son capaces de restaurar el tejido dañado (Mandai et al. 2017).

- **Organoides**

Recientemente los cultivos in vitro tridimensionales (3D) están surgiendo como nuevos sistemas con los que estudiar el desarrollo de tejidos, la organogénesis, el comportamiento de células madre y los mecanismos moleculares de enfermedades. Los organoides son nuevos sistemas de cultivo tridimensionales (3D) que sirven para modelar enfermedades. Su desarrollo ha sido posible gracias a años de estudio de los eventos y cascadas de señalización del proceso de organogénesis, y al trabajo con células pluripotentes humanas. Estos conocimientos han sido el punto de partida para generar cultivos de organoides que recapitulan in vitro el desarrollo de los procesos de organogénesis de tejidos que ocurren in vivo (Lancaster et al. 2019).

Los organoides son grupos de células que crecen en una estructura 3D y que se generan a partir de células madre pluripotentes, células adultas o progenitores embrionarios. Tienen capacidad de auto-renovación y auto-organización, manteniendo una apariencia y funcionalidad similares a las del tejido original. Otra ventaja de los organoides es su capacidad para mantenerse durante largos periodos en cultivo y por otro lado preservar su estabilidad genética en gran medida. Recientes estudios demuestran que cultivos de células madre embrionarias (ES) y de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) diferenciadas acumulan aberraciones genéticas y epigenéticas durante el proceso de diferenciación (Liang et al. 2013). El rango de anormalidades cromosómicas se extiende desde variaciones en el número de copias (CNVs) hasta mutaciones puntuales en regiones del genoma codificante. Estos cambios complican su utilización en el uso de la medicina regenerativa (Bayart et al. 2013). Sin embargo, el análisis de la estabilidad genética de realizado en organoides de hígado in vitro demuestra que las células en expansión durante varios meses preservan su estabilidad genética (Huch et al. 2015a).

Distintos autores han desarrollado sistemas de cultivo de organoides que permiten su expansión durante más de un año, a partir de células madre de intestino de ratón adulto, estómago, hígado y páncreas. En la **Tabla 4** se muestra una relación de los organoides generados a partir de células humanas y de ratón en los últimos años (Lancaster et al. 2019).

Tabla 4. Resumen de cultivos de organoides derivados de distintos órganos

ÓRGANO	DERIVADO DE	REFERENCIAS
Pulmón	Células madre adultas de ratón	(Jeong et al. 2014)
	Progenitores embrionarios humanos	(Nikolic et al. 2017)
	Tejido humano adulto	(Sachs et al. 2019)
Estómago	Células madre de antro adulto de ratón	(Barker et al. 2010)
	Células madre de cuerpo adulto de ratón	(Stange et al. 2013)
	Tejido humano adulto	(Bartfeld et al. 2015)
Hígado	Tejido hepático adulto de ratón (colangiocitos)	(Huch et al. 2013b)
	Hígado embrionario de ratón (E10-E13.5)	(Prior et al. 2019)
	Tejido hepático adulto humano (colangiocitos)	(Huch et al. 2015a)
	Tejido hepático adulto de ratón (hepatocitos)	(Peng et al. 2018)
	Hepatocitos humanos adultos y tejido embrionario	(Hu et al. 2018)
	Tejido biliar adulto humano	(Sampaziotis et al. 2017)
Páncreas	Ratón tejido adulto	(Huch et al. 2013a)
	Tejido embrionario de ratón	(Greggio et al. 2013)
	Tejido humano adulto	(Loomans et al. 2018)
Intestino delgado	Ratón postnatal y tejido adulto	(Ootani et al. 2009)
	Células madre adultas de ratón	(Mahe et al. 2013)
Colon	Tejido humano adulto	(Jung et al. 2011)
Próstata	Células de próstata de ratón	(Lawson et al. 2007)
	Tejido adulto humano y de ratón	(Karthaus et al. 2014)
Hueso	Médula ósea humana	(Kale et al. 2000)
Trompa de Falopio	Tejido humano adulto	(Kessler et al. 2015)
Endometrio	Tejido humano adulto	(Turco et al. 2017)
	Ratón y tejido adulto humano	(Boretto et al. 2017)
Glándula mamaria	Ratón tejido adulto	(Gudjonsson et al. 2002)
	Tejido humano adulto	(Linnemann et al. 2015)
Glándula salivar	Tejido humano adulto	(Pringle et al. 2016)
	Ratón tejido adulto	(Maimets et al. 2016)
Placenta	Tejido humano adulto	(Turco et al. 2018)

Uno de los objetivos principales del desarrollo de organoides humanos es su aplicación en el modelado de enfermedades. Mientras que el establecimiento de organoides para la mayoría de los órganos todavía es bastante reciente, ya existen varios ejemplos del uso de organoides para estudiar enfermedades congénitas (fibrosis quística, microcefalia, autismo) o adquiridas (cáncer, infección por *Helicobacter pylori*, infección virus Zika) (Lancaster et al. 2019).

Existen algunas limitaciones para llegar al modelado de enfermedades humanas. Debido a su naturaleza 3D, el tamaño de los organoides está limitado por el suplemento de nutrientes, ya que los organoides carecen de vasculatura, y su desarrollo y crecimiento depende de la difusión de los medios circundantes. Esto es válido para organoides pequeños o aquellos que no presenten una estratificación compleja como es el caso de organoides derivados de tejidos epiteliales del endodermo (hígado, pulmón, estómago, intestino, tiroides y páncreas) sin

embargo para organoides cerebrales se ha observado una necrosis dramática en el interior del organoide. Actualmente, se está trabajando para mejorar tanto el suministro de nutrientes como la vascularización. Ya se han realizado algunos experimentos en ratones en los que se ha conseguido vascularizar organoides implantados y se han detectado metabolitos de hígado en la sangre del ratón (Huch et al. 2015b; Song et al. 2018).

- **Organoides de hígado para estudio del DAAT**

Actualmente, los estudios experimentales que investigan la enfermedad hepática en el déficit de AAT están limitados por la dificultad de obtener tejido del hígado humano y de mantener cultivos primarios de hepatocitos humanos. Alternativamente, se han utilizado células madre embrionarias humanas y células madre pluripotentes inducidas (Haugabook et al. 2019).

Recientemente, se han desarrollado organoides hepáticos humanos para los estudios de diversas enfermedades hepáticas (Lancaster et al. 2019; Nantasanti et al. 2016). Los descritos por primera vez permitieron la expansión de células madre hepáticas adultas y la posterior diferenciación en hepatocitos recapitulando algunas de las funciones más importantes del tejido hepático ex vivo (Huch et al. 2015a).

Huch y colaboradores generaron organoides de hígado diferenciados de pacientes con DAAT (ZZ) que imitaban las características propias de la enfermedad. Se detectó en ellos acumulación de agregados de AAT como ocurre en las biopsias de los pacientes con déficit, una disminución de los niveles de secreción de AAT, la aparición de stress en el retículo endoplásmico identificada por la fosforilación de eIF2 α , así como un incremento en la apoptosis. Estos resultados sugieren que los organoides constituyen un buen modelo para ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares y fisiopatológicos de esta enfermedad (Huch et al. 2015a).

Más recientemente Hu y colaboradores han desarrollado cultivos a largo plazo de hepatocitos humanos y de ratón en forma de organoides (Hep-Orgs) (Hu et al. 2018), y que son diferentes a los organoides derivados de células ductales o colangiocitos previamente descritos (Chol-Orgs) (Huch et al. 2015a). Los organoides derivados de hepatocito mantienen las características y perfiles de expresión de los hepatocitos maduros, y pueden injertarse en el hígado dañado de ratón y proliferar recapitulando la respuesta al daño de los hepatocitos.

Algunas de las aplicaciones de organoides son el screening de fármacos y la utilización de organoides de hígado como modelo para testar el metabolismo de los medicamentos. La FDA (*Food and Drug Administration*) en Estados Unidos requiere que las compañías farmacéuticas antes de su aprobación para su utilización en humanos, los fármacos sean probados en un modelo de hígado in vitro para determinar los posibles daños. Finalmente, aunque todavía está

lejos de ser una realidad, son aplicables como tecnologías de reemplazo celular o incluso el trasplante del órgano completo (**Figura 17**) (Lancaster et al. 2019).

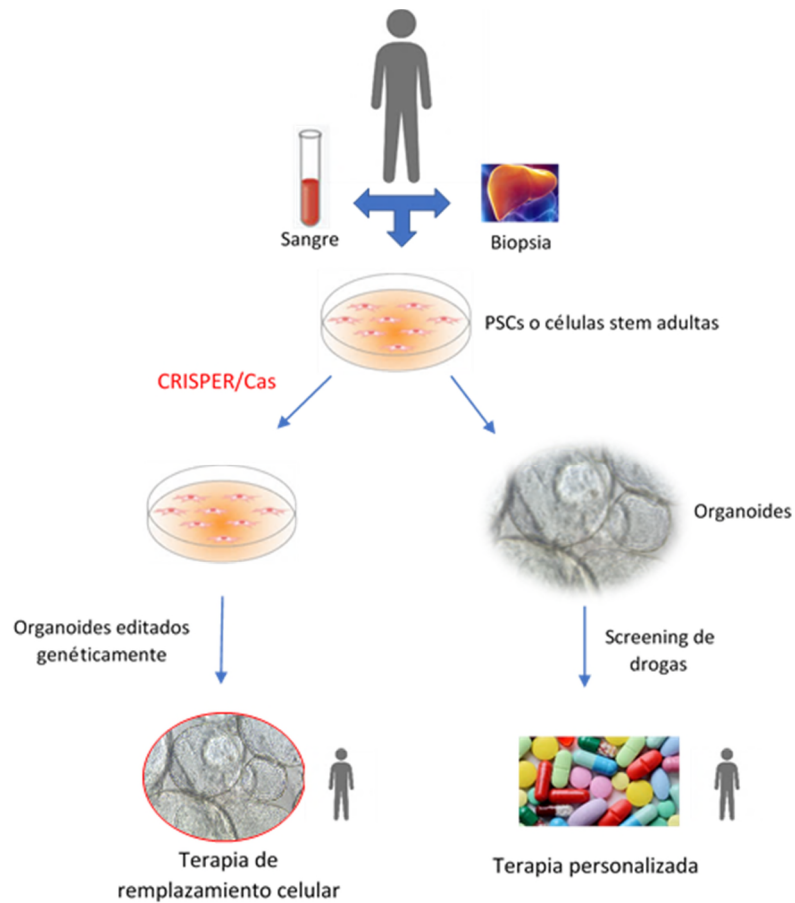
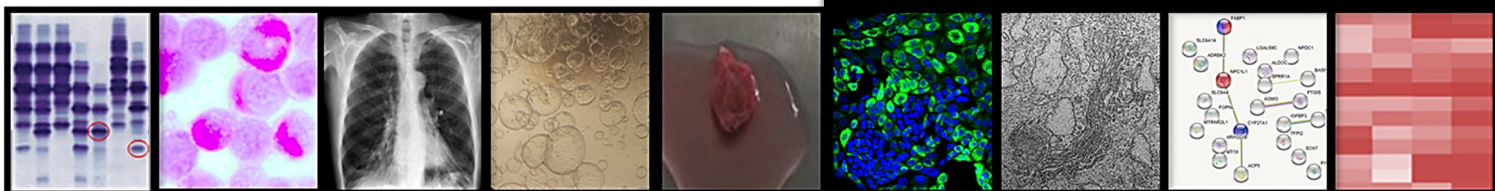


Figura 17. Aplicaciones terapéuticas actuales y futuras de organoides. Modificado de referencia (Lancaster et al. 2019).

Objetivos



OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es avanzar en la investigación de los procesos de pérdida y ganancia de función de la proteína alfa 1 antitripsina (AAT) que ocurren en la enfermedad pulmonar y hepática respectivamente, en el déficit de alfa 1 antitripsina. Concretamente los objetivos son:

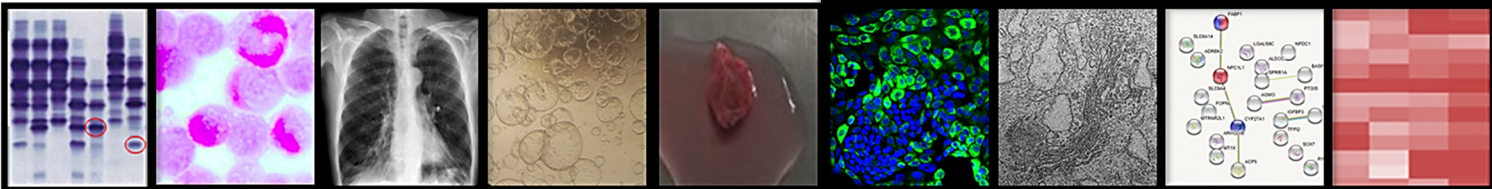
Objetivo 1. Investigar los factores genéticos implicados en la pérdida de función de AAT.

- 1.1. Identificación de nuevas variantes del gen *SERPINA1* en pacientes con déficit de AAT en casos discordantes.
- 1.2. Caracterización del efecto funcional de las nuevas variantes genéticas y su implicación en la enfermedad.

Objetivo 2. Estudio de las alteraciones moleculares implicadas en la ganancia de función de AAT mediante el desarrollo de organoides de hígado de pacientes.

- 2.1. Establecer líneas de cultivo de organoides de hígado de pacientes con diferentes genotipos.
- 2.2. Evaluar las principales características de la enfermedad hepática en organoides de hígado (polímeros intracelulares, secreción de AAT, perfiles de expresión, microscopía electrónica).
- 2.3. Análisis de expresión del gen *SERPINA1* en organoides y su activación mediante factores exógenos (OSM, IL-6, LPS).

Materiales y Métodos



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y genotipado

Durante los años 2017-2019 se han analizado 441 muestras de pacientes principalmente dentro del circuito de diagnóstico genético del REDAAT (registro español de pacientes con deficiencia de AAT). Una vez realizado el genotipado de las variantes más frecuentes (S y Z), cuando se observaron casos con discrepancia entre los niveles séricos de AAT esperados y el resultado de este genotipo inicial, estos casos se estudiaron mediante secuenciación completa del gen *SERPINA1*. Estos estudios permitieron identificar 10 pacientes con variantes no descritas anteriormente, de las cuales 2 se han caracterizado funcionalmente en esta tesis. Los tres pacientes portadores de estas variantes tenían enfermedad pulmonar o hepática. La concentración sérica de AAT se midió por inmuno-nefelometría y el fenotipo de la proteína se determinó por análisis de isoelectroenfoque (IEF). Los datos clínicos de estos pacientes se muestran en la Tabla 8 en el apartado de resultados. Se aisló el DNA de sangre periférica completa o de muestras de sangre en gota seca utilizando el mini kit de sangre de DNA Qiaamp (QiaGen) y métodos estándar.

Para realizar el genotipo se aisló el DNA de sangre periférica completa o de muestras de sangre en gota seca utilizando el mini kit de sangre de DNA Qiaamp (QiaGen) y métodos estándar. La determinación de las variantes S y Z se realizó con el kit Alpha1 Antitrypsin (AAT) PIS y PIZ (diagnóstico de Roche). Para el estudio de otras variantes se realizó secuenciación Sanger de los exones del gen *SERPINA1* (NG_008290.1, NM_000295.4), utilizando cebadores descritos previamente (Lara et al. 2013; Zorzetto et al. 2008) en un secuenciador automático (ABI PRISM 377 Applied BioSystems) en la Unidad de Genómica del ISCIII.

Por otro lado, para el establecimiento de un modelo de enfermedad hepática se establecieron 25 líneas de organoides a partir de biopsias de hígado obtenidas de pacientes y controles del Hospital Doce de Octubre en Madrid (España), o proporcionados por la Dra. Huch de la Universidad de Cambridge (Reino Unido). Los organoides ZZ se derivaron de pacientes con ZZ DAAT con insuficiencia hepática y se obtuvieron de trasplante de hígado, mientras que los organoides MZ se obtuvieron de un paciente adulto con MZ DAAT que se sometió a una colicestomía. Los organoides control de MM AAT fueron derivados de tejido hepático sano de pacientes con diferentes patologías (hepatocarcinoma, coledocolitiasis, colelitiasis o colangiocarcinoma) sometidos a resección quirúrgica (**Tabla 5**). Todas las biopsias fueron genotipadas para *SERPINA1*. La secuenciación de los exones que codifican el gen *SERPINA1* se realizó mediante el uso de cebadores descritos previamente (Lara et al. 2013; Zorzetto et al. 2008) en un secuenciador automático (ABI PRISM 377 Applied BioSystems).

Tabla 5. Lista de líneas de organoides establecidas

MUESTRAS	DIAGNÓSTICO	GENOTIPO
H_CA_01	Donante sano	MM
Hliv PT2	Déficit Alfa 1 Antitripsina	ZZ
H_01_CG	Hepatocarcinoma	MM
H_02_CG	Coledocolitiasis	MI
H_03_CG	Hepatocarcinoma	MM
H_04_CG	Metástasis cáncer esofágico en hígado	MM
H_06_CG	Colangiocarcinoma	MM
H_07_CG	Hepatocarcinoma	MM
H_08_CG	Coledocolitiasis	MM
H_09_CG	Cálculos biliares (Colecistectomía)	MZ
H_10_CG	Cálculos biliares (Colecistectomía)	MM
H_11_CG	Coledocolitiasis	MM
H_13_CG	Colangiocarcinoma	MM
H_14_CG	Colelitiasis	MM
H_15_CG	Cálculos biliares (Colecistectomía)	MM
H_16_CG	Cálculos biliares (Colecistectomía)	MM
H_17_CG	Cirugía Vesícula	MM
H_18_CG	Cálculos biliares (Colecistectomía)	MM
H_19_CG	Cálculos biliares (Colecistectomía)	MM
H_20_CG	Cálculos biliares (Colecistectomía)	MM
H_21_CG	Cálculos biliares (Colecistectomía)	MM
H_23_CG	Donante de trasplante hepático	MM
H_24_CG	Colangiocarcinoma con afectación portal	MM

Todas las biopsias de hígado fueron estudiadas mediante la secuenciación de exones del gen *SERPINA1*.

Se obtuvo el consentimiento informado firmado para participar en el estudio de todos los sujetos, y la investigación fue aprobada por el comité de ética de ISCIII.

2. PCR alelo específica

En los casos donde fue necesario establecer el haplotipo en que se encontraban las variantes genéticas encontradas, como en los alelos S-plus, la fase de las variantes se realizó mediante PCR alelo-específica (AS-PCR) utilizando cebadores específicos para la mutación y para la secuencia normal y posterior secuenciación del amplicón. Concretamente para los alelos S-plus, se amplificó selectivamente un fragmento de DNA de 2.605 pb entre el sitio no-S/S y el exón 5 usando un cebador específico de alelo 5'GGGAACTACAGCACCTGGT3' y el cebador conservado 5'TGGGAGGGATTACAGTCACA3'. Las reacciones de amplificación (volumen final =20µl)

contenían 10ng de muestra de DNA, 0.2 μ M de cada cebador de amplificación, 200 μ M de cada dNTP, 0.2 μ l de DNA polimerasa Phire[®] II (Finnzymes; Thermo Fisher Scientific) y 1X tampón de reacción enzimática. Las condiciones de la AS-PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 $^{\circ}$ C durante 30s; 35 ciclos de amplificación que consisten en 98 $^{\circ}$ C por 10 s, 68 $^{\circ}$ C por 20 s y 72 $^{\circ}$ C por 1.5 min; extensión final a 72 $^{\circ}$ C durante 10 min. La especificidad de la AS-PCR se realizó con un control negativo que consiste en una muestra de DNA de un individuo homocigoto para la secuencia normal no-S. Los amplicones se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, se limpiaron mediante digestión enzimática (ilustrar ExoProStar 1-Step; GE Healthcae) y finalmente se secuenciaron usando el kit de secuenciación Big Dye Dydeoxy Terminator y un secuenciador ABI 3730 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific).

3. Frecuencia alélica y predicción funcional de variantes S-Plus (E264V, Y138C Y P391T)

Se utilizaron varias bases de datos para investigar la frecuencia de la población de las variantes recientemente identificadas: la base de datos de variaciones genéticas (dbSNP) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), el Exome Aggregation Consortium (Consortio de agregación de exomas) (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>), o la del Genome Aggregation Database (gnomAD) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). El efecto de las variantes que causan sustituciones de aminoácidos se predijo con las siguientes herramientas in silico: SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), PoplyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Condel (<https://bbglab.irbbarcelona.org/fannsdb/>), y CADD-phred a través de Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) (<https://www.ensembl.org/Tools/VEP>).

4. Mutagénesis dirigida y expresión in vitro de AAT mutante

Para la expresión in vitro de AAT, utilizamos el vector pCMV6 (OriGene) con cDNA *SERPINA1* M1 (Val213) ligado al vector. Las mutaciones S:(E264V), Y138C o P391T se introdujeron en el DNAC de *SERPINA1* mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit de mutagénesis QuikChange II (Agilent Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los cebadores descritos en la **Tabla 6**. Para la generación de doble mutante, se usó el DNAC de *SERPINA1* con la mutación S para introducir las variantes Y138C o P391T.

Las células HEK293T se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10% (Sigma-Aldrich). Las transfecciones transitorias se realizaron en placas de 6 pocillos con 10 μ l de reactivo de transfección de DNA (Biotool) y 4 μ g de plásmido de expresión en medio de cultivo Opti-MEM sin suero (Gibco). A las 48 horas después de la transfección, se recogieron las células y los medios acondicionados.

Tabla 6. Cebadores diseñados para realizar mutagénesis dirigida en el gen *SERPINA1*.

Variante	Cambio Codón	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
PiS	GAA>GTA	GGGAAACTACAGCACCTGGTAAATGAACTACCCACG	CGTGGGTGAGTTCATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCC
Y138C	TAC>TGC	GGAGGATGTTAAAAAGTTGTCCCACTCAGAAGCC	GGCTTCTGAGTGGCACAACCTTTTAAACATCCTCC
P391T	CCC>ACC	GGGAAAAGTGGTGAATACCACCCAAAATAACTGCC	GGCAGTTATTTTTGGGTGGTATTACCACCTTTTCCC

5. Establecimiento y cultivo de organoides de hígado humanos

Siguiendo el protocolo descrito por Huch y colaboradores. (Huch et al. 2015a; Broutier et al. 2016), hemos establecido organoides hepáticos a partir de células progenitoras adultas (AdSCs) del hígado humano. Brevemente, después de la escisión quirúrgica, el tejido se mantuvo frío en medio basal durante 24h (DMEM/F12 avanzado, 1% penicilina/estreptomicina, Glutamax al 1%, Hepes 10 mM) hasta el procesamiento. El tejido se disgregó, se lavó con medio frío (DMEM, Glutamax, DGlu, Piruvato, 1% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina) y se digirió con colagenasa (solución salina de equilibrio de Earle (EBSS), colagenasa D 2,5 mg/ml, DNAsa I 0,1 mg/ml). Después de centrifugar, las células se resuspendieron en la matriz BME2 (Cultrex Basement Membrane Extract BME Type 2, BME2) y se sembraron en una placa de 24 pocillos con medio de aislamiento (medio basal suplementado con 25 ng/ml de Nogging humano recombinante, medio condicionado al 30% con Wnt3a y 10 μ M de Y-27632 inhibidor de ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase)). En esta condición de cultivo específica, solo las AdSCs progenitoras localizadas principalmente en los ductos biliares pueden crecer formando organoides con capacidad de auto renovación en forma de esferas. En cada pase, los organoides se retiraron de la matriz y después de digerirse, manualmente con la pipeta, se transfirieron a una nueva matriz. Para la expansión, los organoides se cultivaron en un medio de expansión (EM) (medio basal, N-acetilcisteína 1 mM, medio acondicionado Rspo1 al 5%, nicotinamida 10mM, 10nM recombinante humano-gastrina I, 50 ng/l de EGF recombinante (factor de crecimiento epidémico), 100 ng/ml FGF10 humano recombinante (factor de crecimiento de fibroblastos), 50 ng/ml de HGF humano recombinante (factor de crecimiento de hepatocitos), suplementado con 10 μ M de inhibidor de ROCK). La diferenciación a hepatocitos se logró añadiendo al cultivo un medio de diferenciación (DM) durante 15 días (medio basal, 1:50 B27 suplemento con o sin vitamina A, 1: 100 suplemento N2, 1mM N-acetilcisteína, 10nM gastrina I recombinante humana, 50 ng/ml de EGF de ratón recombinante, 100 ng/ml de FGF10 humano recombinante, 50nM A83-01 (inhibidor de ALK5, ALK4 y ALK7), 10 μ M de inhibidor de γ -secretase (DAPT)).

6. Identificación de agregados AAT usando tinción PAS-Diastasa

Para detectar agregados intracelulares de la proteína AAT se utilizó la tinción PAS-Diastasa (PAS-D), en la que las células se trataron con diastasa una enzima que descompone el glucógeno, y posteriormente se tiñeron con Ácido Periódico de Schiff que tiñe polisacáridos y glicoproteínas como la AAT. Para ello, tras la extracción de las células de los organoides se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se extendieron en portaobjetos (1 min a 600 rpm) y se fijaron con etanol al 95% durante 5 min. Posteriormente, las células se trataron con diastasa al 0.1%, durante 15 min, después se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con PAS y contra tiñeron con hematoxilina-eosina. Esta técnica tiñe de fucsia los azúcares presentes en las células. De este modo los acúmulos de AAT se observan marcados de un color rosáceo-fucsia.

7. Análisis por Western blot de AAT

Por un lado, en células HEK293T transfectadas con los diferentes mutantes y por otro, en organoides en expansión y diferenciados, mediante western blot.

Para el análisis proteico a partir de los organoides fue necesario retirar la matriz en la que estaban embebidos mediante 5 lavados con medio basal. Las células se lisaron con tampón RIPA que contenía un cóctel de inhibidor de proteasa completo (Roche, Mannheim, Alemania) y se separaron los extractos celulares y la fracción insoluble, donde se quedan retenidos los polímeros y agregados de AAT. Los extractos celulares y los medios de cultivo de las células se sometieron a electroforesis en 10% de poliacrilamida Dodecil Sulfato Sódico PAGE (SDS-PAGE) para la detección de AAT. La fracción insoluble se sonicó para obtener las proteínas retenidas y se separó en PAGE al 8% no desnaturalizante. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF y se detectaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-AAT B9 (dilución 1:2000) que detecta AAT total y anti-beta-actina (AC-74 Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania) (dilución 1: 5000) para la identificación de la proteína control beta-actina. Como anticuerpo secundario se utilizó un IgG-HRP de pollo anti-ratón (Biotecnología sc-2954 Santa Cruz) (dilución 1: 5000) y se visualizó después de incubar con el sustrato HRP Immobilon (Millipore) utilizando el sistema de imagen Chemidoc Touch (Biorad, Hércules, CA, EE. UU.).

8. Detección de AAT intracelular por inmunofluorescencia

La detección de AAT en las células de organoides se realizó mediante inmuno-fluorescencia, tanto en condiciones de cultivo en expansión (EM) tras su cultivo durante 1-2 meses, así como en organoides diferenciados tras crecer en medio DM durante 2 semanas. Para ello se realizaron citospin de las células en PBS cargando 50 y 200 µl en cada porta y centrifugando 1 min a 600

rpm. Los citospin de las células organoides se lavaron con PBS, se fijaron con etanol al 95% y se permeabilizaron con Triton100/PBS (phosphate buffered saline) al 0,1%, después se bloquearon con BSA (bovine serum albumin/PBS al 1%). La expresión de la proteína AAT total se analizó mediante incubación con el anticuerpo anti-AAT B9 (sc-59438 Santa Cruz Biotechnology). Para la identificación específica de los polímeros de AAT se utilizó el anticuerpo AAT D11 (proporcionado por Sabina Janciauskiene, Hannover). Se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón FICT IGG (Sigma F0257). Se realizó la tinción con 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI, Sigma) para visualizar los núcleos celulares. Las preparaciones fueron examinadas bajo un microscopio de fluorescencia Zeiss Ax10.

9. Análisis transcriptómico de organoides de hígado (RNASeq)

Se aisló el RNA total de células organoides de hígado utilizando TriReagent (Sigma) seguido de un paso de digestión con DNasa I para asegurar que las muestras no estuvieran contaminadas con DNA genómico. La pureza y calidad del RNA se evaluó utilizando el kit nano Agilent RNA 6000 y el bioanalizador Agilent 2100. Se utilizó el kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina) para la preparación de las librerías. La secuenciación de la librería se realizó en el servicio de Genómica (ISCI) en un secuenciador NextSeq500 (Illumina) utilizando lecturas 2x75pares de bases. Los datos obtenidos del RNASeq fueron analizados por la Unidad de Bioinformática (ISCI).

Primero, se llevó a cabo un análisis de control de calidad mediante fastQC v0.11.3 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) y se eliminaron las secuencias adaptadoras y los extremos 3' de baja calidad utilizando Trimmomatic v0.36. Las lecturas de alta calidad se mapearon contra el genoma humano Hg38 usando Tophat v2.0.14 y el control de calidad del mapeo se realizó usando RseQC v2.6.4. La predicción del transcriptoma y la cuantificación del gen/isoforma se calcularon utilizando Cufflinks v2.2.1 basado en los genes de referencia RefSeq del Hg38. Finalmente, el análisis de expresión diferencial se realizó mediante cuffdiff. Se consideraron genes diferencialmente expresados significativos aquellos en los que el valor FDR (False Discovery Rate) < 0,05. El paquete CummeR bund R (v2.14.0) se utilizó para el control de calidad y la visualización de resultados.

El análisis de anotación funcional se llevó a cabo con diferentes herramientas bioinformáticas. Para la anotación funcional se utilizó DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH <https://david.ncifcrf.gov/> (Huang et al. 2009). Los recursos bioinformáticos de DAVID consisten en una base de conocimientos biológicos integrados y herramientas analíticas destinadas a extraer sistemáticamente el significado biológico de grandes listas de genes o proteínas. También utilizamos *hiPathia* para la interpretación de cambios combinados de los niveles de expresión génica de varios genes, en el contexto de vías de señalización, aportándonos

información sobre las diferentes funcionalidades celulares activadas o desactivadas en ellas. El recurso de *hiPathia* está disponible en la web <http://hipathia.babelomics.org/> (Hidalgo et al. 2017). Por otro lado, la herramienta web *STRING* <https://string-db.org/> (Szklarczyk et al. 2019), nos ha permitido establecer las interacciones funcionales de las proteínas en la célula. La base de datos *STRING* tiene como objetivo recopilar, calificar e integrar todas las fuentes disponibles públicamente de información de interacción proteína-proteína, y complementarlas con predicciones computacionales. Su objetivo es lograr una red global integral y objetiva, que incluya interacciones directas (físicas) e indirectas (funcionales).

10. Validación de marcadores de diferenciación y de genes diferencialmente expresados por QT-PCR

Para la validación de marcadores de diferenciación se extrajo RNA total utilizando TriReagent (Sigma) de diferentes muestras de organoides, células HepG2 y una biopsia hepática control. Para la validación de genes diferencialmente expresados se extrajo el RNA de organoides hepáticos MM y ZZ. La síntesis de cDNA se realizó mediante el kit Maxima First Strand (Thermo Scientific, Fermentas Life Sciences).

La expresión de los genes de los marcadores de células progenitoras y ductales, LGR5 (Receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repetición rica en leucina) y KRT19 (Queratina 19), y los genes de marcadores de diferenciación ALB (albúmina), APOB (apolipoproteína B) y CYP3A4 (citocromo P450 3A4,) fueron analizados por PCR cuantitativa, QT-PCR. La QT-PCR se realizó por triplicado utilizando Taqman Fast Advance Master Mix (Applied BioSystems) y cebadores específicos y sondas Taqman, Universal Probe Library, UPL, (Roche) (**Tabla 7**). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C durante 20 segundos, 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 3 segundos, annealing a 60°C durante 30 segundos.

Tabla 7. Cebadores específicos y sondas para la amplificación por QT-PCR de los genes *LGR5*, *KRT19*, *ALB*, *APOB* y *CYP3A4*.

NOMBRE GEN	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Sondas Universal Librería para humanos (Roche)
LGR5	accagactatgcctttggaaac	ttcccaggaggatggattctat	#78, cat.no. 04689011001
KRT19	gccactactacacgaccatcc	caaacttggttcggaagtcac	#71, cat.no. 04688945001
ALB	agaggtctcaagaacctaggaaa	ggttcaggaccacggataga	#44, cat.no. 04688040001
APOB	acagctgattgaggtgtcca	agccactggaggatgtgagt	#90, cat.no. 04689151001
CYP3A4	aagaaactgagtcacaaaagc	ccagcaaaaataagataattgattg	#50, cat.no. 04688112001

El análisis de expresión de los genes *PRAP1* (Proteína ácida rica en prolina 1) y *SQSTM1/P62* (Sequestosoma-1) mediante QT-PCR se realizó utilizando sondas específicas de ambos genes TaqMan Gene Expression Assays (*SQSTM1/P62*, Hs01061917_g1 y *PRAP1*, Hs01583862_g1). El ensayo se realizó por triplicado a partir de RNA extraído de organoides MM y ZZ diferenciados a hepatocitos. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C durante 20 segundos, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, annealing a 60°C durante 20 segundos.

La QT-PCRs en ambos casos se realizaron en el sistema QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific) y el análisis de los resultados se realizó utilizando el software QuantStudio Design and Analysis Software v1.4.3. Se usó el gen β -*ACTINA*, como control endógeno. La expresión génica relativa se calculó mediante el método Ct comparativo, obteniendo el valor fold-change (DDCt).

11. Análisis de expresión de los transcritos del gen *SERPINA1*

La expresión de los transcritos alternativos (AAT-1A, -1B, -1C, y ST1C4) del gen *SERPINA1* se analizó a partir de RNA de organoides MM y ZZ en condiciones de expansión (EM) y diferenciación (DM). Para la QT-PCR se utilizaron cebadores específicos para amplificar los diferentes transcritos alternativos generados por el uso de diferentes promotores y *splicing* alternativo entre los exones no codificantes 1A, 1B y 1C y mediante condiciones descritas previamente (Matamala et al. 2015). La expresión de los transcritos pequeños ST1C4 del *SERPINA1* se realizó con las condiciones previamente descritas (Matamala et al. 2017).

12. Estimulación con OSM, IL6 y LPS en organoides

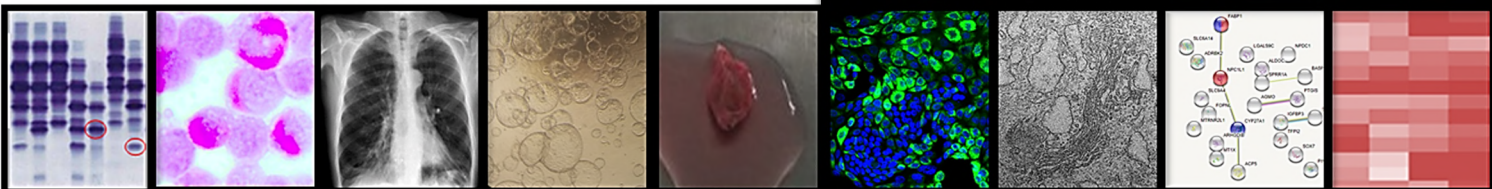
Se analizó la respuesta de la expresión del gen *SERPINA1* al tratamiento con diferentes factores externos como la Oncostatina M (OSM), la Interleuquina-6 (IL6) y el Lipopolisacárido bacteriano (LPS), en cultivos de organoides de hígado de pacientes con diferentes genotipos MM, MI, MZ y ZZ. Los cultivos se trataron con: Oncostatin M (50ng/ml) (OSM: rhOncostatin M recombinante E. Coli humano, RD Systems 295-OM); IL6 (12.5 ng/ml) (IL6 citoquina recombinante E. Coli) y Lipopolisacárido LPS (100ng/ml) (LPS-EB Gram-negativa E. coli 0111: B4). En el día 14 del proceso de diferenciación de los organoides, se añadieron los diferentes factores OSM, IL6 y LPS (2 réplicas experimentales para cada estímulo) en la concentración final indicada anteriormente. Después de 16 h de incubación, se recogieron las células y se cuantificó la expresión de los diferentes transcritos de *SERPINA1*. En paralelo se cultivaron 6 pocillos de organoides diferenciados sin tratamiento para utilizarlos como control. Se utilizó la prueba t de Student para comparar la expresión génica entre los controles y las células estimuladas. Se consideraron valores estadísticamente significativos si $p < 0,05$.

13. Análisis ultraestructural de organoides de hígado mediante microscopía electrónica de transmisión.

Se prepararon organoides de hígado diferenciados y organoides sin diferenciar, tratados con OSM y sin tratar, y se realizó un análisis estructural mediante microscopía electrónica de transmisión. Las condiciones de cultivo y tratamiento de los organoides con OSM fueron las mismas que las utilizadas para la estimulación. Una vez tratados con OSM se recogieron los organoides y se procedió a eliminar al máximo la matriz. Para ello se añadieron 4 veces 15 ml de medio basal, se volteó con la mano varias veces y se dejaron reposar durante 30 minutos cada vez. Seguidamente se fijaron químicamente durante 2h a 4°C con una solución de *para*-formaldehído 4% (Ultra Pure EM Grade, Polysciences Inc., Philadelphia, USA) y glutaraldehído 2% (EM Grade, TAAB Laboratories Equipment Ltd., Berks, UK) en tampón fosfato sódico 0,1M pH 7,4. Transcurrido el tiempo de fijación los organoides se lavaron tres veces con tampón fosfato sódico y se fijaron de nuevo durante 1h a 4°C con una solución de tetróxido de osmio 1% y ferricianuro potásico 1%; se lavaron con agua bidestilada y se incubaron con ácido tánico 0,15% en tampón fosfato sódico a temperatura ambiente durante 1 min, tras el cual se tiñeron 45 min a temperatura ambiente con acetato de uranilo (2% en agua bidestilada). Tras la deshidratación con concentraciones crecientes de etanol (50; 75; 95 y 100%), en tratamientos de 10 min a 4°C, los organoides se incluyeron en resina tipo epoxi (PELCO® Eponate 12TM kit) que se polimerizó 48h, 60 °C en capsulas BEEM®.

Una vez polimerizadas, se cortaron secciones ultrafinas (50-70nm) usando una cuchilla de filo de diamante (DIATOME) en un ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH). Las secciones ultrafinas se depositaron sobre rejillas de cobre de 100 mesh recubiertas de plástico (Formvar®), se dejaron secar y se tiñeron a temperatura ambiente con acetato de uranilo saturado 21 min y citrato de plomo 1 min. Las secciones se observaron en un microscopio electrónico FEI Tecnai 12 equipado con un filamento de LaB6 operado a 120 kV. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital FEI Ceta a varias magnificaciones. Todo el protocolo se realizó con el soporte de la Unidad de Microscopía Electrónica del ISCIII.

Resultados



RESULTADOS

Hasta el comienzo de esta tesis doctoral el laboratorio de Genética Molecular del IIER ha dedicado todos sus esfuerzos al estudio de variantes descritas y no descritas con el objeto de analizar el efecto funcional en la enfermedad pulmonar producida por el DAAT. Por otro lado, y dado que la enfermedad hepática en el DAAT está poco estudiada, nos planteamos en esta tesis además de continuar estudiando la base genética del DAAT, investigar aspectos moleculares que tienen lugar en la enfermedad hepática en estos pacientes. Concretamente hemos iniciado el establecimiento de un nuevo modelo de cultivo 3D de organoides para el estudio de la enfermedad hepática en pacientes con DAAT. De este modo avanzaremos en la investigación de la enfermedad en dos niveles: 1) la mejora del conocimiento de las variantes genéticas que dan lugar al déficit y sus implicaciones a nivel de afectación tanto pulmonar como hepática y 2) contribuyendo a ampliar el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad hepática que son menos conocidos, mediante organoides de hígado.

1. MECANISMOS DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN EN EL DAAT. NUEVAS VARIANTES GENÉTICAS

Durante los últimos años el laboratorio de genética molecular del IIER ha investigado las bases genéticas del DAAT. De esta forma hemos podido identificar y caracterizar previamente algunas de las nuevas variantes genéticas que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad (Matamala et al. 2017; Matamala et al. 2018). La gran variabilidad que presenta el gen *SERPINA1* hace que sigamos identificando variantes raras que necesitan ser estudiadas funcionalmente para identificar su carácter patogénico y por tanto su relación con la enfermedad.

1.1 Identificación de nuevas variantes no descritas

Tras el genotipado de las variantes más frecuentes S y Z, detectamos tres pacientes en los que el nivel de AAT en suero no se explicaba con el genotipo inicial (basado en la presencia de S y/o Z). Las características clínicas y el genotipo final de estos pacientes se muestran en la **Tabla 8**. El caso 1 tenía un genotipo SS, con un valor de AAT en suero de 54 mg/dL; el caso 2 tenía genotipo MS y unos niveles de AAT de 74 mg/dL; y el caso 3 tenía un genotipo también MS con nivel de AAT en suero de 71 mg/dL. En todos ellos el nivel en suero de AAT era claramente discordante con el genotipo inicial. Según los algoritmos de estudio de DAAT, en estos casos es necesario secuenciar los exones del gen *SERPINA1* para identificar otras variantes más raras que expliquen la disminución del nivel de AAT en el suero.

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes con las dos nuevas variantes identificadas en el alelo S.

Caso	Género	Edad (años)	Indicación para AAT screening	Fumador	Paquete cigarrillos/año	Diagnóstico	AAT suero (mg/dl)	Fenotipo proteína	Genotipo
1	Masculino	58	Enfermedad pulmonar	Exfumador	40	EPOC	54	SS	S/S+p.Tyr138Cys
2	Masculino	28	Hepatopatía	Nunca	0	-	74	MM	M/S+p.Tyr138Cys
3	Femenino	62	Enfermedad pulmonar	Exfumador	90	EPOC, BE	71	MM	M/S+p.Pro391Thr

†EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. BE: Broncoectasia.

Se analizó la secuencia codificante completa (exones 2 al 5) del gen *SERPINA1* en estos tres pacientes. Se identificaron dos nuevas variantes de cambio de sentido previamente no descritas. Los casos 1 y 2 compartían una variante en el exón 2 (NM_000295.4: c.485A>G; p. Tyr138Cys). En el paciente 3 se identificó la variante (NM_000295.4: c.1243C>A; p. Pro391Thr) en el exón 5.

1.2 Fenotipo proteico

En los casos discordantes es aconsejable realizar el fenotipo proteico mediante isolectroenfoque (IEF). El fenotipo proteico de AAT en estos tres casos demostró que no se ajustaba al fenotipo esperado en base al genotipo (SS, MS) de estos pacientes, siendo compatible con la pérdida del alelo S en los tres casos (**Figura 18**). No se encontraron bandas aberrantes en el perfil proteico que estuvieran causadas por las nuevas variantes encontradas. Todo sugería que las variantes nuevas encontradas pudieran estar en el mismo alelo que la variante S, y que esta combinación produjera la eliminación de este alelo en el suero de los pacientes, es decir se comportaban como alelos nulos.

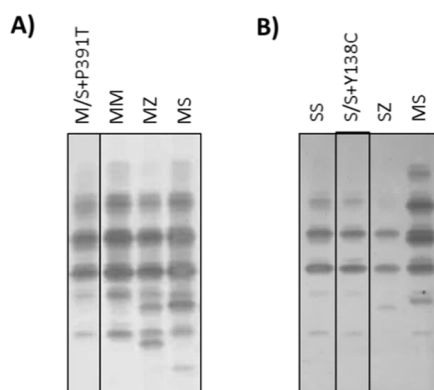


Figura 18. Electroforesis de IEF en muestras de plasma de sujetos con diferentes genotipos *SERPINA1*. A) El plasma del paciente 3 con el genotipo M/S+Pro391Thr muestra un fenotipo de proteína MM, compatible con un fenotipo M nulo. B) El plasma del paciente 1 con el genotipo S/S+Tyr138Cys muestra un fenotipo SS, compatible con un fenotipo S nulo.

1.3 Haplotipo de las nuevas variantes. Localización en cis con la variante S

Para establecer la fase en la que se encontraban las variantes, en los casos 1 y 2 se realizó mediante segregación familiar ya que se disponía de muestra de familiares. En el caso 3 se llevó a cabo una amplificación alelo específica del alelo S. De esta forma se confirmó que ambas estaban en configuración *cis* con el alelo S.

La combinación de las nuevas variantes con la variante S en un mismo haplotipo da lugar a establecer un nuevo tipo de alelos que hemos denominado alelos S-plus asociados al DAAT.

- **Alelo S-plus (Tyr138Cys), QOVigo**

Los pacientes 1 y 2 son portadores de este alelo en heterocigosis. El paciente 1 es ex fumador de 40 años (40 paquetes año) con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y con función pulmonar de FVC 113%, FEV1 41%, FEV1/FVC 28%. La última evaluación por tomografía computarizada (TC) del pulmón reveló enfisema pulmonar con lesiones fibróticas residuales. El paciente fue diagnosticado inicialmente con genotipo SS, con una concentración sérica de AAT de 54 mg/dl.

El paciente 2 es un hombre de 28 años, no fumador, sin evidencia de enfermedad pulmonar, pero con signos de hepatopatía (enzimas hepáticas elevadas) que dio lugar al análisis de los niveles de AAT. Su diagnóstico genético inicial fue genotipo MS, con una concentración sérica de AAT de 74 mg/dl. El fenotipo de la proteína fue analizado por IEF mostrando un fenotipo compatible con MM.

El análisis de secuencia en ambos pacientes reveló una transición A> G en el exón 2 (NM_000295: c.485A> G) que produce un cambio de aminoácido de tirosina a cisteína en el codón 138 (Tyr138Cys) de la proteína madura. El cribado familiar en ambos casos mostró que esta variante se segrega con la mutación S.

- **Alelo S-Plus (Pro391Thr), QOAachen**

El paciente 3 es mujer, fumadora de 5 cigarrillos al día durante 5 años, presentaba enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) con FEV1 62% y broncoectasia (BE). No presentaba evidencias de fibrosis hepática, pero tenía esteatosis o hígado graso con enzimas hepáticas normales. El genotipado inicial (alelos S y Z) reveló la presencia de la mutación S en heterocigosis, y se genotipó inicialmente como MS. Se encontró que la concentración sérica de AAT de 71 mg/dl era más baja de lo esperado según el genotipo MS. La secuenciación del DNA mostró que el paciente portaba la mutación S y una transversión C> A en el exón 5 (NM_000295: c.1243C> A) produciendo una sustitución de prolina por treonina (Pro391Thr) en la proteína madura. La

PCR alelo específica del alelo S seguida de secuenciación confirmó que la nueva variante estaba en el alelo S (**Figura 19**). El fenotipo proteico por isoelectroenfoque IEF del suero del paciente reveló un fenotipo MM inesperado (**Figura 18**).

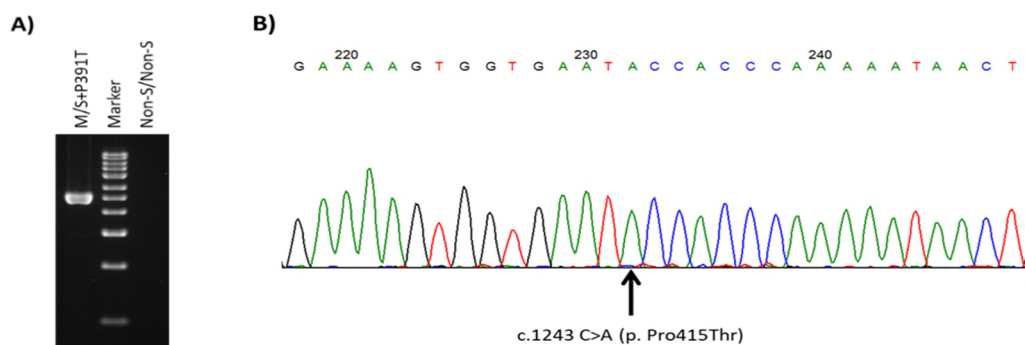


Figura 19. La PCR alelo específica del alelo S en pacientes que albergan la variante P391T. A) La PCR específica de alelo seguida de electroforesis se realizó en el paciente 3 con el genotipo M/S+P391T (primer carril) y un control negativo que consiste en DNAg de un homocigoto individual para la variante no S (tercer carril). El segundo carril muestra el marcador molecular, con bandas correspondientes a 0.5, 1, 1.5, 2, 2, 5, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 kb. B) La secuenciación del alelo amplificado mostró que la nueva variante c.1243 C>A (p. Pro391Thr) está en el alelo S.

1.4 Efecto de las nuevas variantes Tyr138Cys y Pro391Thr *in silico*

Para investigar el impacto patogénico de estas variantes en la secuencia del gen y de la proteína, analizamos su frecuencia alélica, la conservación de los aminoácidos afectados y la localización en la estructura terciaria de proteínas mediante análisis *in silico*. Ninguna de las dos variantes Tyr138Cys ni Pro391Thr se encontraron descritas en ninguna de las bases de datos genéticas consultadas (*dbSNP*, *ExAC* y *gnomAD*), indicando que no son polimorfismos frecuentes en la población.

Los predictores *in silico* de función clasifican ambas variantes como patogénicas por los algoritmos SIFT (score: 0) y Condel (score: 0.945), y como probablemente patogénicas por Polyphen (score: 1). Otros predictores como CADD las clasifican como probablemente deletéreas (PHRED-scaled CADD: 25 y 27.5 para Tyr138Cys y Pro391Thr, respectivamente), indicando que estas sustituciones estarían entre el 1% más perjudicial del genoma humano.

En cuanto al aminoácido que se encuentra afectado en estas variantes Tyr138Cys y Pro391Thr ambas afectan a un residuo altamente conservado en la proteína AAT (**Figura 20A**). Pro391 se encuentra en la región C-terminal, muy cerca de la mutación S en la estructura terciaria de la

proteína. La Tyr138 se localiza al final de la hélice α (E) en el lado opuesto de la proteína donde se encuentra la mutación S (Glu264Val) (**Figura 20B**).

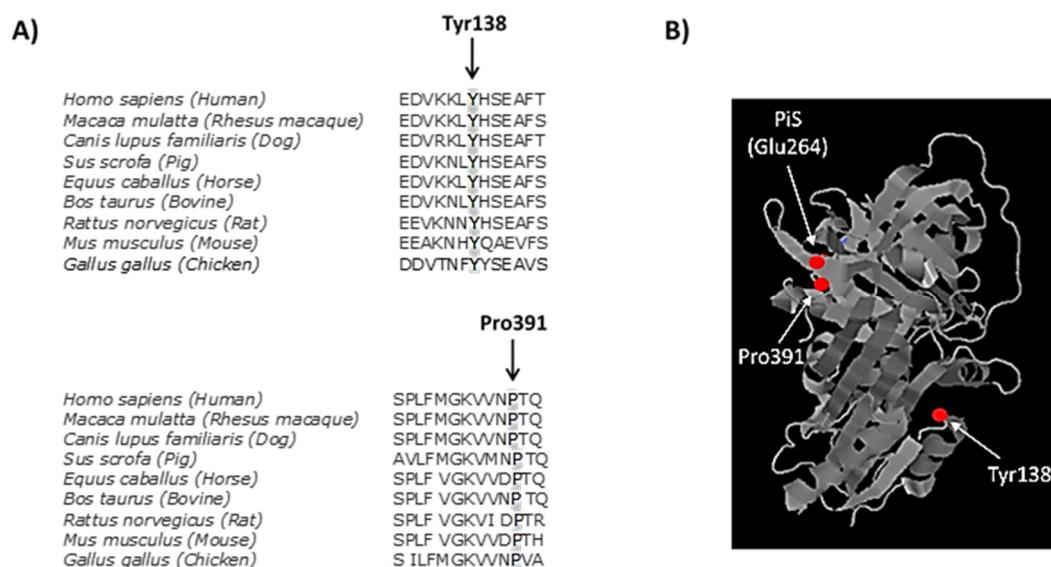


Figure 20. Caracterización de los residuos de aminoácidos afectados por las sustituciones Tyr138Cys y Pro391Thr. A) Conservación de Tyr138 y Pro391 entre varios ortólogos *SERPINA1*. B) Localización de Tyr138, Pro391 y Glu264 (mutación S) en la estructura terciaria AAT.

1.5 Polimerización y disminución de la secreción de AAT de las nuevas variantes S

Para comprobar experimentalmente el efecto funcional de estas variantes, se realizaron ensayos funcionales para evaluar su patogenicidad analizando la formación de polímeros de AAT y la secreción al medio extracelular.

Se estudió la acumulación intracelular y la secreción de AAT de las dos nuevas variantes en cis en el alelo S. Para ello, se transfectaron células HEK293T con plásmidos que expresan *SERPINA1* wt, así como de la variante S (E264V), y se comparó con el efecto de la variante Tyr138Cys (Y138C), la combinación de las variantes S+Y138C, la variante Pro391Thr (P391T) y su combinación S+P391T.

- **Presencia de agregados de AAT**

Los resultados del análisis de la presencia de agregados de AAT en células transfectadas con las nuevas variantes se muestran en la **Figura 21**. Las células que expresan wt-AAT son negativas para la tinción de PAS, mientras que al expresar la variante S-AAT mostraron algunas células

positivas para PAS, características de la acumulación intracelular de AAT. Las células que expresan Y138C y P391T AAT mostraron agregados intracelulares positivos para PAS, ya sea cuando la variante estaba sola o en combinación con la mutación S. En el caso de Y138C, se observó un aumento del doble en el número de células PAS positivas cuando esta variante se combinó con la variante S, lo que sugiere la síntesis de una AAT más polimerigénica cuando ambas variantes están presentes. En el caso de la variante P391T presentó alrededor de un 30% de células PAS+ que se incrementaba hasta un 55% al combinarse esta variante con la mutación S (Figura 21).

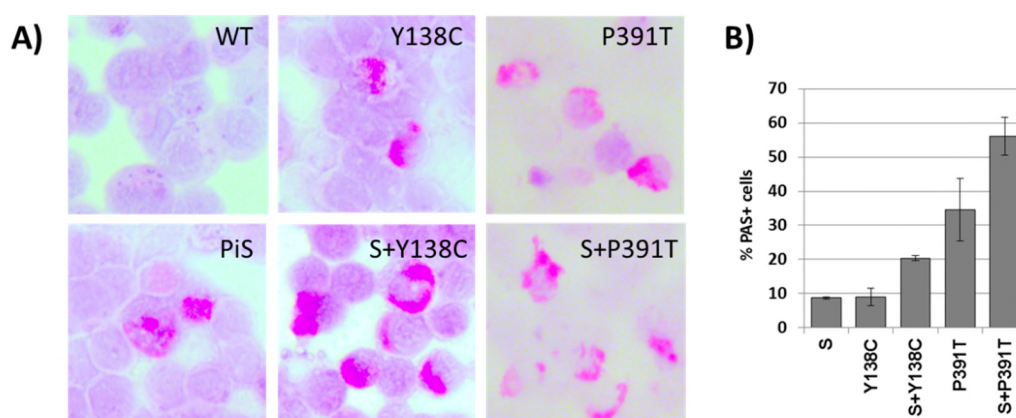


Figura 21. A) Agregados de AAT detectados por tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) en células HEK293T transfectadas con plásmidos que expresan *SERPINA1* wt o diferentes mutantes: S (E264V), Y138C, S+Y138C, P391T y S+P391T. La acumulación de AAT se ve como glóbulos magenta brillantes en el citoplasma. B) Cuantificación de células PAS + en las diferentes células que expresan mutantes AAT. Las barras muestran el porcentaje promedio de células PAS + para cada caso y las barras de error representan la desviación estándar correspondiente.

- **Aumento de polímeros de AAT en los mutantes**

Para analizar la formación de polímeros de AAT de una forma específica se evaluó la presencia de polímeros y monómeros AAT que expresan las variantes mediante western blot, tanto en el extracto celular como en la fracción insoluble donde se quedan retenidos los polímeros, y en el medio extracelular (Figura 22).

Las células transfectadas con wt-AAT o con el vector vacío no muestran cómo era esperable formación de polímeros de AAT (fracción insoluble). Sin embargo, sí que se detectan polímeros AAT en células que expresan la mutación S y en el resto de mutantes de forma significativa. De forma similar a lo que ocurría con la tinción de PAS, las células que expresan Y138C y P391T AAT también presentaron polímeros de AAT, solos o en combinación con el mutante S. La proporción de AAT en la fracción insoluble del doble mutante S+Tyr138Cys aumentó del 25% (mostrado solo

por Tyr138Cys) al 79% (**Figura 22A**). En el caso de Pro391Thr, el porcentaje de proteína AAT en la fracción insoluble fue del 82%, y aumentó al 98% cuando se expresó la combinación de S+Pro391Thr (**Figura 22B**).

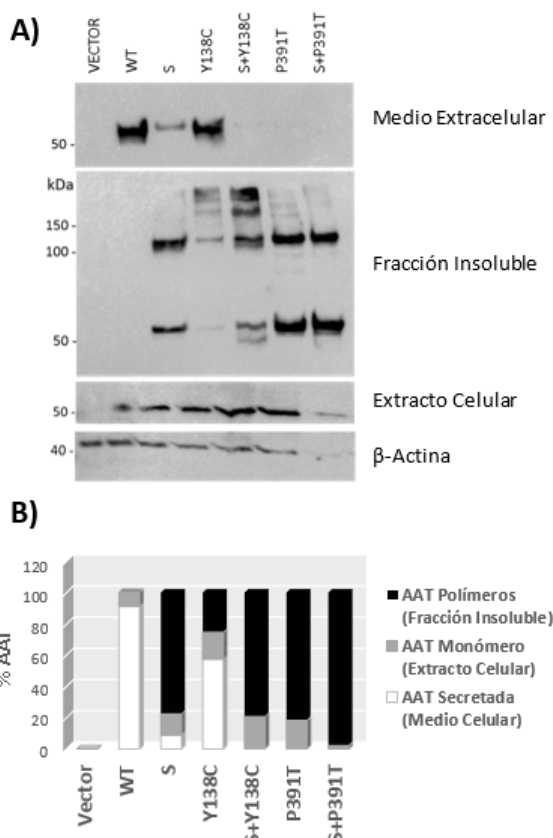


Figura 22. AAT retenido en la fracción insoluble de las células HEK293T (arriba) o secretada en el medio celular (abajo), detectado por Western blot. Las células HEK293T se transfectaron con plásmidos que expresaban *SERPINA1* wt o diferentes mutantes: S (E264V), Y138C, S+Y138C, P391T y S+P391T. Se cuantificaron las bandas de AAT con image J de la fracción insoluble, extracto y medio celular.

2. MECANISMOS DE GANANCIA DE FUNCIÓN EN EL DAAT. ORGANOIDES DE HÍGADO

La alfa-1 antitripsina (AAT) se sintetiza de forma mayoritaria en hepatocitos. Muchas mutaciones dan como resultado proteínas mal plegadas que tienen una elevada tendencia a polimerizar, acumulándose en el interior de las células y, por tanto, aumentando el riesgo de enfermedad hepática, siendo la mutación clínicamente más relevante la Z (Glu342Lys). Hasta el momento, la relación entre la acumulación de Z-AAT y el daño de las células hepáticas sigue sin entenderse completamente debido a la ausencia de un modelo celular que permita su estudio.

En esta tesis, hemos desarrollado organoides de hígado a partir de biopsias hepáticas de pacientes con DAAT con diferentes genotipos, tanto homocigotos (ZZ) como heterocigotos (MZ), y comparado con organoides con genotipo normal de AAT (MM). Las características típicas de la enfermedad hepática asociada a DAAT se analizaron en términos de polimerización y secreción de AAT, así como de expresión e inducción transcripcional del gen *SERPINA1* en organoides sometidos a estímulos externos.

2.1 Establecimiento de cultivos tridimensionales de organoides hepáticos

Para estudiar las características del déficit de alfa 1 antitripsina en un modelo celular se establecieron cultivos 3D de organoides hepáticos. Hemos establecido 25 líneas de organoides procedentes de biopsias hepáticas humanas mediante el aislamiento de células ductales y las condiciones de cultivo adecuadas para la expansión y diferenciación a hepatocitos. En la **Figura 23** se ilustran las diferentes etapas de aislamiento, expansión y diferenciación del organoide hepático. Una vez establecidos los cultivos se llevó a cabo el genotipado de las líneas de organoides para conocer el estatus del gen *SERPINA1*, lo que nos permitió identificar 3 mutantes con genotipos MI, MZ y ZZ y 22 organoides con genotipo normal que nos sirven como controles MM.

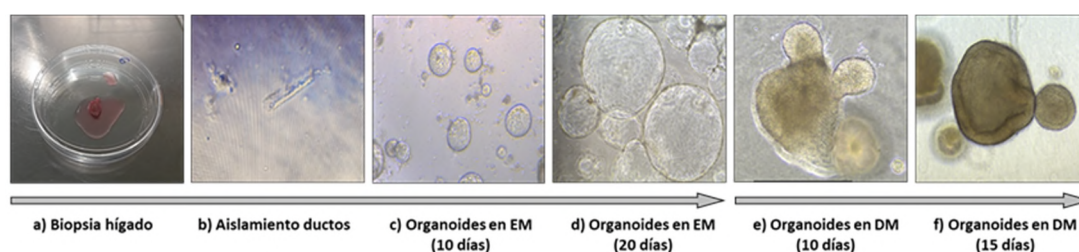


Figura 23. Imágenes representativas de la expansión y diferenciación de organoides hepáticos. a) Los organoides hepáticos humanos se obtuvieron de una biopsia hepática de pacientes. b) Se aíslan las células ductales, c y d) Se desarrollan los organoides hepáticos al crecer en un medio de expansión (EM) y matrigel 3D. e y f) Cultivados en medio de diferenciación (DM) dan lugar a organoides diferenciados (aumento 10x). Microscopio Leica DMIL LED, cámara Leica MC170HD.

2.2 Expresión de marcadores de hepatocitos en organoides diferenciados.

Una vez establecido el cultivo 3D, la expansión en cultivo de las células madre adultas del hígado y su diferenciación a hepatocitos, se evaluó la expresión de ciertos marcadores de células progenitoras, ductales y de hepatocitos en organoides MM y ZZ mediante RT-qPCR, para comprobar que la diferenciación había tenido lugar (**Figura 24**).

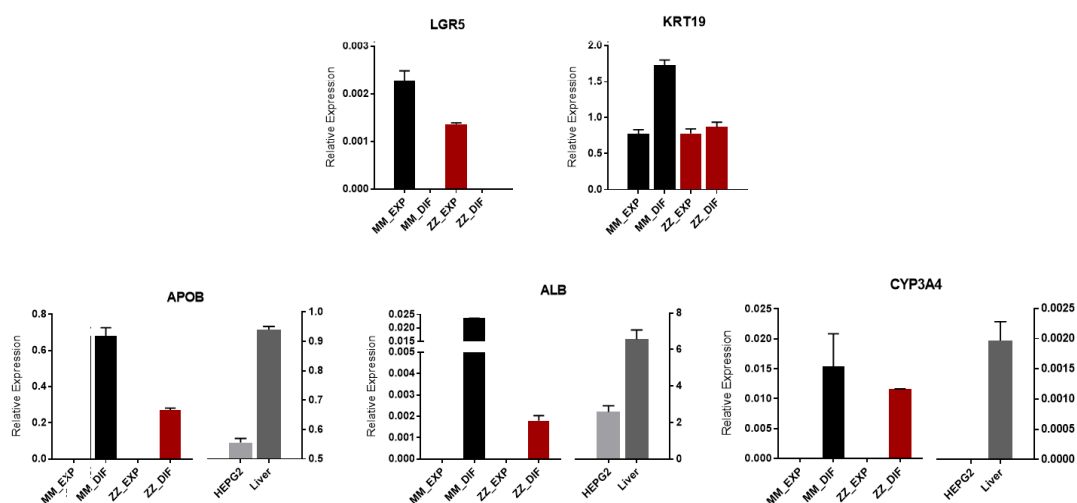


Figura 24. Análisis de expresión génica de marcadores de diferenciación en organoides MM (negro) y ZZ (rojo) en condiciones de expansión y diferenciación, en células HepG2 (gris claro) y en hígado (gris oscuro): marcadores de células pluripotentes (LGR5), células ductales (KRT19) y hepatocitos diferenciados (ALB, APOB y CYP3A4).

Como era de esperar, tanto los organoides MM como ZZ al crecer en medio de expansión (EM) expresaron marcadores de linaje de células progenitoras (LGR5) y ductales (KRT19), pero estos marcadores desaparecieron después de la diferenciación. Por el contrario, los organoides cultivados en medio de diferenciación (DM) expresaron genes de hepatocitos maduros altamente expresados, como la albúmina (ALB), la apolipoproteína B (APOB) y el citocromo P450 3A4 (CYP3A4), que no se detectaron en cultivos de organoides hepáticos no diferenciados. Sorprendentemente, los organoides ZZ, en comparación con los organoides MM, mostraron una menor expresión de los marcadores de hepatocitos APOB y ALB.

2.3 Perfil de expresión en organoides hepáticos.

Además de analizar estos marcadores específicos de células progenitoras indiferenciadas del hígado y de hepatocitos diferenciados, realizamos un análisis del transcriptoma por RNA-Seq para comparar la expresión génica en organoides hepáticos indiferenciados y diferenciados independientemente de los genotipos. Como era de esperar, se encontró una gran cantidad de genes significativos diferencialmente expresados (DEG) (3097 genes) entre los organoides no diferenciados y diferenciados. Los primeros 100 genes diferencialmente expresados estadísticamente más significativos se ilustran en la **Figura 25**, que incluyen 47 genes up-regulados y 53 down-regulados después de la diferenciación. Se pueden encontrar unas listas

completas de los 100 principales DEG en organoides diferenciados en las tablas complementarias 1 y 2.

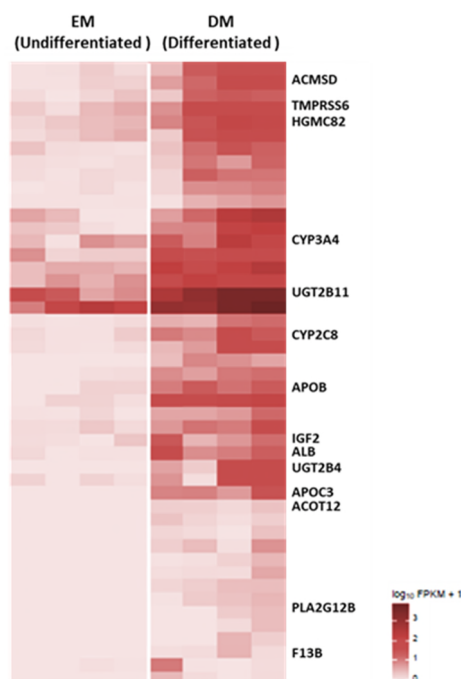


Figura 25. Análisis de expresión génica en organoides de hígado humanos: Heatmap de genes diferencialmente expresados UP regulados entre organoides no diferenciados (EM) y organoides diferenciados en hepatocitos (DM). Algunos de los genes de hepatocitos maduros más relevantes están representados en el lado derecho. El color más oscuro significa niveles de expresión más altos.

Los genes altamente inducidos incluyen genes típicos de hepatocitos maduros, descritos previamente por otros autores (Hsiao et al. 2001; Su et al. 2002). Nuestros resultados confirmaron que los organoides diferenciados, independientemente del genotipo AAT, muestran una mayor expresión de genes específicos de hepatocitos como el de Albumina (ALB), Apolipoproteína B (APOB), apolipoproteína C3 (APOC3), citocromos como CYP3A4, CYP2C8 (miembro 8 de la subfamilia C de la familia 2 del citocromo P450), así como enzimas metabólicas como Fosfolipasa A2 Grupo XIIB (PLA2G12B), Acil-CoA Thioesterasa 12 (ACOT12), UDP Glucuronosyltransferasa Family 2 Member B4 (UGT2B4), Insulin Like Growth Factor 2 Receptor (IGF2R), UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B11 (U11) -Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 2 (HMGCS2), serina proteasa transmembrana 6 (TMPRSS6), descarboxilasa de semialdehído de aminocarboxiamconato (ACMSD) y cadena B del factor de coagulación XIII (F13B).

Los genes reprimidos en organoides diferenciados a hepatocitos que se detectaron, son la mayoría genes implicados en el ciclo celular y su regulación. El gen *SHCBP1* (*SHC Binding and Spindle Associated 1*) que juega un papel importante en la proliferación, crecimiento y diferenciación celular, y el gen *CCNB2* (*Cyclin B2*) que participa en el control de la transición de fase G2 a M durante la mitosis. Por otro lado, también se encuentra reprimido el gen *NR4A1* que es un receptor nuclear que actúa en combinación con *NURR1* regulando la expresión génica durante la regeneración hepática.

2.4 Expresión de transcritos del gen *SERPINA1* en organoides de hígado en condiciones de expansión (EM) y diferenciación (DM)

La enfermedad hepática en el DAAT está muy en relación con una producción elevada de AAT junto con procesos de degradación de la misma con una eficacia disminuida. La síntesis de AAT se incrementa mucho en respuesta a situaciones de estrés o estímulos inflamatorios o infecciosos. Conocer la regulación de la expresión del gen *SERPINA* ante diferentes estímulos en hígado no está muy estudiada. Por eso nos propusimos estudiar la expresión de los diferentes transcritos de *SERPINA1* y su respuesta ante diferentes señales en los organoides derivados de pacientes y controles. Analizamos la expresión tanto de los transcritos completos, derivados de los diferentes promotores localizados en los exones no codificantes (1A, 1B y 1C), como de los transcritos pequeños, producidos por *splicings* alternativos en los que únicamente se mantienen los exones 4 y/o 5 del gen *SERPINA1* (ST1C4 y ST1C5) (Matamala et al. 2017) en organoides hepáticos derivados de MM y ZZ-AAT (**Figura 26**).

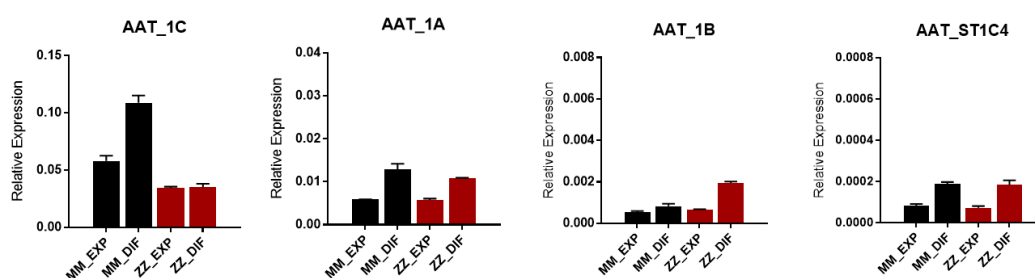


Figura 26. Análisis de expresión génica de transcritos alternativos del gen *SERPINA1* (1C, 1A y 1B) y del transcrito pequeño (ST1C4) en organoides MM (negro) y ZZ (rojo) en condiciones de expansión y diferenciación.

Se observó una mayor expresión en organoides diferenciados MM y ZZ de todos los transcritos del gen *SERPINA1* que en organoides no diferenciados, lo que indica que el gen *SERPINA1* se induce con el proceso de diferenciación en los hepatocitos. Además, los niveles de expresión de

SERPINA1 fueron mayores en organoides diferenciados MM que en los ZZ. Curiosamente, en los organoides ZZ, la expresión del transcrito 1C, el transcrito principal en hepatocitos maduros no se vio aumentado durante el proceso de diferenciación, solo se detectó un ligero aumento en la expresión de los otros transcritos (1A y 1B) originados a partir del promotor de monocitos. En cuanto a los transcritos de pequeño tamaño, de los cuales se desconoce cuál puede ser su papel, detectamos que el transcrito ST1C4 se induce también durante el proceso de diferenciación, tanto en organoides MM como en ZZ, pero no detectamos expresión del transcritos pequeño ST1C5.

2.5 Respuesta de los transcritos del gen *SERPINA1* al tratamiento con Oncostatina M, Interleuquina 6 y Lipopolisacárido.

Después de analizar la expresión de los diferentes transcritos del gen *SERPINA1*, nos pareció interesante estudiar si los hepatocitos de los organoides diferenciados (DM) con genotipos MM, MI, MZ y ZZ, responden también en este tipo de cultivos 3D a diferentes factores, que típicamente activan la expresión AAT. De esta forma se analizó la inducción de la expresión de los diferentes transcritos del gen *SERPINA1* tras el tratamiento de los organoides con citoquinas como la Interleuquina 6 (IL6) y la Oncostatina M (OSM), y por otro lado con el lipopolisacárido bacteriano (LPS).

La OSM es una citoquina pleiotrópica que pertenece al grupo de citoquinas IL-6, conocidos inductores de la producción de AAT (Norris et al. 2014). Hemos detectado que el transcrito 1C, que se expresa mayoritariamente en los hepatocitos, se induce por OSM en todos los organoides diferenciados, más significativamente en MM y ZZ (**Figura 27**). El transcrito pequeño ST1C4 también se induce por OSM, aunque en menor medida en los organoides ZZ. Es importante señalar que, en los hepatocitos de organoides diferenciados, la OSM también indujo, aunque en menor medida la expresión de los transcritos derivados de los promotores de monocitos, 1A y 1B. Esto indica que la OSM es un factor importante que puede inducir la expresión de prácticamente todos los transcritos alternativos del gen *SERPINA1*.

Observamos que la IL6 también induce la expresión de los transcritos 1C y ST1C4 del gen *SERPINA1*, aunque parece tener menor efecto que la OSM en todos los genotipos (**Figura 28**). Esta menor inducción podría deberse a que la concentración de IL6 utilizada en el ensayo, fue más baja que la de OSM. Solamente observamos inducción significativa de la expresión de los transcritos 1A y 1B en organoides ZZ.

Al contrario que la OSM y la IL6, el estímulo de LPS no parece tener efectos significativos en la expresión del transcrito 1C, a excepción de los organoides MZ. Sin embargo, si se observó inducción de la expresión del transcrito pequeño ST1C4 en todos los genotipos (**Figura 29**).

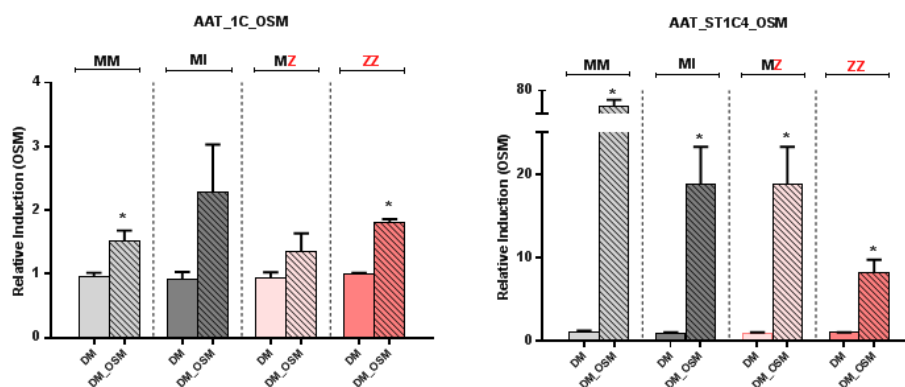


Figura 27. Inducción de transcritos del gen *SERPINA1* 1C y transcrito pequeño (ST1C4) estimulados con OSM. La expresión génica relativa de los transcritos se analizó en organoides cultivados en medio de diferenciación (DM). Los valores estadísticamente significativos se muestran con * ($p < 0.05$). MM (gris), MI (gris oscuro), MZ (rosa) y ZZ (rojo).

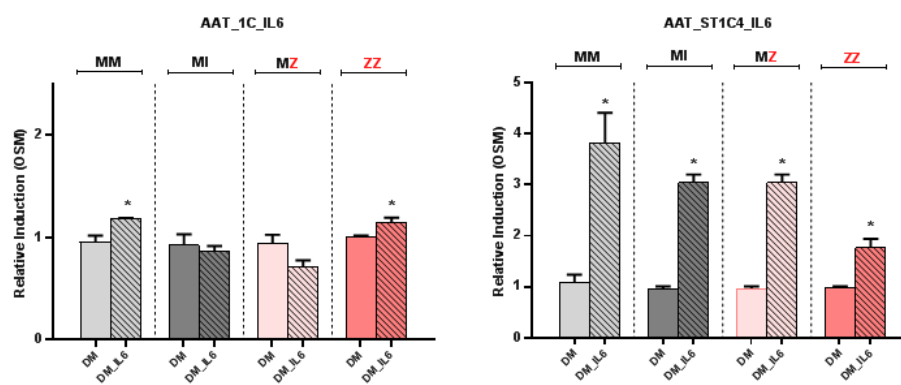


Figura 28. Inducción de transcritos del gen *SERPINA1* 1C y transcrito pequeño (ST1C4) estimulados con IL6. La expresión genética relativa de los transcritos se analizó en organoides cultivados en medio de diferenciación (DM). Los valores estadísticamente significativos se muestran con * ($p < 0.05$). MM (gris), MI (gris oscuro), MZ (rosa) y ZZ (rojo).

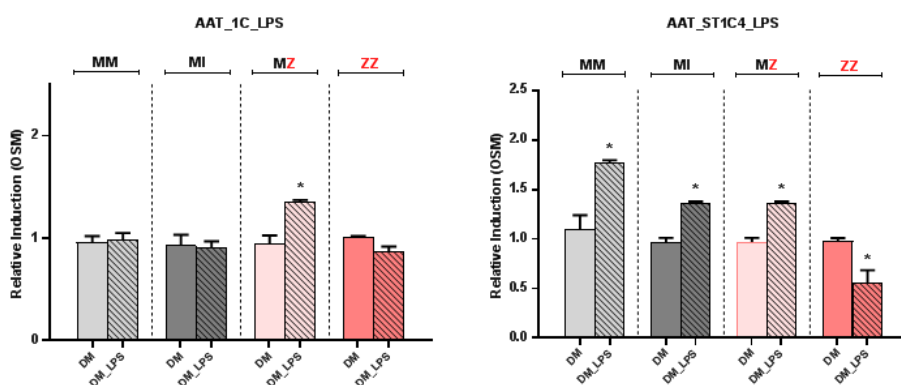


Figura 29. Inducción de transcritos del gen *SERPINA1* 1C y transcrito pequeño (ST1C4) estimulados con LPS. La expresión genética relativa de los transcritos se analizó en organoides cultivados en medio de diferenciación (DM). Los valores estadísticamente significativos se muestran con * ($p < 0.05$). MM (gris), MI (gris oscuro), MZ (rosa) y ZZ (rojo).

Cabe destacar que los tres estímulos, OSM, IL6 y LPS, inducen la expresión del transcrito pequeño ST1C4 en los organoides MM, MI, MZ y ZZ diferenciados a hepatocitos, siendo menor el efecto en los ZZ para todos ellos.

2.6 Detección de polímeros de AAT en organoides de hígado.

Estudios previos demuestran que los organoides son capaces de reproducir las características de la enfermedad. Dado que la principal característica en el DAAT es la acumulación de polímeros intracelulares, llevamos a cabo la detección de polímeros AAT mediante diferentes análisis: tinciones PAS-diestasa resistente, ensayos de inmunofluorescencia y determinación por western blot.

En biopsias de pacientes con enfermedad hepática, es característico encontrar gránulos que tiñen PAS-D positiva, indicativos de la acumulación de AAT mutada (American Thoracic Society 2003; Fairbanks et al. 2008; Janciauskiene et al. 2004). Como se esperaba, nuestros resultados mostraron una tinción PAS-D positiva en los organoides generados a partir de los pacientes ZZ. Por otro lado, resaltamos la detección de agregados PAS-D+ en organoides MZ. S, la tinción PAS-D fue negativa en organoides de pacientes AAT MM y AAT MI (**Figura 30**).

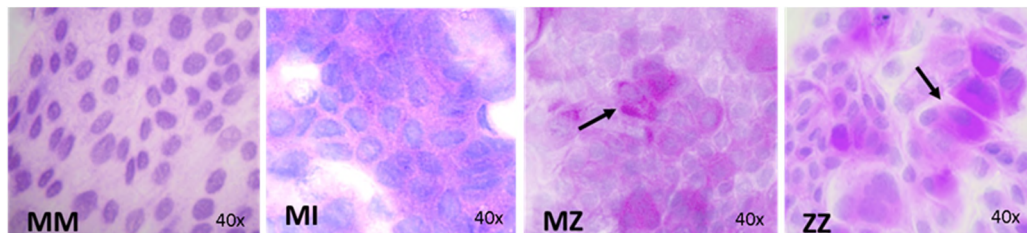
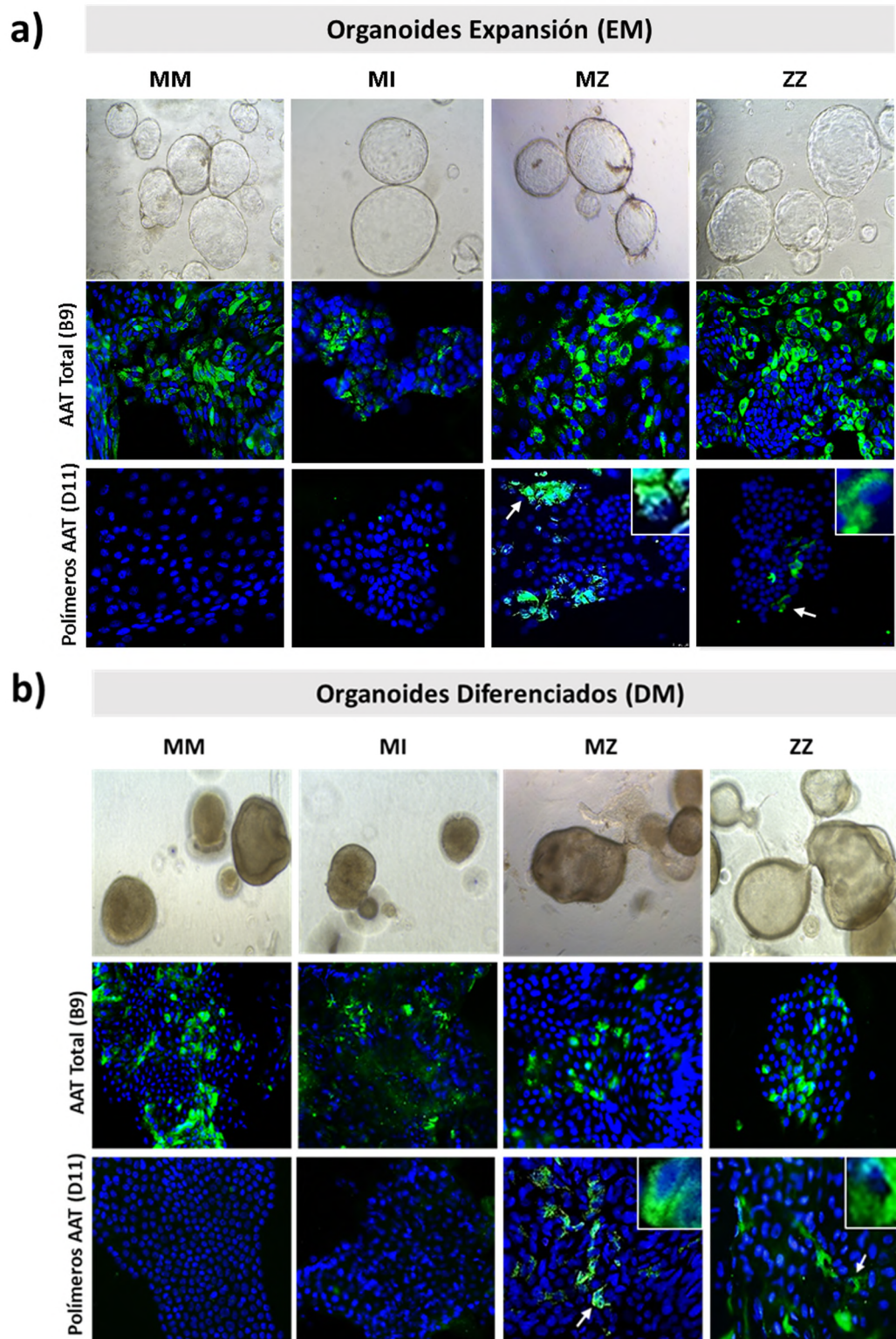


Figura 30. Tinción PAS-D para detección de agregados de proteínas Z-AAT. Los organoides diferenciados MM y MI no mostraron tinción PAS +, mientras que los organoides MZ y ZZ muestran agregados evidentes de polímeros Z-AAT. Microscopio Leica DM2000, cámara Leica DFC450 y software LAS v4 (aumento 40x).

Para detectar específicamente la proteína AAT, realizamos un segundo análisis mediante ensayos de inmunofluorescencia en organoides no diferenciados y diferenciados de pacientes MM, MI, MZ y ZZ utilizando tanto un anticuerpo que detecta AAT total en cualquiera de sus formas (B9), como otro que detecta específicamente polímeros de AAT (D11) (**Figura 31a y 31b**).

Como se esperaba, los polímeros Z-AAT eran evidentes en los organoides ZZ y MZ, pero no en organoides normales MM ni MI. En ambos casos, ZZ y MZ, los polímeros AAT se limitaron a grupos restringidos de células o a células aisladas. La cuantificación de células positivas para la tinción de polímero AAT (anticuerpo D11) reveló que los organoides MZ tenían alrededor del

5-10% de las células con acumulación de polímeros, aproximadamente la mitad de las células positivas encontradas en los organoides ZZ (10-15%) (**Figura 31c**).



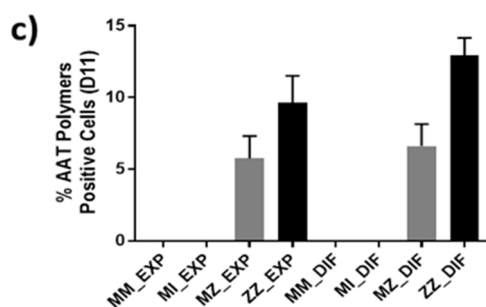


Figura 31. Inmunofluorescencia para detección de polímeros AAT y AAT. La detección específica de AAT total con anti-AAT-B9 y de polímeros AAT con anti-AAT-D11 se muestra con fluorescencia verde. **a)** Organoides sin diferenciar MM, MI, MZ y ZZ en medio de expansión (EM) **b)** Organoides diferenciados MM, MI, MZ y ZZ en medio de diferenciación (DM). Las imágenes ampliadas de células positivas se muestran en la esquina derecha de las imágenes (aumento 10x). **c)** Cuantificación de células positivas para polímeros AAT (D11) en los diferentes organoides MM, MZ y ZZ. Microscopio Zeiss Ax10, cámara Axio Cam Mrm Carl Zeiss y software AxioVision Rel.4.7 (aumento de imágenes 40x).

Finalmente, la detección de la proteína AAT tanto intracelularmente como en el medio extracelular mediante western blot, reveló que la AAT es capaz de secretarse al medio en organoides control MM y también en organoides MZ, pero que no se secretaba al medio de cultivo en organoides ZZ, de forma similar a lo que ocurre en los pacientes con déficit grave. Además, la mayor parte de la AAT en organoides ZZ se encontraba en forma de polímeros retenida en la fracción insoluble y prácticamente no se detectó proteína AAT monomérica en los extractos celulares. Por otro lado, en los organoides MZ se detecta AAT monomérica en los extractos celulares y mostraban una cantidad intermedia de polímeros de AAT en la fracción insoluble (**Figura 32**).

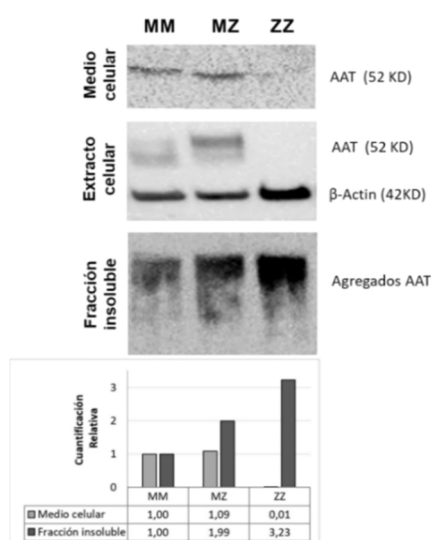


Figura 32. Detección por Western blot de la expresión y secreción de la proteína AAT en organoides diferenciados MM, MZ y ZZ. Las transferencias de fracciones extracelulares, citoplasmáticas e insolubles se incubaron con anti-AAT-B9. El anticuerpo anti- β -actina se usó como marcador de control en el extracto de citoplasma. Se conformaron paneles de figuras para mostrar AAT de MM, MZ y ZZ en el mismo orden. En la parte inferior se muestra la cuantificación relativa con respecto a la cantidad de AAT en medio extracelular y en la fracción insoluble de organoides MM.

2.7 Rutas de señalización alteradas en organoides hepáticos MZ y ZZ.

Se realizó un análisis de la expresión diferencial (RNASeq) en organoides hepáticos MM, MZ y ZZ. Para determinar que *Pathways* estaban alterados en organoides MZ y ZZ con respecto al control (MM), se utilizaron las aplicaciones bioinformáticas de *STRING* e *hiPathia*. Por otro lado, se recurrió a la herramienta *DAVID* para la anotación funcional de los genes que presentaron una alteración significativa en su expresión.

El análisis se planteó de dos maneras distintas, por un lado, se compararon los resultados de expresión diferencial significativa entre organoides hepáticos MM y ZZ y por otro, entre organoides MM, frente a MZ y ZZ conjuntamente para buscar genes alterados comunes en MZ y ZZ.

El resultado de análisis de expresión diferencial entre organoides MM y ZZ nos mostró 285 genes significativos ($q_value < 0.05$), de los cuales 171 estaban inducidos y 114 reprimidos. En las tablas complementarias 3 y 4 se muestran una relación de todos los genes inducidos y reprimidos.

Tras realizar un estudio con *STRING* para determinar cómo interaccionaban entre sí las proteínas codificadas por los 285 genes y en qué *Pathways* estaban agrupados, observamos que se agrupaban en 33 *Pathways* de reactoma significativamente representados. La mayoría de ellos se agrupaban en 5 *Pathways* más generales que involucran metabolismo, glicosilación, sistema inmune, transporte de moléculas y matriz extracelular.

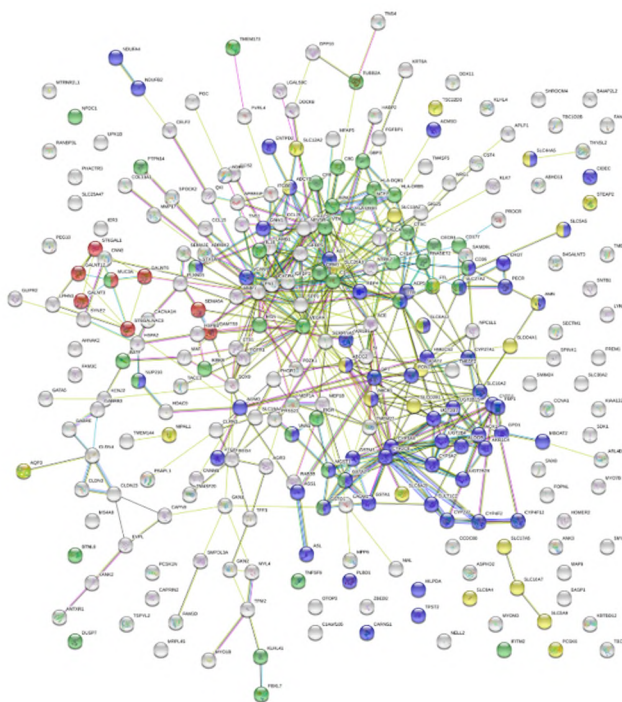


Figura 33. Red de interacciones de los *Pathways* de metabolismo (azul), O-glicosilación (rojo), sistema inmune (verde) y transporte de moléculas (amarillo).

En la **Figura 33** se muestran las interacciones entre los genes de los *Pathways* de metabolismo, del sistema inmune y de O-glicosilación. En la **Tabla 9** se detallan los *Pathways* con el número de genes incluidos en cada uno de ellos, y el *False Discovery Rate* (FDR).

Tabla 9. *Pathways* de reactoma de genes diferencialmente expresados en organoides hepáticos MM y ZZ con FDR < 0.05.

ID <i>Pathways</i> Reactoma	<i>Pathways</i> Reactoma	Nº genes observados	Nº genes totales	FDR (false discovery rate)
HSA-1430728	Metabolism	62	2032	8.84e-07
HSA-556833	Metabolism of lipids	23	721	0.0145
HSA-196854	Metabolism of vitamins and cofactors	10	185	0.0190
HSA-196849	Metabolism of water-soluble vitamins and cofactors	7	120	0.0407
HSA-2142753	Arachidonic acid metabolism	5	59	0.0407
HSA-194068	Bile acid and bile salt metabolism	5	42	0.0190
HSA-193368	Synthesis of bile acids and bile salts via 7alpha-hydroxycholesterol	4	23	0.0190
HSA-193775	Synthesis of bile acids and bile salts via 24-hydroxycholesterol	4	14	0.0088
HSA-193807	Synthesis of bile acids and bile salts via 27-hydroxycholesterol	3	15	0.0407
HSA-211935	Fatty acids	3	15	0.0407
HSA-211859	Biological oxidations	19	214	3.55e-07
HSA-211897	Cytochrome P450 - arranged by substrate type	8	65	0.0012
HSA-211981	Xenobiotics	4	23	0.0190
HSA-211979	Eicosanoids	3	12	0.0292
HSA-156580	Phase II - Conjugation of compounds	11	103	0.00011
HSA-156590	Glutathione conjugation	5	33	0.0137
HSA-156588	Glucuronidation	4	24	0.0190
HSA-5668599	RHO GTPases Activate NADPH Oxidases	3	13	0.0329
HSA-5173105	O-linked glycosylation	8	108	0.0137
HSA-913709	O-linked glycosylation of mucins	6	60	0.0160
HSA-168256	Immune System	43	1925	0.0329
HSA-1280215	Cytokine Signaling in Immune system	19	654	0.0453
HSA-6798695	Neutrophil degranulation	16	471	0.0307
HSA-202430	Translocation of ZAP-70 to Immunological synapse	3	14	0.0367
HSA-202427	Phosphorylation of CD3 and TCR zeta chains	3	17	0.0464
HSA-1236973	Cross-presentation of particulate exogenous antigens (phagosomes)	3	8	0.0190
HSA-382551	Transport of small molecules	24	706	0.0076
HSA-425407	SLC-mediated transmembrane transport	13	241	0.0067
HSA-425393	Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides	7	104	0.0259
HSA-1474244	Extracellular matrix organization	13	298	0.0190
HSA-1474228	Degradation of the extracellular matrix	8	139	0.0282
HSA-421270	Cell-cell junction organization	6	64	0.0190

Por otro lado, llevamos a cabo el análisis, con la herramienta *hiPathia*, a partir de los datos de expresión diferencial en organoides MM y ZZ, para determinar las vías de señalización celular que se activan o reprimen y los efectos que producen en las funciones celulares. Los resultados del análisis nos revelaron cambios en diferentes rutas del proceso de autofagia con la activación de los genes *RHEB*, *AMPKK*, *CaMKK2* y *SQSTM1/P62* y la represión del gen *PRAP-1* (**Figura 34**).

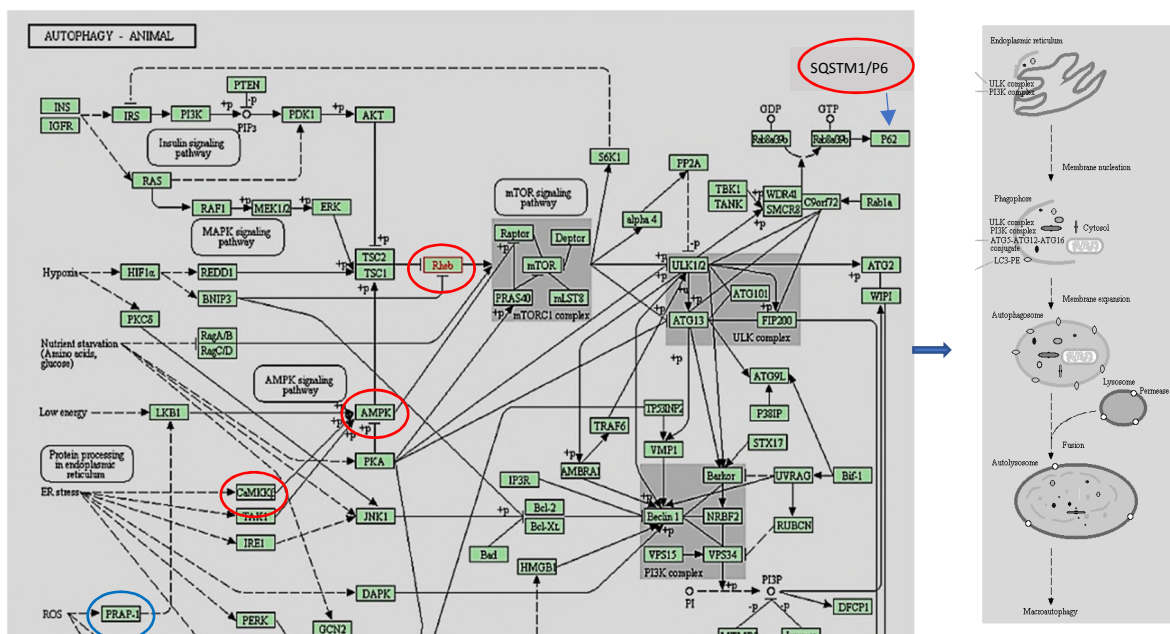


Figura 34. Pathway de autofagia. Los genes inducidos se muestran rodeados en rojo y los reprimidos en azul.

Algunos de los genes implicados en la vía de señalización de autofagia, más relevantes (*PRAP-1* y *SQSTM1/P62*) se validaron mediante RT-qPCR, (**Figura 35**).

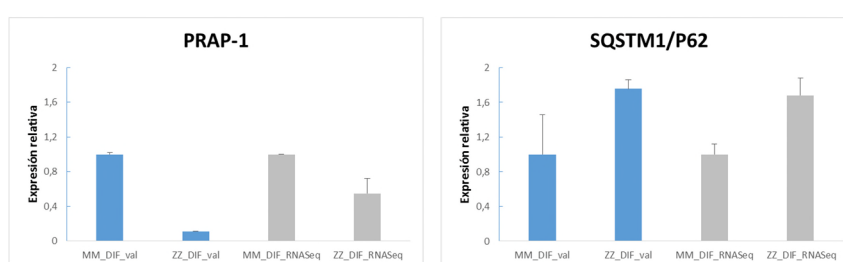


Figura 35. Resultados validación (azul) y RNASeq (gris) de los genes *PRAP-1* y *SQSTM1/P62* en organoides MM y ZZ diferenciados (DIF). *PRAP-1* se confirma su menor expresión y *SQSTM1/P62* se confirma su sobreexpresión.

La activación de la autofagia se ha descrito previamente en relación con el déficit de AAT (Teckman et al. 2000). Nuestros resultados apoyan esta idea, mostrando que en organoides ZZ aumentaría el estrés en el retículo endoplásmico lo que afecta al procesamiento proteico y a la activación de la señalización de la autofagia.

Por otro lado, el análisis con hiPathia en organoides ZZ vs MM mostró que en ZZ habría una activación de las vías de señalización apoptótica que repercutiría en los genes *CASP9* y *BID*, y de las vías de respuesta inflamatoria debido a una inducción de los genes *CXCL9* y *CXCL10* y una represión del gen *ILB1*. En la **Figura 36** se muestra una imagen de las vías alteradas en organoides ZZ dentro del *Pathway* de señalización del receptor Toll-like.

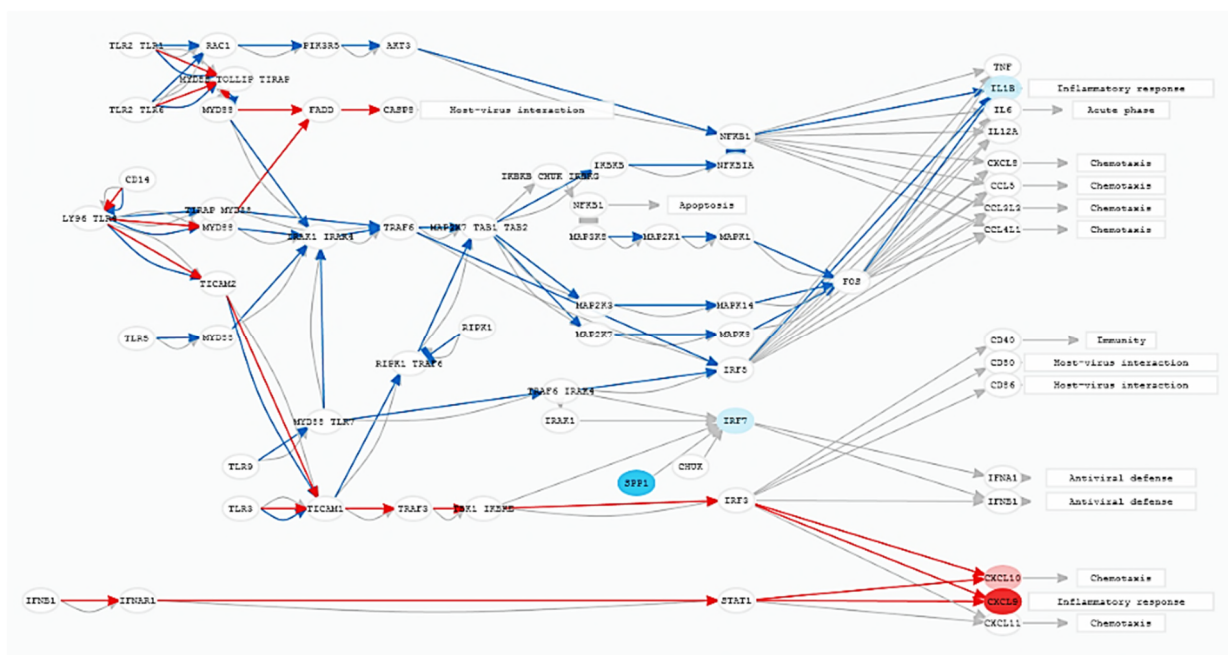


Figura 36. *Pathway* de señalización del receptor Toll-like. El color rojo representa vías activadas y el color azul vías reprimidas.

Por otro lado, realizamos un análisis de los genes diferencialmente expresados comparando organoides MM frente a organoides MZ y ZZ conjuntamente para determinar que genes son comunes entre MZ y ZZ y que podrían estar asociados con la presencia del alelo Z. Este análisis nos reveló que 33 genes presentaban cambios de expresión significativa comunes en ambos genotipos MZ y ZZ vs MM. De ellos 10 genes estaban inducidos y 23 genes estaban reprimidos en MZ y ZZ. En la **Tabla 10** se muestra una relación de estos genes y su grado de significancia.

Mediante *STRING* se analizaron las posibles implicaciones funcionales de los genes de cada grupo (inducidos y reprimidos) comúnmente alterados en MZ y ZZ. Obtuvimos que los 10 genes inducidos tanto en organoides MZ como ZZ representaban significativamente proteínas de membrana (valor $FDR < 0,05$ Go-term). Entre ellas la proteína TM4SF20 (*Transmembrane 4 L6 family member 20*) que es un regulador negativo de la proteólisis regulada intermembrana de CREB3L1, AMN (*Amnion associated transmembrane protein*) que es una proteína transmembrana que participa en el transporte de proteínas del Golgi a la membrana plasmática

y la proteína TNFRSF11B (*TNF receptor superfamily member 11b*) que es un receptor que citoquinas que participa en la respuesta inflamatoria.

Tabla 10. Listados de genes inducidos y reprimidos comunes en organoides MZ y ZZ. $q_value < 0,05$.

GENES INDUCIDOS		
ID GEN	NOMBRE GEN	q_value
AMN	amnion associated transmembrane protein	0,00800059
BCAM	basal cell adhesion molecule	0,0236539
GKN2	gastrokine 2	0,00800059
MPP6	membrane palmitoylated protein 6	0,00800059
SECTM1	Secreted and transmembrane protein 1	0,00055
SERPINA5	serpin family A member 5	5,00E-05
SLC16A4	solute carrier family 16 member 4	5,00E-05
SLC16A7	solute carrier family 16 member 7	0,00035
TM4SF20	transmembrane 4 L six family member 20	0,0188903
TNFRSF11B	TNF receptor superfamily member 11b	0,0188903
GENES REPRIMIDOS		
ID GEN	NOMBRE GEN	q_value
ACPS5	acid phosphatase 5, tartrate resistant	0,00800059
AGMO	alkylglycerol monooxygenase	0,00800059
ALDOC	aldolase, fructose-bisphosphate C	0,0143168
ARHGDI3	Rho GDP dissociation inhibitor beta	0,0342471
BASP1	brain abundant membrane attached signal protein 1	0,00800059
CYP27A1	cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1	0,00800059
FABP1	fatty acid binding protein 1	0,00800059
FOPNL	FGFR1OP N-terminal like	0,00800059
GRK3	G protein-coupled receptor kinase 3	0,00800059
IGFBP3	insulin like growth factor binding protein 3	0,0143168
LGALS9C	galectin 9C	0,0267736
MT1X	metallothionein 1X	0,0267736
MTRNR2L1	MT-RNR2-like 1	0,00800059
NPC1L1	NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1	0,0342471
NPDC1	neural proliferation, differentiation and control 1	0,0309114
PINLYP	phospholipase A2 inhibitor and LY6/PLAUR domain containing	0,0267736
PTGIS	prostaglandin I2 synthase	0,0309114
SLC6A14	solute carrier family 6 member 14	0,0342471
SLC9A4	solute carrier family 9 member A4	0,00800059
SOX7	SRY-box 7	0,00800059
SPRR1A	small proline rich protein 1A	0,0188903
STC2	stanniocalcin 2	0,00800059
TFPI2	tissue factor <i>Pathway</i> inhibitor 2	0,00800059

Por otro lado, los 23 genes reprimidos conjuntamente organoides MZ y ZZ estaban involucrados en vías de señalización todas ellas relacionadas con el metabolismo de lípidos (definidos tanto por KEEG como Reactoma). Los genes *FABP1* (*fatty acid binding protein 1*), *NPC1L1* (*NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1*) y *CYP27A1* (*cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1*) identifican específicamente la vía de digestión y absorción de grasas y la vía de señalización de PPAR (KEEG). Estos y algunos otros genes, como *PTGIS* (*prostaglandin I2 synthase*) y *AGMO* (*alkylglycerol monooxygenase*) indican que las vías de metabolismo de triglicéridos, síntesis de ácidos y sales biliares y esteroles endógenos están significativamente representadas por genes con expresión disminuida en organoides con la variante Z (**Figura 37**).

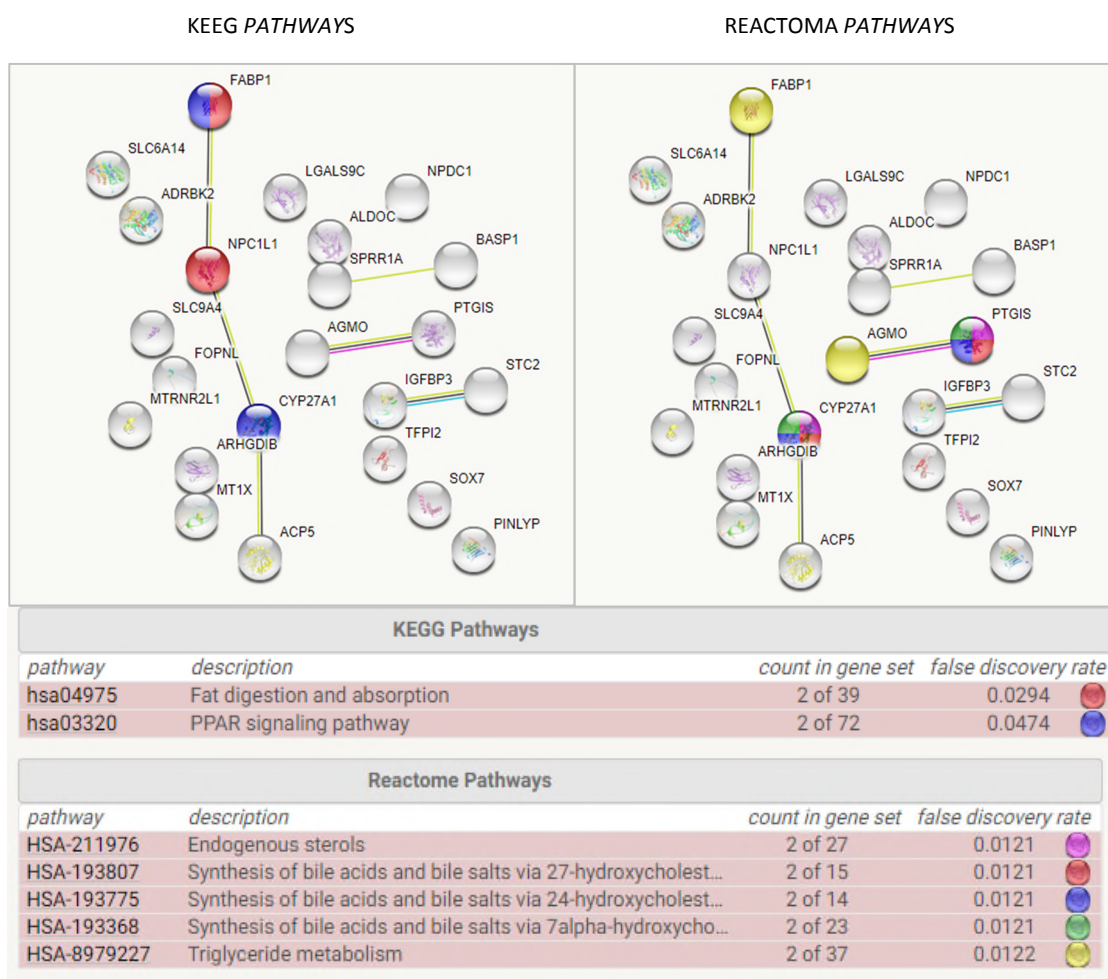


Figura 37. Pathways KEEG y de REACTOMA. Las imágenes muestran las redes de interacción entre los genes. En las tablas, se incluyen el número de genes de cada Pathway, así como el False Discovery Rate.

La proteína FABP1 se une a ácidos grasos en el hígado, desempeñando un papel en la absorción de colesterol mediada por lipoproteínas. Además de unirse a colesterol lo hace a ácidos grasos libres. En la **Figura 38** se muestra el *Pathway* de señalización PPAR donde se observa la baja expresión de la proteína FABP1 que interviene en el metabolismo de lípidos: degradación de ácidos grasos, biosíntesis de ácidos biliares, síntesis y degradación de cuerpos cetónicos y al metabolismo de gliceroesfingolípidos.

Por otro lado, la proteína NPC1L1 participa en la homeostasis del colesterol, su falta de actividad conduce a múltiples defectos en el transporte de lípidos y su homeostasis, por lo que puede desempeñar un papel crítico en la regulación del metabolismo de lípidos. Es un componente integral de la membrana plasmática y de la membrana de vesículas citoplasmáticas.

Observando los resultados que obtuvimos en los *Pathways* de reactoma el gen *CYP27A1* es común a 4 de los *Pathways*. La proteína *CYP27A1* en el hígado participa en la síntesis de ácidos y sales biliares, así como en procesos de óxido-reducción. Se encuentra localizada en la membrana interna mitocondrial y en la matriz mitocondrial.

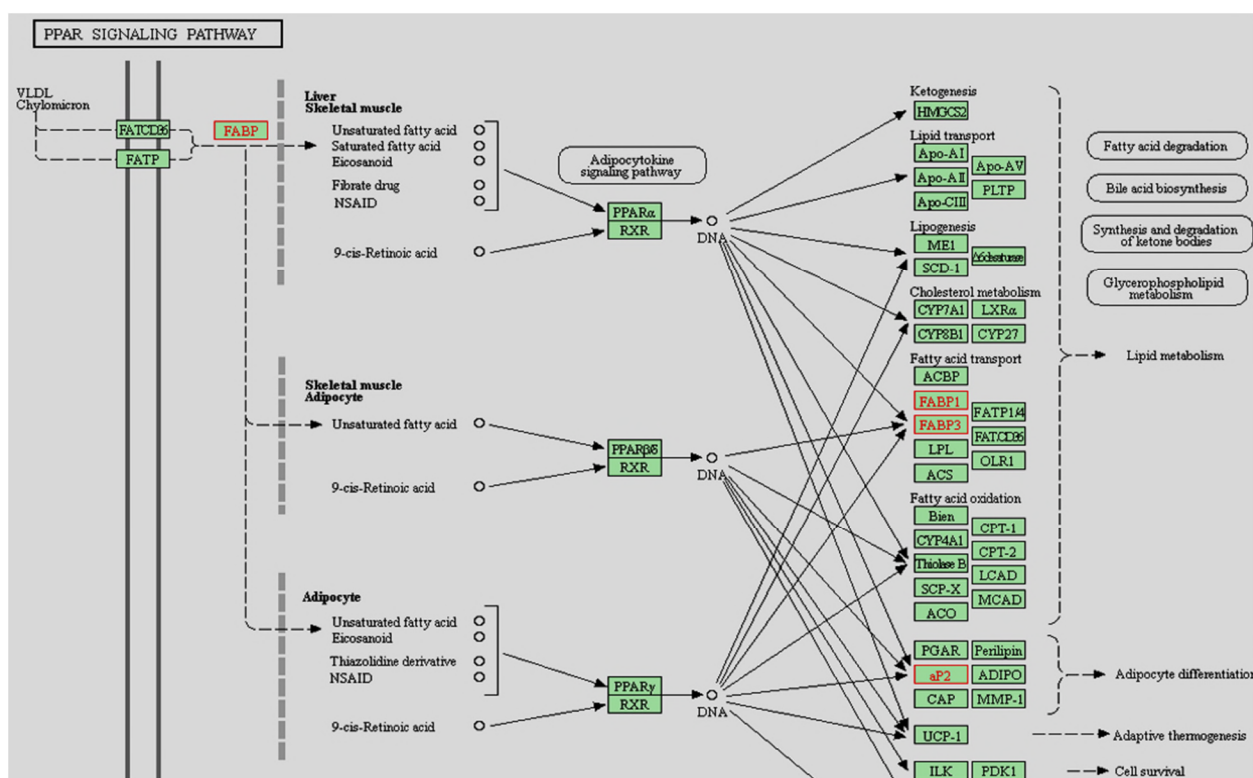


Figura 38. Pathway de señalización PPAR.

2.8 Análisis estructural de organoides mediante microscopía electrónica de transmisión.

La microscopía electrónica ha evidenciado previamente alteraciones estructurales en el DAAT. Una de las más características es la dilatación de las cisternas del RE debido al estrés producido en el retículo por la acumulación de agregados de AAT. Hemos examinado por microscopía electrónica de transmisión, células de organoides de hígado diferenciados a hepatocitos con genotipos MM y MZ tratados con OSM, la cual aumenta la expresión de AAT, para analizar si las células portadoras de la mutación Z adquieren las alteraciones previamente descritas para el DAAT. Como esperábamos hemos observado esta dilatación del retículo endoplásmico (RE) en organoides MZ_OSM, además se visualizaron en el interior de algunas cisternas lo que podrían ser depósitos de proteína no secretada compatibles con la acumulación de AAT en pacientes con déficit (**Figura 39**).

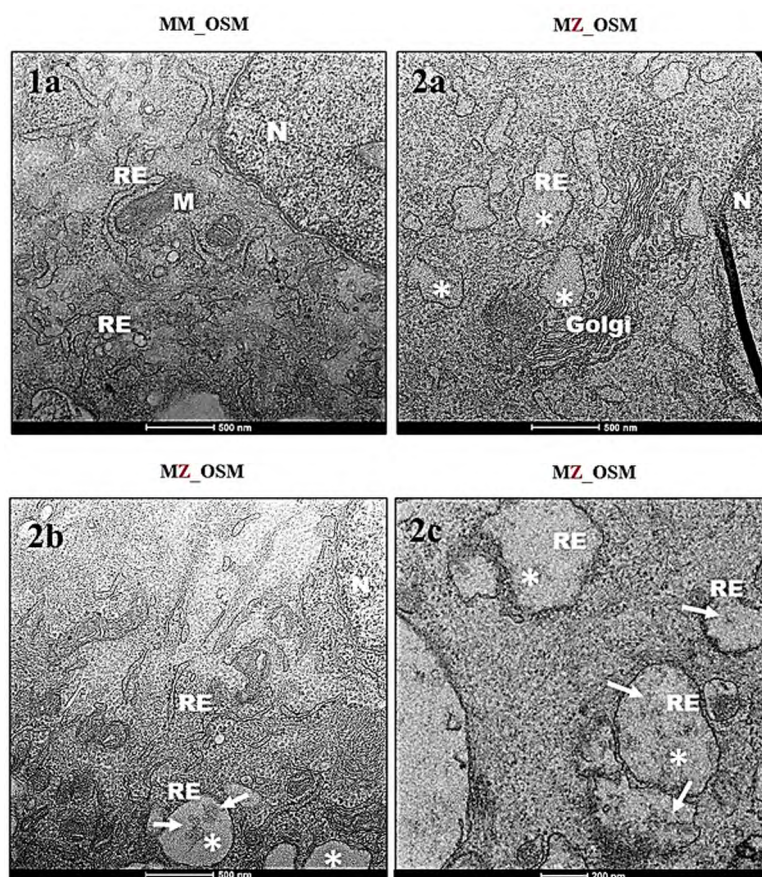


Figura 39. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de organoides de hígado MM (1a) y MZ (2a-2c) tratados con OSM. En organoides MZ_OSM se observa: dilatación de las cisternas del RE (2a) marcado con un asterisco blanco y posibles acúmulos de proteína (2b y 2c) indicado con flechas blancas. N: núcleo; M: mitocondria; RE: retículo endoplásmico; Golgi. Barras de escala 500 nm y 200 nm.

Por otro lado, observamos la presencia de autofagosomas con contenido de orgánulos celulares tal y como se muestra en la **Figura 40**. La autofagia desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular mediante la eliminación de agregados proteicos, orgánulos dañados y protege las células reduciendo el estrés oxidativo y del RE (Ding 2010). Es una vía de degradación intracelular, que normalmente se activa condiciones de estrés celular y ausencia de nutrientes, en la que los orgánulos dañados son envueltos en vacuolas especializadas de doble membrana que surgen del RE y dan lugar a autofagosomas. La autofagia desempeña un papel en las enfermedades relacionadas con los agregados de proteínas hepáticas, en la muerte celular de los hepatocitos, en infecciones por el virus de la hepatitis y en el hepatocarcinoma (Teckman et al. 2000).

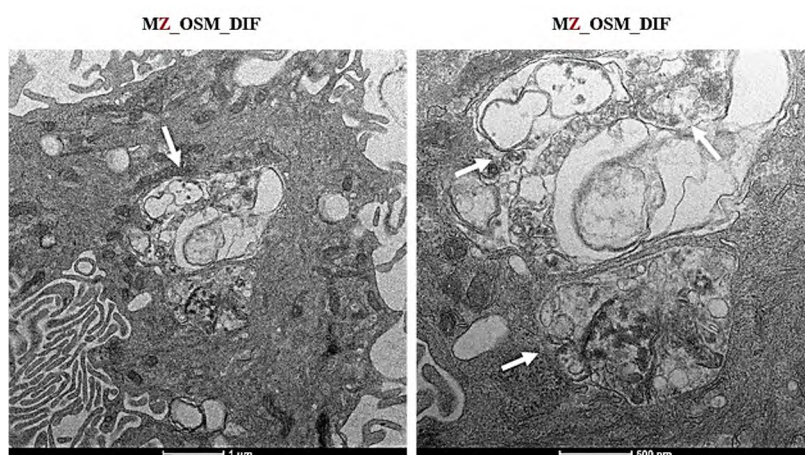


Figura 40. Se muestra la presencia de autofagosomas en organoides de hepatocitos MZ (se marcan con flechas blancas). Barras de escala 1 µm y 500nm.

Además de la autofagia y de la dilatación de las cisternas del RE, observamos indicios de autofagia mitocondrial. Estudios previos han demostrado que la retención de la proteína Z-AAT en el retículo endoplásmico induce una intensa respuesta autofágica en hepatocitos. Estudios previos describen la existencia de autofagia mitocondrial (mitofagia), en el modelo de ratón transgénico Z y en hígado de pacientes con DAAT (Teckman et al. 2004). Es interesante resaltar que los organoides MZ tanto en expansión (colangiocitos) como diferenciados a hepatocitos mostraban mitocondrias que se encontraban rodeadas de gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso a diferencia de los organoides control MM en los que no se evidenció (**Figura 41**). La mitofagia juega un papel importante en el hígado en condiciones patológicas. La lesión mitocondrial provocaría el aumento de especies reactivas de oxígeno dando lugar a citotoxicidad celular en pacientes con DAAT (Teckman et al. 2004).

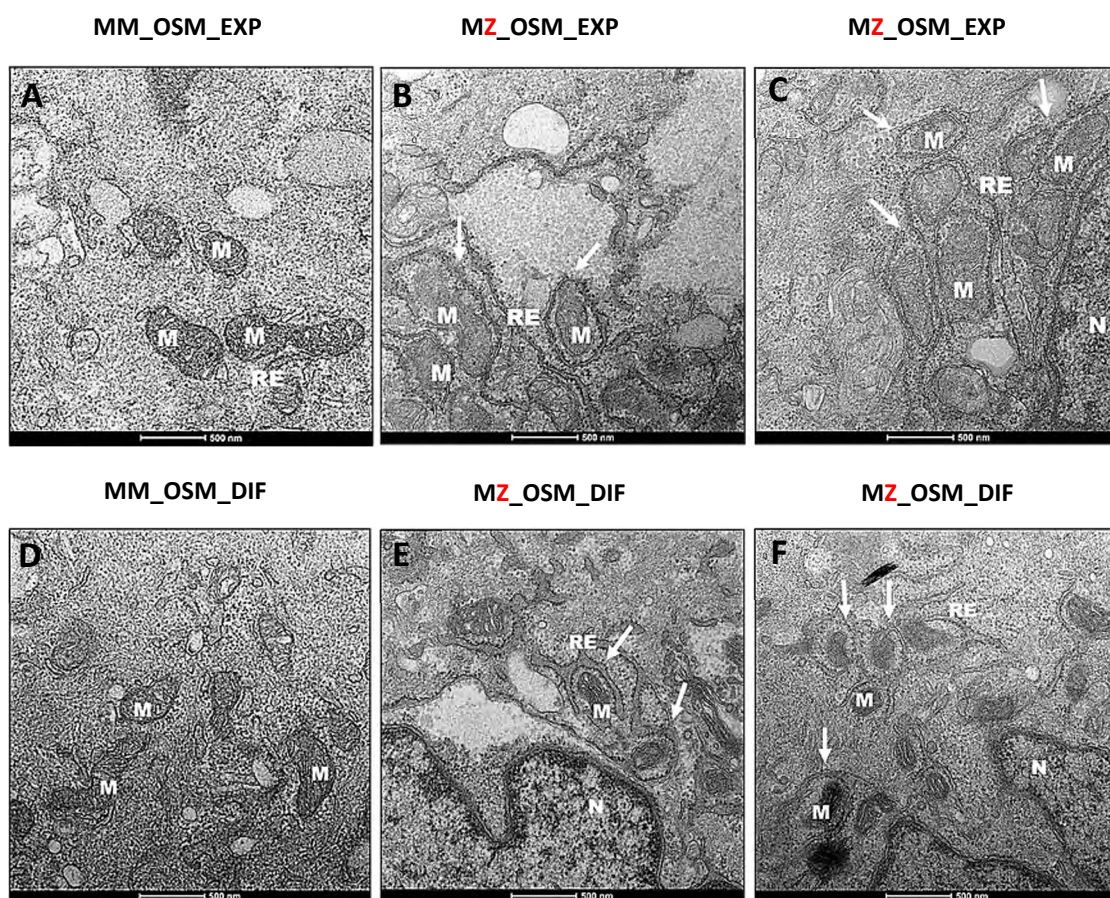


Figura 41. Autofagia de mitocondrias en organoides MZ de colangiocitos y hepatocitos. Las imágenes muestran organoides MM y MZ de colangiocitos (A-C) y hepatocitos (D-F). Se puede observar: en organoides MM (A y D) mitocondrias no rodeadas de RE rugoso; en organoides MZ B-C y E-F mitocondrias en proceso de autofagia rodeadas de RE rugoso, indicado por flechas blancas. Barra de escala 500nm.

Otra característica observada previamente en algunos trabajos en biopsias de hígado de pacientes Z-AAT, fue la pérdida de microvellosidades en los canálculos biliares, espacios entre los hepatocitos responsables de la excreción de la bilis (Czarnowska et al. 2017). Nosotros hemos observado en la estructura de los organoides MZ_OSM diferenciados (hepatocitos) un ensanchamiento de los canálculos que podría estar relacionado con alteraciones de las microvellosidades (**Figura 42**).

Todos estos resultados indican que los organoides heterocigotos MZ ya muestran muchas de las alteraciones celulares descritas en el DAAT y sugieren que estos pacientes MZ ya podrían presentar características de la enfermedad.

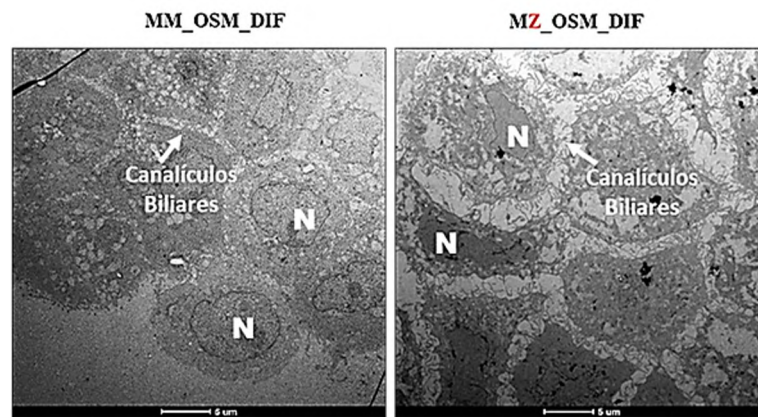
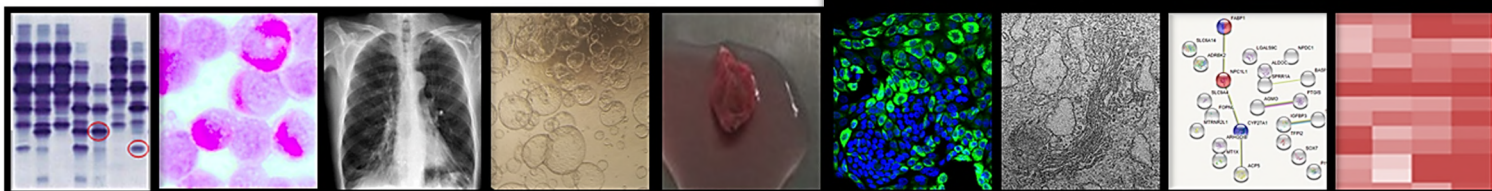


Figura 42. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de organoides MM y MZ tratados con OSM. En organoides MZ_OSM se observa el ensanchamiento de los canaliculos biliare. N: núcleo; Barra de escala 5 µm.

Discusión



DISCUSIÓN

1. NUEVAS VARIANTES EN EL DAAT

Las mutaciones en la AAT son la base que condiciona el desarrollo de la enfermedad tanto pulmonar como hepática en los individuos con Déficit de Alfa-1 Antitripsina. En este trabajo de tesis hemos abordado principalmente dos aspectos que nos ayudan a entender mejor tanto la pérdida de función como la ganancia de función de la AAT en el desarrollo de las manifestaciones clínicas del DAAT. Por un lado, con la investigación de nuevas variantes genéticas encontradas en pacientes y su estudio funcional, hemos podido identificar nuevos alelos que combinan variantes deficientes y que finalmente producen alelos nulos con ausencia de AAT circulante. Por otro lado, las manifestaciones hepáticas asociadas al DAAT se generan a partir de una ganancia de función producida por la acumulación de algunos mutantes de AAT en el hígado. En este sentido hemos desarrollado, un nuevo modelo celular 3D, de organoides de hígado, para el estudio de los mecanismos detrás de las alteraciones hepáticas

1.1 Dos nuevas variantes (Tyr138Cys y Pro391Thr) en configuración cis con el alelo S. Nuevos alelos S-Plus.

El estudio genético exhaustivo de casos con DAAT con discordancia entre los niveles de AAT en suero y el genotipo inicial en base a los alelos S y Z es clave para identificar nuevas variantes genéticas. Tanto nuestra experiencia como la de otros investigadores demuestra que las variantes raras en el gen *SERPINA1* no son tan infrecuentes en estos casos (Lara et al. 2014; Matamala et al. 2018; Renoux et al. 2018; Rodriguez-Frias et al. 2012).

De esta forma hemos identificado dos nuevas variantes genéticas patogénicas del gen *SERPINA1* previamente no descritas (Tyr138Cys y Pro391Thr). Según comprobamos con los estudios funcionales, ambas variantes afectan directamente a la pérdida de funcionalidad de la proteína teniendo consecuencias clínicas en la manifestación de la enfermedad en los pacientes y constituyendo dos nuevos alelos nulos implicados en el DAAT. Lo más particular es que estas variantes aparecieron en configuración cis en el mismo alelo junto con la mutación S modificando las propiedades del alelo S en términos de mayor retención intracelular y como muy poca secreción extracelular. Por esto los denominamos alelos S-Plus. Cuando se analizaron en el laboratorio clínico, las muestras de plasma de los pacientes que portaban estas combinaciones de variantes, vimos que estos nuevos alelos mutantes S-Plus se comportaban como alelos nulos, con ausencia de la proteína en el análisis de fenotipo.

1.2 Aumento de la polimerización y ausencia de secreción de AAT de los dos nuevos variantes S-Plus

La caracterización in vitro de los mutantes expresados en células mostró tanto mediante tinción PAS como el análisis de expresión de la proteína AAT un aumento de la polimerización intracitoplasmática de AAT y una reducción de la secreción al medio de AAT a niveles casi indetectables. En el caso de la variante Tyr138Cys en combinación con la mutación S, estas características estaban en consonancia con los bajos niveles de AAT en suero observados en los dos pacientes que presentaron este alelo S-Plus (S+Tyr138Cys). Estos pacientes presentaban inicialmente genotipos SS y MS con niveles séricos de AAT más bajos, que no se corresponden con esos genotipos (54 y 74 mg/dl respectivamente). Además, uno de estos pacientes, con genotipo M/S+Tyr138Cys tenía las enzimas hepáticas elevadas en el suero, lo que podría estar relacionado con una mayor polimerización de la proteína AAT dentro del RE de los hepatocitos. Sin embargo, la mayoría de los estudios de polimerización realizados hasta ahora se han hecho con polímeros de la variante Z. Las características de estos nuevos polímeros S-Plus aún se desconocen y deberían estudiarse más a fondo. Dado que son el resultado de la combinación del mutante S con otra mutación de cambio de sentido, es posible que tengan diferentes patrones de polimerización, degradación o estabilidad en comparación con los polímeros Z.

La otra variante, Pro391Thr en combinación con el alelo S, también formó polímeros en nuestro modelo celular y la proteína no fue secretada al medio extracelular. Este efecto in vitro concuerda con los bajos niveles de AAT en suero observados en el paciente (71 mg/dl, diagnosticado inicialmente con genotipo MS). Estos resultados, junto con la falta de bandas para el alelo S en el IEF, nos llevan a clasificar esta variante también como un alelo nulo. El codón 391 ha sido descrito previamente como esencial para una secreción normal de AAT (Brodbeck et al. 1992). Estos autores expresaron formas truncadas de AAT en células COS1 y demostraron que las proteínas con menos de 391 aminoácidos fueron retenidas en RE y no fueron transportadas al aparato de Golgi y, en consecuencia, no se secretaban. Así, sugirieron un papel importante de la Pro391 en la secreción de AAT, ya sea permitiendo el plegamiento adecuado de la proteína o como parte de una señal de transporte en la región C-terminal.

Además, la sustitución de Pro391 por un residuo His, en lugar de por Thr como en nuestro caso, también se ha descrito como patogénica. Jordi y col describieron el alelo Pi*YBarcelona que combina una variante Pro391His con un cambio Asp256Val en un fondo M1 (Val213) normal (Jordi et al. 1998). El paciente que presentó este alelo en forma homocigótica tenía EPOC grave, niveles séricos de AAT muy bajos, de 16 mg/dl y un patrón de fenotipo ZZ obtenido por IEF. Del mismo modo, Fra y col caracterizaron el alelo Pi*YOrzinuovi que es el resultado de una sustitución Pro391His en un fondo M1 (Val213) normal (Fra et al. 2012). Este último se identificó

en forma heterocigota en un paciente con antecedentes de hipertransaminasemia leve y un nivel plasmático de AAT de 68 mg/dl. La expresión de la variante en modelos celulares demostró una acumulación de polímeros AAT y un defecto de secreción grave. En este caso, la sustitución de Pro391 por His parece reducir drásticamente la secreción de AAT, pero no conduce a un fenotipo nulo. Aunque la variante Pro391Thr que hemos encontrado parece ser suficiente para causar una falta de secreción en las células HEK293T por sí misma, la combinación en el mismo alelo con la mutación S puede contribuir al estado nulo. De hecho, Pro391 y Glu264 están muy cerca en la estructura terciaria, y la acumulación de ambos cambios podría producir una proteína conformacionalmente inestable.

1.3 Variantes S-Plus podrían contribuir a la variabilidad fenotípica de pacientes portadores del alelo S

La combinación de la mutación S con otras variantes raras de cambio de sentido en el mismo alelo, aunque muy infrecuente, ya se ha descrito anteriormente en pacientes con DAAT. En la **Tabla 11** hemos recogido los alelos de tipo S-Plus descritos hasta ahora.

Tabla 11. Listado de todos los S-Plus descritos.

S-Plus	Nombre alelo	Variante adicional		Fenotipo	Referencia
		cDNA (NM_000295.4)	Proteína madura		
S+Try138Cys	QOVigo	c.485A>G	p. Tyr138Cys	nulo	Este estudio
S+Pro391Thr	QOAachen	c.1243C>A	p. Pro391Thr	nulo	Este estudio
S+Phe52del	QOLaPalma	c.221_223TCT	p. Phe52del	nulo	(Hernandez-Perez et al. 2017)
S+Ser14Phe	Pi*SDonosti	c.113C>T	p. Ser14Phe	Deficiente	(Matamala et al. 2018)
S+Z(Glu342Lys)	-	c.1096G>A	p. Glu342Lys	No IEF	(Speevak et al. 2019)

El alelo nulo QOLaPalma se describió previamente en un paciente con una concentración sérica de AAT de 8,5 mg/dl que portaba un genotipo Z/QOLaPalma (Hernandez-Perez et al. 2017). De manera similar nuestras variantes, el alelo QOLaPalma es el resultado de la variante S en cis con la variante Malton (Phe52del) y también da lugar a un fenotipo nulo de AAT (Hernandez-Perez et al. 2017). En estudios anteriores, nuestro grupo describió el alelo Pi*SDonosti en dos pacientes con fenotipos SS y SZ (Matamala et al. 2018), y posteriormente se describió en otros dos casos adicionales con fenotipos MS y SS (Renoux et al. 2018). Este alelo combina la variante

S con una sustitución Ser14Phe, y está asociado con la polimerización y la secreción reducida de AAT, aunque en este caso no se comporta como alelo nulo. Además, recientemente se ha descrito un caso que tenía un alelo con las mutaciones S y Z en cis y el otro un alelo Z (SZ/Z) en una mujer con enfisema y AAT sérica muy baja (20 mg/dl) (Speevak et al. 2019). Por lo tanto, nuestros nuevos alelos amplían la lista de variantes patogénicas identificadas que aparecen en el alelo S.

El alelo S se considera un alelo que produce una deficiencia moderada y generalmente, a no ser que se combine con otros alelos más dañinos como el Z, no tiene consecuencias clínicas significativas. Sin embargo, es importante destacar que al menos algunas de las variantes en cis en los alelos S, que llamamos S-Plus, modifican las características de estos alelos y hacen que se comporten como alelos más agresivos, con consecuencias drásticas en cuanto a niveles más reducidos de AAT más, o incluso como alelos nulos.

Sin embargo, en contraste con los alelos nulos QO descritos en el DAAT que son causados por mutaciones que típicamente producen codones de parada o de *splicing* y que impiden la expresión de AAT, estos nuevos alelos S-Plus descritos aquí, sí que expresan una proteína AAT que se queda fuertemente retenida en las células, que no se secreta y fenotípicamente puede describirse alelo nulo. Estos alelos S-Plus en contraste con la mayoría de los alelos QO podrían tener un mayor riesgo de daño hepático ya que la proteína está altamente acumulada en las células. Esto podría ser particularmente importante en casos homocigotos para estos alelos S-Plus y deben estudiarse más a fondo. Además, dado que la proteína no se secreta, estos alelos S-Plus también pueden estar asociados a un mayor riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar.

Todo esto nos ha hecho plantear que los algoritmos de diagnóstico en el DAAT, deberían contemplar la necesidad de estudiar la fase en la que aparecen las variantes genéticas detectadas, al menos en aquellos casos en los que los niveles de AAT tengan discrepancias después de haber realizado el genotipo y/o el fenotipo proteico. De esta forma proponemos el siguiente algoritmo para el estudio del DAAT (**Figura 43**).

Sin embargo, hay que destacar que precisamente en España es donde se encuentra una mayor frecuencia del alelo S. Por eso es posible que pueda haber casos de DAAT portadores de alelos S (por ejemplo, SS, SZ), que manifiesten características clínicas más graves de lo que es más común para estos alelos y que realmente puedan ser portadores de un alelo S-Plus.

La detección de variantes raras en combinación con la variante S en el mismo alelo es importante porque estos alelos pueden conferir nuevas propiedades a la proteína AAT y modificar las consecuencias clínicas. La existencia de diferentes alelos S-Plus, al menos en parte, podría explicar la variabilidad fenotípica observada entre los pacientes con DAAT. Sin embargo, es importante destacar que aún está por estimar la frecuencia de aparición de estos alelos S-Plus,

que sería de interés principalmente en regiones donde el alelo S es más frecuente, como en España. Dada la rareza en general de estas variantes es posible que solo una pequeña parte de la variabilidad fenotípica de DAAT esté causada por la presencia de alelos S-Plus. Además, es probable que otros factores genéticos y no genéticos también desempeñen un papel en la variabilidad de las manifestaciones fenotípicas de la enfermedad.

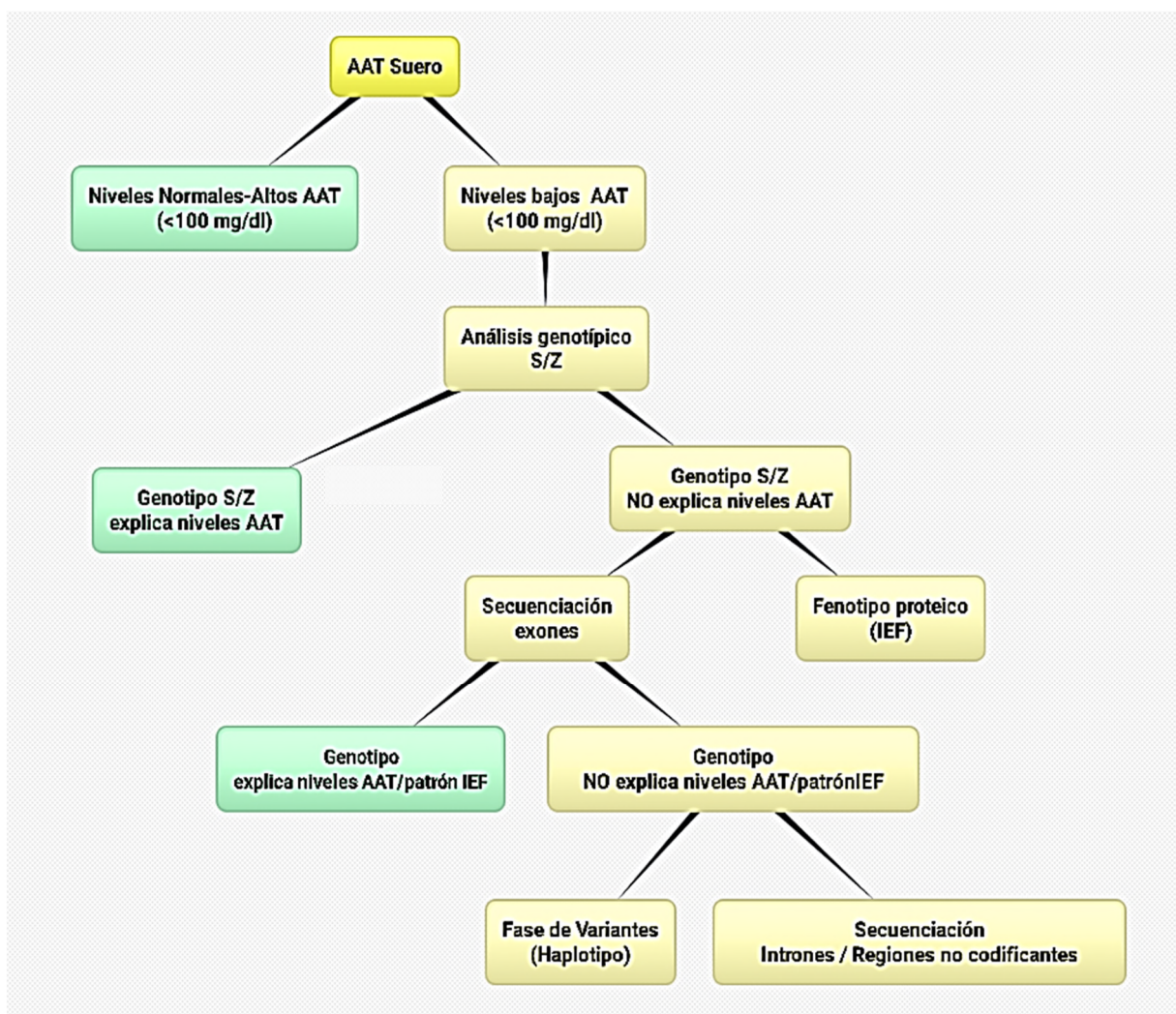


Figura 43. Algoritmo de diagnóstico genético de alfa-1-antitripsina que describe los pasos seguidos, comenzando midiendo el nivel sérico de AAT por nefelometría. Cuando el nivel sérico es inferior a 100 mg/ml, se realiza el genotipo para los alelos S/Z. Si el nivel de AAT no se explica por el genotipo S/Z, entonces se necesitaría una secuenciación adicional de los exones y el estudio del fenotipo por IEF. Si las discrepancias persisten después de este genotipo y fenotipo extendido, se debe realizar un análisis adicional que incluya la detección de la fase o haplotipo en el que se hayan esas variantes o por otra parte se podría realizar la secuenciación de otras regiones no codificantes del gen *SERPINA1* en el caso de no haber detectado variantes que expliquen los niveles de AAT.

Podemos concluir como resultado de este estudio la descripción de dos nuevos alelos nulos S-Plus asociados al DAAT: QOVigo (S+Tyr138Cys) y QOAachen (S+ Pro391Thr). Ambos alelos son el

resultado de una variante rara de cambio de sentido en cis con la variante S. Este estudio destaca el efecto adicional que pueden tener determinadas variantes raras cuando se combinan con mutaciones más comunes asociadas con DAAT, contribuyendo así a la variabilidad clínica de esta condición genética. Por lo tanto, cuando en un paciente el fenotipo o el genotipo específico basado en los alelos S y Z no son concluyentes, proponemos una secuenciación completa del gen *SERPINA1* y si aparecen variantes adicionales, la determinación de la de la fase de las variantes encontradas para llegar a un diagnóstico preciso y, en consecuencia, un mejor manejo clínico de los pacientes.

2. ORGANOIDES DE HIGADO EN EL DAAT

2.1 Los Organoides como un nuevo modelo de cultivo celular 3D para el estudio del DAAT

El déficit de AAT es una causa común de enfermedad hepática con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que pueden ir desde ictericia neonatal hasta cirrosis en la edad adulta que requiera un trasplante. Actualmente, no hay biomarcadores/predictores para identificar qué pacientes con DAAT desarrollarán o no enfermedad hepática severa. Además, los mecanismos moleculares de las enfermedades hepáticas relacionadas con el déficit permanecen en gran parte inexplorados.

Por otro lado, no son muchas las herramientas de que disponemos para el estudio de las alteraciones en el hígado en el DAAT. Los hepatocitos humanos primarios son ideales para su estudio ya que reflejan el metabolismo y la funcionalidad del hígado humano. Sin embargo, la disponibilidad de hepatocitos primarios, especialmente de pacientes con enfermedades hereditarias raras como el DAAT, es limitado, y por otro lado cuando se cultivan in vitro, estas células experimentan desdiferenciación, lo que hace que pierdan mucho de su funcionalidad. Otros modelos celulares alternativos como las iPSCs están siendo utilizadas en los últimos años con éxito. Estudios recientes con hepatocitos derivados de iPSCs de individuos con DAAT revelaron que estas células son útiles para investigar factores moleculares que contribuyen a la enfermedad hepática (Tafaleng et al. 2015). Sin embargo, un factor limitante para su uso radica en que parecen tener inestabilidad genómica durante su cultivo y manipulación.

Por estos motivos, en este trabajo hemos utilizado organoides de hígado como un nuevo modelo desarrollado recientemente que permite el cultivo y estudio de hepatocitos humanos funcionales. Los organoides de hígado son uno de los mejores modelos disponibles para el estudio funcional de células hepáticas ya que presentan diferentes ventajas frente a otros sistemas (Huch et al. 2015a; Huch et al. 2015b; Nibourg et al. 2012; Tafaleng et al. 2015).

Primero, los organoides permiten una expansión a largo plazo con estabilidad genómica preservada; segundo, los cultivos de organoides recapitulan las funciones de los hepatocitos y permiten estudiar los mecanismos moleculares del hígado sano y enfermo, ex vivo; y tercero, pueden ser trasplantados, y regenerar la función alterada en el hígado como se demostró en modelos de ratón (Huch et al. 2015a; Yui et al. 2012), abriendo nuevas vías para la medicina regenerativa y la terapia génica. Estas ventajas de los organoides junto con las nuevas tecnologías emergentes (como la impresión 3D y las técnicas de imagen) están contribuyendo significativamente al estudio de las enfermedades hepáticas y al desarrollo de nuevas terapias.

Los resultados de los estudios realizados hasta el momento con organoides de hígado, abren la vía para comenzar a utilizar material hepático humano in vitro como una fuente alternativa de generación de hepatocitos para el estudio de enfermedades hepáticas hereditarias raras. Una gran variedad de enfermedades hereditarias monogénicas, afectan específicamente al hígado, y este modelo de cultivo puede ser de gran utilidad para poder ser estudiadas cada una de ellas, incluyendo el déficit de alfa 1 antitripsina.

Aplicando los métodos de cultivo 3D desarrollados previamente a partir de células pluripotentes adultas (AdSC) (Huch et al. 2015a), hemos podido desarrollar organoides de hígado a partir de muestras de pacientes con DAAT. Por un lado, como ya se había descrito, hemos comprobado que estos organoides adquieren las características histopatológicas típicas del DAAT. Pero además hemos avanzado en la caracterización de la enfermedad hepática en pacientes con mutaciones concretas (MM, MI, MZ, ZZ) abriendo paso al estudio personalizado de pacientes con diferentes genotipos. Por otro lado, nos ha permitido estudiar la expresión de los diferentes transcritos del gen SERPINA1 en el hígado en respuesta a diferentes estímulos.

2.2 Los organoides diferenciados expresan marcadores típicos de hepatocitos

En comparación con el uso de los tradicionales modelos celulares 2D (Matamala et al. 2018), los organoides reproducen mejor las características del tejido hepático con respecto a la morfología, la expresión génica y la secreción de proteínas. El hígado produce y secreta proteínas circulantes importantes, como la albúmina, la AAT, fibrinógenos y apolipoproteínas. Estudios previos y nuestros resultados demuestran que los cultivos de organoides hepáticos diferenciados pueden expresar y secretar, albúmina, apolipoproteína B, y otras proteínas que muestran esta función secretora de proteínas de hígado (Huch et al. 2015a). Los pacientes con daño hepático muchas veces tienen hipoalbuminemia causada por una disminución de la síntesis de albúmina por los hepatocitos que reflejan una función alterada, como ocurre en pacientes con DAAT y hepatopatía (Greene et al. 2016; Henriksen et al. 2001). Nuestros estudios de expresión génica muestran que los organoides diferenciados expresan niveles significativos de marcadores

característicos de los hepatocitos como *ALB*, *SERPINA1*, *CYP3A4* y *APOB*, Además también demuestran que los organoides de los individuos ZZ tienen una menor expresión de *ALB* y *APOB* en comparación con los organoides control MM. Esto confirma que los organoides portadores de estas variantes genéticas se comportan de forma similar a lo que ocurre en los pacientes ZZ en cuanto a sus perfiles de expresión génica.

Por otro lado, como cabía esperar los organoides hepáticos diferenciados tienen reprimida la expresión de genes que participan en la proliferación, crecimiento y división celular como *SHCBP1* y *CCNB2* además del gen *NR4A1* que regula la regeneración hepática.

2.3 Los organoides de hígado reproducen las características de la enfermedad hepática del DAAT

Una de las principales características fisiopatológicas de la enfermedad hepática portadores deficientes Z-AAT es el daño en los hepatocitos producido por la activación de mecanismos de ganancia de toxicidad debido a la acumulación intracelular de la proteína Z-AAT (Teckman et al. 1996). Como se esperaba, los cultivos de organoides hepáticos derivados de pacientes portadores de mutación Z-AAT revelaron agregados intrahepáticos de polímeros de la proteína Z-AAT. La acumulación intracelular de AAT (tinción positiva de PAS-D) y los polímeros detectados mediante inmunotinción con anticuerpo específico de polímero anti-Z-AAT fueron fácilmente detectados en organoides derivados de ZZ, en un 10-15% de las células. Es importante señalar que los organoides con genotipo MZ también mostraron formación de polímeros de AAT, aunque en un porcentaje menor de células (5-7%). El hecho de ser heterocigoto para el alelo Z (genotipo MZ) se ha descrito como un factor de riesgo de padecer cirrosis en personas con enfermedad hepática como hígado graso no alcohólico, o por abuso de alcohol (Strnad et al. 2019a). Además, recientemente se ha encontrado que individuos con genotipo MZ tienen menos inclusiones de AAT en el hígado que los individuos con genotipo ZZ, pero muestran más que los no portadores de ningún alelo Z (genotipo MM). Y también los MZ tenían niveles intermedios, entre los que presentaban los ZZ y los MM, de transaminasas séricas, y de fibrosis hepática (Schneider et al. 2020). Teniendo en cuenta que la proporción de individuos MZ puede suponer hasta un 4% de la población caucásica, conocer las posibles manifestaciones patológicas que puede manifestar este grupo es de gran interés. Los hallazgos que hemos encontrado mediante microscopía electrónica muestran ciertos cambios estructurales, en determinadas células en organoides MZ. Entre ellos el retículo endoplásmico se veía en ocasiones dilatado con posibles agregados compatibles con polímeros Z-AAT en el interior, lo que se ha descrito anteriormente en pacientes ZZ y Mmalton (Feldmann et al. 1975; Callea et al. 2018). Además, encontramos indicios de autofagia mitocondrial, ya observada en ratones transgénicos Z donde se estableció una relación directa entre la disfunción mitocondrial, la acumulación de agregados

Z-AAT en el RE y el daño hepático en el DAAT (Teckman et al. 2004). Según nuestros resultados parece más evidente la autofagia mitocondrial en organoides MZ no diferenciados, pero estos resultados son preliminares y objetivo de estudio en un futuro por sus posibles implicaciones en la enfermedad.

A diferencia de los cultivos de organoides MM y MZ, los organoides ZZ mostraron prácticamente, ausencia de proteína AAT secretada al medio extracelular. Estos hallazgos indican que los cultivos de organoides hepáticos reflejan el comportamiento de AAT visto en individuos con genotipo ZZ, los cuales muestran una reducción de entre un 80%-90% en los niveles de AAT en el suero, y por lo tanto representan una herramienta valiosa para estudiar los mecanismos moleculares que subyacen a la acumulación y secreción intracelular de la proteína AAT.

Los organoides ZZ presentaron perfiles de expresión génica diferentes a los organoides MM y ponen de manifiesto la alteración de vías de señalización celular implicadas en autofagia, respuesta inflamatoria y metabolismo lipídico. La acumulación agregados de proteína Z-AAT en organoides ZZ estaría induciendo la expresión de genes como *RHEB*, *AMPKK*, *CaMKK2* y *SQSTM1/P62* que activan las vías de autofagia, con el fin de promover la degradación de la proteína mutante Z-AAT que se encuentra en forma de polímeros y evitar el daño celular de los hepatocitos. Se conoce que SQSTM1/p62 se une a proteínas mal plegadas y ubiquitinadas, promoviendo su degradación por autofagia (Clausen et al. 2010), y que la utilización de fármacos que potencian la autofagia como la carbamazepina (CBZ) disminuye los agregados y la fibrosis hepática en un modelo de ratón con DAAT (Hidvegi et al. 2010). Los organoides ZZ mostraron activada la respuesta inflamatoria por expresión elevada de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 y una inhibición de la ILB1, citoquina moduladora de la respuesta inflamatoria. Se ha descrito que pacientes con hepatitis C crónica presentan inflamación y fibrosis hepática debido a los niveles altos de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 (Zeremski et al. 2008). También se mostró en organoides MZ y ZZ una activación de la expresión de proteínas de membrana como TM4SF20 que es un regulador negativo de la proteólisis y que, aunque su papel en el DAAT es desconocido podría contribuir a la mayor presencia de agregados intrahepáticos en pacientes con déficit.

Por otro lado, los genes comúnmente alterados en organoides MZ y ZZ comparando con los organoides MM apuntan a una disminución de la expresión de una veintena de genes muchos de ellos implicados en el metabolismo lipídico entre los que se encuentran *FABP1*, *NPC1L1* y *CYP27A1* que participan en la regulación de la homeostasis de colesterol. Recientemente se ha descrito que los pacientes ZZ muestran concentraciones séricas más bajas de triglicéridos y de colesterol de baja y muy baja densidad que los controles, lo que sugiere una secreción hepática alterada de lípidos. Conjuntamente se ha encontrado acumulación intrahepática de triglicéridos y de colesterol LDL en pacientes ZZ lo cual podría estar relacionado con la acumulación de Z-AAT

en el RE, que alteraría el metabolismo lipídico de este subcompartimento. Además, el hígado de ratones transgénicos Z-AAT tenían esteatosis y menor expresión de genes implicados en la secreción de lípidos. Una posible explicación que aún está pendiente de estudio es que la autofagia lipídica puede verse sobrepasada por la necesidad de degradar el exceso de Z-AAT dando lugar a alteraciones en el metabolismo lipídico (Hamesch et al. 2019). Podría ser también que una alteración del HNF4A (factor nuclear de hepatocitos 4A) el cual se ha visto reprimido en ratones que sobreexpresan Z-AAT puede dar como resultado un ensamblaje de lipoproteínas y una secreción de lípidos alterada (Hayhurst et al. 2001). Otros estudios han mostrado también una conexión entre la respuesta inflamatoria y la homeostasis del colesterol a través de una supresión específica de la biosíntesis de ácidos biliares mediante el péptido c-36 de AAT (Gerbod-Giannone et al. 2002). El hecho de que el metabolismo de lípidos esté alterado incluso ya en los organoides de pacientes MZ sugiere que esta pueda ser una alteración temprana en el desarrollo de la enfermedad hepática debida al DAAT. Nuevos estudios en este sentido serán abordados en un futuro.

Dado que los organoides se derivan directamente de los individuos afectados, también pueden ayudarnos a dilucidar la compleja heterogeneidad de la enfermedad hepática entre los portadores de DAAT y estudiar por ejemplo aquellos factores modificadores que hacen que una persona ZZ desarrolle enfermedad hepática y otra con el mismo genotipo no tenga manifestaciones en el hígado a lo largo de toda su vida. Además de la mutación Z-AAT, se han descrito muchos otros alelos raros asociados con la deficiencia de AAT (Giacopuzzi et al. 2018; Matamala et al. 2018; Renoux et al. 2018) para los cuales se desconocen los posibles efectos de daño en los hepatocitos. Los organoides derivados de pacientes portadores de estas otras variantes diferentes a la variante Z ayudarían a investigar los mecanismos de acumulación, secreción y degradación de estas variantes de AAT que ahora mismo están mucho menos estudiadas.

2.4 Inducción del gen *SERPINA1* mediante OSM, IL6 y LPS en organoides

La AAT es una proteína reactante de fase aguda que modula su expresión en presencia de diferentes estímulos. En procesos infecciosos o inflamatorios los niveles de AAT en suero pueden incrementarse entre 2-5 veces, limitando el posible daño tisular producido por la inflamación. La expresión basal y reactiva de AAT está controlada por muchos factores que pueden activar sustancialmente la transcripción (Kalsheker et al. 2002; Yuan et al. 1992). El aumento de la secreción de AAT está mediado principalmente por las citoquinas, como IL-6, IL-1 β , TNF α , oncostatina M (OSM) o lipopolisacárido bacteriano LPS (Boutten et al. 1998; Knoell et al. 1998). Estos estímulos parecen actuar específicamente sobre hepatocitos, monocitos, macrófagos u otras células productoras de AAT, y pueden inducir la expresión de AAT en diferentes

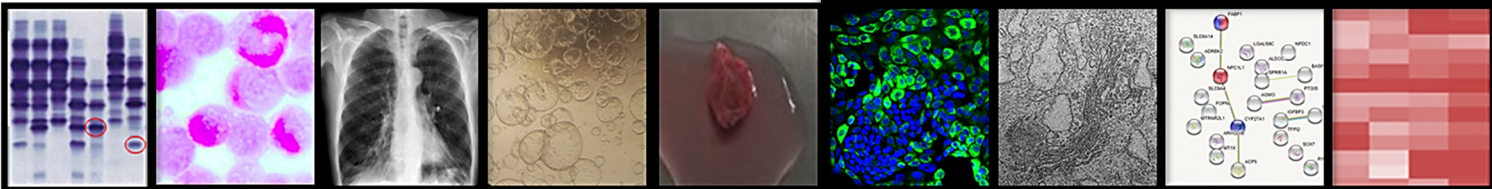
magnitudes (van 't Wout et al. 2012). Conocer cómo afectan todos estos factores a los niveles de expresión, estabilidad o traducción de los diferentes transcritos alternativos del gen *SERPINA1* no ha sido investigado en profundidad. En condiciones de deficiencia de AAT por ejemplo en individuos ZZ, estos estímulos incrementarían la producción de proteína mutada lo que podría agravar más aún que en condiciones basales la reacción inflamatoria y el daño celular.

Específicamente, en el hígado, la AAT está regulada principalmente por citoquinas similares a IL-6, incluida la OSM. Este proceso está mediado por la interacción entre el promotor de hepatocitos de *SERPINA1* y un elemento de respuesta OSM ubicado en el 3'UTR del gen AAT a través de la interacción de factores de transcripción como STAT3 (Morgan et al. 2002). En nuestro trabajo estudiamos como algunos de estos factores como la OSM, IL-6 o el LPS inducían transcripcionalmente la expresión del gen *SERPINA1* en los organoides de hígado tanto en controles como en organoides con déficit. Nuestros resultados muestran que en organoides diferenciados la expresión sobre todo del transcrito 1C, el principal que se expresa en hígado, se inducía significativamente mediante OSM, en las concentraciones y tiempos post-estímulo utilizadas, tanto en organoides MM como con genotipos deficientes MI, MZ y también en ZZ. IL-6 también inducía mayormente el transcrito 1C, mientras que no hemos detectado un aumento significativo en los transcritos principales tras el tratamiento con LPS. Sin embargo, sería necesario ensayar otras concentraciones de estas citoquinas para definir de una forma más definitiva en qué medida estos estímulos regulan la expresión de AAT en el hígado.

En relación al transcrito pequeño ST1C4, su expresión se ha detectado previamente en el hígado, aunque la regulación transcripcional y el papel funcional de este transcrito no están definidos (Matamala et al, 2017), es importante señalar que se induce significativamente en organoides tras el tratamiento tanto con OSM como con IL-6 y LPS, estos últimos en menor medida que con OSM. La inducción de ST1C4 en respuesta a estas señales inflamatorias confirma aún más su papel funcional y sugiere nuevas investigaciones en este sentido en el futuro. Hipotéticamente este transcrito puede generar un péptido C-terminal de AAT, el cual se ha descrito que puede regular la síntesis de ácidos biliares en hepatocitos primarios de rata (Janciauskiene et al. 1999).

Estos resultados proporcionan evidencia clara de que los organoides representan un buen modelo para estudiar la regulación de la expresión de AAT en el hígado, y cómo la inducción y por tanto el incremento de los niveles de AAT en determinadas condiciones podría condicionar el daño hepático en relación con diferentes genotipos de AAT.

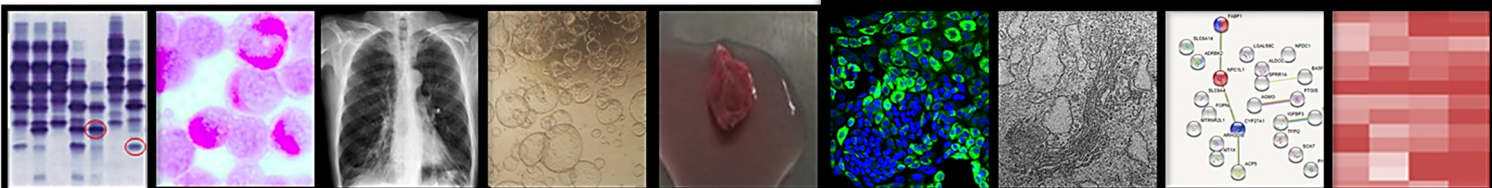
Conclusiones



CONCLUSIONES

1. Hemos identificado dos nuevas variantes que aparecen en configuración *cis* con el alelo S (S+Tyr138Cys) y (S+Pro391Thr), asociadas al déficit de Alfa-1 Antitripsina, que constituyen los nuevos alelos S-plus y contribuyen a la variabilidad fenotípica de pacientes portadores del alelo S.
2. La caracterización de los dos nuevos alelos S-Plus reveló un comportamiento más agresivo que los alelos S, con un aumento de la polimerización intracitoplásmica y una ausencia de secreción de proteína AAT, que dan lugar a fenotipos nulos.
3. En aquellos casos en los que las variantes genéticas encontradas no expliquen los niveles séricos de AAT, proponemos que se incluya en el algoritmo diagnóstico para el estudio del déficit de alfa 1 antitripsina, la determinación de la fase o haplotipo de las variantes, para mejorar el diagnóstico genético y el manejo clínico de estos pacientes.
4. Los organoides de hígado derivados de pacientes ZZ proporcionan un buen modelo para estudiar las características de la enfermedad hepática en el déficit de alfa 1 antitripsina. Reproducen la formación de agregados intrahepáticos de polímeros de proteína Z-AAT y la disminución del nivel de AAT secretada al medio extracelular.
5. Los perfiles de expresión de los organoides reflejan alteraciones en vías de señalización principalmente relacionadas con el metabolismo de lípidos, respuesta inmune, transporte de moléculas, apoptosis y autofagia.
6. Los organoides derivados de pacientes MZ desarrollan niveles intermedios de células con polímeros de AAT, que estarían entre los MM, en los que son prácticamente inexistentes y los ZZ, en los que un 10-15% de las células muestran esta acumulación de polímeros.
7. Los genes diferencialmente expresados de forma común en organoides MZ y ZZ apuntan a ciertas proteínas de membrana y a la alteración en el metabolismo de colesterol y ácidos biliares, que podrían representar modificaciones importantes en el inicio del proceso patológico en la enfermedad hepática del DAAT.
8. La expresión de diferentes transcritos del gen *SERPINA1* puede inducirse en los organoides mediante el tratamiento con factores exógenos de inflamación (como OSM, IL6 o LPS), afectando principalmente el transcrito 1C mayoritario en el hígado, y el transcrito pequeño ST1C4

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

1. Akbas N, Gonzalez G, Buffone GJ, Grenache DG, and Devaraj S. (2016). A Library of Rare alpha1-Antitrypsin (AAT) Variant Phenotypes to Aid in the Diagnosis of AAT Deficiency. *Am.J.Clin.Pathol.* 146 (3):289-293.
2. Ali R, Perfumo S, della RC, Amicone L, Pozzi L, McCullagh P, Millward-Sadler H, Edwards Y, Povey S, and Tripodi M. (1994). Evaluation of a transgenic mouse model for alpha-1-antitrypsin (AAT) related liver disease. *Ann.Hum.Genet.* 58 (4):305-320.
3. American Thoracic 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.
4. Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulsom R, and Clevers H. (2010). Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 6 (1):25-36.
5. Bartfeld S and Clevers H. (2015). Organoids as Model for Infectious Diseases: Culture of Human and Murine Stomach Organoids and Microinjection of Helicobacter Pylori. *J.Vis.Exp.* (105).
6. Bayart E and Cohen-Haguenaer O. (2013). Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Curr.Gene Ther.* 13 (2):73-92.
7. Bjursell M, Porritt MJ, Ericson E, Taheri-Ghahfarokhi A, Clausen M, Magnusson L, Admyre T, Nitsch R, Mayr L, Aasehaug L, Seeliger F, Maresca M, Bohlooly Y, and Wiseman J. (2018). Therapeutic Genome Editing With CRISPR/Cas9 in a Humanized Mouse Model Ameliorates alpha1-antitrypsin Deficiency Phenotype. *EBioMedicine.* 29:104-111.
8. Blanco I, Bueno P, Diego I, Perez-Holanda S, Casas-Maldonado F, Esquinas C, and Miravittles M. (2017). Alpha-1 antitrypsin Pi*Z gene frequency and Pi*ZZ genotype numbers worldwide: an update. *Int.J.Chron.Obstruct.Pulmon.Dis.* 12:561-569.
9. Blanco I, de Serres FJ, Carcaba V, Lara B, and Fernandez-Bustillo E. (2012). Alpha-1 Antitrypsin Deficiency PI*Z and PI*S Gene Frequency Distribution Using on Maps of the World by an Inverse Distance Weighting (IDW) Multivariate Interpolation Method. *Hepat.Mon.* 12 (10 HCC):e7434.
10. Blanco I, Hernandez J (2016a) Otras manifestaciones clínicas del déficit de Alfa-1 antitripsina (Capítulo 11). In RESPIRA-FUNDACIÓN ESPAÑOLA DEL PULMÓN-SEPAR. (ed) Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento, 2ª ed. SEPAR © 2016.

11. Blanco I, Matamala N, Martínez-Delgado B (2016b) Alfa-1 antitripsina: estructura, gen, funciones, herencia y nomenclatura (Capítulo 3). In RESPIRA-FUNDACIÓN ESPAÑOLA DEL PULMÓN-SEPAR. (ed) Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento, 2ª ed. SEPAR © 2016.
12. Borel F, Sun H, Zieger M, Cox A, Cardozo B, Li W, Oliveira G, Davis A, Gruntman A, Flotte TR, Brodsky MH, Hoffman AM, Elmallah MK, and Mueller C. (2018). Editing out five *Serpina1* paralogs to create a mouse model of genetic emphysema. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 115 (11):2788-2793.
13. Borel F, Tang Q, Gernoux G, Greer C, Wang Z, Barzel A, Kay MA, Shultz LD, Greiner DL, Flotte TR, Brehm MA, and Mueller C. (2017). Survival Advantage of Both Human Hepatocyte Xenografts and Genome-Edited Hepatocytes for Treatment of alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Mol.Ther.* 25 (11):2477-2489.
14. Boretto M, Cox B, Noben M, Hendriks N, Fassbender A, Roose H, Amant F, Timmerman D, Tomassetti C, Vanhie A, Meuleman C, Ferrante M, and Vankelecom H. (2017). Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development* 144 (10):1775-1786.
15. Boutten A, Venembre P, Seta N, Hamelin J, Aubier M, Durand G, and 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):511-520.
16. Brodbeck RM and Brown JL. (1992). Secretion of alpha-1-proteinase inhibitor requires an almost full length molecule. *J.Biol.Chem.* 267 (1):294-297.
17. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo BK, and Huch M. (2016). Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat.Protoc.* 11 (9):1724-1743.
18. Burrows JA, Willis LK, and Perlmutter DH. (2000). Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (4):1796-1801.
19. Callea F, Giovannoni I, Francalanci P, Boldrini R, Faa G, Medicina D, Nobili V, Desmet VJ, Ishak K, Seyama K, and Bellacchio E. (2018). Mineralization of alpha-1-antitrypsin inclusion bodies in Mmalton alpha-1-antitrypsin deficiency. *Orphanet.J.Rare.Dis.* 13 (1):79.
20. Cameron PH, Chevet E, Pluquet O, Thomas DY, and Bergeron JJ. (2009). Calnexin phosphorylation attenuates the release of partially misfolded alpha1-antitrypsin to the secretory pathway. *J.Biol.Chem.* 284 (50):34570-34579.

21. Chapman KR, Burdon JG, Piitulainen E, Sandhaus RA, Seersholm N, Stocks JM, Stoel BC, Huang L, Yao Z, Edelman JM, and McElvaney NG. (2015). Intravenous augmentation treatment and lung density in severe alpha1 antitrypsin deficiency (RAPID): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 386 (9991):360-368.
22. Clausen TH, Lamark T, Isakson P, Finley K, Larsen KB, Brech A, Overvatn A, Stenmark H, Bjorkoy G, Simonsen A, and Johansen T. (2010). p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy*. 6 (3):330-344.
23. Curiel D, Brantly M, Curiel E, Stier L, and Crystal RG. (1989). Alpha 1-antitrypsin deficiency caused by the alpha 1-antitrypsin Nullmattawa gene. An insertion mutation rendering the alpha 1-antitrypsin gene incapable of producing alpha 1-antitrypsin. *J.Clin.Invest* 83 (4):1144-1152.
24. de Serres FJ and Blanco I. (2012). Prevalence of alpha1-antitrypsin deficiency alleles PI*S and PI*Z worldwide and effective screening for each of the five phenotypic classes PI*MS, PI*MZ, PI*SS, PI*SZ, and PI*ZZ: a comprehensive review. *Ther.Adv.Respir.Dis.* 6 (5):277-295.
25. de Serres FJ and Blanco I. (2014). Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J.Intern.Med.* 276 (4):311-335.
26. Ding J, Yannam GR, Roy-Chowdhury N, Hidvegi T, Basma H, Rennard SI, Wong RJ, Avsar Y, Guha C, Perlmutter DH, Fox IJ, and Roy-Chowdhury J. (2011). Spontaneous hepatic repopulation in transgenic mice expressing mutant human alpha1-antitrypsin by wild-type donor hepatocytes. *J.Clin.Invest* 121 (5):1930-1934.
27. Ding WX. (2010). Role of autophagy in liver physiology and pathophysiology. *World J.Biol.Chem.* 1 (1):3-12.
28. Ellis P, Dirksen A, Turner SM (2019) Treatment of lung disease (Chapter 7). In Pavel Strnad MLBaRB (ed) a1-Antitrypsin Deficiency (monograph) .European Respiratory Society © 2019.
29. Escribano A, Amor M, Pastor S, Castillo S, Sanz F, Codoner-Franch P, and Dasi F. (2015). Decreased glutathione and low catalase activity contribute to oxidative stress in children with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Thorax* 70 (1):82-83.
30. Fairbanks KD and Tavill AS. (2008). Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am.J.Gastroenterol.* 103 (8):2136-2141.
31. Feldmann G, Martin JP, Sesboue R, Ropartz C, Perelman R, Nathanson M, Seringe P, and Benhamou JP. (1975). The ultrastructure of hepatocytes in alpha-1-antitrypsin deficiency with the genotype Pi--. *Gut* 16 (10):796-799.

32. Ferrarotti I, Ottaviani S (2019) Laboratory diagnosis (Chapter 4). In Pavel Strnad MLBaRB (ed) *a1-Antitrypsin Deficiency* (monograph) .European Respiratory Society © 2019.
33. Fra AM, Gooptu B, Ferrarotti I, Miranda E, Scabini R, Ronzoni R, Benini F, Corda L, Medicina D, Luisetti M, and Schiaffonati L. (2012). Three new alpha1-antitrypsin deficiency variants help to define a C-terminal region regulating conformational change and polymerization. *PLoS.One.* 7 (6):e38405.
34. Gerbod-Giannone MC, Del Castillo-Olivares A, Janciauskiene S, Gil G, and Hylemon PB. (2002). Suppression of cholesterol 7alpha-hydroxylase transcription and bile acid synthesis by an alpha1-antitrypsin peptide via interaction with alpha1-fetoprotein transcription factor. *J.Biol.Chem.* 277 (45):42973-42980.
35. Giacomuzzi E, Laffranchi M, Berardelli R, Ravasio V, Ferrarotti I, Gooptu B, Borsani G, and Fra A. (2018). Real-world clinical applicability of pathogenicity predictors assessed on SERPINA1 mutations in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hum.Mutat.* 39 (9):1203-1213.
36. Gishen P, Saunders AJ, Tobin MJ, and Hutchison DC. (1982). Alpha 1-antitrypsin deficiency: the radiological features of pulmonary emphysema in subjects of Pi type Z and Pi type SZ: a survey by the British Thoracic Association. *Clin.Radiol.* 33 (4):371-377.
37. Gotzsche PC and Johansen HK. (2010). Intravenous alpha-1 antitrypsin augmentation therapy for treating patients with alpha-1 antitrypsin deficiency and lung disease. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* (7):CD007851.
38. Granell S and Baldini G. (2008). Inclusion bodies and autophagosomes: are ER-derived protective organelles different than classical autophagosomes? *Autophagy.* 4 (3):375-377.
39. Greene CM, Marciniak SJ, Teckman J, Ferrarotti I, Brantly ML, Lomas DA, Stoller JK, and McElvaney NG. (2016). alpha1-Antitrypsin deficiency. *Nat.Rev.Dis.Primers.* 2:16051.
40. Greggio C, De FF, Figueiredo-Larsen M, Gobaa S, Ranga A, Semb H, Lutolf M, and Grapin-Botton A. (2013). Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development in vitro. *Development* 140 (21):4452-4462.
41. Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, and Petersen OW. (2002). Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev.* 16 (6):693-706.
42. Guo S, Booten SL, Aghajan M, Hung G, Zhao C, Blomenkamp K, Gattis D, Watt A, Freier SM, Teckman JH, McCaleb ML, and Monia BP. (2014). Antisense oligonucleotide treatment ameliorates alpha-1 antitrypsin-related liver disease in mice. *J.Clin.Invest* 124 (1):251-261.

43. Gupta R, Sridhara S, and Wood JA. (2014). A rare case of alpha 1-antitrypsin deficiency associated with hypogammaglobulinemia and recurrent pulmonary thrombosis. *Ann.Thorac.Med.* 9 (1):39-41.
44. Hamesch K, Mandorfer M, Pereira VM, Moeller LS, Pons M, Dolman GE, Reichert MC, Heimes CV, Woditsch V, Voss J, Lindhauer C, Fromme M, Spivak I, Guldiken N, Zhou B, Arslanow A, Schaefer B, Zoller H, Aigner E, Reiberger T, Wetzel M, Siegmund B, Simoes C, Gaspar R, Maia L, Costa D, Bento-Miranda M, van HJ, Yagmur E, Bzdok D, Stolk J, Gleiber W, Knipel V, Windisch W, Mahadeva R, Bals R, Koczulla R, Barrecheuren M, Miravittles M, Janciauskiene S, Stickel F, Lammert F, Liberal R, Genesca J, Griffiths WJ, Trauner M, Krag A, Trautwein C, and Strnad P. (2019). Liver Fibrosis and Metabolic Alterations in Adults with Alpha1 Antitrypsin Deficiency Caused by the Pi*ZZ Mutation. *Gastroenterology*.
45. Haugabook SJ, Ferrer M, and Ottinger EA. (2019). In vitro and in vivo translational models for rare liver diseases. *Biochim.Biophys.Acta Mol.Basis.Dis.* 1865 (5):1003-1018.
46. Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, and Gonzalez FJ. (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol.Cell Biol.* 21 (4):1393-1403.
47. Henriksen JH, Siemssen O, Krintel JJ, Malchow-Moller A, Bendtsen F, and Ring-Larsen H. (2001). Dynamics of albumin in plasma and ascitic fluid in patients with cirrhosis. *J.Hepatol.* 34 (1):53-60.
48. Hernandez-Perez JM, Ramos-Diaz R, Fumero-Garcia S, and Perez JA. (2017). Molecular characterization of PI*Q0la palma , a new alpha-1-antitrypsin null allele that combines two defective genetic variants. *Clin.Genet.* 91 (6):927-928.
49. Hidalgo MR, Cubuk C, Amadoz A, Salavert F, Carbonell-Caballero J, and Dopazo J. (2017). High throughput estimation of functional cell activities reveals disease mechanisms and predicts relevant clinical outcomes. *Oncotarget.* 8 (3):5160-5178.
50. Hidvegi T, Ewing M, Hale P, Dippold C, Beckett C, Kemp C, Maurice N, Mukherjee A, Goldbach C, Watkins S, Michalopoulos G, and Perlmutter DH. (2010). An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science* 329 (5988):229-232.
51. Hobbs BD, Silverman EK, Cho MH (2019) Genetics and epidemiology (Chapter 3). In Pavel Strnad MLBaRB (ed) a1-Antitrypsin Deficiency (monograph) .European Respiratory Society © 2019.
52. Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, Hong R, Jensen RV, Misra J, Dillon W, Lee KF, Clark KE, Haverty P, Weng Z, Mutter GL, Frosch MP, MacDonald ME, Milford EL, Crum CP, Bueno R, Pratt RE, Mahadevappa M, Warrington JA, Stephanopoulos G, Stephanopoulos G, and Gullans SR. (2001). A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics* 7 (2):97-104.

53. Hu H, Gehart H, Artegiani B, LOpez-Iglesias C, Dekkers F, Basak O, van EJ, Chuva de Sousa Lopes SM, Begthel H, Korving J, van den Born M, Zou C, Quirk C, Chiriboga L, Rice CM, Ma S, Rios A, Peters PJ, de Jong YP, and Clevers H. (2018). Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids. *Cell* 175 (6):1591-1606.
54. Huang dW, Sherman BT, and Lempicki RA. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat.Protoc.* 4 (1):44-57.
55. Huch M, Bonfanti P, Boj SF, Sato T, Loomans CJ, van de Wetering M, Sojoodi M, Li VS, Schuijers J, Gračanin A, Ringnalda F, Begthel H, Hamer K, Mulder J, van Es JH, de KE, Vries RG, Heimberg H, and Clevers H. (2013a). Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J.* 32 (20):2708-2721.
56. Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, Sato T, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries RG, Grompe M, and Clevers H. (2013b). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494 (7436):247-250.
57. Huch M, Gehart H, van BR, Hamer K, Blokzijl F, Versteegen MM, Ellis E, van WM, Fuchs SA, de LJ, van de Wetering M, Sasaki N, Boers SJ, Kemperman H, de JJ, Ijzermans JN, Nieuwenhuis EE, Hoekstra R, Strom S, Vries RR, van der Laan LJ, Cuppen E, and Clevers H. (2015a). Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 160 (1-2):299-312.
58. Huch M and Koo BK. (2015b). Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 142 (18):3113-3125.
59. Janciauskiene S, Eriksson S, Callea F, Mallya M, Zhou A, Seyama K, Hata S, and Lomas DA. (2004). Differential detection of PAS-positive inclusions formed by the Z, Siiyama, and Mmalton variants of alpha1-antitrypsin. *Hepatology* 40 (5):1203-1210.
60. Janciauskiene S and Lindgren S. (1999). Effects of fibrillar C-terminal fragment of cleaved alpha1-antitrypsin on cholesterol homeostasis in HepG2 cells. *Hepatology* 29 (2):434-442.
61. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Kohnlein T, and Welte T. (2011). The discovery of alpha1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir.Med.* 105 (8):1129-1139.
62. Jardi R, Rodriguez F, Miravittles M, Vidal R, Cotrina M, Quer J, Pascual C, and Weidinger S. (1998). Identification and molecular characterization of the new alpha-1-antitrypsin deficient allele PI Y barcelona (Asp256-->Val and Pro391-->His). Mutations in brief no. 174. Online. *Hum.Mutat.* 12 (3):213.
63. Jeong Y, Choi J, and Lee KH. (2014). Technology advancement for integrative stem cell analyses. *Tissue Eng Part B Rev.* 20 (6):669-682.

64. Jung P, Sato T, Merlos-Suarez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, Auer H, Gallardo M, Blasco MA, Sancho E, Clevers H, and Batlle E. (2011). Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat.Med.* 17 (10):1225-1227.
65. Kale S, Biermann S, Edwards C, Tarnowski C, Morris M, and Long MW. (2000). Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone. *Nat.Biotechnol.* 18 (9):954-958.
66. Kalsheker N, Morley S, and Morgan K. (2002). Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochem.Soc.Trans.* 30 (2):93-98.
67. Kalsheker NA and 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 Pt 2):S183-S189.
68. Karthaus WR, Iaquinta PJ, Drost J, Gracanin A, van BR, Wongvipat J, Dowling CM, Gao D, Begthel H, Sachs N, Vries RGJ, Cuppen E, Chen Y, Sawyers CL, and Clevers HC. (2014). Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* 159 (1):163-175.
69. Kaserman JE and Wilson AA. (2018). Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Disease Modeling and Therapeutic Discovery. *Chronic.Obstr.Pulm.Dis.* 5 (4):258-266.
70. Kaushal S, Annamali M, Blomenkamp K, Rudnick D, Halloran D, Brunt EM, and Teckman JH. (2010). Rapamycin reduces intrahepatic alpha-1-antitrypsin mutant Z protein polymers and liver injury in a mouse model. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 235 (6):700-709.
71. Kessler M, Hoffmann K, Brinkmann V, Thieck O, Jackisch S, Toelle B, Berger H, Mollenkopf HJ, Mangler M, Sehoul J, Fotopoulou C, and Meyer TF. (2015). The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat.Commun.* 6:8989.
72. Knoell DL, Ralston DR, Coulter KR, and Wewers MD. (1998). Alpha 1-antitrypsin and protease complexation is induced by lipopolysaccharide, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157 (1):246-255.
73. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, and Rahman I. (2008). Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 294 (3):L478-L488.
74. Lancaster MA and Huch M. (2019). Disease modelling in human organoids. *Dis.Model.Mech.* 12 (7).

75. Lara B, Martinez MT, Blanco I, Hernandez-Moro C, Velasco EA, Ferrarotti I, Rodriguez-Frias F, Perez L, Vazquez I, Alonso J, Posada M, and Martinez-Delgado B. (2014). Severe alpha-1 antitrypsin deficiency in composite heterozygotes inheriting a new splicing mutation QOMadrid. *Respir.Res.* 15:125.
76. Lara B, Martinez-Delgado B, Torres ML, Marin-Arguedas S, Bustamante A, and Miravittles M. (2013). Alpha-1-antitrypsin deficiency associated with the Mattawa variant. *Arch.Bronconeumol.* 49 (12):548-550.
77. Lawson DA, Xin L, Lukacs RU, Cheng D, and Witte ON. (2007). Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104 (1):181-186.
78. Liang G and Zhang Y. (2013). Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell* 13 (2):149-159.
79. Lieberman J. (2000). Augmentation therapy reduces frequency of lung infections in antitrypsin deficiency: a new hypothesis with supporting data. *Chest* 118 (5):1480-1485.
80. Linnemann JR, Miura H, Meixner LK, Irmeler M, Kloos UJ, Hirschi B, Bartsch HS, Sass S, Beckers J, Theis FJ, Gabka C, Sotlar K, and Scheel CH. (2015). Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development* 142 (18):3239-3251.
81. Lomas DA, Elliott PR, Sidhar SK, Foreman RC, Finch JT, Cox DW, Whisstock JC, and Carrell RW. (1995). alpha 1-Antitrypsin Mmalton (Phe52-deleted) forms loop-sheet polymers in vivo. Evidence for the C sheet mechanism of polymerization. *J.Biol.Chem.* 270 (28):16864-16870.
82. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, and Carrell RW. (1992). The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357 (6379):605-607.
83. Lomas DA, Finch JT, Seyama K, Nukiwa T, and Carrell RW. (1993). Alpha 1-antitrypsin Siiyama (Ser53-->Phe). Further evidence for intracellular loop-sheet polymerization. *J.Biol.Chem.* 268 (21):15333-15335.
84. Lomas DA, Irving JA, Goo B (2019) Serpinopathies (Chapter 2). In Pavel Strnad MLBaRB (ed) a1-Antitrypsin Deficiency (monograph) .European Respiratory Society © 2019.
85. Loomans CJM, Williams GN, Balak J, Ringnalda F, van GL, Huch M, Boj SF, Sato T, Kester L, de Sousa Lopes SMC, Roost MS, Bonner-Weir S, Engelse MA, Rabelink TJ, Heimberg H, Vries RGJ, van OA, Carlotti F, Clevers H, and de Koning EJP. (2018). Expansion of Adult Human Pancreatic Tissue Yields Organoids Harboring Progenitor Cells with Endocrine Differentiation Potential. *Stem Cell Reports.* 10 (3):712-724.
86. Mahe MM, Aihara E, Schumacher MA, Zavros Y, Montrose MH, Helmrath MA, Sato T, and Shroyer NF. (2013). Establishment of Gastrointestinal Epithelial Organoids. *Curr.Protoc.Mouse.Biol.* 3 (4):217-240.

87. Mahr AD, Edberg JC, Stone JH, Hoffman GS, St Clair EW, Specks U, Dellaripa PF, Seo P, Spiera RF, Rouhani FN, Brantly ML, and Merkel PA. (2010). Alpha(1)-antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 62 (12):3760-3767.
88. Maimets M, Rocchi C, Bron R, Pringle S, Kuipers J, Giepmans BN, Vries RG, Clevers H, de HG, van OR, and Coppes RP. (2016). Long-Term In Vitro Expansion of Salivary Gland Stem Cells Driven by Wnt Signals. *Stem Cell Reports.* 6 (1):150-162.
89. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramami Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata KI, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, and Takahashi M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N.Engl.J.Med.* 376 (11):1038-1046.
90. Matamala N, Aggarwal N, Iadarola P, Fumagalli M, Gomez-Mariano G, Lara B, Martinez MT, Cuesta I, Stolk J, Janciauskiene S, and Martinez-Delgado B. (2017). Identification of Novel Short C-Terminal Transcripts of Human SERPINA1 Gene. *PLoS.One.* 12 (1):e0170533.
91. Matamala N, Lara B, Gomez-Mariano G, Martinez S, Retana D, Fernandez T, Silvestre RA, Belmonte I, Rodriguez-Frias F, Vilar M, Saez R, Iturbe I, Castillo S, Molina-Molina M, Texido A, Tirado-Conde G, Lopez-Campos JL, Posada M, Blanco I, Janciauskiene S, and Martinez-Delgado B. (2018). Characterization of Novel Missense Variants of SERPINA1 Gene Causing Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 58 (6):706-716.
92. Matamala N, Martinez MT, Lara B, Perez L, Vazquez I, Jimenez A, Barquin M, Ferrarotti I, Blanco I, Janciauskiene S, and Martinez-Delgado B. (2015). Alternative transcripts of the SERPINA1 gene in alpha-1 antitrypsin deficiency. *J.Transl.Med.* 13:211.
93. Morgan K, Marsters P, Morley S, van GD, Hejazi A, Backx M, Thorpe ER, and 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):555-560.
94. Mueller C and Flotte TR. (2013). Gene-based therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD.* 10 Suppl 1:44-49.
95. Nantasanti S, de BA, Rothuizen J, Penning LC, and Schotanus BA. (2016). Concise Review: Organoids Are a Powerful Tool for the Study of Liver Disease and Personalized Treatment Design in Humans and Animals. *Stem Cells Transl.Med.* 5 (3):325-330.
96. Needham M and Stockley RA. (2005). Exacerbations in {alpha}1-antitrypsin deficiency. *Eur.Respir.J.* 25 (6):992-1000.

97. Ni K, Serban KA, Batra C, and Petrache I. (2016). Alpha-1 Antitrypsin Investigations Using Animal Models of Emphysema. *Ann.Am.Thorac.Soc.* 13 Suppl 4:S311-S316.
98. Nibourg GA, Chamuleau RA, van Gulik TM, and Hoekstra R. (2012). Proliferative human cell sources applied as biocomponent in bioartificial livers: a review. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 12 (7):905-921.
99. Nikolic MZ, Caritg O, Jeng Q, Johnson JA, Sun D, Howell KJ, Brady JL, Laresgoiti U, Allen G, Butler R, Zilbauer M, Giangreco A, and Rawlins EL. (2017). Human embryonic lung epithelial tips are multipotent progenitors that can be expanded in vitro as long-term self-renewing organoids. *Elife.* 6.
100. Norris CA, He M, Kang LI, Ding MQ, Radder JE, Haynes MM, Yang Y, Paranjpe S, Bowen WC, Orr A, Michalopoulos GK, Stolz DB, and Mars WM. (2014). Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli. *PLoS.One.* 9 (4):e96053.
101. Okayama H, Brantly M, Holmes M, and Crystal RG. (1991). Characterization of the molecular basis of the alpha 1-antitrypsin F allele. *Am.J.Hum.Genet.* 48 (6):1154-1158.
102. Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho QT, Ueno H, Toda S, Sugihara H, Fujimoto K, Weissman IL, Capecchi MR, and Kuo CJ. (2009). Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat.Med.* 15 (6):701-706.
103. Ordonez A, Perez J, Tan L, Dickens JA, Motamedi-Shad N, Irving JA, Haq I, Ekeowa U, Marciniak SJ, Miranda E, and Lomas DA. (2015). A single-chain variable fragment intrabody prevents intracellular polymerization of Z alpha1-antitrypsin while allowing its antiprotease activity. *FASEB J.* 29 (6):2667-2678.
104. Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, and Carrell RW. (1983). Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N.Engl.J.Med.* 309 (12):694-698.
105. Peng WC, Logan CY, Fish M, Anbarchian T, Aguisanda F, Alvarez-Varela A, Wu P, Jin Y, Zhu J, Li B, Grompe M, Wang B, and Nusse R. (2018). Inflammatory Cytokine TNFalpha Promotes the Long-Term Expansion of Primary Hepatocytes in 3D Culture. *Cell* 175 (6):1607-1619.
106. Perez-Rubio G, Jimenez-Valverde LO, Ramirez-Venegas A, Camarena A, Sansores RH, Flores-Trujillo F, Resendiz-Hernandez JM, and Falfan-Valencia R. (2015). Prevalence of alpha-1 antitrypsin high-risk variants in Mexican mestizo population and their association with lung function values. *Arch.Bronconeumol.* 51 (2):80-85.
107. Perlmutter DH. (2016). alpha1-antitrypsin Deficiency: A Misfolded Secretory Protein Variant with Unique Effects on the Endoplasmic Reticulum. *Endoplasmic.Reticulum.Stress.Dis.* 3 (1):63-72.

108. Perlmutter DH, Travis J, and Punsal PI. (1988). Elastase regulates the synthesis of its inhibitor, alpha 1-proteinase inhibitor, and exaggerates the defect in homozygous PiZZ alpha 1 PI deficiency. *J.Clin.Invest* 81 (6):1774-1780.
109. Piccolo P, Sergio Attanasio S, Brunetti-Pierri N (2019) Mechanisms of liver disease (Chapter 8). In Pavel Strnad MLBaRB (ed) α 1-Antitrypsin Deficiency (monograph) .European Respiratory Society © 2019.
110. Poller W, Merklein F, Schneider-Rasp S, Haack A, Fechner H, Wang H, Anagnostopoulos I, and Weidinger S. (1999). Molecular characterisation of the defective alpha 1-antitrypsin alleles PI Mwurzburg (Pro369Ser), Mheerlen (Pro369Leu), and Q01isbon (Thr68Ile). *Eur.J.Hum.Genet.* 7 (3):321-331.
111. Pringle S, Maimets M, van der Zwaag M, Stokman MA, van GD, Zwart E, Witjes MJ, de HG, van OR, and Coppes RP. (2016). Human Salivary Gland Stem Cells Functionally Restore Radiation Damaged Salivary Glands. *Stem Cells* 34 (3):640-652.
112. Prior N, Inacio P, and Huch M. (2019). Liver organoids: from basic research to therapeutic applications. *Gut* 68 (12):2228-2237.
113. Ramos RR, Swanson AJ, and Bass J. (2007). Calreticulin and Hsp90 stabilize the human insulin receptor and promote its mobility in the endoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104 (25):10470-10475.
114. Rashid ST, Corbineau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G, Huang-Doran I, Griffin J, Ahrlund-Richter L, Skepper J, Semple R, Weber A, Lomas DA, and Vallier L. (2010). Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J.Clin.Invest* 120 (9):3127-3136.
115. Renoux C, Odou MF, Tosato G, Teoli J, Abbou N, Lombard C, Zerimech F, Porchet N, Chapuis CC, Balduyck M, and Joly P. (2018). Description of 22 new alpha-1 antitrypsin genetic variants. *Orphanet.J Rare.Dis.* 13 (1):161.
116. Rodríguez Frías F et al (2016) Diagnóstico de laboratorio (Capítulo 7). In RESPIRA-FUNDACIÓN ESPAÑOLA DEL PULMÓN-SEPAR. (ed) Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento, 2ª ed.SEPAR © 2016.
117. Rodriguez-Frias F, Miravittles M, Vidal R, Camos S, and Jardi R. (2012). Rare alpha-1-antitrypsin variants: are they really so rare? *Ther.Adv.Respir.Dis.* 6 (2):79-85.
118. Ronzoni R, Berardelli R, Medicina D, Sitia R, Gooptu B, and Fra AM. (2016). Aberrant disulphide bonding contributes to the ER retention of alpha1-antitrypsin deficiency variants. *Hum.Mol.Genet.* 25 (4):642-650.

119. Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G, and Gonzalez-Mangado N. (2004). Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest* 125 (4):1500-1506.
120. Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Bottinger L, Klay D, Weeber F, Huelsz-Prince G, Iakobachvili N, Amatngalim GD, de LJ, van HA, Proost N, Viveen MC, Lyubimova A, Teeven L, Derakhshan S, Korving J, Begthel H, Dekkers JF, Kumawat K, Ramos E, van Oosterhout MF, Offerhaus GJ, Wiener DJ, Olimpio EP, Dijkstra KK, Smit EF, van der Linden M, Jaksani S, van d, V, Jonkers J, Rios AC, Voest EE, van Moorsel CH, van der Ent CK, Cuppen E, van OA, Coenjaerts FE, Meyaard L, Bont LJ, Peters PJ, Tans SJ, van Zon JS, Boj SF, Vries RG, Beekman JM, and Clevers H. (2019). Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J.* 38 (4).
121. Saltini C, Krotova K (2019) Mechanisms of lung disease (Chapter 5). In Pavel Strnad MLBaRB (ed) α 1-Antitrypsin Deficiency (monograph) .European Respiratory Society © 2019.
122. Sampaziotis F, Justin AW, Tysoe OC, Sawiak S, Godfrey EM, Upponi SS, Gieseck RL, III, de Brito MC, Berntsen NL, Gomez-Vazquez MJ, Ortmann D, Yiangou L, Ross A, Bargehr J, Bertero A, Zonneveld MCF, Pedersen MT, Pawlowski M, Valestrand L, Madrigal P, Georgakopoulos N, Pirmadjid N, Skeldon GM, Casey J, Shu W, Materek PM, Snijders KE, Brown SE, Rimland CA, Simonic I, Davies SE, Jensen KB, Zilbauer M, Gelson WTH, Alexander GJ, Sinha S, Hannan NRF, Wynn TA, Karlsen TH, Melum E, Markaki AE, Saeb-Parsy K, and Vallier L. (2017). Reconstruction of the mouse extrahepatic biliary tree using primary human extrahepatic cholangiocyte organoids. *Nat.Med.* 23 (8):954-963.
123. Sandhaus RA. (2004). α 1-Antitrypsin deficiency . 6: new and emerging treatments for α 1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 59 (10):904-909.
124. Schmidt BZ and Perlmutter DH. (2005). Grp78, Grp94, and Grp170 interact with α 1-antitrypsin mutants that are retained in the endoplasmic reticulum. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 289 (3):G444-G455.
125. Schneider CV, Hamesch K, Gross A, Mandorfer M, Moeller LS, Pereira V, Pons M, Kuca P, Reichert MC, Benini F, Burbaum B, Voss J, Gutberlet M, Woditsch V, Lindhauer C, Fromme M, Kumpers J, Bewersdorf L, Schafer B, Eslam M, Bals R, Janciauskiene S, Carvao J, Neureiter D, Zhou B, Woran K, Bantel H, Geier A, Dirrichs T, Stickel F, Teumer A, Verbeek J, Nevens F, Govaere O, Krawczyk M, Roskams T, Haybaeck J, Lurje G, Chorostowska-Wynimko J, Genesca J, Reiberger T, Zoller H, Lammert F, Krag A, George J, Anstee QM, Trauner M, Datz C, Gaisa NT, Denk H, Trautwein C, Aigner E, and Strnad P. (2020). Liver Phenotypes of European Adults Heterozygous or Homozygous for Pi*Z Variant of AAT (Pi*MZ vs Pi*ZZ genotype) and Non-carriers. *Gastroenterology*.
126. Segeritz CP, Rashid ST, de Brito MC, Serra MP, Ordonez A, Morell CM, Kaserman JE, Madrigal P, Hannan NRF, Gatto L, Tan L, Wilson AA, Lilley K, Marciniak SJ, Gooptu B, Lomas DA, and Vallier L. (2018). hiPSC hepatocyte model demonstrates the role of

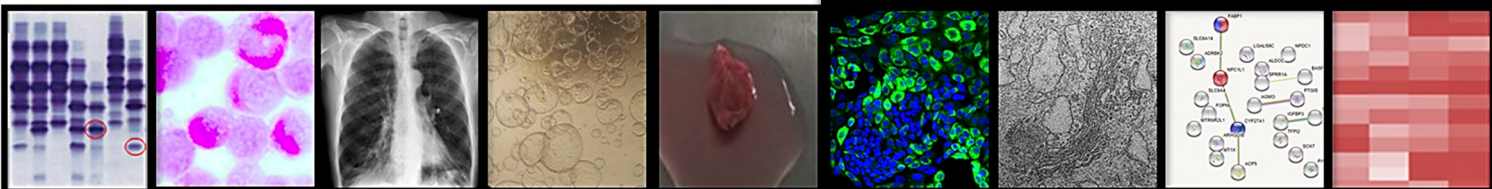
- unfolded protein response and inflammatory networks in alpha1-antitrypsin deficiency. *J.Hepatol.* 69 (4):851-860.
127. Seixas S, Garcia O, Trovoada MJ, Santos MT, Amorim A, and Rocha J. (2001). Patterns of haplotype diversity within the serpin gene cluster at 14q32.1: insights into the natural history of the alpha1-antitrypsin polymorphism. *Hum.Genet.* 108 (1):20-30.
 128. Seixas S, Mendonca C, Costa F, and Rocha J. (2002). alpha1-Antitrypsin null alleles: evidence for the recurrence of the L353fsX376 mutation and a novel G-->A transition in position +1 of intron 1C affecting normal mRNA splicing. *Clin.Genet.* 62 (2):175-180.
 129. Smith SE, Granell S, Salcedo-Sicilia L, Baldini G, Egea G, Teckman JH, and Baldini G. (2011). Activating transcription factor 6 limits intracellular accumulation of mutant alpha(1)-antitrypsin Z and mitochondrial damage in hepatoma cells. *J.Biol.Chem.* 286 (48):41563-41577.
 130. Song CQ, Wang D, Jiang T, O'Connor K, Tang Q, Cai L, Li X, Weng Z, Yin H, Gao G, Mueller C, Flotte TR, and Xue W. (2018). In Vivo Genome Editing Partially Restores Alpha1-Antitrypsin in a Murine Model of AAT Deficiency. *Hum.Gene Ther.* 29 (8):853-860.
 131. Speevak MD, DeMarco ML, Wiebe NS, and Chapman KR. (2019). An unusual case of alpha-1-antitrypsin deficiency: SZ/Z. *Clin.Biochem.* 64:49-52.
 132. Stange DE, Koo BK, Huch M, Sibbel G, Basak O, Lyubimova A, Kujala P, Bartfeld S, Koster J, Geahlen JH, Peters PJ, van Es JH, van de Wetering M, Mills JC, and Clevers H. (2013). Differentiated Troy+ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium. *Cell* 155 (2):357-368.
 133. Stolk J, Tov N, Chapman KR, Fernandez P, MacNee W, Hopkinson NS, Piitulainen E, Seersholm N, Vogelmeier CF, Bals R, McElvaney G, and Stockley RA. (2019). Efficacy and safety of inhaled alpha1-antitrypsin in patients with severe alpha1-antitrypsin deficiency and frequent exacerbations of COPD. *Eur.Respir.J.* 54 (5).
 134. Stoller JK PM (2008) Panniculitis in alpha-1antitrypsin deficiency: a review. *Clin Pulm Med.*
 135. Stone H, Pye A, and Stockley RA. (2014). Disease associations in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Respir.Med.* 108 (2):338-343.
 136. Strnad P, Buch S, Hamesch K, Fischer J, Rosendahl J, Schmelz R, Brueckner S, Brosch M, Heimes CV, Woditsch V, Scholten D, Nischalke HD, Janciauskiene S, Mandorfer M, Trauner M, Way MJ, McQuillin A, Reichert MC, Krawczyk M, Casper M, Lammert F, Braun F, von SW, Hinz S, Burmeister G, Hellerbrand C, Teufel A, Feldman A, Schattenberg JM, Bantel H, Pathil A, Demir M, Kluwe J, Boettler T, Ridinger M, Wodarz N, Soyka M, Rietschel M, Kiefer F, Weber T, Marhenke S, Vogel A, Hinrichsen H, Canbay A, Schlattjan M, Sosnowsky K, Sarrazin C, von FJ, Geier A, Deltenre P, Sipos B, Schafmayer C, Nothnagel M, Aigner E, Datz C, Stickel F, Morgan MY, Hampe J, Berg T, and Trautwein C. (2019a).

- Heterozygous carriage of the alpha1-antitrypsin Pi*Z variant increases the risk to develop liver cirrhosis. *Gut* 68 (6):1099-1107.
137. Strnad P, Schneider CV, Clark V (2019b) Clinical approach to liver disease in adults (Chapter 10). In Pavel Strnad MLBaRB (ed) a1-Antitrypsin Deficiency (monograph) .European Respiratory Society © 2019.
 138. Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, Orth AP, Vega RG, Sapinoso LM, Moqrich A, Patapoutian A, Hampton GM, Schultz PG, and Hogenesch JB. (2002). Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (7):4465-4470.
 139. Sveger T. (1988). The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr.Scand.* 77 (6):847-851.
 140. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, and Mering CV. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1):D607-D613.
 141. Tafaleng EN, Chakraborty S, Han B, Hale P, Wu W, Soto-Gutierrez A, Feghali-Bostwick CA, Wilson AA, Kotton DN, Nagaya M, Strom SC, Roy-Chowdhury J, Stolz DB, Perlmutter DH, and Fox IJ. (2015). Induced pluripotent stem cells model personalized variations in liver disease resulting from alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* 62 (1):147-157.
 142. Teckman JH. (2013). Liver disease in alpha-1 antitrypsin deficiency: current understanding and future therapy. *COPD.* 10 Suppl 1:35-43.
 143. Teckman JH, An JK, Blomenkamp K, Schmidt B, and Perlmutter D. (2004). Mitochondrial autophagy and injury in the liver in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 286 (5):G851-G862.
 144. Teckman JH and Perlmutter DH. (2000). Retention of mutant alpha(1)-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 279 (5):G961-G974.
 145. Teckman JH, Qu D, and Perlmutter DH. (1996). Molecular pathogenesis of liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* 24 (6):1504-1516.
 146. The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. (1998). Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha1-antitrypsin. The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158 (1):49-59.
 147. Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, Boucek MM, Aurora P, Taylor DO, Dobbels F, Rahmel AO, Keck BM, and Hertz MI. (2007). Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J.Heart Lung Transplant.* 26 (8):782-795.

148. Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova-Davies T, Gomez MJ, Farrell L, Hollinshead M, Marsh SGE, Brosens JJ, Critchley HO, Simons BD, Hemberger M, Koo BK, Moffett A, and Burton GJ. (2017). Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat.Cell Biol.* 19 (5):568-577.
149. Turco MY, Gardner L, Kay RG, Hamilton RS, Prater M, Hollinshead MS, McWhinnie A, Esposito L, Fernando R, Skelton H, Reimann F, Gribble FM, Sharkey A, Marsh SGE, O'Rahilly S, Hemberger M, Burton GJ, and Moffett A. (2018). Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation. *Nature* 564 (7735):263-267.
150. van 't Wout EF, van SA, Savage ND, Stolk J, and Hiemstra PS. (2012). alpha1-antitrypsin production by proinflammatory and antiinflammatory macrophages and dendritic cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 46 (5):607-613.
151. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardi R, and Miravittles M. (2006). [Guidelines for the diagnosis and management of alpha-1 antitrypsin deficiency]. *Arch.Bronconeumol.* 42 (12):645-659.
152. Warter J, Storck D, Grosshans E, Metais P, Kuntz JL, and Klumpp T. (1972). [Weber-Christian syndrome associated with an alpha-1 antitrypsin deficiency. Familial investigation]. *Ann.Med.Interne (Paris)* 123 (10):877-882.
153. Wewers MD, Casolaro MA, Sellers SE, Swayze SC, McPhaul KM, Wittes JT, and Crystal RG. (1987). Replacement therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency associated with emphysema. *N.Engl.J.Med.* 316 (17):1055-1062.
154. Wilson AA, Ying L, Liesa M, Segeritz CP, Mills JA, Shen SS, Jean J, Lonza GC, Liberti DC, Lang AH, Nazaire J, Gower AC, Mueller FJ, Mehta P, Ordonez A, Lomas DA, Vallier L, Murphy GJ, Mostoslavsky G, Spira A, Shirihaï OS, Ramirez MI, Gadue P, and Kotton DN. (2015). Emergence of a stage-dependent human liver disease signature with directed differentiation of alpha-1 antitrypsin-deficient iPS cells. *Stem Cell Reports.* 4 (5):873-885.
155. Yuan ZA, Soprano KJ, and Kueppers F. (1992). Alpha-1 antitrypsin response of stimulated alveolar macrophages. *J.Cell Biochem.* 49 (4):410-416.
156. Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, and Watanabe M. (2012). Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell. *Nat.Med.* 18 (4):618-623.
157. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, Miranda E, Ordonez A, Hannan NR, Rouhani FJ, Darche S, Alexander G, Marciniak SJ, Fusaki N, Hasegawa M, Holmes MC, Di Santo JP, Lomas DA, Bradley A, and Vallier L. (2011). Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* 478 (7369):391-394.

158. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, Brown QB, Yee HT, Kinkhabwala M, Jacobson IM, Dimova R, Markatou M, and Talal AH. (2008). Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 48 (5):1440-1450.
159. Zorzetto M, Russi E, Senn O, Imboden M, Ferrarotti I, Tinelli C, Campo I, Ottaviani S, Scabini R, von EA, Berger W, Brandli O, Rochat T, Luisetti M, and Probst-Hensch N. (2008). SERPINA1 gene variants in individuals from the general population with reduced alpha1-antitrypsin concentrations. *Clin.Chem.* 54 (8):1331-1338.

Material suplementario



MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 1. Lista principal de genes DEGs up-regulados en organoides diferenciados a hepatocitos.

GENE_ID	GENE_NAME_UP	Dosis Expression (EM)†	Dosis Expression (DM)†	log2 (fold_change)	p_value	q_value
SULT1C3	<i>Sulfotransferase Family 1C Member 3</i>	0,34	90,62	-8,08	5,00E-05	0,00061
SULT1C2	<i>Sulfotransferase Family 1C Member 2</i>	0,23	33,48	-7,19	5,00E-05	0,00061
ALB	<i>Albumin</i>	0,18	22,83	-6,98	5,00E-05	0,00061
COL6A2	<i>Collagen Type VI Alpha 2 Chain</i>	0,04	4,71	-6,98	0,0001	0,00113
CD36	<i>CD36 Molecule</i>	0,65	80,46	-6,95	5,00E-05	0,00061
UGT2B11	<i>UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B11</i>	19,58	2302,24	-6,88	5,00E-05	0,00061
UGT2B28	<i>UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B28</i>	1,38	149,13	-6,76	5,00E-05	0,00061
ACMSD	<i>Aminocarboxymuconate Semialdehyde Decarboxylase</i>	0,39	33,89	-6,43	0,0041	0,02269
SLC26A3	<i>Solute Carrier Family 26 Member 3</i>	0,32	25,92	-6,32	5,00E-05	0,00061
CYP2C8	<i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 8</i>	0,37	26,82	-6,17	5,00E-05	0,00061
HSD11B2	<i>Hydroxysteroid 11-Beta Dehydrogenase 2</i>	2,44	173,27	-6,15	5,00E-05	0,00061
GDPD2	<i>Glycerophosphodiester Phosphodiesterase Domain Containing 2</i>	0,37	22,88	-5,96	5,00E-05	0,00061
DAPK2	<i>Death Associated Protein Kinase 2</i>	0,14	8,5	-5,91	5,00E-05	0,00061
APOB	<i>Apolipoprotein B</i>	0,29	16,42	-5,8	5,00E-05	0,00061
HMGCS2	<i>3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2</i>	1,32	66,3	-5,66	5,00E-05	0,00061
MEP1A	<i>Meprin A Subunit Alpha</i>	0,17	7,61	-5,51	5,00E-05	0,00061
SLC16A9	<i>Solute Carrier Family 16 Member 9</i>	0,25	10,54	-5,39	5,00E-05	0,00061
RBPM5	<i>RNA Binding Protein, MRNA Processing Factor 2</i>	0,16	6,58	-5,33	0,0001	0,00113
AKAP12	<i>A-Kinase Anchoring Protein 12</i>	0,22	8,09	-5,18	5,00E-05	0,00061
DISP2	<i>Dispatched RND Transporter Family Member 2</i>	0,16	5,52	-5,15	5,00E-05	0,00061
ACE2	<i>Angiotensin I Converting Enzyme 2</i>	2,08	69,75	-5,07	5,00E-05	0,00061
HRASL2	<i>Phospholipase A And Acyltransferase 2</i>	0,51	17,16	-5,07	5,00E+05	0,00061
ZNF114	<i>Zinc Finger Protein 114</i>	0,08	2,61	-5,06	5,00E-05	0,00061
TMPRSS6	<i>Transmembrane Serine Protease 6</i>	1,53	49,61	-5,02	5,00E-05	0,00061
FKBP5	<i>FKBP Prolyl Isomerase 5</i>	3,87	123,39	-4,99	5,00E-05	0,00061
CYP3A4	<i>Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4</i>	3	88,03	-4,88	5,00E-05	0,00061
PHGR1	<i>Proline, Histidine and Glycine Rich 1</i>	137	3482,4	-4,67	5,00E-05	0,00061
APOBEC1	<i>Apolipoprotein B MRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 1</i>	1,34	33,59	-4,65	5,00E-05	0,00061
SAMD9	<i>Sterile Alpha Motif Domain Containing 9</i>	2,73	21,66	-2,99	5,00E-05	0,00061
IGF2R	<i>Insulin Like Growth Factor 2 Receptor</i>	12,88	25,67	-0,99	0,0008	0,0063
ACOT12	<i>Acyl-CoA Thioesterase 12</i>	0	0,77	-	5,00E-05	0,00061
APOC3	<i>Apolipoprotein C3</i>	0	13,02	-	5,00E-05	0,00061
AVP	<i>Arginine Vasopressin</i>	0	1,08	-	5,00E-05	0,00061
AWAT1	<i>Acyl-CoA Wax Alcohol Acyltransferase 1</i>	0	0,51	-	5,00E-05	0,00061

GENE_ID	GENE_NAME_UP	Dosis Expression (EM) [†]	Dosis Expression (DM) [‡]	log2 (fold_change)	p_value	q_value
F13B	<i>Coagulation Factor XIII B Chain</i>	0	0,76	-	5,00E-05	0,00061
LINC01471	<i>Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1471</i>	0	0,66	-	5,00E-05	0,00061
SCNN1B	<i>Sodium Channel Epithelial 1 Beta Subunit</i>	0	2,06	-	5,00E-05	0,00061
SCNN1G	<i>Sodium Channel Epithelial 1 Gamma Subunit</i>	0	0,56	-	5,00E-05	0,00061
SPX	<i>Spexin Hormone</i>	0	1,02	-	5,00E-05	0,00061
TBPL2	<i>TATA-Box Binding Protein Like 2</i>	0	1,05	-	5,00E-05	0,00061
UGT2B4	<i>UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B4</i>	0	33,11	-	5,00E-05	0,00061
UOX	<i>Urate Oxidase (Pseudogene)</i>	0	0,7	-	5,00E-05	0,00061
ZBTB16	<i>Zinc Finger and BTB Domain Containing 16</i>	0	0,63	-	5,00E-05	0,00061
KCNMB2	<i>Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily M Regulatory Beta Subunit 2</i>	0	0,74	-	0,00175	0,01156

[†] EM: Medio de expansión; [‡] DM: medio de diferenciación p-value: valor p no corregido del test estadístico; q-value: valor p ajustado por FDR del test estadístico.

Tabla 2. Lista principal de genes DEGs down-regulados en organoides diferenciados a hepatocitos.

GENE_ID	GENE_NAME_DOWN	Dosis Expresión (EM)†	Dosis Expresión (DM)†	log2 (fold_change)	p_value	q_value
NUSAP1	<i>Nucleolar and Spindle Associated Protein 1</i>	11,19	0,44	4,67	5,00E-05	0,00061
CRIP1	<i>Cysteine Rich Protein 1</i>	47,65	1,86	4,68	5,00E-05	0,00061
ELOVL4	<i>ELOVL Fatty Acid Elongase 4</i>	0,96	0,04	4,68	0,00165	0,01106
KRT13	<i>Keratin 13</i>	81,42	3,15	4,69	5,00E-05	0,00061
FLNA	<i>Filamin A</i>	20,51	0,78	4,73	5,00E-05	0,00061
NR4A1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1</i>	4,12	0,15	4,74	0,00155	0,01056
ANLN	<i>Anillin Actin Binding Protein</i>	7,46	0,27	4,77	0,00615	0,03114
CCK	<i>Cholecystokinin</i>	452,95	16,13	4,81	5,00E-05	0,00061
GTSE1	<i>G2 And S-Phase Expressed 1</i>	2,68	0,1	4,81	5,00E-05	0,00061
TTK	<i>TTK Protein Kinase</i>	4,12	0,14	4,85	0,0051	0,02684
KLK6	<i>Kallikrein Related Peptidase 6</i>	148,04	4,85	4,93	5,00E-05	0,00061
ASF1B	<i>Anti-Silencing Function 1B Histone Chaperone</i>	12,63	0,4	4,98	5,00E-05	0,00061
CCNB2	<i>Cyclin B2</i>	14,78	0,46	5	5,00E-05	0,00061
NUF2	<i>NUF2 Component of NDC80 Kinetochore Complex</i>	4,25	0,13	5	0,0001	0,00113
CSPG5	<i>Chondroitin Sulfate Proteoglycan 5</i>	2,26	0,07	5,02	0,0096	0,04413
CDC45	<i>Cell Division Cycle 45</i>	5,77	0,18	5,03	5,00E-05	0,00061
KCNH8	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 8</i>	0,81	0,02	5,29	0,0022	0,01388
PHGDH	<i>Phosphoglycerate Dehydrogenase</i>	23,04	0,58	5,32	5,00E-05	0,00061
CEP55	<i>Centrosomal Protein 55</i>	8,28	0,2	5,38	5,00E-05	0,00061
GINS2	<i>GINS Complex Subunit 2</i>	7,61	0,18	5,42	0,00015	0,00158
UHRF1	<i>Ubiquitin Like with PHD And Ring Finger Domains 1</i>	3,7	0,09	5,42	0,00015	0,00158
MXRA5	<i>Matrix Remodeling Associated 5</i>	2,43	0,05	5,5	5,00E-05	0,00061
PTTG1	<i>PTTG1 Regulator of Sister Chromatid Separation, Securin</i>	42,37	0,85	5,64	5,00E-05	0,00061
ASPM	<i>Abnormal Spindle Microtubule Assembly</i>	2,09	0,04	5,66	0,00175	0,01156
MEG3	<i>Maternally Expressed 3</i>	22,5	0,43	5,69	0,0038	0,02146
MYB	<i>MYB Proto-Oncogene, Transcription Factor</i>	0,81	0,02	5,73	0,00325	0,01888
CDC25C	<i>Cell Division Cycle 25C</i>	2,11	0,04	5,76	0,00565	0,02912
ALDH3A1	<i>Aldehyde Dehydrogenase 3 Family Member A1</i>	326,17	5,82	5,81	5,00E-05	0,00061
CDK1	<i>Cyclin Dependent Kinase 1</i>	21,76	0,36	5,9	5,00E-05	0,00061
EPHB3	<i>EPH Receptor B3</i>	12,55	0,2	5,99	5,00E-05	0,00061
SCARA3	<i>Scavenger Receptor Class A Member 3</i>	8,42	0,11	6,23	5,00E-05	0,00061
NEK2	<i>NIMA Related Kinase 2</i>	5,34	0,06	6,47	0,0002	0,002
DTL	<i>Denticleless E3 Ubiquitin Protein Ligase Homolog</i>	2,05	0,02	6,61	0,00925	0,0428
BUB1	<i>BUB1 Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase</i>	4,81	0,05	6,62	5,00E-05	0,00061
FAIM2	<i>Fas Apoptotic Inhibitory Molecule 2</i>	2,45	0,02	6,67	0,00165	0,01106
SHCBP1	<i>SHC Binding and Spindle Associated 1</i>	3,46	0,03	6,68	5,00E-05	0,00061
KCNE3	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E RegulatorySubunit 3</i>	64,43	0,62	6,7	5,00E-05	0,00061

GENE_ID	GENE_NAME_DOWN	Dosis Expresión (EM)†	Dosis Expresión (DM)‡	log2 (fold_change)	p_value	q_value
CDC20	<i>Cell Division Cycle 20</i>	27,53	0,21	7,04	0,0001	0,00113
IL33	<i>Interleukin 33</i>	10,26	0,07	7,15	0,0052	0,02727
RRM2	<i>Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2</i>	20,05	0,07	8,26	5,00E-05	0,00061
BIRC5	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 5</i>	11,98	0,04	8,27	5,00E-05	0,00061
CLDN2	<i>Claudin 2</i>	453,78	1,14	8,63	5,00E-05	0,00061
SPINK4	<i>Serine Peptidase Inhibitor, Kazal Type 4</i>	3892,87	6,64	9,2	5,00E-05	0,00061
HIST2H2AC	<i>Histone Cluster 2 H2A Family Member C</i>	0,89	0	-	0,0001	0,00113
IGFL1	<i>IGF Like Family Member 1</i>	0,52	0	-	5,00E-05	0,00061
LOC150051	<i>Uncharacterized LOC150051</i>	1,35	0	-	5,00E-05	0,00061
LOC388282	<i>Uncharacterized LOC388282</i>	0,53	0	-	5,00E-05	0,00061
NUPR2	<i>Nuclear Protein 2, Transcriptional Regulator</i>	0,44	0	-	0,00035	0,0032
RIBC2	<i>RIB43A Domain with Coiled-Coils 2</i>	1,46	0	-	5,00E-05	0,00061
SMPX	<i>Small Muscle Protein X-Linked</i>	1,6	0	-	5,00E-05	0,00061
SNORA25	<i>Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 25</i>	41,37	0	-	0,00015	0,00158

† EM: Medio de expansión; ‡ DM: medio de diferenciación. p-value: valor p no corregido del test estadístico; q-value: valor p ajustado por FDR del test estadístico.

Tabla 3. Lista de 171 genes inducidos (*UP*) en organoides ZZ diferenciados con expresión diferencial significativa ($q_value < 0,05$).

GENE_ID	GENE_NAME_UP	Dosis Expression MM	Dosis Expression ZZ	log2 (fold_change)	p_value	q_value
SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase acid like 3A(SMPDL3A)	39,477	128,768	1,7057	5,00E-05	0,0048
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1(ABCB1)	19,232	63,833	1,7308	5,00E-05	0,0048
ANK3	ankyrin 3(ANK3)	6,193	20,700	1,7408	5,00E-05	0,0048
CAPN9	calpain 9(CAPN9)	26,089	87,829	1,7513	5,00E-05	0,0048
SMIM22	small integral membrane protein 22(SMIM22)	64,338	216,809	1,7527	5,00E-05	0,0048
GSTA1	glutathione S-transferase alpha 1(GSTA1)	42,128	146,242	1,7955	5,00E-05	0,0048
RGS2	regulator of G-protein signaling 2(RGS2)	69,582	243,003	1,8042	5,00E-05	0,0048
NIPAL1	NIPA like domain containing 1(NIPAL1)	5,275	18,691	1,8252	5,00E-05	0,0048
MYO1B	myosin IB(MYO1B)	14,005	49,944	1,8344	5,00E-05	0,0048
GALNT12	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12(GALNT12)	9,013	32,620	1,8557	5,00E-05	0,0048
RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family (RAB3B)	6,770	24,559	1,8590	5,00E-05	0,0048
SEMA5A	semaphorin 5A(SEMA5A)	3,464	12,653	1,8689	5,00E-05	0,0048
SLCO2B1	solute carrier organic anion transporter family member 2B1(SLCO2B1)	11,823	44,896	1,9250	5,00E-05	0,0048
PSAPL1	prosaposin-like 1 (gene/pseudogene) (PSAPL1)	6,247	24,131	1,9498	5,00E-05	0,0048
OTOP3	otopetrin 3(OTOP3)	36,222	143,159	1,9827	5,00E-05	0,0048
HSPB1	heat shock protein family B (small) member 1(HSPB1)	72,583	292,652	2,0115	5,00E-05	0,0048
REG4	regenerating family member 4(REG4)	98,042	417,743	2,0911	5,00E-05	0,0048
UGT2B15	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B15(UGT2B15)	4,681	20,250	2,1131	5,00E-05	0,0048
RNASET2	ribonuclease T2(RNASET2)	26,748	117,760	2,1384	5,00E-05	0,0048
NPDC1	neural proliferation, differentiation and control 1(NPDC1)	24,879	112,313	2,1745	5,00E-05	0,0048
AGT	angiotensinogen (AGT)	47,044	216,188	2,2002	5,00E-05	0,0048
ANTXR1	anthrax toxin receptor 1(ANTXR1)	1,625	7,476	2,2019	5,00E-05	0,0048
PDZK1	PDZ domain containing 1(PDZK1)	6,951	32,132	2,2088	5,00E-05	0,0048
IKKBK	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta (IKKBK)	30,336	146,623	2,2730	5,00E-05	0,0048
CCL28	C-C motif chemokine ligand 28(CCL28)	12,218	59,268	2,2783	5,00E-05	0,0048
MPP6	membrane palmitoylated protein 6(MPP6)	2,499	12,203	2,2878	5,00E-05	0,0048
MMP7	matrix metalloproteinase 7(MMP7)	10,917	54,450	2,3184	5,00E-05	0,0048

GENE_ID	GENE NAME_UP	Dosis Expression MM	Dosis Expression ZZ	log2 (fold_change)	p_value	q_value
CLRN3	clarin 3(CLRN3)	23,785	119,952	2,3343	5,00E-05	0,0048
CYP27A1	cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1(CYP27A1)	9,742	49,749	2,3524	5,00E-05	0,0048
MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1(MGST1)	61,622	317,562	2,3655	5,00E-05	0,0048
CYP2C8	cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8(CYP2C8)	8,220	43,008	2,3874	5,00E-05	0,0048
MEP1A	meprin A subunit alpha (MEP1A)	2,330	12,251	2,3948	5,00E-05	0,0048
NPC1L1	NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1(NPC1L1)	7,145	38,638	2,4351	5,00E-05	0,0048
CYP2J2	cytochrome P450 family 2 subfamily J member 2(CYP2J2)	5,256	28,541	2,4409	5,00E-05	0,0048
PEG10	paternally expressed 10(PEG10)	16,128	95,683	2,5687	5,00E-05	0,0048
ACMSD	aminocarboxymuconate semialdehyde decarboxylase (ACMSD)	9,106	55,810	2,6157	5,00E-05	0,0048
AGR3	anterior gradient 3, protein disulphide isomerase family member (AGR3)	36,178	223,204	2,6252	5,00E-05	0,0048
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2(HMGCS2)	17,555	109,319	2,6386	5,00E-05	0,0048
TM4SF5	transmembrane 4 L six family member 5(TM4SF5)	33,767	210,478	2,6400	5,00E-05	0,0048
CACNA1H	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 H(CACNA1H)	0,745	4,708	2,6607	5,00E-05	0,0048
CELF2	CUGBP, Elav-like family member 2(CELF2)	0,059	0,402	2,7737	5,00E-05	0,0048
AGMO	alkylglycerol monooxygenase (AGMO)	6,156	42,549	2,7890	5,00E-05	0,0048
LGALS9C	galectin 9C(LGALS9C)	5,762	40,006	2,7956	5,00E-05	0,0048
HDAC9	histone deacetylase 9(HDAC9)	0,401	2,809	2,8076	5,00E-05	0,0048
GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1(GPD1)	1,299	10,064	2,9531	5,00E-05	0,0048
GBA3	glucosylceramidase beta 3 (gene/pseudogene) (GBA3)	5,212	40,842	2,9702	5,00E-05	0,0048
GSTA2	glutathione S-transferase alpha 2(GSTA2)	4,768	38,126	2,9992	5,00E-05	0,0048
ALDOB	aldolase, fructose-bisphosphate B(ALDOB)	11,528	95,033	3,0433	5,00E-05	0,0048
MUC3A	mucin 3A, cell surface associated (MUC3A)	7,220	59,986	3,0545	5,00E-05	0,0048
TTR	transthyretin (TTR)	4,832	40,429	3,0646	5,00E-05	0,0048
VTN	vitronectin (VTN)	74,235	675,502	3,1858	5,00E-05	0,0048
CLDN3	claudin 3(CLDN3)	2,998	27,693	3,2073	5,00E-05	0,0048
CYBA	cytochrome b-245 alpha chain (CYBA)	20,241	191,697	3,2435	5,00E-05	0,0048

GENE_ID	GENE NAME_UP	Dosis Expression MM	Dosis Expression ZZ	log2 (fold_change)	p_value	q_value
AMN	amnion associated transmembrane protein (AMN)	7,432	73,443	3,3048	5,00E-05	0,0048
CYP3A4	cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4(CYP3A4)	14,653	153,534	3,3893	5,00E-05	0,0048
MTRNR2L1	MT-RNR2-like 1(MTRNR2L1)	5,553	58,698	3,4021	5,00E-05	0,0048
PGC	progastricin (PGC)	1,827	19,988	3,4519	5,00E-05	0,0048
LOC100505817	uncharacterized LOC100505817(LOC100505817)	2,022	22,536	3,4781	5,00E-05	0,0048
PHACTR3	phosphatase and actin regulator 3(PHACTR3)	4,081	47,253	3,5335	5,00E-05	0,0048
ACP5	acid phosphatase 5, tartrate resistant (ACP5)	3,090	35,843	3,5362	5,00E-05	0,0048
SLC5A9	solute carrier family 5 member 9(SLC5A9)	0,551	6,562	3,5748	5,00E-05	0,0048
VNN1	vanin 1(VNN1)	26,561	332,431	3,6457	5,00E-05	0,0048
RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2) (RAC2)	1,832	24,032	3,7133	5,00E-05	0,0048
SPOCK2	SPARC/osteonectin, cwcv and kazal like domains proteoglycan 2(SPOCK2)	2,549	33,432	3,7134	5,00E-05	0,0048
KBTBD12	kelch repeat and BTB domain containing 12(KBTBD12)	0,275	4,417	4,0081	5,00E-05	0,0048
SLC26A3	solute carrier family 26 member 3(SLC26A3)	2,779	46,767	4,0727	5,00E-05	0,0048
PAX8-AS1	PAX8 antisense RNA 1(PAX8-AS1)	3,615	68,659	4,2475	5,00E-05	0,0048
UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7(UGT2B7)	5,099	96,908	4,2484	5,00E-05	0,0048
SLC30A2	solute carrier family 30 member 2(SLC30A2)	1,683	33,163	4,3003	5,00E-05	0,0048
CD36	CD36 molecule (CD36)	7,328	146,642	4,3227	5,00E-05	0,0048
SULT1C2	sulfotransferase family 1C member 2(SULT1C2)	3,016	60,969	4,3373	5,00E-05	0,0048
SLC27A2	solute carrier family 27 member 2(SLC27A2)	2,109	51,091	4,5988	5,00E-05	0,0048
UGT2B4	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4(UGT2B4)	2,269	61,153	4,7522	5,00E-05	0,0048
UGT2B28	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B28(UGT2B28)	9,041	276,525	4,9347	5,00E-05	0,0048
SLC16A4	solute carrier family 16 member 4(SLC16A4)	0,423	17,771	5,3932	5,00E-05	0,0048
SLC13A2	solute carrier family 13 member 2(SLC13A2)	0,764	38,590	5,6588	5,00E-05	0,0048
DOCK8	dedicator of cytokinesis 8(DOCK8)	0,077	4,805	5,9670	5,00E-05	0,0048
EVPL	envoplakin (EVPL)	0,135	11,984	6,4676	5,00E-05	0,0048
UPK1B	uroplakin 1B(UPK1B)	5,566	733,073	7,0412	5,00E-05	0,0048
CRAT8	cervical cancer-associated transcript 8(CRAT8)	0,000	8,196	-	5,00E-05	0,0048
CST4	cystatin S(CST4)	0,000	10,088	-	5,00E-05	0,0048

GENE_ID	GENE_NAME_UP	Dosis Expression MM	Dosis Expression ZZ	log2 (fold_change)	p_value	q_value
GSTM1	glutathione S-transferase mu 1(GSTM1)	0,000	3,622	-	5,00E-05	0,0048
HLA-DRB3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3(HLA-DRB3)	0,000	0,568	-	5,00E-05	0,0048
LINC01426	long intergenic non-protein coding RNA 1426(LINC01426)	0,000	1,109	-	5,00E-05	0,0048
MMP17	matrix metalloproteinase 17(MMP17)	0,000	0,465	-	5,00E-05	0,0048
MYL4	myosin light chain 4(MYL4)	0,000	1,297	-	5,00E-05	0,0048
ORM1	orosomucoid 1(ORM1)	0,000	1,330	-	5,00E-05	0,0048
SI	sucrase-isomaltase (SI)	0,000	1,075	-	5,00E-05	0,0048
SLC25A47	solute carrier family 25 member 47(SLC25A47)	0,000	0,397	-	5,00E-05	0,0048
SOAT2	sterol O-acyltransferase 2(SOAT2)	0,000	0,392	-	5,00E-05	0,0048
TMEM173	transmembrane protein 173(TMEM173)	0,000	2,077	-	5,00E-05	0,0048
TM6SF2	transmembrane 6 superfamily member 2(TM6SF2)	28,975	82,086	1,5023	0,0001	0,0085
GBP3	guanylate binding protein 3(GBP3)	45,394	133,146	1,5524	0,0001	0,0085
MYO7B	myosin VIIb(MYO7B)	6,750	21,173	1,6493	0,0001	0,0085
BAIAP2L2	BAI1 associated protein 2 like 2(BAIAP2L2)	8,819	30,127	1,7723	0,0001	0,0085
STX1A	syntaxin 1A(STX1A)	5,975	24,275	2,0224	0,0001	0,0085
TMEM98	transmembrane protein 98(TMEM98)	15,202	62,250	2,0338	0,0001	0,0085
C8G	complement C8 gamma chain(C8G)	3,714	29,736	3,0013	0,0001	0,0085
MYOM3	myomesin 3(MYOM3)	0,665	6,764	3,3468	0,0001	0,0085
MEP1B	mepirin A subunit beta (MEP1B)	1,516	18,062	3,5751	0,0001	0,0085
PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor (PCSK1N)	2,432	29,938	3,6215	0,0001	0,0085
CECR1	cat eye syndrome chromosome region, candidate 1(CECR1)	0,114	1,588	3,7978	0,0001	0,0085
ASS1	argininosuccinate synthase 1(ASS1)	29,391	85,767	1,5450	0,00015	0,0119
FBP1	fructose-bisphosphatase 1(FBP1)	23,869	70,219	1,5567	0,00015	0,0119
TFF3	trefoil factor 3(TFF3)	134,125	510,050	1,9271	0,00015	0,0119
SLC16A7	solute carrier family 16 member 7(SLC16A7)	0,885	4,064	2,1999	0,00015	0,0119
CYP4F2	cytochrome P450 family 4 subfamily F member 2(CYP4F2)	2,759	13,185	2,2567	0,00015	0,0119
TPM2	tropomyosin 2 (beta)(TPM2)	7,852	39,707	2,3382	0,00015	0,0119
PON1	paraoxonase 1(PON1)	1,011	11,113	3,4581	0,00015	0,0119
BATF	basic leucine zipper ATF-like transcription factor (BATF)	0,951	55,842	5,8761	0,00015	0,0119
SLC6A20	solute carrier family 6 member 20(SLC6A20)	8,155	23,068	1,5002	0,0002	0,0149

GENE_ID	GENE NAME_UP	Dosis Expression MM	Dosis Expression ZZ	log2 (fold_change)	p_value	q_value
CYP4F12	cytochrome P450 family 4 subfamily F member 12(CYP4F12)	12,727	39,588	1,6372	0,0002	0,0149
BTNL8	butyrophilin like 8(BTNL8)	13,972	46,533	1,7358	0,0002	0,0149
ABCG2	ATP binding cassette subfamily G member 2 (Junior blood group) (ABCG2)	5,830	20,374	1,8053	0,0002	0,0149
PIGR	polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)	12,125	42,796	1,8195	0,0002	0,0149
RBP4	retinol binding protein 4(RBP4)	25,434	89,927	1,8220	0,0002	0,0149
AKR1C4	aldo-keto reductase family 1 member C4(AKR1C4)	5,035	24,795	2,2998	0,0002	0,0149
NDUFA4	NDUFA4, mitochondrial complex associated (NDUFA4)	53,165	159,879	1,5884	0,00025	0,0176
FAM3D	family with sequence similarity 3 member D(FAM3D)	61,120	208,229	1,7685	0,00025	0,0176
FTL	ferritin light chain(FTL)	605,185	2703,700	2,1595	0,0003	0,0207
KCNJ2	potassium voltage-gated channel subfamily J member 2(KCNJ2)	0,739	4,116	2,4776	0,0003	0,0207
MAP9	microtubule associated protein 9(MAP9)	0,431	2,423	2,4914	0,0003	0,0207
CROT	carnitine O-octanoyltransferase (CROT)	14,656	40,346	1,4610	0,00035	0,0231
CIDEc	cell death inducing DFFA like effector c(CIDEc)	44,761	147,465	1,7201	0,00035	0,0231
NPY5R	neuropeptide Y receptor Y5(NPY5R)	0,000	0,393	-	0,00035	0,0231
GSTO1	glutathione S-transferase omega 1(GSTO1)	99,608	270,819	1,4430	0,00045	0,0283
CYP3A7	cytochrome P450 family 3 subfamily A member 7(CYP3A7)	5,554	21,454	1,9497	0,00045	0,0283
NDUFB2	NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit B2(NDUFB2)	114,465	298,274	1,3817	0,0005	0,0301
CCL15	C-C motif chemokine ligand 15(CCL15)	4,474	18,804	2,0714	0,0005	0,0301
NECTIN4	nectin cell adhesion molecule 4(NECTIN4)	1,937	8,177	2,0774	0,0005	0,0301
CTSC	cathepsin C(CTSC)	3,863	18,223	2,2380	0,0005	0,0301
C14orf105	chromosome 14 open reading frame 105(C14orf105)	1,760	11,101	2,6570	0,0005	0,0301
SMIM24	small integral membrane protein 24(SMIM24)	0,934	15,357	4,0398	0,0005	0,0301
SLC10A2	solute carrier family 10 member 2(SLC10A2)	0,354	6,087	4,1038	0,0005	0,0301
ACE	angiotensin I converting enzyme (ACE)	0,065	2,961	5,5107	0,0005	0,0301
B2M	beta-2-microglobulin(B2M)	192,780	532,458	1,4657	0,00055	0,0323
KLHL41	kelch like family member 41(KLHL41)	0,225	3,630	4,0101	0,00055	0,0323
CLDN23	claudin 23(CLDN23)	18,509	53,324	1,5266	0,0006	0,0342
SPINK1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1(SPINK1)	195,946	587,262	1,5836	0,0006	0,0342
TP53TG1	TP53 target 1 (non-protein coding) (TP53TG1)	23,335	75,056	1,6855	0,0006	0,0342
ASL	argininosuccinate lyase (ASL)	66,971	180,214	1,4281	0,00065	0,0365

GENE_ID	GENE NAME_UP	Dosis Expression MM	Dosis Expression ZZ	log2 (fold_change)	p_value	q_value
FREM1	FRAS1 related extracellular matrix 1(FREM1)	0,151	1,176	2,9647	0,00065	0,0365
PROCR	protein C receptor (PROCR)	1,632	13,282	3,0245	0,00065	0,0365
TM4SF20	transmembrane 4 L six family member 20(TM4SF20)	0,183	4,639	4,6654	0,00065	0,0365
GALNT3	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3(GALNT3)	19,470	50,414	1,3726	0,0007	0,0380
SLC17A5	solute carrier family 17 member 5(SLC17A5)	53,863	151,684	1,4937	0,0007	0,0380
ADIRF	adipogenesis regulatory factor (ADIRF)	51,968	150,973	1,5386	0,0007	0,0380
LAMB1	laminin subunit beta 1(LAMB1)	2,908	8,737	1,5873	0,0007	0,0380
SEMA3E	semaphorin 3E(SEMA3E)	5,218	16,431	1,6549	0,0007	0,0380
SNTB1	syntrophin beta 1(SNTB1)	1,613	6,144	1,9296	0,0007	0,0380
HABP2	hyaluronan binding protein 2(HABP2)	58,370	169,456	1,5376	0,00075	0,0398
PHGR1	proline, histidine and glycine rich 1(PHGR1)	1053,430	5623,550	2,4164	0,00075	0,0398
CYB5A	cytochrome b5 type A(CYB5A)	248,866	685,766	1,4624	0,0008	0,0416
SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9 like (SAMD9L)	7,038	23,104	1,7150	0,0008	0,0416
STEAP2	STEAP2 metalloredutase (STEAP2)	5,295	18,145	1,7768	0,0008	0,0416
MS4A8	membrane spanning 4-domains A8(MS4A8)	3,873	29,401	2,9245	0,0008	0,0416
GNAI1	G protein subunit alpha i1(GNAI1)	19,121	45,690	1,2567	0,00085	0,0427
GPT	glutamic--pyruvic transaminase (GPT)	8,231	24,863	1,5949	0,00085	0,0427
IL18	interleukin 18(IL18)	14,790	47,230	1,6751	0,00085	0,0427
SNX8	sorting nexin 8(SNX8)	2,925	9,550	1,7069	0,00085	0,0427
PECR	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase (PECR)	5,192	19,306	1,8947	0,00085	0,0427
ENTPD2	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2(ENTPD2)	2,552	13,955	2,4513	0,00085	0,0427
TMEM144	transmembrane protein 144(TMEM144)	7,339	19,863	1,4364	0,0009	0,0443
ABHD11	abhydrolase domain containing 11(ABHD11)	12,328	40,067	1,7005	0,0009	0,0443
CLDN4	claudin 4(CLDN4)	134,475	450,988	1,7458	0,0009	0,0443
TUBB2A	tubulin beta 2A class IIa (TUBB2A)	19,930	55,637	1,4811	0,00095	0,0459
KLHL4	kelch like family member 4(KLHL4)	1,947	8,060	2,0499	0,00095	0,0459
RN7SL2	RNA, 7SL, cytoplasmic 2(RN7SL2)	43,947	183,601	2,0628	0,00095	0,0459
PLBD1	phospholipase B domain containing 1(PLBD1)	9,225	33,345	1,8539	0,001	0,0481
FAM3C	family with sequence similarity 3 member C(FAM3C)	51,936	125,323	1,2708	0,00105	0,0498
GLIPR2	GLI pathogenesis related 2(GLIPR2)	0,050	0,401	3,0131	0,00105	0,0498

Tabla 4. Lista de 114 genes reprimidos (*DOWN*) en organoides ZZ diferenciados con expresión diferencial significativa ($q_value < 0,05$).

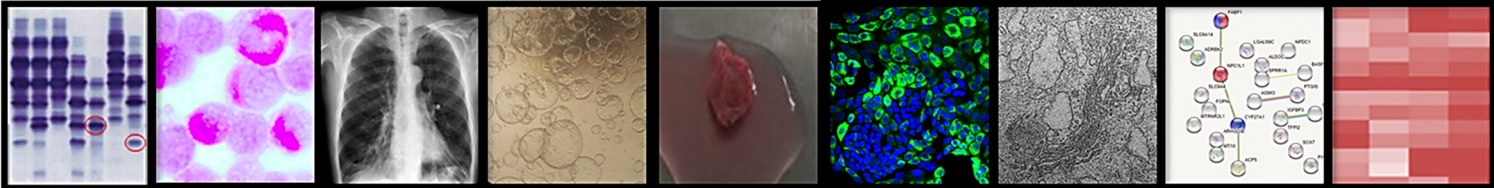
GENE_ID	GENE_NAME_DOWN	Dosis Expression MM	Dosis Expression ZZ	log2 (fold_change)	p_value	q_value
APLP1	amyloid beta precursor like protein 1(APLP1)	51,7752	10,5453	-2,2957	0,00005	0,0048
AQP3	aquaporin 3 (Gill blood group) (AQP3)	43,9253	10,5586	-2,0566	0,00005	0,0048
BASP1	brain abundant membrane attached signal protein 1(BASP1)	51,8262	3,4283	-3,9181	0,00005	0,0048
C3	complement C3(C3)	53,4661	3,5515	-3,9121	0,00005	0,0048
CAPRN2	caprin family member 2(CAPRN2)	24,5226	4,3738	-2,4872	0,00005	0,0048
CD177	CD177 molecule(CD177)	1,7435	0,0000	-	0,00005	0,0048
CFB	complement factor B(CFB)	4,4022	0,0000	-	0,00005	0,0048
DPP10	dipeptidyl peptidase like 10(DPP10)	0,6915	0,0650	-3,4113	0,00005	0,0048
FAM90A1	family with sequence similarity 90 member A1(FAM90A1)	0,7939	0,0000	-	0,00005	0,0048
FBXL7	F-box and leucine rich repeat protein 7(FBXL7)	1,2683	0,0000	-	0,00005	0,0048
FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1(FGFBP1)	67,8013	2,4718	-4,7777	0,00005	0,0048
FOPNL	FGFR1OP N-terminal like (FOPNL)	1,2140	0,0000	-	0,00005	0,0048
GABRB3	gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit (GABRB3)	11,4717	0,5438	-4,3989	0,00005	0,0048
GABRE	gamma-aminobutyric acid type A receptor epsilon subunit (GABRE)	14,6431	1,1422	-3,6803	0,00005	0,0048
GATA5	GATA binding protein 5(GATA5)	11,1209	1,6353	-2,7657	0,00005	0,0048
GKN1	gastrokine 1(GKN1)	1655,6500	5,9862	-8,1115	0,00005	0,0048
GKN2	gastrokine 2(GKN2)	529,8660	9,3751	-5,8207	0,00005	0,0048
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1(HLA-DQB1)	8,2361	0,0000	-	0,00005	0,0048
HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1(HLA-DRB1)	19,4634	0,0000	-	0,00005	0,0048
HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5(HLA-DRB5)	1,9535	0,0000	-	0,00005	0,0048
HSPA2	heat shock protein family A (Hsp70) member 2(HSPA2)	21,4201	4,7827	-2,1631	0,00005	0,0048
IER3	immediate early response 3(IER3)	0,5043	0,0000	-	0,00005	0,0048
IGFBP5	insulin like growth factor binding protein 5(IGFBP5)	1,7116	0,0000	-	0,00005	0,0048
LOC339975	uncharacterized LOC339975(LOC339975)	1,2070	0,0000	-	0,00005	0,0048
MAL	mal, T-cell differentiation protein (MAL)	34,5547	1,7314	-4,3188	0,00005	0,0048
MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2(MBOAT2)	25,0719	7,6073	-1,7206	0,00005	0,0048

GENE_ID	GENE_NAME_DOWN	Dosis Expression MM	Dosis Expression ZZ	log2 (fold_change)	p_value	q_value
MFAP5	microfibrillar associated protein 5(MFAP5)	11,2088	0,4255	-4,7193	0,00005	0,0048
MRPL45	mitochondrial ribosomal protein L45(MRPL45)	1,1329	0,0000	-	0,00005	0,0048
MSN	moesin(MSN)	24,0835	1,0973	-4,4561	0,00005	0,0048
NUP210	nucleoporin 210(NUP210)	6,6119	1,1173	-2,5651	0,00005	0,0048
PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6(PCSK6)	12,9554	1,5308	-3,0812	0,00005	0,0048
PRSS21	protease, serine 21(PRSS21)	0,8182	0,0000	-	0,00005	0,0048
RANBP3L	RAN binding protein 3 like (RANBP3L)	0,4095	0,0000	-	0,00005	0,0048
SDK1	sidekick cell adhesion molecule 1(SDK1)	3,6503	0,4086	-3,1593	0,00005	0,0048
SERPINA3	serpin family A member 3(SERPINA3)	264,0700	14,3385	-4,2030	0,00005	0,0048
SERPINA5	serpin family A member 5(SERPINA5)	100,2290	11,5560	-3,1166	0,00005	0,0048
SLC6A12	solute carrier family 6 member 12(SLC6A12)	33,8635	4,1595	-3,0253	0,00005	0,0048
SLC9A4	solute carrier family 9 member A4(SLC9A4)	5,2396	0,6126	-3,0964	0,00005	0,0048
SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family member 4A1(SLCO4A1)	28,4553	6,8694	-2,0504	0,00005	0,0048
SPP1	secreted phosphoprotein 1(SPP1)	11,4837	0,8690	-3,7241	0,00005	0,0048
ST6GAL1	ST6 beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1(ST6GAL1)	23,2770	4,0115	-2,5367	0,00005	0,0048
ST6GALNAC3	ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3(ST6GALNAC3)	21,1218	1,8038	-3,5497	0,00005	0,0048
TACC1	transforming acidic coiled-coil containing protein 1(TACC1)	8,4181	1,8667	-2,1730	0,00005	0,0048
TBC1D2B	TBC1 domain family member 2B(TBC1D2B)	34,3289	10,1870	-1,7527	0,00005	0,0048
THNSL2	threonine synthase like 2(THNSL2)	7,9712	0,0000	-	0,00005	0,0048
TLR8-AS1	TLR8 antisense RNA 1(TLR8-AS1)	2,0217	0,0000	-	0,00005	0,0048
TNS4	tensin 4(TNS4)	43,0833	8,6289	-2,3199	0,00005	0,0048
TPST2	tyrosylprotein sulfotransferase 2(TPST2)	43,6195	4,9101	-3,1512	0,00005	0,0048
TSPYL2	TSPY like 2(TSPYL2)	12,5508	2,3753	-2,4016	0,00005	0,0048
B4GALNT3	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 3(B4GALNT3)	9,2451	1,2924	-2,8387	0,00010	0,0085
GRK3	G protein-coupled receptor kinase 3(GRK3)	2,0551	0,1007	-4,3506	0,00010	0,0085
HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet associated (HILPDA)	24,6663	4,3783	-2,4941	0,00010	0,0085
ITGB8	integrin subunit beta 8(ITGB8)	8,9576	2,3900	-1,9061	0,00010	0,0085
KLK7	kallikrein related peptidase 7(KLK7)	31,1979	4,3721	-2,8350	0,00010	0,0085
LYNX1	Ly6/neurotoxin 1(LYNX1)	32,0796	8,5583	-1,9063	0,00010	0,0085
NELL2	neural EGFL like 2(NELL2)	13,8553	2,1542	-2,6852	0,00010	0,0085
TNFSF9	tumor necrosis factor superfamily member 9(TNFSF9)	50,2329	13,9159	-1,8519	0,00010	0,0085

GENE_ID	GENE_NAME_DOWN	Dosis Expression MM	Dosis Expression ZZ	log2 (fold_change)	p_value	q_value
AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2(AHNAK2)	3,9415	1,0143	-1,9583	0,00015	0,0119
ESRG	embryonic stem cell related (non-protein coding) (ESRG)	25,9677	8,4426	-1,6210	0,00015	0,0119
PTPN14	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14(PTPN14)	2,5637	0,5517	-2,2161	0,00015	0,0119
TBC1D3E	TBC1 domain family member 3E(TBC1D3E)	0,4014	0,0000	-	0,00015	0,0119
CCNA1	cyclin A1(CCNA1)	7,1558	0,2040	-5,1323	0,00020	0,0149
COL13A1	collagen type XIII alpha 1 chain (COL13A1)	1,2397	0,0576	-4,4280	0,00020	0,0149
ETS1	ETS proto-oncogene 1, transcription factor(ETS1)	8,9016	2,4433	-1,8652	0,00020	0,0149
PTGIS	prostaglandin I2 synthase(PTGIS)	5,8851	1,1209	-2,3924	0,00020	0,0149
ADGRL1	adhesion G protein-coupled receptor L1(ADGRL1)	28,1105	10,6308	-1,4029	0,00025	0,0176
APBB1IP	amyloid beta precursor protein binding family B member 1 interacting protein (APBB1IP)	3,8022	0,3026	-3,6512	0,00025	0,0176
CNN3	calponin 3(CNN3)	12,2844	3,3991	-1,8536	0,00025	0,0176
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2(NCF2)	11,8145	2,0044	-2,5593	0,00025	0,0176
QKI	QKI, KH domain containing RNA binding (QKI)	5,8052	1,5929	-1,8657	0,00025	0,0176
SYNE2	spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2(SYNE2)	17,8099	2,4965	-2,8347	0,00025	0,0176
VEGFA	vascular endothelial growth factor A(VEGFA)	115,6850	37,7859	-1,6143	0,00025	0,0176
ZBED2	zinc finger BED-type containing 2(ZBED2)	35,7436	11,1579	-1,6796	0,00025	0,0176
LOC101927354	uncharacterized LOC101927354(LOC101927354)	14,9045	0,7749	-4,2656	0,00030	0,0207
CALCA	calcitonin related polypeptide alpha(CALCA)	0,3982	0,0000	-	0,00035	0,0231
HOMER2	homer scaffolding protein 2(HOMER2)	27,9187	8,4826	-1,7187	0,00035	0,0231
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2(IFITM2)	24,0312	1,4574	-4,0434	0,00035	0,0231
KIAA1324L	KIAA1324 like(KIAA1324L)	2,7784	0,3495	-2,9910	0,00035	0,0231
SLC44A5	solute carrier family 44 member 5(SLC44A5)	3,9684	0,2009	-4,3043	0,00035	0,0231
SLC5A5	solute carrier family 5 member 5(SLC5A5)	9,5796	1,1920	-3,0066	0,00035	0,0231
AKR1B1	aldo-keto reductase family 1 member B(AKR1B1)	207,3220	52,7666	-1,9742	0,00040	0,0260
PSMD5-AS1	PSMD5 antisense RNA 1 (head to head) (PSMD5-AS1)	8,2166	2,3352	-1,8150	0,00040	0,0260
VCAN	versican(VCAN)	15,0290	5,5154	-1,4462	0,00040	0,0260
AOX1	aldehyde oxidase 1(AOX1)	2,7451	0,1120	-4,6151	0,00045	0,0283
CADM1	cell adhesion molecule 1(CADM1)	1,8672	0,2794	-2,7407	0,00045	0,0283

GENE_ID	GENE_NAME_DOWN	Dosis Expression MM	Dosis Expression ZZ	log2 (fold_change)	p_value	q_value
CCDC80	coiled-coil domain containing 80(CCDC80)	4,4737	0,2845	-3,9748	0,00045	0,0283
IGFBP3	insulin like growth factor binding protein 3(IGFBP3)	13,1012	3,2168	-2,0260	0,00045	0,0283
TMEM27	transmembrane protein 27(TMEM27)	34,4453	9,8058	-1,8126	0,00045	0,0283
ASPHD2	aspartate beta-hydroxylase domain containing 2(ASPHD2)	35,9379	12,4029	-1,5348	0,00050	0,0301
KANK2	KN motif and ankyrin repeat domains 2(KANK2)	15,6015	5,5164	-1,4999	0,00050	0,0301
ARL4D	ADP ribosylation factor like GTPase 4D(ARL4D)	5,7935	0,7462	-2,9569	0,00055	0,0323
DDX11	DEAD/H-box helicase 11(DDX11)	2,2056	0,2522	-3,1284	0,00055	0,0323
SECTM1	secreted and transmembrane 1(SECTM1)	29,3941	9,4156	-1,6424	0,00055	0,0323
DUSP7	dual specificity phosphatase 7(DUSP7)	11,3879	3,7903	-1,5871	0,00060	0,0342
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1(FGFR1)	3,4045	0,4755	-2,8400	0,00060	0,0342
GALNT6	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6(GALNT6)	9,7518	2,7602	-1,8209	0,00060	0,0342
MAF	MAF bZIP transcription factor (MAF)	3,7289	1,0949	-1,7680	0,00060	0,0342
SLC12A2	solute carrier family 12 member 2(SLC12A2)	44,5743	13,6609	-1,7062	0,00070	0,0380
TSC22D3	TSC22 domain family member 3(TSC22D3)	271,5010	66,7055	-2,0251	0,00070	0,0380
ADCY9	adenylate cyclase 9(ADCY9)	6,1459	2,1794	-1,4957	0,00075	0,0398
CARNS1	carnosine synthase 1(CARNS1)	11,0970	2,9562	-1,9083	0,00075	0,0398
NRG1	neuregulin 1(NRG1)	2,3183	0,3494	-2,7302	0,00075	0,0398
PRKXP1	protein kinase, X-linked, pseudogene 1(PRKXP1)	1,3703	0,1763	-2,9581	0,00075	0,0398
FN1	fibronectin 1(FN1)	1,5018	0,2893	-2,3759	0,00080	0,0416
CNNM1	cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 1(CNNM1)	17,0036	5,8650	-1,5357	0,00085	0,0427
PLXND1	plexin D1(PLXND1)	2,6114	0,3653	-2,8378	0,00085	0,0427
SHROOM4	shroom family member 4(SHROOM4)	1,3289	0,1174	-3,5007	0,00085	0,0427
ADAMTS9	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9(ADAMTS9)	6,6340	2,0550	-1,6907	0,00090	0,0443
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4(CXCR4)	8,2472	1,3513	-2,6096	0,00090	0,0443
ZNF204P	zinc finger protein 204, pseudogene (ZNF204P)	12,6041	3,6703	-1,7799	0,00090	0,0443
KRT6A	keratin 6A(KRT6A)	191,8920	54,4642	-1,8169	0,00095	0,0459
SOX9	SRY-box 9(SOX9)	13,0535	4,4400	-1,5558	0,00095	0,0459
NTRK2	neurotrophic receptor tyrosine kinase 2(NTRK2)	3,3518	0,3691	-3,1827	0,00105	0,0498
TNS1	tensin 1(TNS1)	1,9098	0,2552	-2,9038	0,00105	0,0498

Publicaciones, ponencias y congresos



PUBLICACIONES, PONENCIAS ORALES Y POSTERS

Publicaciones

1. **Gómez-Mariano G**, Matamala N, Martínez S, Justo I, Marcacuzco A, Jimenez C, Monzón S, Cuesta I, Garfia C, Martínez MT, Huch M, Pérez de Castro I, Posada M, Janciauskiene S, Martínez-Delgado B. Liver organoids reproduce alpha-1 antitrypsin deficiency-related liver disease. *Hepatology Int.* 2020 Jan; 14 (1):127-137. doi: 10.1007/s12072-019-10007-y. Epub 2019 Dec 13. PMID: 31832977; PMCID: PMC6994530.
2. **Matamala N***, **Gomez-Mariano G***, Perez JA, Baladrón B, Torres-Durán M, Michel FJ, Saez R, Hernández-Pérez JM, Belmonte I, Rodríguez-Frias F, Blanco I, Strnad P, Janciauskiene S, Martinez-Delgado B. New cis-acting Variants in PI*S Background Produce Null Phenotypes Causing Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020 Jun 9. doi: 10.1165/rcmb.2020-0021OC. Epub ahead of print. PMID: 32515985. * **Igual contribución de los autores.**

Otras publicaciones relacionadas

1. Matamala N, Aggarwal N, Iadarola P, Fumagalli M, **Gomez-Mariano G**, Lara B, Martinez MT, Cuesta I, Stolk J, Janciauskiene S, Martinez-Delgado B. Identification of Novel Short C-Terminal Transcripts of Human SERPINA1 Gene. *PLoS One.* 2017 Jan 20; 12 (1):e0170533. doi: 10.1371/journal.pone.0170533. PMID: 28107454; PMCID: PMC5249162.
2. Matamala N, Lara B, **Gomez-Mariano G**, Martínez S, Retana D, Fernandez T, Silvestre RA, Belmonte I, Rodríguez-Frias F, Vilar M, Sáez R, Iturbe I, Castillo S, Molina-Molina M, Texido A, Tirado-Conde G, Lopez-Campos JL, Posada M, Blanco I, Janciauskiene S, Martinez-Delgado B. Characterization of Novel Missense Variants of SERPINA1 Gene Causing Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018 Jun; 58 (6):706-716. doi: 10.1165/rcmb.2017-0179OC. PMID: 29232161.
3. Ercetin E, Richtmann S, Delgado BM, **Gomez-Mariano G**, Wrenger S, Korenbaum E, Liu B, DeLuca D, Kühnel MP, Jonigk D, Yuskaeva K, Warth A, Muley T, Winter H, Meister M, Welte T, Janciauskiene S, Schneider MA. Clinical Significance of SERPINA1 Gene and Its Encoded Alpha1-antitrypsin Protein in NSCLC. *Cancers (Basel).* 2019 Sep 4; 11 (9):1306. doi: 10.3390/cancers11091306. PMID: 31487965; PMCID: PMC6770941.
4. Matamala N, Lara B, **Gómez-Mariano G**, Martínez S, Vázquez-Domínguez I, Otero-Sobrino Á, Muñoz-Callejas A, Sánchez E, Esquinas C, Bustamante A, Cadenas S, Curi S, Lázaro L, Martínez MT, Rodríguez E, Miravittles M, Torres-Duran M, Herrero I, Michel FJ, Castillo S,

Hernández-Pérez JM, Blanco I, Casas F, Martínez-Delgado B. miR-320c Regulates SERPINA1 Expression and Is Induced in Patients With Pulmonary Disease. Arch Bronconeumol. 2020 May 18;S0300-2896(20)30084-3. English, Spanish. doi: 10.1016/j.arbres.2020.03.006. Epub ahead of print. PMID: 32439252.

Ponencias orales

Gema Gómez-Mariano; Nerea Matamala; Selene Martínez; Iago Justo; Alberto Marcacuzco; Carlos Jiménez; Sara Monzón; Isabel Cuesta; Maritxell Huch; Beatriz Martínez-Delgado. "Identificación de vías de señalización alteradas en organoides de hígado de pacientes con Déficit de Alfa-1-Antitripsina mediante RNASeq". AEGH 2019, MADRID España.

Posters

1. **Gema Gómez-Mariano** ; N. Matamala ; S. Martínez ; I. Justo ; A. Marcacuzco ; C. Jiménez ; M. Huch ; B. Martínez-Delgado ; "Alpha 1 Antitrypsin Deficiency molecular mechanisms in liver organoids". ERS 2019, MADRID España.
2. **Gema Gómez-Mariano**; Nerea Matamala; Iago Justo; Alberto Marcacuzco; Carlos Jiménez; Cristina Garfia; Meritxell Huch; Sabina Janciauskiene; Beatriz Martínez-Delgado; "Organoids as a model for AAT deficiency liver disease". AATD Liver 2019, POZZULI Italia.
3. **Gema Gómez-Mariano**; Nerea Matamala; Selene Martínez; Iago Justo; Alberto Marcacuzco; Carlos Jiménez; Sara Monzón; Isabel Cuesta; Meritxell Huch; Beatriz Martínez-Delgado. "Transcriptomic analysis of liver organoids reveals altered metabolic Pathways in alpha 1 antitrypsin deficiency". ESGH 2019 GOTHENBURG, Suecia
4. Nerea Matamala; **Gema Gómez-Mariano**; Selene Martínez; Alejandra Damián; Virginia Aquino; Sheila Ramos; Irene Gonzalo; Raquel Sáez; Igor Turbe; Javier Michel; María Molina-Molina; María Del Puerto; Ignacio Blanco; Cristina Esquinas; Francisco Casas; Beatriz Martínez-Delgado. "Molecular characterization of novel PiS-like alleles identified in Spanish patients with Alpha-1 antitrypsin deficiency". ERS 2018 PARIS, Francia
5. Nerea Matamala; **Gema Gómez-Mariano**; Selene Martínez; Alejandra Damián; Sheila Ramos; Virginia Aquino; Irene Gonzalo; Ana Navarro; Beatriz Martínez-Delgado. "Comparison between functional predictors and in vitro effect of alpha-1 antitrypsin missense variants". ERS 2018 PARIS, Francia.
6. Nerea Matamala; **Gema Gómez**; Selene Martínez; Alejandra Damián; Cristina Esquinas; Ana Bustamante; Sergio Cadenas; Sergio Curí; , Lourdes Lázaro; María Teresa Martínez; Esther Rodríguez; María Torres; Inés Herrero; Francisco Javier Michel; Silvia Castillo; Francisco Dasí; Francisco Rodríguez Frías; Amparo Escribano; M.ª Jesús Cabero; Marc Miravittles; Beatriz Lara; Ignacio Blanco; Francisco Casas; Beatriz Martínez-Delgado; Importancia del

diagnóstico genético en pacientes con Déficit de Alfa-1 Antitripsina. Estimación de variantes raras e identificación de nuevas variantes en población española. SEPAR 2018 PALMA DE MALLORCA, España.

7. **Gema Gómez-Mariano**; Carolina Epifanio; Nerea Matamala; Selene Martínez; María Teresa Martínez; Meritxell Huch; Ignacio Pérez de Castro; Beatriz Martínez-Delgado. "Alpha-1 antitrypsin gene expression in liver organoids". EHG 2017 Dinamarca.
8. **Gema Gómez Mariano**; Carolina Epifanio; Nerea Matamala; Selene Martínez; María Teresa Martínez; Meritxell Huch; Ignacio Pérez de Castro; Beatriz Martínez-Delgado. "Desarrollo de organoides de hígado como modelo de enfermedad hepática en el déficit de alfa 1 antitripsina". AEGH 2017 MADRID, España.

*Liver organoids reproduce alpha-1
antitrypsin deficiency-related liver disease*

**Gema Gómez-Mariano, Nerea
Matamala, Selene Martínez, Iago Justo,
Alberto Marcacuzco, Carlos Jimenez,
Sara Monzón, Isabel Cuesta, et al**

Hepatology International

ISSN 1936-0533

Hepatol Int

DOI 10.1007/s12072-019-10007-y



Your article is published under the Creative Commons Attribution license which allows users to read, copy, distribute and make derivative works, as long as the author of the original work is cited. You may self-archive this article on your own website, an institutional repository or funder's repository and make it publicly available immediately.



Liver organoids reproduce alpha-1 antitrypsin deficiency-related liver disease

Gema Gómez-Mariano¹ · Nerea Matamala¹ · Selene Martínez¹ · Iago Justo² · Alberto Marcacuzco² · Carlos Jimenez² · Sara Monzón³ · Isabel Cuesta³ · Cristina Garfía⁴ · María Teresa Martínez⁵ · Meritxell Huch⁶ · Ignacio Pérez de Castro⁷ · Manuel Posada⁸ · Sabina Janciauskiene⁹ · Beatriz Martínez-Delgado^{1,8}

Received: 30 August 2019 / Accepted: 26 November 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

Background and aims Alpha-1 antitrypsin (AAT) is a product of *SERPINA1* gene mainly expressed by hepatocytes. Clinically relevant mutations in the *SERPINA1* gene, such as Z (Glu342Lys), results in an expression of misfolded AAT protein having high propensity to polymerize, accumulate in hepatocytes and thus to enhance a risk for hepatocyte damage and subsequent liver disease. So far, the relationship between the Z-AAT accumulation and liver cell damage remains not completely understood. We present three-dimensional organoid culture systems, as a novel tool for modeling Z-AAT-related liver diseases.

Methods We have established liver organoids from liver biopsies of patients with homozygous (ZZ) and heterozygous (MZ) deficiency and normal (MM) genotypes of AAT. The features of these organoid models were characterized by analyzing AAT protein secretion and intracellular aggregation in MZ and ZZ genotypes as well as *SERPINA1* expression in differentiated cultures.

Results Transcriptional analysis of differentiated organoid cultures by RNA-Seq showed hepatocyte-specific gene expression profile. Genes, such as *ALB*, *APOB*, *CYP3A4* and *SERPINA1*, were validated and confirmed through quantitative-PCR analysis. The organoids from MZ and ZZ cases showed intracellular aggregation and lower secretion of AAT protein, and lower expression of *ALB* and *APOB*, as typically seen in hepatocytes from Z-AAT deficiency patients. Furthermore, organoids responded to external stimulus. Treatment with oncostatin M, a well-known inducer of *SERPINA1*, increased expression of the full-length transcripts (AAT-1C) as well as the short transcript of AAT (AAT-ST1C4).

Conclusions Liver organoid model recapitulates the key features of Z-AAT deficiency and provides a useful tool for disease modeling.

Keywords Organoids · Liver · Alpha-1 antitrypsin deficiency · Oncostatin M · RNA-seq · SERPINA1

Introduction

Alpha1-antitrypsin (AAT), a prototypic member of the serine protease inhibitor (serpin) superfamily, is mainly produced by hepatocytes. A normal concentration of the AAT in

human blood ranges between 1 and 2 g/l and it is estimated that liver accounts for about 80% of the total circulating AAT [1]. Human AAT is also an acute phase glycoprotein with broad anti-protease and anti-inflammatory functions, and therefore AAT deficiency leads to various health problems, including liver disorders [2].

AAT is encoded by the *SERPINA1* gene located at the distal end of the long arm of chromosome 14. The typical *SERPINA1* gene consists of two alleles, named M, which are responsible for the synthesis of quantitatively and qualitatively normal AAT. The most frequent deficient alleles are so called S (Glu264Val) and Z (Glu342Lys). The combinations of the M, S and Z alleles give rise to the different genotypes MM, SS, MZ, SZ and ZZ. The homozygous ZZ genotype is the most relevant genotype in the clinical and

Gema Gómez-Mariano and Nerea Matamala contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12072-019-10007-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Beatriz Martínez-Delgado
bmartinezd@isciii.es

Extended author information available on the last page of the article

genetic knowledge of *SERPINA1*, which results in about 90% reduced levels of circulating AAT protein. The deficiency in ZZ cases occurs due to the aberrant folding of the Z-AAT causing its polymerization and intracellular accumulation. The clinical manifestations of severe AAT deficiency include liver (intracellular retention of aggregated AAT that resists degradation) and lung (missing protective levels of functional AAT) diseases, and less frequently skin diseases such as panniculitis or ANCA + vasculitis [3].

The AAT deficiency-related liver damage can occur at any age. Clinical studies have shown that children who progressed to the end-stage liver disease had more severe abnormalities in infancy such as persistent jaundice for more than 6 weeks, hepatomegaly, higher transaminases and severe morphological changes including bile duct reduplication, fibrosis and cirrhosis. Currently, however, there are no distinguishable features/markers allowing to predict which child will develop a fast decline in liver function requiring liver transplantation or who will recover without sequelae of chronic liver disease [4]. In adults, liver damage can be manifested by liver fibrosis and cirrhosis, and hepatocellular carcinoma [3, 5]. On the other hand, Z-AAT deficiency carriers may remain clinically healthy until later adulthood. This variability in clinical presentation suggests that in addition to inherited abnormality in AAT protein, other environmental, genetic and epigenetic factors are necessary to promote the development of the AAT deficiency-related liver disease. Therefore, better understanding of the molecular mechanisms underlying liver disease related to Z-AAT deficiency is of critical importance for the diagnosis and the development of specific and personalized therapies.

Currently, experimental studies investigating liver disease in AAT deficiency are limited by the difficulty to obtain human liver tissue and to maintain primary cultures of human hepatocytes. Alternatively, human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells are used [6]. However, full differentiation of stem cells into mature hepatocytes has yet not been reported.

Organoids are new three-dimensional (3D) model systems referred to a group of cells growing in a 3D structure that are generated from primary tissues or cells, with self-renewal and self-organization capacity, maintaining similar appearance and functionality as the original tissue. Adult tissue-derived organoids can be maintained through indefinite passage and preserve genetic stability [7]. Recently, human liver organoids started to be used for the studies of various liver diseases [8, 9]. The first described human liver organoids allowed the expansion of adult liver stem cells and subsequent differentiation to hepatocytes that recapitulate some function of ex vivo liver tissue. Moreover, differentiated liver organoids from AAT-deficient patients mimicked the characteristics of the disease [7]. In this study, we have established and compared adult human liver organoids from

liver biopsies of individuals with normal, MM and deficient ZZ and MZ AAT genotypes. The aim was to show if liver organoid cultures can recapitulate the typical features of liver cells expressing normal and deficient AAT and can be useful for AAT deficiency-related liver disease modeling. Typical features of AAT deficiency-associated liver disease were analyzed in terms of AAT polymerization and secretion, and transcriptional induction of *SERPINA1* gene transcripts in organoids subjected to external stimuli. The results show that liver organoids is a useful tool allowing modeling liver disease in individuals with different AAT mutations.

Materials and methods

Patients and genotyping

Organoids were established from liver biopsies collected from patients and controls at the Hospital 12 de Octubre in Madrid (Spain) and also provided by Dr. Huch at Cambridge University (UK). The ZZ organoids were derived from ZZ AATD patients with hepatic failure who had liver transplant, whereas MZ organoids were obtained from an adult MZ AATD patient who underwent colectomy. The control MM AAT organoids were derived from an individual with hepatocellular carcinoma undergoing surgical resection. Tissue sample was obtained from macroscopically defined non-neoplastic adjacent area. All biopsies were genotyped for *SERPINA1*. Sequencing of *SERPINA1* gene coding exons was performed by using previously described primers [10, 11] in an automatic sequencer (ABI PRISM 377 Applied BioSystems). Signed informed consent for the study was obtained from all the subjects and the research was approved by the ethics committee of Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Establishment and culture of human liver organoids

We aimed to generate liver organoids expressing ZZ and MZ genotypes of AAT, and normal MM variant of AAT. Following the protocol described by Huch and collaborators [7, 12], we established liver organoids from ductal cells of human liver. Briefly, after surgical excision, the tissue was kept cold in basal medium (Advanced DMEM/F12, 1% penicillin/streptomycin, 1% Glutamax, 10 mM Hepes) until processing. The tissue was minced, washed with cold medium (DMEM, Glutamax, DGluc, Pyruvato, 1% FBS, 1% penicillin/streptomycin) and digested (Earle's Balance Salt Solution (EBSS), collagenase D 2.5 mg/ml, DNase I 0.1 mg/ml). After centrifugation, cells were resuspended in a basement matrix and seeded in a 24-well plate with isolation medium (basal medium supplemented with 25 ng/ml recombinant human Nogging, 30% conditioned medium with Wnt3a

and 10 μ M Rho kinase (Rock inhibitor)). In this specific culture condition, only progenitor adult stem cells, mainly located in ducts, are able to grow forming self-renewing organoids in the form of spheres. In each passage, organoids were removed from the basement matrix and transferred to fresh matrix. For expansion, the undifferentiated organoids were cultured in an expansion medium (EM) (basal medium, 1 mM *N*-acetylcysteine, 5% conditioned medium Rspo1, 10 mM nicotinamide, 10 nM recombinant human gastrin I, 50 ng/ml recombinant EGF, 100 ng/ml recombinant human fibroblast growth factor (FGF) 10, 50 ng/ml recombinant human hepatocyte growth factor (HGF), supplemented with 10 μ M Rho kinase (Rock inhibitor)). The differentiation into hepatocytes was achieved with a differentiation medium (DM) (basal medium, 1:50 B27 supplement with or without vitamin A, 1:100 N2 supplement, 1 mM *N*-acetylcysteine, 10 nM recombinant human-gastrin I, 50 ng/ml recombinant mouse EGF, 100 ng/ml recombinant human FGF10, 50 nM A83-01, 10 μ M γ -secretase inhibitor (DAPT)). Figure 1 illustrates different stages of the isolation, expansion and differentiation of the liver organoid.

Identification of Z-AAT aggregates by using PAS-D staining

To detect intracellular aggregates of the Z-AAT protein, cytopspins of organoid liver cells were stained with the periodic acid–Schiff–diastase (PAS-D). Organoids were washed with phosphate-buffered saline (PBS), spread on slides (1 min at 600 rpm) and fixed with 95% ethanol for 5 min. Afterward, cells were washed twice with PBS and stained with hematoxylin–eosin and PAS-D.

Detection of intracellular AAT by immunofluorescence

Organoids growing in EM (undifferentiated) for 1–2 months or differentiated organoids growing in DM for 2 weeks were

collected for immunofluorescence detection of total AAT or polymers of AAT. Cytopspins of organoid cells were washed with PBS, fixed with 95% ethanol and permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS and blocked with 1% bovine serum albumin/phosphate-buffered saline (BSA/PBS). The expression of AAT protein was analyzed by incubating with anti-AAT B9 antibodies (sc-59438 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for total AAT and with D11 antibody specific for AAT polymers (provided by Sabina Janciauskiene, Hannover). A secondary anti-mouse FICT IGG (Sigma F0257) antibody was used. 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI Sigma) staining of cell nuclei was performed. The preparations were examined under a fluorescence microscope Zeiss Ax10. The proportion of positive cells showing AAT polymers (D11) was estimated by counting at least 300 nuclei from three different fields from MM, MZ and ZZ organoids (counting was performed by two independent researchers).

Western blot analysis of AAT

Native and polymeric forms of AAT protein were detected in cell pellets and culture medium of expanding and differentiated organoids. Cell pellets were lysed with RIPA buffer containing a cocktail of complete protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany). The lysates and culture media were electrophoresed on 10% polyacrylamide sodium dodecyl sulfate PAGE (SDS-PAGE). The insoluble fraction was sonicated and separated on non-denaturing 8% PAGE. Proteins were detected with the following primary antibodies: anti-AAT B9 (1:100 dilution) and anti-beta-actin (AC-74 Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) (1:5000 dilution) followed by chicken anti-mouse IgG-HRP (sc-2954 Santa Cruz Biotechnology) (1:5000 dilution), and visualized after labeling with Immobilon HRP substrate (Millipore) using Chemidoc Touch imaging system (Biorad, Hercules, CA, USA). Quantification of the western blot bands of AAT protein of MM, MZ and ZZ organoids was performed with Image J software.

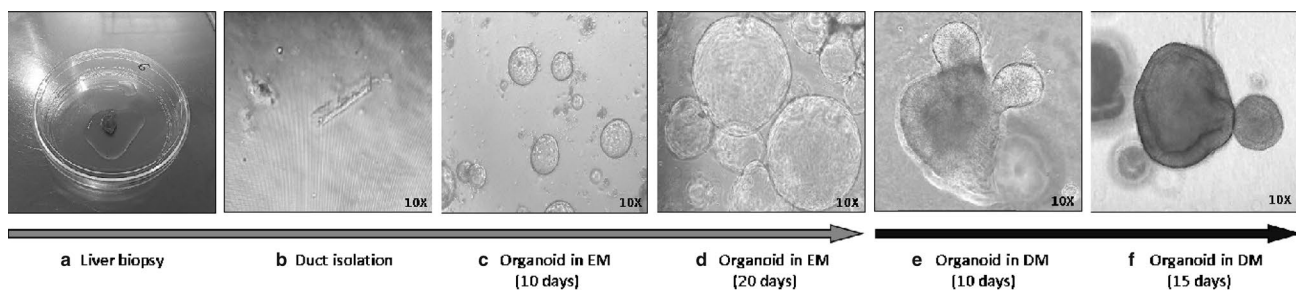


Fig. 1 Representative images of the expansion and differentiation of liver organoids. **a** Human liver organoids were obtained from a liver biopsy of patients. **b** Ductal cells are isolated, **c, d** Liver organoids are developed by growing in an expansion medium (EM) and a 3D

Matrigel, **e, f** Cultured in differentiation medium (DM) giving rise to differentiated organoids (magnification $\times 10$). Microscope Leica DMIL LED, camera Leica MC170HD

Transcriptomic analysis of liver organoids (RNA-Seq)

Total RNA was isolated from organoid cells using TriReagent (Sigma) followed by DNase1 digestion step to ensure that the samples were not contaminated with genomic DNA. The purity of RNA was assessed using Agilent RNA 6000 Nano Kit and the Agilent 2100 Bioanalyzer. TruSeq Stranded mRNA Kit (Illumina) was used for library preparation based on the recommendations from the manufacturer. The sequencing of the library was performed at the Genomics service (ISCI) on a NextSeq 500 sequencer using 75 base read lengths in paired-end mode. The obtained RNA-Seq data were analyzed by the Bioinformatics Facility (ISCI). First, quality control analysis involving fastQC v0.11.3 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) was carried out, and any adapter sequences as well as low quality 3' ends were removed using Trimmomatic v0.36. The high-quality reads were then mapped against Hg38 human genome using Tophat v2.0.14 and mapping quality control was performed using RseqQC v2.6.4. Transcriptome prediction and gene/isoform quantification was calculated using Cufflinks v2.2.1 based on Hg38 RefSeq reference genes. Finally, differential expression analysis was carried out using cuffdiff. Differentially expressed genes (DEGs) were considered when FDR values were < 0.05. The CummeRbund R package (v2.14.0) was used for quality control and results visualization. The functional analysis was carried out with Functional Annotation Tool DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH.

Validation of differentiation markers by RT-qPCR

Progenitor and ductal cell markers, leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (*LGR5*) and keratin 19 (*KRT19*), and differentiation markers (albumin, *ALB*; apolipoprotein B, *APOB*; and cytochrome P450 3A4, *CYP3A4*) were analyzed by RT-qPCR. Total RNA was extracted from organoids by using TriReagent (Sigma) and expression was also analyzed in HepG2 cells and control liver biopsy. cDNA was synthesized using Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Germany). The RT-qPCR of selected hepatocyte markers was performed in triplicate using Taqman Fast Advance master mix (Applied Biosystems) and specific primers and probes (Supplementary Table 1). Taqman probes were from Universal probe library, UPL, (Roche): *KRT19* (#71), *LGR5* (#78), *ALB* (#44), *APOB* (#90), *CYP3A4* (#50). Amplification conditions were as follows: 95 °C for 20 s, 45 denaturation cycles at 95 °C for 3 s, annealing at 60 °C for 30 s. RT-qPCR was performed on the QuantStudio 5 System (ThermoFisher Scientific) and the analysis using the software QuantStudio Design and Analysis Software v1.4.3. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GADPH*) was

used as an endogenous control. The relative gene expression was calculated by comparative Ct method and obtaining the fold-change value (DDCt).

Expression analysis of *SERPINA1* transcripts

The expression of alternative *SERPINA1* gene transcripts was analyzed in RNA from MM, MZ and ZZ organoids under both the expansion (EM) and differentiation (DM) conditions. The RT-qPCR for *SERPINA1* transcripts, generated by the use of different promoters and alternative splicing between non coding exons 1A, 1B and 1C, was performed with primers and methods previously described [13]. In addition, expression of *SERPINA1* short transcripts was analyzed as described [14].

Exogenous organoid stimulation with OSM

To study the expression regulation of *SERPINA1* gene, organoids were exposed to oncostatin M (OSM: rhOncostatin M recombinant human *E. Coli* from RD Systems 295-OM). We added OSM (50 ng/ml) to organoids at day 14 of the differentiation process. After 16 h of stimulation, cells were collected and the expression of *SERPINA1* transcripts was quantified. A Student's *t* test analysis was performed to compare the gene expression between controls and stimulated cells. Statistically significant values were considered if $p < 0.05$.

Results

Hepatocyte-specific gene expression in differentiated organoids

Transcriptome analysis by RNA-Seq was used to compare undifferentiated and differentiated liver organoids independently of the genotypes. As expected, a high number of differentially expressed genes DEGs (3097 genes) were found between the undifferentiated and differentiated organoids. The top hundred most differentially expressed genes are illustrated in Fig. 2a, which include 48 up-regulated and 53 down-regulated genes after differentiation. Highly induced genes included typical mature hepatocyte genes, as previously described by other authors [15, 16]. The results confirmed that differentiated organoids, regardless of the AAT genotype, show increased expression of hepatocyte-specific genes such as albumin (*ALB*), apolipoprotein B (*APOB*), apolipoprotein C3 (*APOC3*), cytochromes *CYP3A4*, *CYP2C8* (*cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8*), as well as metabolism enzymes phospholipase A2 group XIIB (*PLA2G12B*), acyl-CoA thioesterase 12 (*ACOT12*), UDP glucuronosyltransferase

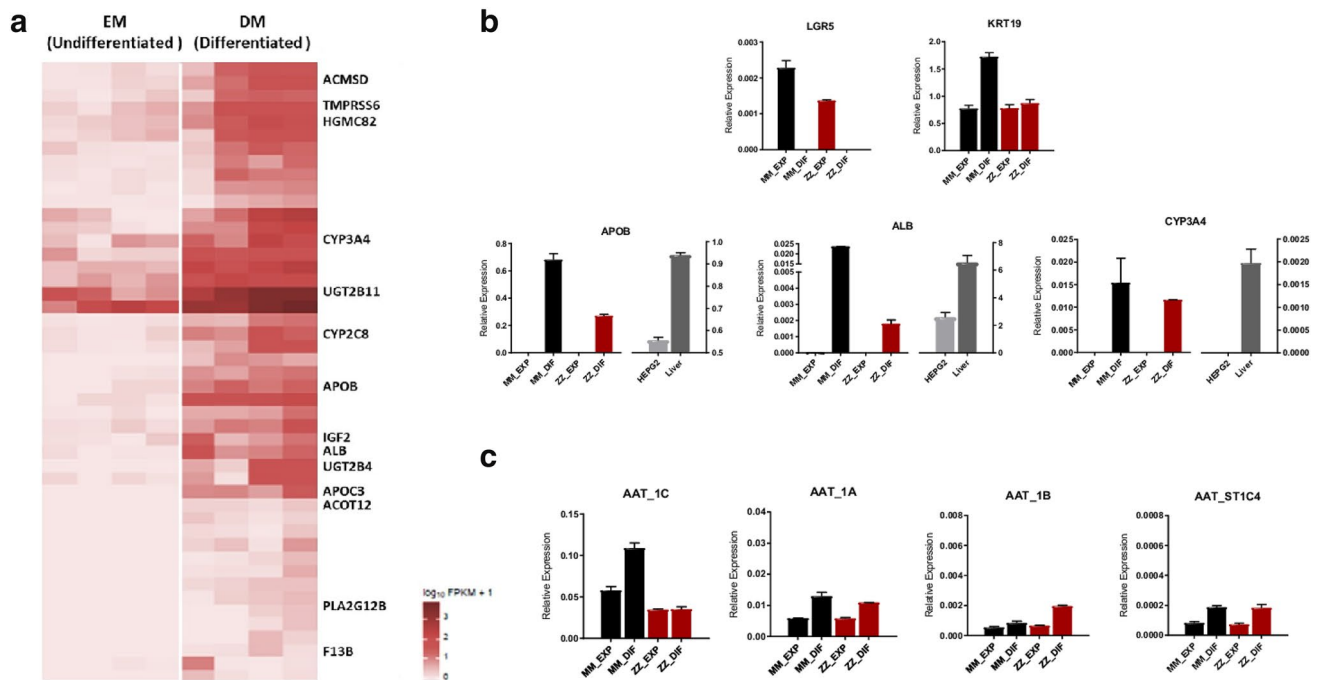


Fig. 2 Gene expression analysis in human liver organoids. **a** Heatmap of the top up-regulated differentially expressed genes between undifferentiated organoids (EM) and organoids differentiated into hepatocytes (DM). Some of the most relevant mature hepatocyte genes are represented at the right side. Darker color means higher expression levels. Gene expression analysis of differentiation markers

family 2 member B4 (*UGT2B4*), insulin-like growth factor 2 receptor (*IGF2R*), UDP glucuronosyltransferase family 2 member B11 (*UGT2B11*), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (*HMGCS2*), transmembrane serine protease 6 (*TMPRSS6*), aminocarboxymuconate semialdehyde decarboxylase (*ACMSD*) and coagulation factor XIII B chain (*F13B*). A complete list of the top 100 most DEGs in differentiated organoids can be found in supplementary Tables 2 and 3.

The expression of certain progenitor, ductal and hepatocyte cell markers were validated in MM and ZZ by RT-qPCR (Fig. 2b). As expected, both MM and ZZ organoids when growing in EM expressed markers of progenitor (*LGR5*) and ductal (*KRT19*) cell lineage, but these markers disappeared after differentiation. In contrast, organoids cultured in DM highly expressed hepatocyte genes, such as albumin (*ALB*), apolipoprotein B (*APOB*) and cytochrome P450 3A4 (*CYP3A4*), which were mostly not detected in undifferentiated liver organoid cultures. Remarkably, when compared to MM AAT organoids, lower expression of the *APOB* and *ALB* hepatocyte markers, but increased expression of the *CYP3A4*, was observed in ZZ AAT organoids.

in organoids MM (black) and ZZ (red) under expansion and differentiation conditions: **b** expression of markers of pluripotent (*LGR5*), ductal cells (*KRT19*) and differentiated hepatocytes (*ALB*, *APOB* and *CYP3A4*); **c** expression of alternative transcripts of *SERPINA1* gene (1C, 1A and 1B) and short transcripts (ST1C4) in MM and ZZ organoids

SERPINA1 gene transcripts expression in liver organoids under expansion (EM) and differentiation (DM) conditions

The expression of full-length and short (*ST1C4*) transcripts of *SERPINA1* gene [14] was analyzed in MM and ZZ AAT-derived liver organoids (Fig. 2c). Higher expression of all *SERPINA1* transcripts was observed in differentiated than in undifferentiated MM and ZZ organoids, indicating that *SERPINA1* gene is induced with the differentiation process in hepatocytes. Moreover, *SERPINA1* expression levels were higher in MM than in ZZ differentiated hepatocytes. Interestingly, in ZZ AAT organoids the expression of 1C transcript, the main liver transcript, did not increase during the differentiation process (Fig. 2c). Only a slight increase in the expression of the other minor AAT transcripts originated by the monocyte promoters (1A and 1B) was detected. A short *ST1C4* transcript of *SERPINA1* gene was induced in differentiated M and Z hepatocytes as compared to undifferentiated organoids.

Regulation of *SERPINA1* gene transcripts by oncostatin M (OSM)

The production of AAT in hepatocytes is controlled by a variety of cytokines released during inflammation, whereas leading regulators are IL-6-type cytokines. Therefore, we next analyzed transcriptional regulation of *SERPINA1* gene in liver organoids treated with oncostatin M, a pleiotropic cytokine that belongs to the IL-6 group of cytokines, a well-known inducer of AAT production [17]. This analysis was performed on both undifferentiated (EM) and differentiated (DM) organoids from MM, MZ and ZZ AAT cases (Fig. 3). In MM AAT organoids, the 1C full-length transcript of AAT, which is typically expressed by hepatocytes, was induced by OSM under both EM and DM conditions. However, in ZZ organoids, the more evident induction of 1C transcript was observed in the differentiated stage. It is important to point out that in differentiated hepatocytes, OSM also induced the expression of transcripts derived from the monocyte promoter 1A and 1B (Supplementary Fig). Short transcripts ST1C4 were highly induced by OSM in differentiated MM and MZ AAT organoids, and to a lesser extent in ZZ AAT organoids (Fig. 3). No expression of the other described short transcript, ST1C5, was detected in the liver organoids.

Detection of PAS-D-positive AAT polymers in liver organoids

The presence of aberrant AAT polymers positive for PAS diastase-resistant (PAS-D) staining within hepatocytes is a characteristic feature of Z-AAT-deficient liver [3, 5, 18]. As expected, positive PAS-D staining was observed in organoids generated from the ZZ and from MZ AAT patients indicating the accumulation of the Z-AAT polymers within differentiated organoid cells. By contrast, PAS-D staining was negative in MM AAT organoids (Fig. 4).

Detection of total and polymeric form of AAT protein in liver organoids

To detect specifically AAT protein, we performed immunofluorescence assays in undifferentiated and differentiated organoids from MM, MZ and ZZ AAT cases (Fig. 5). As expected, Z-AAT polymers were evident in Z, but not in M organoids. In both ZZ and MZ cases, AAT polymers were limited to restricted groups of cells or isolated cells. The quantification of cells positive for AAT polymer staining (D11 antibody) revealed that MZ organoids had around 5% of cells with polymer accumulation, approximately half of the positive cells found in ZZ organoids (10%) (Fig. 5c).

The western blot analyses revealed the presence of AAT protein in the extracellular medium and cell extracts of MM and MZ differentiated organoids (Fig. 6). The monomeric

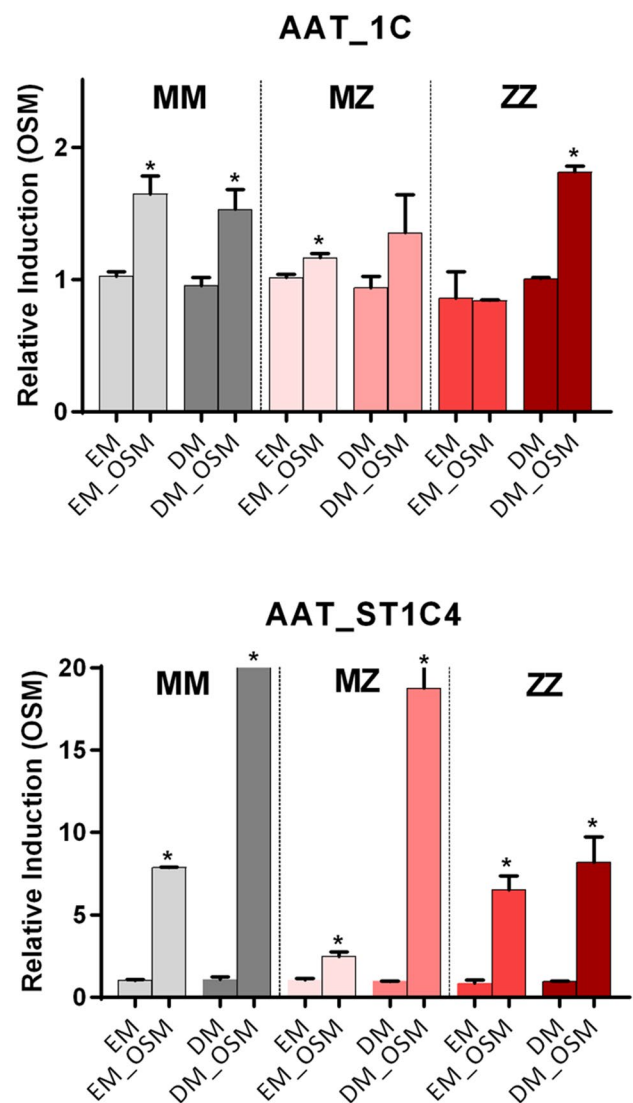


Fig. 3 Induction of *SERPINA1* gene transcripts (1C) and short transcripts (ST1C4) by stimulations with OSM. Relative gene expression of the analyzed transcripts was measured in organoids grown in expansion medium (EM) and in differentiated organoids (DM). Statistically significant values are shown by * ($p < 0.05$)

AAT protein was not detected in the cell extracts and extracellular medium of ZZ AAT organoids. By contrast, we found that the largest amount of insoluble AAT was present in ZZ compared to MZ or MM organoids (Fig. 6).

Discussion

Inherited AAT deficiency is a common cause of genetic liver disease having a wide spectrum of presentations ranging from neonatal liver disease to an incidental finding of adulthood end-stage cirrhosis requiring transplantation. Currently, there are no biomarkers/predictors to identify

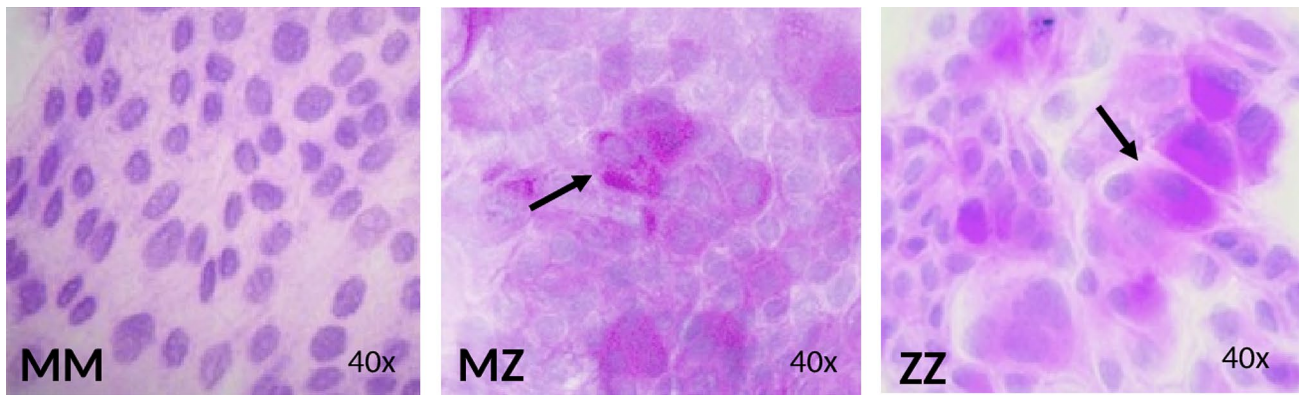


Fig. 4 PAS-D staining for the detection of Z-AAT protein aggregates. Differentiated hepatocytes from MM organoids did not show PAS+ staining, while the MZ and ZZ organoids show evident aggre-

gates of Z polymers. Microscope Leica DM 2000, camera Leica DFC450 and software LAS v4 (magnification $\times 40$)

AAT-deficient patients who will or not develop a severe course of liver disease. Moreover, the molecular mechanisms of AAT deficiency-related liver diseases remain largely unexplored.

Primary human hepatocytes reflect the metabolism and functionality of the human liver and are considered as the gold standard for hepatic *ex vivo* studies. However, the availability of primary human hepatocytes, especially from patients with rare inherited diseases such as AAT deficiency, is limited, and the function of isolated hepatocytes is hard to maintain *ex vivo*. When cultured *in vitro*, these cells undergo dedifferentiation, causing them to lose hepatocyte function. To solve the above issues, the development of new models allowing the culture and study of functional human hepatocytes is of great need [19–21].

To date, the 3D organoids are the best available representation of the liver cells with several advantages. First, organoids permit a long-term expansion with preserved genomic stability; second, organoid cultures recapitulate hepatocyte functions and allow to study molecular mechanisms of healthy and diseased liver, *ex vivo*; and third, organoids can be transplanted, as demonstrated in mouse models [7, 22], opening new avenues for regenerative medicine and gene therapy. These advantages of organoid systems together with emerging new technologies (such as 3D printing and imaging techniques) significantly contribute to the new strategies of how liver diseases are studied, and therapeutics developed.

Extensive analysis of cultured liver organoids revealed that the expanded cells preserve their genetic integrity over months in culture [7]. These results open up the avenue to start using human liver material expanded *in vitro* as an alternative hepatocyte source for studies of rare hereditary liver diseases. A variety of monogenic hereditary diseases affect the liver specifically, and these should be studied individually.

Therefore, in this study we established human liver organoid cultures reproducing the main characteristics of the wild-type M and pathogenic, deficient ZZ and MZ variants of AAT protein. When compared to 2D cell models [19], organoids are closer to liver tissue with respect to morphology, gene expression, and protein secretion. For example, the liver produces and secretes major proteins into the circulation, such as albumin, AAT, fibrinogens and apolipoproteins. Previous studies demonstrated that liver organoid cultures are able to express and secrete albumin and apolipoprotein B [7]. Patients with liver damage almost always have hypoalbuminemia caused by decreased albumin synthesis by the hepatocytes [23]. Data from a large cohort of patients revealed that ZZ AAT carriers have markedly reduced serum triglyceride and VLDL cholesterol concentrations compared to non-carriers [24]. In the model, we not only confirm that differentiated hepatocyte organoids express *ALB*, *SERPINA1*, *CYP3A4* and *APOB*, but also demonstrate that organoids from ZZ AAT individuals have lower expression of *ALB* and *APOB* in comparison to organoids from MM AAT. These findings further confirm that organoids from different genetic variants of AAT recapitulate specific features of the condition.

As an acute phase reactant protein, expression of AAT increases in response to various stimuli. Specifically, in the liver AAT is mainly regulated by IL-6-like cytokines including OSM. This process is mediated by the interaction between the hepatocyte promoter of *SERPINA1* and an OSM response element located at the 3'UTR of the AAT gene via the interaction of transcription factors like STAT3 [25]. We found that OSM significantly up-regulates AAT expression in MM and MZ organoids under undifferentiated and differentiated stages, whereas in ZZ organoids AAT was up-regulated only after differentiation. Currently, we are not able to explain these latter differences; however, the results provide clear evidence that organoids represent a

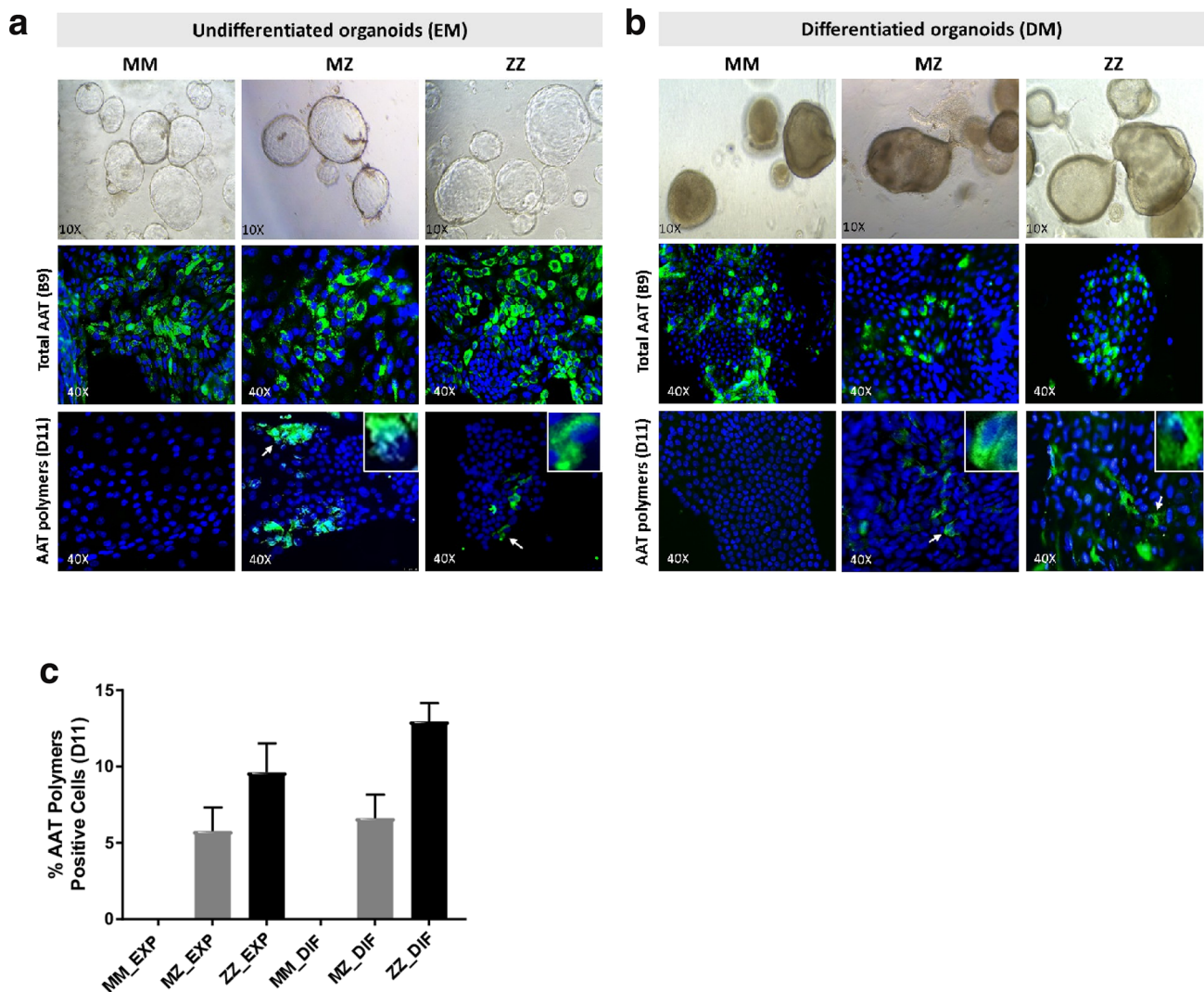


Fig. 5 Immunofluorescence detection of AAT and AAT polymers. **a** Representative pictures of liver organoids in the expansion medium (EM) of MM, MZ and ZZ patients (images magnification $\times 10$). **b** Differentiated liver organoids from MM, MZ and ZZ patients. Specific detection of total AAT protein with anti-AAT-B9 or with anti-AAT-D11 against AAT polymers, are shown in green fluorescence.

good model to study the expression of liver AAT in relation to different AAT genotypes.

It is also important to point out that the expression of the *STIC4* alternative short transcript of *SERPINA1* gene was up-regulated by OSM. Interestingly, some differences were observed between Z and M organoids. Namely, higher induction of the *STIC4* was found in MM and MZ than in ZZ organoids after hepatic cell differentiation. The expression of *STIC4* was previously found in the liver [5]; however, the transcriptional regulation and functional role of this transcript are not clear. The induction of *STIC4* transcript in response to inflammatory signal further confirms its functional role and encourages further investigations.

Zoomed images of individual positive cells are shown in the right corner. **c** Quantification of AAT polymers (D11) positive cells in the different organoids MM, MZ and ZZ. Microscope Zeiss Ax10, camera Axio Cam Mrm Carl Zeiss and software AxioVision Rel.4.7 (images magnification $\times 40$)

Hypothetically, this transcript can generate C-terminal peptide of AAT, which has been found to regulate bile acid synthesis in primary rat hepatocytes in vivo [26].

Based on clinical and experimental data, we have learned that hepatocytes from Z-AAT deficiency carriers can be damaged by gain-of-toxic mechanisms activated because of intracellular accumulation of Z-AAT protein [27]. As expected, the cultures of hepatic organoids derived from patients carrying Z-AAT mutation revealed intrahepatic aggregates of misfolded Z-AAT protein. The intracellular AAT accumulation (positive PAS-D staining) and polymerization (immunostainings with specific anti-Z-AAT polymer antibody) were abundant in organoids derived from ZZ and also detected in MZ

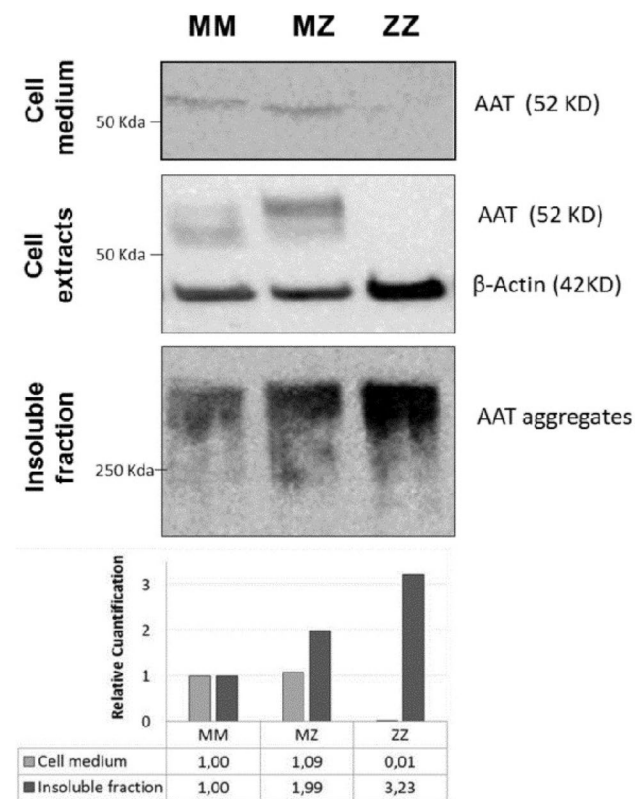


Fig. 6 Representative western blot detection of AAT protein expression and secretion in MM, MZ and ZZ differentiated organoids. Blots of extracellular, cytoplasmic and insoluble fractions were incubated with anti-AAT-B9. The anti- β actin antibody was used as a control marker in the cytoplasm extract. Panels of figures were composed to show MM, MZ and ZZ AAT in the same order. Relative quantification with respect to MM amount of AAT in the extracellular medium and in the insoluble fraction of organoids is shown at the bottom

subjects. Differently from MM and MZ organoid cultures, ZZ organoids showed almost no detectable secretion of AAT protein. These findings indicate that liver organoid cultures reflect AAT behavior seen in individuals with normal M- and mutant Z-AAT, and thus represent a valuable tool to study the molecular mechanisms underlying intracellular accumulation and secretion of AAT protein. Since organoids are derived directly from the affected individuals, they may also help us to elucidate the complex heterogeneity of liver disease among AATD carriers. In addition to Z-AAT mutation, many other rare alleles associated with AAT deficiency have been described [19, 28, 29] for which the potential damaging effects in hepatocytes are unknown. Organoids derived from patients carrying other than the Z variant would help to investigate the mechanisms of accumulation, secretion and degradation of these much less studied AAT variants.

Moreover, the development of organoid cultures has been successfully reported for other organs derived from the endoderm, such as the intestine, stomach, pancreas and lung, as well as for other internal organs derived from

the mesoderm including the kidney, heart, cartilage, bone, reproductive organs and muscle, and also for tissues derived from ectoderm, both skin and its associated glands and neural ectoderm, giving rise to the brain, spinal cord and neural crest [8]. Organoids have proved very useful for a wide range of applications such as modeling human diseases, organogenesis and tissue development, drug screening, gene editing for monogenic diseases and regenerative medicine [8, 30].

Organoids represent an innovative approach to validate specific genetic alterations in the *SERPINA1* gene that are associated with liver disease development, and furthermore to identify and elucidate other genes associated with liver disease progression and to investigate putative treatments.

Acknowledgements This work was funded by grants from the Institute of Health Carlos III (AESI PI17CIII/00042 and DTS17CIII/00007) and Alpha-1 Antitrypsin Laurell's Training award, ALTA 2017. Supporting institutions had no involvement in the study design; collection, analysis and interpretation of data; writing of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

Authors' contributions GGM: established organoids, performed experiments, analyzed data, drafted manuscript. NM: established organoids, performed experiments, analyzed data, drafted manuscript. SM: performed experiments, analyzed data, IJ: provided samples, reviewed patient's clinical data, interpreted results AM: provided samples, reviewed patient's clinical data, interpreted results. CJ: provided samples, reviewed patient's clinical data, interpreted results. SM: performed bioinformatic analysis, helped in drafting manuscript. IC: performed bioinformatic analysis, helped in drafting manuscript. CG: provided samples, reviewed patient's clinical data, interpreted results. MTM: reviewed patient's clinical data, interpreted results. MH: provided samples, analyzed data, drafted the manuscript and revised it critically. IPC: analyzed data, drafted the manuscript and revised it critically. MP: participated in the collection of samples, interpreted the results, final review. SJ: participated in the study design, interpreted the results, drafted the manuscript. BMD: designed and coordinated the study, drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Gema Gómez-Mariano, Nerea Matamala, Selene Martínez, Iago Justo, Alberto Marcacuzco, Carlos Jimenez, Sara Monzón, Isabel Cuesta, Cristina Garfía, María Teresa Martínez, Meritxell Huch, Ignacio Pérez de Castro, Manuel Posada, Sabina Janciauskienė and Beatriz Martínez-Delgado declare no conflicts of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Carlson JA, Rogers BB, Sifers RN, Hawkins HK, Finegold MJ, Woo SL. Multiple tissues express alpha 1-antitrypsin in transgenic mice and man. *J Clin Invest.* 1988;82(1):26–36.
2. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Kohnlein T, Welte T. The discovery of alpha1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med.* 2011;105(8):1129–39.
3. 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.* 2003;168(7):818–900.
4. Sveger T. The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr Scand.* 1988;77(6):847–51.
5. Fairbanks KD, Tavill AS. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(8):2136–41.
6. Haugabook SJ, Ferrer M, Ottinger EA. In vitro and in vivo translational models for rare liver diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(5):1003–18.
7. Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, Blokzijl F, Versteegen MM, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell.* 2015;160(1–2):299–312.
8. Lancaster MA, Huch M. Disease modelling in human organoids. *Dis Model Mech.* 2019;12(7):dmm039347.
9. Nantasanti S, de Bruin A, Rothuizen J, Penning LC, Schotanus BA. Concise review: organoids are a powerful tool for the study of liver disease and personalized treatment design in humans and animals. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(3):325–30.
10. Lara B, Martinez-Delgado B, Torres ML, Marin-Arguedas S, Bustamante A, Miravittles M. Alpha-1-antitrypsin deficiency associated with the Mattawa variant. *Arch Bronconeumol.* 2013;49(12):548–50.
11. Zorzetto M, Russi E, Senn O, Imboden M, Ferrarotti I, Tinelli C, et al. SERPINA1 gene variants in individuals from the general population with reduced alpha1-antitrypsin concentrations. *Clin Chem.* 2008;54(8):1331–8.
12. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo BK, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc.* 2016;11(9):1724–43.
13. Matamala N, Martinez-Delgado B, Lara B, Perez L, Vazquez I, Jimenez A, et al. Alternative transcripts of the SERPINA1 gene in alpha-1 antitrypsin deficiency. *J Transl Med.* 2015;4(13):211.
14. Matamala N, Aggarwal N, Iadarola P, Fumagalli M, Gomez-Mariano G, Lara B, et al. Identification of novel short C-terminal transcripts of human SERPINA1 gene. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170533.
15. Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, et al. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(7):4465–70.
16. Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, Hong R, Jensen RV, Misra J, et al. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics.* 2001;7(2):97–104.
17. Norris CA, He M, Kang LI, Ding MQ, Radder JE, Haynes MM, et al. Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli. *PLoS One.* 2014;9(4):e96053.
18. Janciauskiene S, Eriksson S, Callea F, Mallya M, Zhou A, Seyama K, et al. Differential detection of PAS-positive inclusions formed by the Z, Siiyama, and Mmalton variants of alpha1-antitrypsin. *Hepatology.* 2004;40(5):1203–10.
19. Matamala N, Lara B, Gomez-Mariano G, Martinez S, Retana D, Fernandez T, et al. Characterization of novel missense variants of SERPINA1 Gene causing alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;58(6):706–16.
20. Nibourg GA, Chamuleau RA, van Gulik TM, Hoekstra R. Proliferative human cell sources applied as biocomponent in bioartificial livers: a review. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(7):905–21.
21. Tafaleng EN, Chakraborty S, Han B, Hale P, Wu W, Soto-Gutierrez A, et al. Induced pluripotent stem cells model personalized variations in liver disease resulting from alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology.* 2015;62(1):147–57.
22. Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell. *Nat Med.* 2012;18(4):618–23.
23. Henriksen JH, Siemssen O, Krintel JJ, Malchow-Moller A, Bendtsen F, Ring-Larsen H. Dynamics of albumin in plasma and ascitic fluid in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 2001;34(1):53–60.
24. Hamesch K, Mandorfer M, Pereira VM, Moeller LS, Pons M, Dolman GE, et al. Liver fibrosis and metabolic alterations in adults with alpha1 antitrypsin deficiency caused by the Pi*ZZ mutation. *Gastroenterology* 2019
25. Morgan K, Marsters P, Morley S, van Gent D, Hejazi A, Backx M, et al. Oncostatin M induced alpha1-antitrypsin (AAT) gene expression in Hep G2 cells is mediated by a 3' enhancer. *Biochem J.* 2002;365(Pt 2):555–60.
26. Janciauskiene S, Lindgren S. Effects of fibrillar C-terminal fragment of cleaved alpha1-antitrypsin on cholesterol homeostasis in HepG2 cells. *Hepatology.* 1999;29(2):434–42.
27. Teckman JH, Qu D, Perlmutter DH. Molecular pathogenesis of liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology.* 1996;24(6):1504–16.
28. Renoux C, Odou MF, 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(1):161.
29. Giacomuzzi E, Laffranchi M, Berardelli R, Ravasio V, Ferrarotti I, Gooptu B, et al. Real-world clinical applicability of pathogenicity predictors assessed on SERPINA1 mutations in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hum Mutat.* 2018;39(9):1203–13.
30. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell.* 2013;13(6):653–8.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

New *cis*-Acting Variants in PI*S Background Produce Null Phenotypes Causing Alpha-1 Antitrypsin Deficiency

Nerea Matamala^{1*}, Gema Gomez-Mariano^{1*}, Jose Antonio Perez², Beatriz Baladrón¹, María Torres-Durán³, Francisco Javier Michel⁴, Raquel Saez⁵, Jose María Hernández-Pérez⁶, Irene Belmonte⁷, Francisco Rodriguez-Frias⁷, Ignacio Blanco⁸, Pavel Strnad⁹, Sabina Janciauskiene¹⁰, and Beatriz Martinez-Delgado^{1,11}

¹Molecular Genetics Unit, Instituto de Investigación de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ²Área de Genética, Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain; ³Servicio de Neumología, Hospital Álvaro Cunqueiro, EOXI Vigo, Pneumovigo I + i, IIS Galicia Sur, Vigo, Spain; ⁴Servicio de Neumología, and ⁵Genetics and Immunology, Hospital Universitario Donostia, País Vasco, Spain; ⁶Servicio de Neumología, Hospital General de la Palma, Canarias, Spain; ⁷Biochemistry Department, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁸Registro Español de Pacientes con Déficit de Alfa-1 Antitripsina, Fundación Española, de Pulmón, Respira, SEPAR, Barcelona, Spain; ⁹Department of Internal Medicine III, University Hospital Aachen, Aachen, Germany; ¹⁰Department of Respiratory Medicine, Biomedical Research in Endstage and Obstructive Lung Disease Hannover, Member of the German Center for Lung Research, Hannover Medical School, Hannover, Germany; and ¹¹CIBER de Enfermedades Raras, Madrid, Spain

Abstract

Alpha-1 antitrypsin (AAT) deficiency (AATD) is an inherited condition characterized by reduced levels of serum AAT due to mutations in the *SERPINA1* gene. The Pi*S (Glu264Val) is one of the most frequent deficient alleles of AATD, showing high incidence in the Iberian Peninsula. Herein, we describe two new alleles carrying an S mutation, but producing a null phenotype: QO_{Vigo} and QO_{Aachen}. The new alleles were identified by sequencing *SERPINA1* gene in three patients who had lower AAT serum levels than expected for the initial genotype. These alleles are the result of combined mutations *in cis* in a Pi*S allele. Sequencing detected the S mutation *in cis* with Tyr138Cys (S + Tyr138Cys) in two patients, whereas a third one had the S mutation *in cis* with Pro391Thr variant (S + Pro391Thr). When expressed in a cellular model, these variants caused strong AAT

polymerization and very low AAT secretion to almost undetectable levels. The isoelectric focusing method for plasma AAT phenotyping did not show AAT protein encoded by the novel mutant alleles, behaving as null. We called these alleles Pi*S-plus because the S variant was phased with another variant conferring more aggressive characteristics to the allele. The current data demonstrate that the clinical variability observed in AATD can be explained by additional genetic variation, such as dual *cis*-acting variants in the *SERPINA1* gene. The possible existence of other unrevealed variants combined in the Pi*S alleles should be considered to improve the genetic diagnosis of the patients.

Keywords: alpha-1 antitrypsin; *SERPINA1* genetic mutations; Pi*S allele; polymerization

Alpha-1 antitrypsin (AAT) is a 52-kD glycoprotein encoded by the *SERPINA1* gene, being the major plasma inhibitor of serine proteases in human plasma and an important

immunomodulatory protein. AAT is primarily synthesized by hepatocytes and released into the blood circulation from the liver, reaching normal serum concentrations of ~1.3–2.5 g/L.

The protein exerts its major function in the lungs, where it provides essential protection against proteolytic attacks, mainly by neutrophil elastase and proteinase-3 (1).

(Received in original form January 15, 2020; accepted in final form June 8, 2020)

*These authors contributed equally to this work.

Supported by Institute of Health Carlos III grant AESI PI17CIII/00042, and by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) grant STR 1095/6-1 (Heisenberg Professorship) (P.S.) and DFG consortium grant SFB/TRR57 "Liver fibrosis" (P.S.).

Author Contributions: N.M. and G.G.-M. performed experiments, analyzed the data, and drafted the manuscript. J.A.P. performed experiments, interpreted the data, and drafted the manuscript. B.B. performed the experiments. R.S. collected the patient data and interpreted the results. I. Belmonte and F.R.-F. performed isoelectric focusing analysis and interpreted the results. M.T.-D., F.J.M., J.M.H.-P., and P.S. reviewed the patient clinical data, interpreted the results, and helped in drafting the manuscript. I. Blanco participated in collection of the samples, interpretation of the results, and drafting and critically revising the manuscript. S.J. participated in the protein expression analysis, interpretation of the results, and drafting the manuscript. B.M.-D. designed and coordinated the study, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Beatriz Martinez-Delgado, ■■■■, Molecular Genetics, Instituto de Investigación en Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo Km2,200, 28220 Madrid, Spain. E-mail: bmartinez@isciii.es.

This article has a data supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org.

Am J Respir Cell Mol Biol Vol ■■■, Iss ■■■, pp 1–8, ■■■ 2020

Copyright © 2020 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2020-0021OC on June 9, 2020

Internet address: www.atsjournals.org

Clinical Relevance

PIS alleles are considered as moderately deficient alleles related to alpha-1 antitrypsin (AAT) deficiency (AATD). In this work, we identified and characterize two new alleles carrying the S mutation, but they behaved as null alleles. This was caused by novel missense variants confirmed to be in *in cis* configuration each of them with the S mutation, and demonstrated that they modify the properties of the PIS allele in terms of higher intracellular polymerization and no extracellular secretion. We named these alleles as “PIS-plus” alleles, as they have more pathogenic properties compared to typical PIS alleles. That means that the genetic diagnosis of AATD in addition to identify the gene variants should consider phasing these variants, especially when discrepancies between AAT level, genotype, and phenotype exist, to establish their definitive effect.

AAT deficiency (AATD) is still a largely underrecognized genetic disorder. This hereditary condition is caused by mutations in the *SERPINA1* gene, which cause a predisposition to lung and liver disease. The variants of *SERPINA1* gene are classified as normal, deficient, dysfunctional, or null (2–4). Normal and dysfunctional variants are associated with normal levels of serum AAT, whereas deficient variants lead to a reduction of circulating AAT levels. Remarkably, null variants do not produce detectable AAT, mostly as a result of nonsense, frameshift, or splicing mutations. In addition, some null QO alleles could be caused by missense variants, such as QO_{Cardiff} (Asp256Val) or QO_{Ludwigshafen} (Ile92Asn) (5). The most common deficient alleles are Pi*Z (Glu342Lys) and Pi*S (Glu264Val), with frequencies in subjects of European ancestry varying between 1% and 4% for Pi*Z, the highest frequency being in Latvia, and between 3% and 13% for Pi*S, the highest being in Portugal and Spain (6). Normal AAT levels are associated with the wild-type Pi*M allele (frequency, 80–95%). Both Pi*Z and Pi*S mutations cause the misfolding and polymerization of the AAT protein within the rough endoplasmic

reticulum (ER) of hepatocytes. Nonetheless, S proteins polymerize more slowly than Z proteins, resulting in less accumulation of AAT within hepatocytes and intermediate plasma deficiency (7). Thus, Z variant is associated with an 85–90% reduction of normal serum AAT, whereas S variant is associated with a 40% reduction. In addition, S variant does not lead to liver disease unless inherited with a rapidly polymerizing variant like Z (8, 9).

The Pi*S allele has been found at a high frequency in the Iberian Peninsula (~10%) (10, 11). PiMS, PiSS, and PiSZ genotypes are considered deficient genotypes expressing 80%, 60%, and 40% of serum AAT, respectively. Although the PiSZ genotype seems to be associated with an increased risk of pulmonary emphysema and liver disease, there is much less evidence that PiMS and PiSS genotypes predispose to lung or liver damage. Nevertheless, combination of the S mutation in the same allele with other rare variants can give rise to more pathogenic phenotypes (12, 13).

In this study, we describe two new AATD alleles that combine the S variant with other amino acid variants *in cis*, unexpectedly producing AAT null phenotypes. These “Pi*S-plus” alleles, in contrast to the majority of null alleles, produce AAT protein, but this protein is strongly retained intracellularly so that it cannot be detected in the serum of patients.

Methods

Patients and Samples

Following our genetic diagnosis algorithm for AATD (Figure 1), three cases showed discrepancies between AAT serum levels, phenotype pattern, and genotype. The AAT serum concentration was determined by immune nephelometry and protein phenotype by isoelectric focusing (IEF). The clinical data of these patients are shown in Table 1. Signed informed consent was obtained from all subjects, and the Ethics Committee of the Instituto de Salud Carlos III approved the study.

Genotyping and Haplotyping of *SERPINA1* Gene

DNA was isolated from whole peripheral blood or dried blood spot samples using Qiamp DNA blood mini kit (Qiagen) and standard methods. Genotyping of S and Z

variants was performed with AAT PIS and PIZ kit (Roche Diagnostics). Sanger sequencing of coding exons of *SERPINA1* gene (NG_008290.1, NM_000295.4) was performed as previously described (14, 15). Haplotypes were deduced by familial segregation analysis or allele-specific PCR and amplicon sequencing. In this last case, a 2,605-bp DNA fragment downstream of the no-S/S site was selectively amplified from the S allele using the allele-specific primer, 5'-GGGAACTACAGC ACCTGGT-3', and the conserved primer, 5'-TGGGAGGGATTACAGTCACA-3'.

Allele Frequency and Functional Prediction of Variants

We used databases to investigate the population frequency of the newly identified variants: the Short Genetic Variations Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>); the Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>); and the Genome Aggregation Database (gnomAD; <https://gnomad.broadinstitute.org/>). The effect of the amino acid substitutions was predicted with the following *in silico* tools: SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>); PoplyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>); Condel (<https://bbglab.irbbarcelona.org/fannsd/>); and CADD phred predictions through Ensembl Variant Effect Predictor (<https://www.ensembl.org/tools/vpep>).

Site-Directed Mutagenesis and *In Vitro* Expression of Mutant AAT

For *in vitro* expression of AAT, we used the vector, pCMV6 (OriGene), with *SERPINA1* M1 (Val213) cDNA. The S mutation (Glu264Val), Tyr138Cys, or Pro391Thr variants were introduced by site-directed mutagenesis using the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), and the primers are described in Table E1 in the data supplement. HEK293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich). Transfections were performed by DNA transfection reagent (Biotool) and 4 µg of expression plasmid in serum-free Opti-MEM culture medium (Gibco). At 48 hours after transfection, cells and conditioned media were collected.

Periodic Acid-Schiff Staining

Transfected HEK293T cells were fixed on slices with 95% ethanol and stained with hematoxylin and eosin and periodic

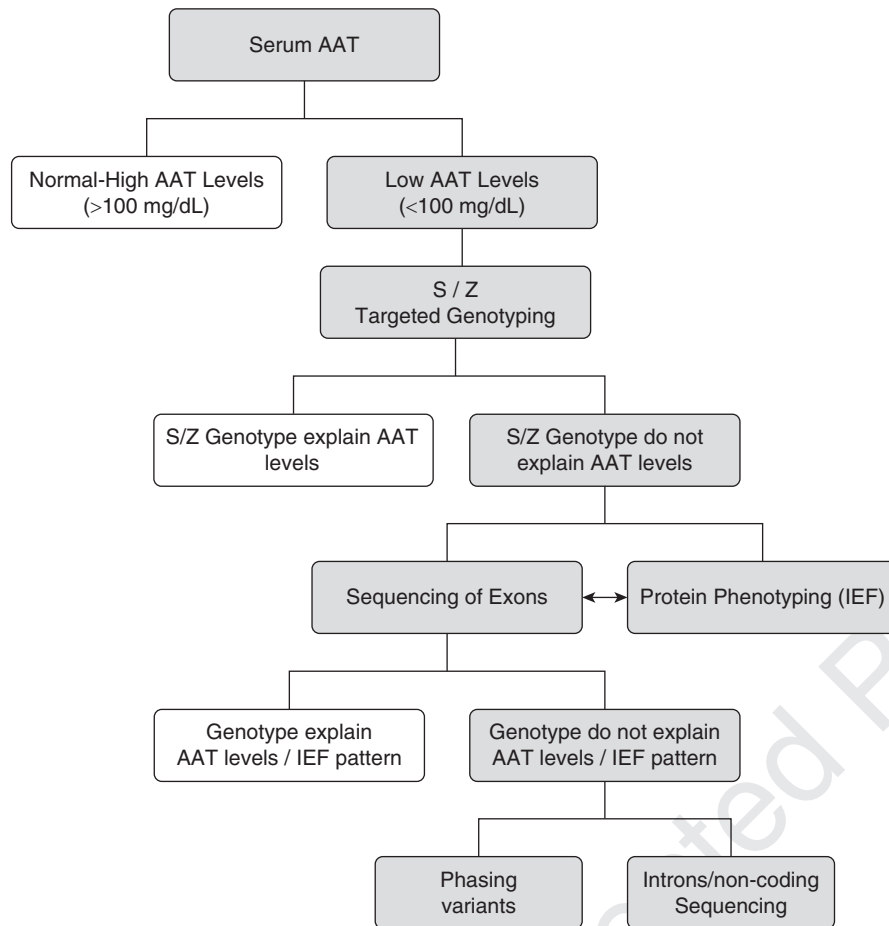


Figure 1. Alpha-1 antitrypsin (AAT) genetic diagnostic algorithm describing the steps followed, starting by measuring AAT serum level by nephelometry. When the serum level is below 100 mg/ml, we follow with S/Z genotyping. If AAT level is not explained by S/Z genotype, then further sequencing of exons and phenotyping by isoelectric focusing (IEF) would be needed. If discrepancies persist after extended genotyping and phenotyping, further analysis should be done, including phasing detected variants or sequencing other noncoding regions of the *SERPINA1* gene.

acid-Schiff (PAS) staining. The accumulation of AAT aggregates was recognized as bright magenta globules. Quantification of PAS⁺ cells was performed by counting the percentage of PAS⁺ in at least three different fields (100–300 cells).

Western Blotting

Transfected HEK293T cells and cell media were collected for the detection of retained and secreted AAT, respectively. Cell pellets were lysed with RIPA buffer, and cell lysates and insoluble elements were obtained. Then,

proteins retained in the insoluble fraction were obtained after sonication. Acrylamide SDS-PAGE (10%) or 8% acrylamide nondenaturing PAGE was performed for detection of monomeric or polymeric AAT, respectively. Blots were probed with 1:2,000 anti-AAT B9 (sc-59438; Santa Cruz Biotechnology) and 1:5,000 anti-β-actin (AC-74; Sigma-Aldrich), followed by 1:5,000 chicken anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (sc-2954; Santa Cruz Biotechnology). Membranes were visualized after labeling with Immobilon horseradish peroxidase substrate (Millipore).

Results

Identification of Two New Variants in a PI*S Background

The entire coding sequence of *SERPINA1* gene was analyzed in three patients who had lower serum levels of AAT than expected for the initial phenotype and genotype (PI*S and PI*Z alleles; Table 1 and Figure 2). Two novel, previously undescribed missense variants were identified: p.Tyr138Cys in patients 1 and 2, and p.Pro391Thr in patient 3. Both were confirmed to be the *in-cis* configuration with S mutation, either by means of familial segregation or allelic-specific PCR. The clinical characteristics and final genotype of these patients are shown in Table 1. Descriptions of these new PI*S-plus alleles is summarized in Table 2.

PI*S-plus (Tyr138Cys), QO_{Vigo}. Two unrelated patients carried this variant in heterozygosity. Patient 1 was a 58 year-old male former smoker (40 pack-years) with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with lung function of forced vital capacity of 113%, forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) of 41%, and

Table 1. Clinical Characteristics of the Patients with the Two New Variants Identified in the PI*S-Plus Alleles

Case	Sex	Age (yr)	Indication for AAT Screening	Smoking Status	Pack-Years	Diagnosis	Serum AAT (Expected) (mg/dl)*	Protein Phenotype	Genotype
1	Male	58	Lung disease	Former	40	COPD	54 (70–105)	SS	S/S + p.Tyr138Cys
2	Male	28	Elevated liver enzymes	Never	0	—	74 (103–200)	MM	M/S + p.Tyr138Cys
3	Female	62	Lung disease	Former	90	COPD, BE	71 (103–200)	MM	M/S + p.Pro391Thr

Definition of abbreviations: AAT = alpha-1 antitrypsin; BE = bronchiectasis; COPD = chronic obstructive pulmonary disease.

*Expected AAT serum levels. Reference values from Vidal and colleagues (21).

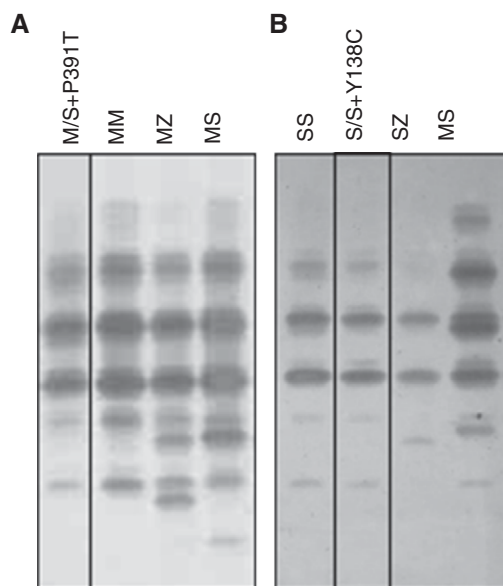


Figure 2. IEF electrophoresis of plasma samples from subjects with different *SERPINA1* genotypes. (A) Plasma from patient 3 with the PiM/S + Pro391Thr genotype shows a Pi*M protein phenotype, compatible with a PiM/QO genotype. (B) Plasma from patient 1 with the PiS/S + Tyr138Cys genotype shows a Pi*SS phenotype, compatible with a PiS/QO genotype.

FEV₁/forced vital capacity of 28%. The last evaluation by computed tomography of the lung revealed lung emphysema with residual fibrotic lesions. Evaluation of hepatic disease with an abdominal ultrasound showed a liver with normal structure and morphology, and a cholelithiasis was noted. Fibroscan analysis showed no signs of liver fibrosis (FS, 4.3 KPa; interquartile range [IQR], 0.3 KPa), but a severe steatosis (CAP, 286 dB/m; IQR, 16). The patient was initially diagnosed as PiSS genotype, with an AAT serum concentration of 54 mg/dl.

Patient 2 was a 28-year-old male never-smoker without evidence of pulmonary disease, but with signs of hepatic pathology mirrored by elevated hepatic enzymes, which prompted us to test AAT levels (AST, 26; ALT, 46; GGT, 197). Fibroscan analysis showed no fibrosis (FS, 4.3 kPa). His initial

genetic diagnosis was PiMS genotype, with an AAT serum concentration of 74 mg/dl. Protein phenotype was evaluated by IEF, showing a phenotype compatible with PiMM genotype.

Sequence analysis in both patients revealed an A > G transition in exon 2 (NM_000295:c.485A > G) producing an amino acid change of tyrosine to cysteine at codon 138 (p.Tyr138Cys) in the mature protein. Family screening in both cases showed that this variant segregates with the S mutation.

Pi*S-plus (Pro391Thr), QO_{Aachen}. Patient 3 was a 62-year-old female former smoker of five cigarettes per day for 5 years, who presented with COPD and bronchiectasis, with an FEV₁ of 62%. She had no evidence of significant liver fibrosis (FS, 5.3–4.8 kPa), but had some degree of steatosis (CAP, 253–302), with normal liver enzymes (AST, 23–21;

ALT, 17–19; GGT, 15–12). Allele-specific genotyping (Pi*S and Pi*Z alleles) revealed the presence of heterozygous S mutation, and the patient genotype was therefore initially reported as PiMS. The AAT serum concentration of 71 mg/dl was found to be lower than expected based on Pi*MS genotype. DNA sequencing showed that the patient carried the S mutation and a C > A transversion at the end of exon 5 (NM_000295:c.1243C > A), producing a substitution of proline to threonine (Pro391Thr) in the mature protein. Selective amplification of the S allele followed by sequencing confirmed that the new variant was phased in the S allele (Figure E1). Protein phenotyping by IEF of patient serum revealed an unexpected Pi*M phenotype (Figure 2).

In Silico Analysis of the New Variants

To investigate the putative pathogenic impact of these variants on the gene and protein sequence, we analyzed their allele frequency, amino acid conservation, and localization on protein tertiary structure. Neither Tyr138Cys nor Pro391Thr substitutions were found described in any of the assessed genetic databases (Short Genetic Variations Database, Exome Aggregation Consortium, or Genome Aggregation Database). Both variants are classified as deleterious by SIFT (score: 0) and Condel (score: 0.945) algorithms, as probably damaging by Polyphen (score: 1), and likely benign by CADD (PHRED-like scaled CADD scores are 25 and 27.5 for Tyr138Cys and Pro391Thr, respectively). Accordingly, Tyr138Cys and Pro391Thr involve the replacement of a highly conserved residue in AAT protein (Figure 3A). The Pro391 is located in the C-terminal region, very close to the S mutation in the tertiary structure of the protein. The Tyr138 localizes at the end of

Table 2. List of All Pi*S-Plus Alleles Described to Date

Pi*S-plus	Allele Name	Additional Variant			Reference
		cDNA (NM_000295.4)	Mature Protein	Phenotype	
S + Try138Cys	QO _{Vigo}	c.485A>G	p.Tyr138Cys	Null	Present study
S + Pro391Thr	QO _{Aachen}	c.1243C>A	p.Pro391Thr	Null	Present study
S + Phe52del	QO _{LaPalma}	c.221_223TCT	p.Phe52del	Null	(11)
S + Ser14Phe	Pi*S _{Donosti}	c.113C>T	p.Ser14Phe	Deficient	(12)
S + Z(Glu342Lys)	—	c.1096G>A	p.Glu342Lys	—	(19)

α -helix(E) at the opposite side of the protein, where the S mutation (Glu264Val) is located.

Polymerization and Secretion of Mutant AAT

Next, we investigated the intracellular accumulation and secretion of AAT in HEK293T cells transfected with plasmids expressing *SERPINA1* wt or S (Glu264Val), Tyr138Cys, combined S + Tyr138Cys, Pro391Thr, and combined S + Pro391Thr mutants. As illustrated in Figure 4A, cells expressing wt-AAT are negative for PAS staining, whereas cells expressing S-AAT showed PAS positivity, which is characteristic of intracellular accumulation of AAT. Both Tyr138Cys and Pro391Thr AAT-expressing cells showed PAS⁺ intracellular aggregates, independently of whether the variant was alone or in a combination with the S mutation. In both cases, Tyr138Cys and Pro391Thr, an increase in the number of PAS⁺ cells was observed when these variants were combined with the S variant (Figure 4B), suggesting the synthesis of a more polymerogenic AAT when both variants are present.

We also assessed the presence of AAT polymers in the insoluble fraction of cells expressing these variants by Western blot analysis (Figures 5A and 5B). We detected AAT polymers in cells expressing the S variant, but not in cells transfected with wt-AAT or empty vector. In accordance with PAS staining, Tyr138Cys- and Pro391Thr-expressing cells, either alone or in combination with the S mutant, formed polymers of AAT. Again, when or Pro391Thr and S mutation were expressed together, we observed an enhanced polymerization of AAT protein. The proportion of AAT in the insoluble fraction of double mutant S + Tyr138Cys increased from 25% (shown by Tyr138Cys alone) to 79% (Figure 5B). In the case of Pro391Thr, the percentage of AAT protein in the insoluble fraction was 82%, and increased to 98% when the combination of S + Pro391Thr was expressed (Figure 5B).

The analysis of the secretion of AAT into the culture medium by Western blot revealed the expected result, that wt-AAT was efficiently secreted into the medium, whereas S-AAT showed lower secretion. No AAT was detected for the empty vector. The Tyr138Cys AAT was partially secreted

into the medium, whereas combined S + Tyr138Cys and Pro391Thr or combined S + Pro391Thr AAT were almost undetectable, suggesting strong intracellular retention.

Discussion

The most important finding of the present study is the discovery of two novel pathogenic genetic variants of *SERPINA1* gene (Tyr138Cys and Pro391Thr), which appeared in *in cis* configuration with S mutation (PI*S-plus alleles) and modified the properties of the PI*S allele in terms of higher intracellular retention and almost no extracellular secretion. When analyzed in a clinical laboratory, plasma samples from patients carrying these combinations showed that these new PI*S-plus mutant alleles had features of null-phenotype behavior.

The PAS staining and Western blot analysis of AAT in cells expressing the Tyr138Cys variant in combination with the S mutation led us to demonstrate an increase of AAT polymerization and a reduction in AAT secretion to almost undetectable levels.

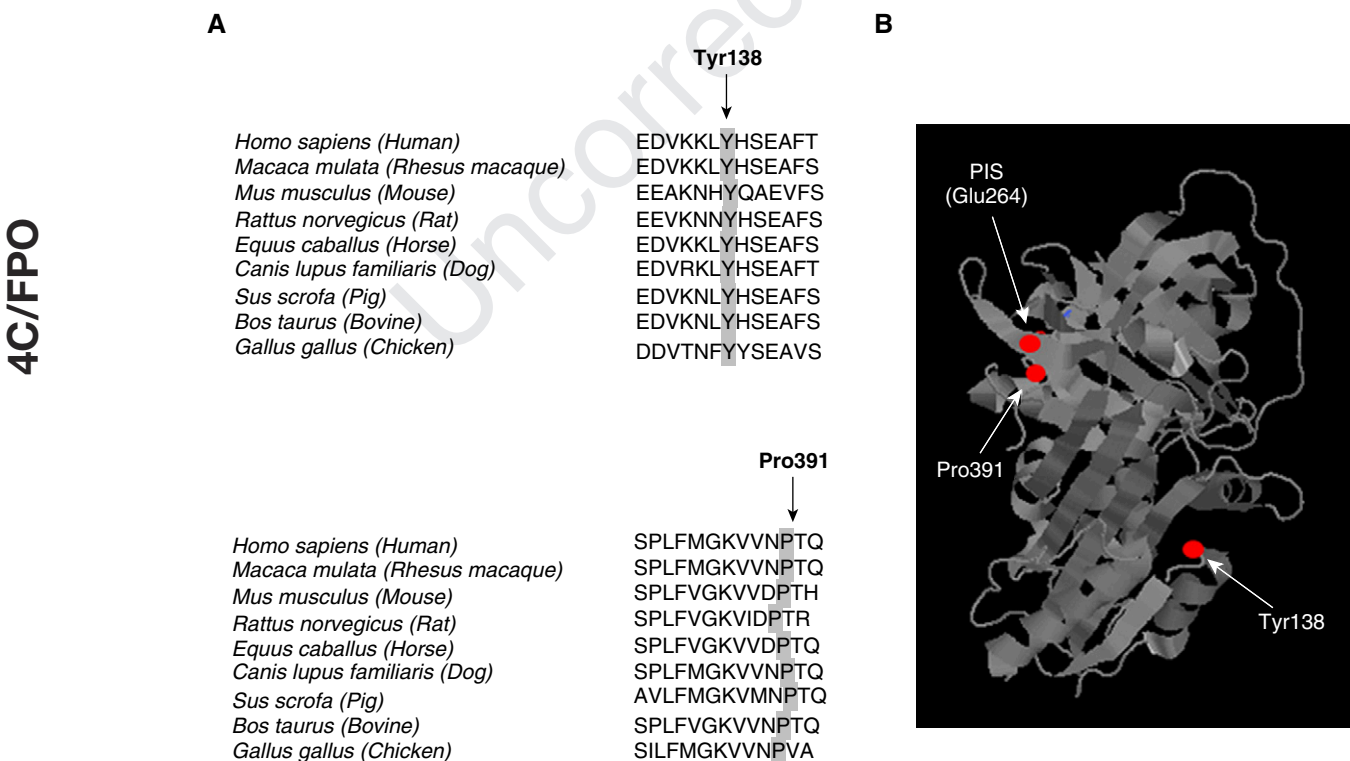


Figure 3. Characterization of the amino acid residues affected by Tyr138Cys and Pro391Thr substitutions. (A) Conservation of Tyr138 and Pro391 residues among *SERPINA1* from different species. (B) Localization of Tyr138, Pro391 and Glu264 (S mutation) on AAT tertiary structure.

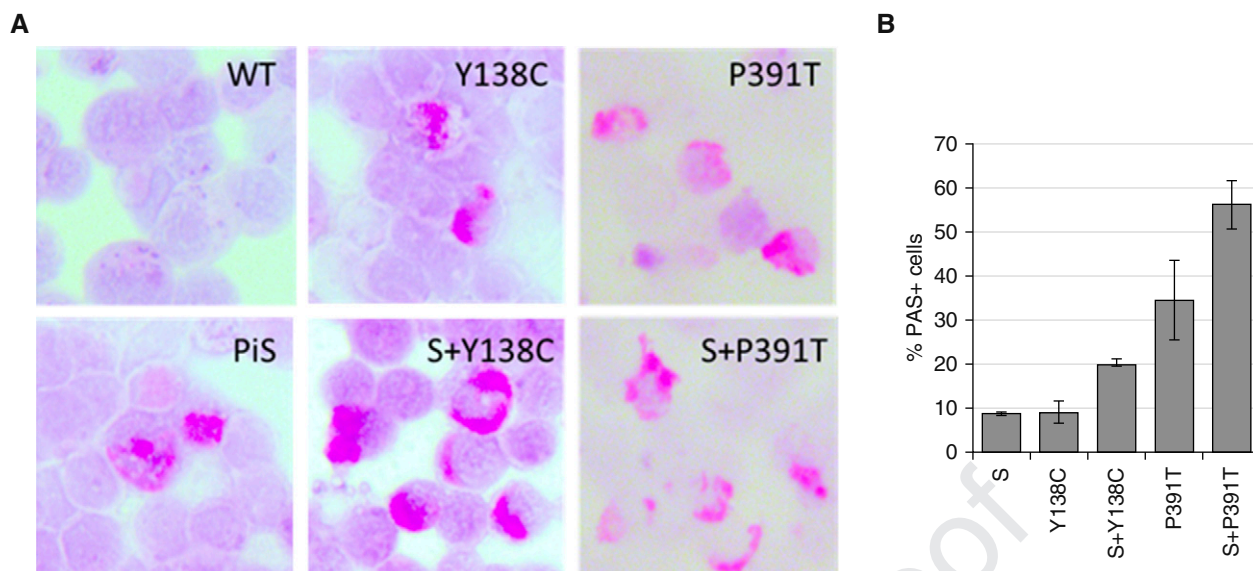


Figure 4. AAT aggregates detected by periodic acid–Schiff (PAS) staining in HEK293T cells transfected with different mutants. (A) Accumulation of AAT is seen as bright magenta globules in the cytoplasm of cells expressing S (E264V), Y138C, S + Y138C, P391T, and S + P391T, but not in *SERPINA1* wt. (B) Quantification of PAS⁺ cells in the different AAT mutant expressing cells. Bars show averaged percentage of PAS⁺ cells for each case and error bars represent the corresponding SD.

This was in accordance with the low levels of serum AAT observed in the two patients who presented the S + Tyr138Cys allele (54 and 74 mg/dl for those initially labeled as PiSS and PiMS genotypes, respectively). In addition, elevated liver enzymes in the serum of patient carrying an M/S + Tyr138Cys genotype could be related with an increased polymerization of the AAT protein within the ER of hepatocytes. However, the characteristics of these polymers are still unknown and should be further studied. Because they are the result of a combination of the S mutant with another missense mutation, it is possible that they have different polymerization, degradation, or stability properties compared with the Z polymers.

The other variant, Pro391Thr, also formed polymers in our cellular model, and the protein was not secreted into the media. This *in vitro* effect was in line with the low levels of serum AAT observed in the patient (71 mg/dl, initially diagnosed as MS genotype). These results, together with the lack of bands for the S allele in the IEF, lead us to classify this variant as a null allele. Codon 391 has been described previously by Brodbeck and Brown (16) as essential for a normal secretion of AAT. They expressed truncated forms of AAT in COS1 cells, and demonstrated that proteins with

less than 391 amino acids were retained in the ER and were not transported to the Golgi apparatus, and consequently not secreted. They suggested an important role of Pro391 in AAT secretion, either by allowing proper folding or as part of a transport signal in the C-terminal region.

Moreover, the substitution of Pro391 by a His residue has been described as pathogenic. Jardi and collaborators (17) described the PI*Y_{Barcelona} allele, which combines a Pro391His variant with an Asp256Val change on a normal M1(Val213) background. The patient who presented this allele in homozygous form had severe COPD, serum AAT levels of 16 mg/dl, and a PiZZ phenotype pattern, obtained by IEF. Similarly, Fra and coworkers (18) characterized the PI*Y_{Orzinuovi} allele, which is the result of a Pro391His substitution on a normal M1(Val213) background. The latter was identified in heterozygous form in a patient with a history of mild hypertransaminasemia and an AAT plasma level of 68 mg/dl. Expression of the variant in cellular models demonstrated an accumulation of AAT polymers and a severe secretion defect. In this case, substitution of Pro391 by His seems to reduce dramatically the secretion of AAT, but does not lead to a null phenotype.

Although the newly identified Pro391Thr variant seems to be enough to cause a lack of secretion in HEK293T cells by itself, the combination in the same allele with the S mutation may contribute to the null state. In fact, Pro391 and Glu264 are very close in the tertiary structure, and the accumulation of both changes could produce conformationally unstable protein.

The combination of the S mutation with other rare missense variants in the same allele has been reported previously in AATD (Table 2). The allele, QO_{LaPalma}, was previously described in a patient with AAT serum concentration of 8.5 mg/dl carrying a PiZ/QO_{LaPalma} genotype (12). Similarly to the present study, the QO_{LaPalma} allele is the result of the S variant *in cis* with the ΔPhe52 variant, and also gives rise to an AAT null phenotype (12). The PI*S_{Donosti} allele was described by our group in two patients with PiSS and PiSZ phenotypes (13), and subsequently was reported in two additional cases with PiMS and PiSS phenotypes (19). This allele combines the S variant with a Ser14Phe substitution, and it is associated with polymerization and reduced secretion of AAT. Moreover, an *in cis* PiSZ allele has recently been reported in a woman with emphysema and very low serum AAT (20 mg/dl) (20). Thus, the novel alleles reported here expand the list of

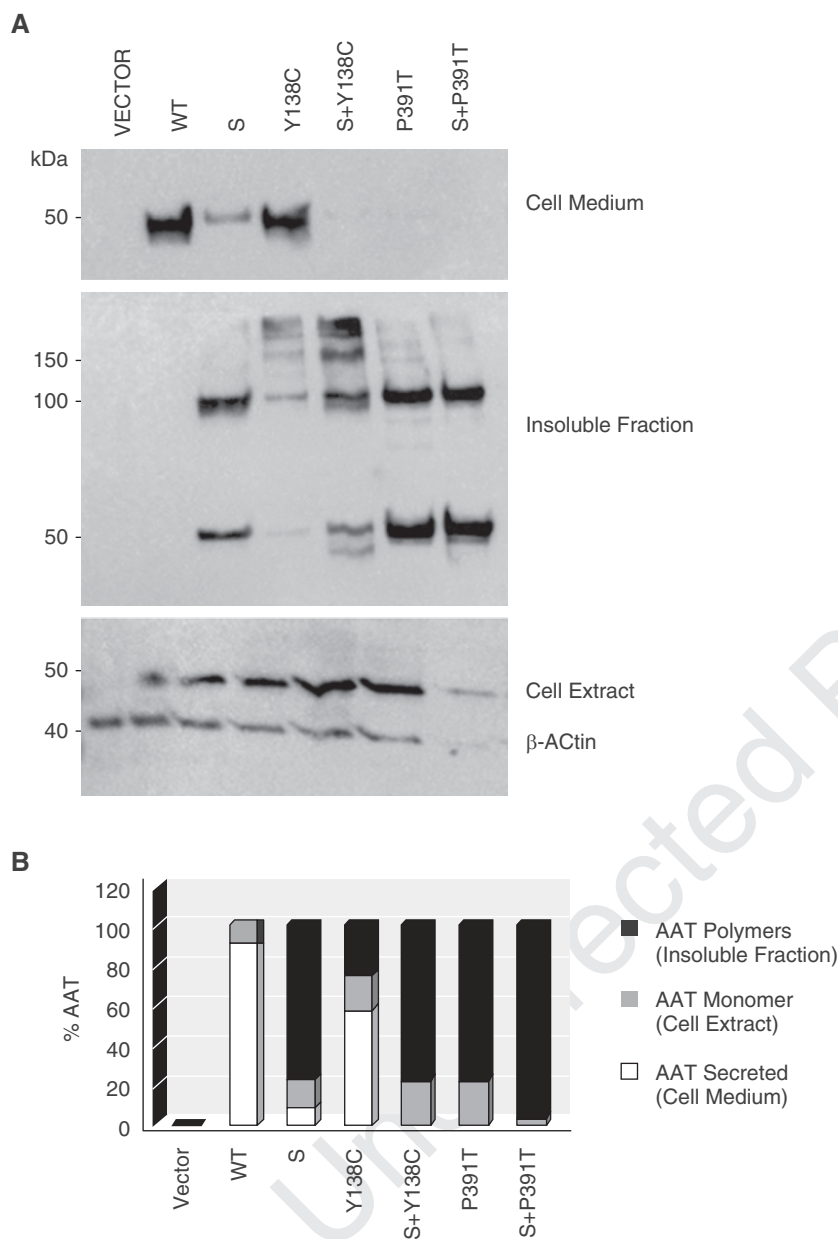


Figure 5. Western blot detection of the AAT protein in different cell fractions from the HEK293T cells expressing *SERPINA1* wt or the different mutants: S (E264V), Y138C, S + Y138C, P391T, and S + P391T. (A) The presence of secreted AAT protein was evaluated in cell media, as well as the accumulated AAT in the insoluble fraction and the expressed AAT in protein cell extracts after RIPA buffer. (B) Proportion of the AAT protein in the different cell compartments was estimated by densitometry analysis relative to β -actin. Bars represent 100% of AAT protein. White, the percentage of secreted AAT; gray, the AAT protein in cell extracts; black, the AAT found within the insoluble fraction were polymers are retained.

pathogenic variants identified in a PI*S background.

Importantly, at least some of the *cis*-acting variants in PI*S alleles, which we call PI*S-plus, make them behave as null alleles

in the sense that they are absent in protein phenotyping by IEF. However, in contrast to QO alleles that are caused by mutations that prevent the expression of AAT, these new alleles express an AAT protein that

is strongly retained in cells, and phenotypically can be described as null. These PI*S-plus alleles, in contrast to the majority of QO alleles, might have increased risk of hepatic damage, as protein is highly accumulated in cells. This might be particularly important in cases homozygous for these PI*S-plus alleles, and should be further studied. In addition, because the protein is not secreted, these PI*S-plus alleles might also be associated with higher risk of developing lung disease.

The detection of rare variants in combination with the S variant in the same allele is of importance because they can confer new properties to the AAT protein and modify clinical consequences. The existence of different PI*S-plus alleles could, at least in part, explain the phenotypical variability observed among patients with AATD. The incidence of these PI*S-plus alleles is still to be estimated, although, given the rarity of these variants, the presence of other missense mutations *in cis* with PI*S allele will probably explain only a minor fraction of AATD phenotypical variability. Other genetic and nongenetic factors are likely to play a role as well.

In conclusion, we describe two new null PI*S-plus alleles causing AATD: QO_{Vigo} (S + Tyr138Cys) and QO_{Aachen} (S + Pro391Thr). Both alleles are the result of a rare missense variant *in cis* with the S variant. This study highlights the additional effect that rare variants may have when combined with more common mutations associated with AATD, thus contributing to the clinical variability of this genetic condition. Therefore, when phenotyping or allele-specific genotyping (PI*S and PI*Z) is inconclusive, a complete sequencing of the *SERPINA1* gene with phase information and allelic segregation of variants is highly recommended for an accurate diagnosis and, consequently, an improved clinical management of the patients. ■

Author disclosures are available with the text of this article at www.atsjournals.org.

Acknowledgment: The authors thank collaborators from the Spanish Registry of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Patients and all members of the Genetic Diagnostic Unit and the Human Genetics Area of the Instituto de Salud Carlos III for their support.

References

- Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med* 2011;105:1129–1139.
- Brantly M, Nukiwa T, Crystal RG. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Med* 1988;84:13–31.
- Crystal RG. The alpha 1-antitrypsin gene and its deficiency states. *Trends Genet* 1989;5:411–417.
- Luisetti M, Seersholm N. Alpha1-antitrypsin deficiency: 1. epidemiology of alpha1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 2004;59:164–169.
- Lee JH, Brantly M. Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles. *Respir Med* 2000;94(Suppl C):S7–11.
- Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J* 2006;27:77–84.
- Dafforn TR, Mahadeva R, Elliott PR, Sivasothy P, Lomas DA. A kinetic mechanism for the polymerization of alpha1-antitrypsin. *J Biol Chem* 1999;274:9548–9555.
- 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.
- Strnad P, Schneider CV, Clark V. Clinical approach to liver disease in adults. In: Alpha1-antitrypsin deficiency (ERS Monograph). Sheffield: European Respiratory Society; 2019. pp. 114–126.
- Blanco I, de Serres FJ, Cárcaba V, Lara B, Fernández-Bustillo E. Alpha-1 antitrypsin deficiency PI*Z and PI*S gene frequency distribution using on maps of the world by an inverse distance weighting (IDW) multivariate interpolation method. *Hepat Mon* 2012;12:e7434.
- Blanco I, Bueno P, Diego I, Pérez-Holanda S, Lara B, Casas-Maldonado F, et al. Alpha-1 antitrypsin PI*SZ genotype: estimated prevalence and number of SZ subjects worldwide. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2017;12:1683–1694.
- Hernández-Pérez JM, Ramos-Díaz R, Fumero-García S, Pérez JA. Molecular characterization of PI*Q0_{la palma}, a new alpha-1-antitrypsin null allele that combines two defective genetic variants. *Clin Genet* 2017;91:927–928.
- Matamala N, Lara B, Gomez-Mariano G, Martínez S, Retana D, Fernandez T, et al. Characterization of novel missense variants of SERPINA1 gene causing alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018;58:706–716.
- Lara B, Martínez-Delgado B, Torres ML, Marín-Arguedas S, Bustamante A, Miravittles M. Alpha-1-antitrypsin deficiency associated with the Mattawa variant. *Arch Bronconeumol* 2013;49:548–550.
- Zorzetto M, Russi E, Senn O, Imboden M, Ferrarotti I, Tinelli C, et al.; SAPALDIA Team. SERPINA1 gene variants in individuals from the general population with reduced alpha1-antitrypsin concentrations. *Clin Chem* 2008;54:1331–1338.
- Brodbeck RM, Brown JL. Secretion of alpha-1-proteinase inhibitor requires an almost full length molecule. *J Biol Chem* 1992;267:294–297.
- Jardi R, Rodríguez F, Miravittles M, Vidal R, Cotrina M, Quer J, et al. Identification and molecular characterization of the new alpha-1-antitrypsin deficient allele PI Y barcelona (Asp256-->Val and Pro391-->His): mutations in brief no. 174. Online. *Hum Mutat* 1998;12:213.
- 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.
- Renoux C, Odou MF, 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.
- Speevak MD, DeMarco ML, Wiebe NS, Chapman KR. An unusual case of alpha-1-antitrypsin deficiency: SZ/Z. *Clin Biochem* 2019;64:49–52.
- Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardi R, Miravittles M; Committee on the National Registry of Individuals with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. Guidelines for the diagnosis and management of alpha-1 antitrypsin deficiency [in Spanish]. *Arch Bronconeumol* 2006;42:645–659.

RESEARCH ARTICLE

Identification of Novel Short C-Terminal Transcripts of Human *SERPINA1* Gene

Nerea Matamala¹, Nupur Aggarwal², Paolo Iadarola³, Marco Fumagalli³, Gema Gomez-Mariano¹, Beatriz Lara⁴, Maria Teresa Martinez⁵, Isabel Cuesta⁶, Jan Stolk⁷, Sabina Janciauskiene², Beatriz Martinez-Delgado¹*✉

1 Molecular Genetics Unit, Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, **2** Department of Respiratory Medicine, Hannover Medical School, Hannover, Biomedical Research in Endstage and Obstructive Lung Disease Hannover (BREATH), Hannover, Germany, **3** Department of Biology and Biotechnologies, Biochemistry Unit, University of Pavia, Pavia, Italy, **4** Respiratory Medicine Department, Coventry and Warwickshire University Hospital, Coventry, Warwickshire, United Kingdom, **5** Pneumology Department, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, **6** Bioinformatics Unit, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, **7** Department of Pulmonology, Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands

✉ These authors contributed equally to this work.

* bmartinezd@isciii.es



OPEN ACCESS

Citation: Matamala N, Aggarwal N, Iadarola P, Fumagalli M, Gomez-Mariano G, Lara B, et al. (2017) Identification of Novel Short C-Terminal Transcripts of Human *SERPINA1* Gene. PLoS ONE 12(1): e0170533. doi:10.1371/journal.pone.0170533

Editor: Pavel Strnad, Medizinische Fakultät der RWTH Aachen, GERMANY

Received: October 28, 2016

Accepted: January 5, 2017

Published: January 20, 2017

Copyright: © 2017 Matamala et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The sequence data of the described transcripts are available at NCBI GenBank with the following accession numbers: KU535895 (ST1C4), KU535894 (ST1C5), KU755451 (ST1A4) and KU755450 (ST1A5).

Funding: This work has been partially funded by the Instituto de Salud Carlos III (www.isciii.es) grant PI14CIII/00070 (BMD) and SEPAR (Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica, www.separ.es) grant 92/2014. The funders had no role in study design, data collection and analysis,

Abstract

Human *SERPINA1* gene is located on chromosome 14q31-32.3 and is organized into three (IA, IB, and IC) non-coding and four (II, III, IV, V) coding exons. This gene produces α 1-antitrypsin (A1AT), a prototypical member of the serpin superfamily of proteins. We demonstrate that human peripheral blood leukocytes express not only a product corresponding to the transcript coding for the full-length A1AT protein but also two short transcripts (ST1C4 and ST1C5) of A1AT. In silico sequence analysis revealed that the last exon of the short transcripts contains an Open Reading Frame (ORF) and thus putatively can produce peptides. We found ST1C4 expression across different human tissues whereas ST1C5 was mainly restricted to leukocytes, specifically neutrophils. A high up-regulation (10-fold) of short transcripts was observed in isolated human blood neutrophils after activation with lipopolysaccharide. Parallel analyses by liquid chromatography-mass spectrometry identified peptides corresponding to C-terminal region of A1AT in supernatants of activated but not naïve neutrophils. Herein we report for the first time a tissue specific expression and regulation of short transcripts of *SERPINA1* gene, and the presence of C-terminal peptides in supernatants from activated neutrophils, *in vitro*. This gives a novel insight into the studies on the transcription of *SERPINA1* gene.

Introduction

Gene expression is responsible for the synthesis of functional gene products, typically proteins. The question of how many genes are present in the human genome led to the collection of known protein-coding genes not only in the human genome but also in *Arabidopsis*, worm, fly and mouse [1–4]. The findings revealed that there is a significantly greater amount of

decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

transcriptional output from genomes than anticipated by the collection of annotated protein-coding transcripts [5]. New proteomic high-throughput technologies provide a strong evidence of the existence of non-canonical protein isoforms generated by the translation outside of the annotated protein-coding genes [6,7]. A variety of short open reading frames (ORFs), long noncoding RNAs and pseudogenes are coding short transcripts [8,9], which may express unrecognized biological functions.

The serpins (serine proteinase inhibitors) are proteins found in plants, animals, and viruses [10–12]. These proteins participate in the regulation of the coagulation, fibrinolysis, complement activation, angiogenesis, apoptosis, inflammation, neoplasia, viral pathogenesis, among others [13]. Human genome encodes 16 serpin clades, termed A to P. So far, 36 human serpins have been identified, among which 29 have a primary function in the regulation of the proteolytic activity. Mutations in serpin genes are associated with different human diseases, globally named serpinopathies [14]. Alternative splicing results in multiple transcript variants of serpin genes, however, to our knowledge; current databases contain no information about noncoding transcripts in human serpins.

Human *SERPINA1* gene is located on chromosome 14q31-32.3 [15], which covers approximately 12.2 kb, and has four coding exons, three untranslated exons and six introns. *SERPINA1* gene is expressed and translated in different tissues, and encodes alpha1-antitrypsin (A1AT), a prototypical member of the serpin superfamily of proteins. The regulation of A1AT expression is controlled by different promoters and transcription start sites located in the 5'UTR of the gene [16–18]. In hepatocytes, transcription typically begins in exon 1C [17,19] whereas in monocytes and macrophages A1AT transcribed mainly from exons 1A and 1B [16,18,20]. One particular feature of *SERPINA1* gene is its high transcriptional complexity i.e. according to the Emsembl Genome Browser, human *SERPINA1* gene has 19 transcripts (splice variants), generated in a stimulus- and cell-type specific manner [21–23]. Different types of alternative splicing mechanisms generate this complexity of transcripts, including exon skipping and alternative 5' and 3' splice site usage. Most of the *SERPINA1* transcript variants are produced by the alternative splicing between the non-coding exons 1A, 1B and 1C.

Remarkably, a recent study on ovine *SERPINA1* gene expression found short transcripts lacking exons II or III [24]. Because the *SERPINA1* gene exon and intron organization is similar among the species, theoretically short transcripts can also be present in human *SERPINA1* gene. In support of our prediction, herein we identified novel short transcripts of *SERPINA1* gene and provided evidence for tissue specific expression and regulation of these transcripts.

Materials and Methods

RNA extraction, cDNA synthesis and *SERPINA1* expression analysis by RT-PCR

Peripheral blood samples were obtained from subjects previously tested for A1ATD, and informed consent for this study was signed. The study was approved by the ethics committee of Instituto de Salud Carlos III. RNA isolation from peripheral blood leukocytes was performed using RNAeasy kit (Qiagen) following manufacturer's recommendations. The cDNA synthesis was generated using the Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific). To amplify *SERPINA1* transcripts, primers located in exon 1C: 1C_F:5' ctgtctcctc agcttcaggc3' and 1A: 1A_F:5' tgaggagagcaggaaaggaca3' were used in combination with a reverse primer located in exon V, EX5_R:5' ccatgaagaggggagacttgg3'. The PCR was performed under the following conditions: 35 cycles of 94°C for 45s, 60°C for 45s, and 72°C for 45s. Amplified products were visualized in 1–2% agarose gels. PCR products were purified by using PCR purification Kit (Qiagen) and subsequently cloned into pGEM-T

Characterization of Novel Missense Variants of *SERPINA1* Gene Causing Alpha-1 Antitrypsin Deficiency

Nerea Matamala¹, Beatriz Lara², Gema Gomez-Mariano¹, Selene Martínez¹, Diana Retana¹, Taiomara Fernandez¹, Ramona Angeles Silvestre³, Irene Belmonte⁴, Francisco Rodriguez-Frias⁴, Marçal Vilar⁵, Raquel Sáez⁶, Igor Iturbe⁷, Silvia Castillo⁸, María Molina-Molina⁹, Anna Texido¹⁰, Gema Tirado-Conde¹¹, Jose Luis Lopez-Campos^{12,13}, Manuel Posada^{1,14}, Ignacio Blanco¹⁵, Sabina Janciauskiene^{16,17}, and Beatriz Martinez-Delgado¹

¹Molecular Genetics Unit, Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER), ¹³Consortio Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), and ¹⁴Consortio Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain; ²Respiratory Medicine Department, Coventry University Hospital, Coventry, United Kingdom; ³Biochemistry Unit, Hospital Puerta de Hierro, Madrid, Spain; ⁴Biochemistry Department, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁵Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Valencia, Spain; ⁶Immunology and Genetics, Hospital Donosti, San Sebastián, Spain; ⁷Pneumology, Hospital de Zumárraga, Gipuzkoa, Spain; ⁸Pediatrics, Hospital Clínico de Valencia, Valencia, Spain; ⁹Pulmonary Medicine, Bellvitge University Hospital, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Hospital de Llobregat, Barcelona, Spain; ¹⁰Pneumology, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Reus (Tarragona), Spain; ¹¹Complejo Hospitalario Universitario Granada, Parque Tecnológico de las Ciencias de la Salud, Granada, Spain; ¹²Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; ¹⁵Spanish Registry of Patients with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency (REDAAT), Spanish Society of Pneumology (SEPAR), Fundación Española de Pulmón (RESPIRA), Barcelona, Spain; ¹⁶Department of Respiratory Medicine, Hannover Medical School, Hannover, Germany; and ¹⁷Biomedical Research in Endstage and Obstructive Lung Disease Hannover (BREATH), Member of the German Center for Lung Research (DZL), Hannover, Germany

Abstract

The *SERPINA1* gene is highly polymorphic, with more than 100 variants described in databases. *SERPINA1* encodes the alpha-1 antitrypsin (AAT) protein, and severe deficiency of AAT is a major contributor to pulmonary emphysema and liver diseases. In Spanish patients with AAT deficiency, we identified seven new variants of the *SERPINA1* gene involving amino acid substitutions in different exons: PiSDonosti (S+Ser14Phe), PiTijarafe (Ile50Asn), PiSevilla (Ala58Asp), PiCadiz (Glu151Lys), PiTarragona (Phe227Cys), PiPuerto Real (Thr249Ala), and PiValencia (Lys328Glu). We examined the characteristics of these variants and the putative association with the disease. Mutant proteins were overexpressed in HEK293T cells, and AAT expression, polymerization, degradation, and secretion, as well as

antielastase activity, were analyzed by periodic acid-Schiff staining, Western blotting, pulse-chase, and elastase inhibition assays. When overexpressed, S+S14F, I50N, A58D, F227C, and T249A variants formed intracellular polymers and did not secrete AAT protein. Both the E151K and K328E variants secreted AAT protein and did not form polymers, although K328E showed intracellular retention and reduced antielastase activity. We conclude that deficient variants may be more frequent than previously thought and that their discovery is possible only by the complete sequencing of the gene and subsequent functional characterization. Better knowledge of *SERPINA1* variants would improve diagnosis and management of individuals with AAT deficiency.

Keywords: alpha-1 antitrypsin deficiency; *SERPINA1* novel variants; alpha-1 antitrypsin polymers; elastase

(Received in original form May 10, 2017; accepted in final form December 12, 2017)

Supported by Instituto de Salud Carlos III grant AESI PI14CIII/00070.

Author Contributions: N.M.: performed experiments, analyzed data, and drafted manuscript; B.L.: collected clinical data, interpreted results, and drafted the manuscript; G.G.-M., S.M., D.R., and T.F.: performed experiments and analyzed data; R.A.S.: obtained and analyzed biochemical results and reviewed the manuscript; I. Belmonte and F.R.-F.: performed isoelectric focusing analysis and interpreted the results; M.V.: performed protein structure analysis and interpreted the results; R.S., I.L., S.C., M.M.-M., A.T., G.T.-C., and J.L.L.-C.: reviewed patients' clinical data, interpreted results, and helped in drafting the manuscript; M.P. and I. Blanco: participated in collection of samples, interpreted the results, drafted the manuscript, and revised the manuscript critically; S.J.: participated in protein expression analysis, interpretation of the results, and drafting of the manuscript; and B.M.-D.: designed and coordinated the study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Beatriz Martinez-Delgado, Ph.D., Molecular Genetics, Instituto de Investigación en Enfermedades Raras (IIER), Instituto de Salud Carlos III, Carretera de Majadahonda-Pozuelo, Km 2,200, 28220 Madrid, Spain. E-mail: bmartinezd@isciii.es.

This article has a data supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 58, Iss 6, pp 706–716, Jun 2018

Copyright © 2018 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2017-0179OC on December 12, 2017

Internet address: www.atsjournals.org

Clinical Relevance

SERPINA1 is a highly polymorphic gene with more than 100 variants described, most of them missense variants classified as being of uncertain significance. To reach a definitive diagnosis of patients with alpha-1 antitrypsin deficiency and improve knowledge of the molecular bases of the disease, characterization of the pathophysiologic effects of novel variants is needed. In the present study, cell models were used to check molecular effects of seven new variants of unknown significance identified in Spanish patients with alpha-1 antitrypsin deficiency. By using different strategies such as directed mutagenesis, exogenous expression of mutants in cells, mutant protein detection and secretion, pulse-chase assays, and functional assays such as elastase inhibition assays, we were able to determine the pathogenicity of most of these new mutations, improving the diagnosis of these patients. We describe seven novel allelic variants of alpha-1 antitrypsin related to alpha-1 antitrypsin deficiency.

Alpha-1 antitrypsin (AAT) deficiency (AATD) is a genetic condition characterized by low serum concentrations of AAT (normal serum concentrations of AAT are 1.3–2 g/L). AATD is caused by mutations in the *SERPINA1* gene and is linked to increased risk for liver diseases; early-onset pulmonary emphysema; and, more rarely, systemic vasculitis, necrotizing panniculitis, and probably other diseases (1, 2).

Laboratory testing for AATD typically involves analysis of AAT protein concentration by nephelometry and the identification of specific alleles by phenotyping and genotyping using defined diagnostic algorithms (3, 4). Despite the American Thoracic Society/European Respiratory Society recommendations for the testing, diagnosis, and management of AATD (5), this condition remains underdiagnosed.

To identify AAT variants based on the AAT protein migration patterns, isoelectric focusing (IEF) is typically used (6). This method allows the characterization of about 30 normal and pathological variants

(e.g., M, I, F, S, and Z). However, a number of rare variants, such as PiMmalton, PiMpalermo, and PiMheerlen, have an isoelectric point similar to the normal M alleles. Therefore, one cannot be certain that phenotyping will identify all variants. Another drawback is that the IEF technique cannot detect null alleles. Besides, the recognition of unusual variants of AAT by IEF requires adequate expertise. Genotyping using allele-specific PCR methodologies can detect S, Z, F, or MMalton alleles, and analytical genotyping kits are available that can measure about 25 AATD alleles (7, 8). Nevertheless, these methods may also disregard some of the rare and null alleles. Therefore, sequence analysis of the AAT gene is the reference method for identifying and characterizing rare and null variants of AAT. This method relies on complete analysis of the DNA sequence of the four coding exons of the *SERPINA1* gene and, for particularly rare cases, involves analyses of the intronic and regulatory sequences (9).

The AAT is an approximately 52 kD glycoprotein produced predominantly in the liver and secreted to the extracellular milieu, where it exerts protease-inhibitory and antiinflammatory functions. The commonest deficient variants of AAT are the S (Glu264Val) and Z (Glu342Lys) variants. The combination of these alleles into the ZZ and SZ genotypes accounts for the vast majority of severe AATD-related diseases. Other rare alleles of AAT are also associated with reduced serum concentrations of AAT protein (10). The molecular mechanism underlying the deficiency is the increased intracellular proteolysis or aggregation of AAT protein (11). PiMmalton (Phe52del) and PiSiiyama (Ser53Phe) are two well-known deficiency variants of AAT (12, 13). All these variants form intracellular polymers and show a positive response to periodic acid–Schiff (PAS) staining (11, 13).

To date, over 100 rare genetic variants of human AAT are known, although most of them are not well characterized (11, 14). These variants occur mainly as a result of the amino acid substitutions or deletions, which result in deficiency (11), or absence (null variants) of AAT (10). The discovery of rare variants is continually increasing, specifically in subjects with lower concentrations of AAT (9, 15, 16), and many of the variants remain of unknown significance.

On the basis of the present study, we report seven new variants of the *SERPINA1* gene found in subjects with deficient concentrations of AAT. When overexpressed, some of these variants form intracellular polymers or accumulate within the cell and show low secretion or reduced antielastase activity. These new variants help to increase knowledge of the structural and functional properties of AAT protein as well as awareness of the existence of variants with unknown significance.

Methods

Patients

Patient samples and their clinical data were obtained from REDAAT (the Spanish Registry of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency). A total 972 patients enrolled between 2013 and 2016 were routinely genotyped for S and Z variants at the Molecular Genetics Unit of IIER (Instituto de Investigación de Enfermedades Raras)/ISCIII (Instituto de Salud Carlos III). On the basis of Spanish guidelines (17) providing the reference serum concentrations for specific genotypes, extended genotype analysis was undertaken for patients with 1) discrepancies between serum AAT concentration and allele-specific genotype, 2) AAT concentration in the lower limit of the range for the corresponding genotype, and 3) AAT concentration not discordant but severe clinical manifestations present.

Of 192 sequenced patients, 101 (52.6%) carried at least one of the already known variants of AAT (e.g., MMalton, Mattawa, MProcida), whereas 8 (3.6%) had AAT variants not previously described. Clinical data of these latter eight patients are shown in Table 1. All of them had lung disease, except for one male with chronic diarrhea of unspecified etiology and one asymptomatic female (low serum concentration detected on the basis of family screening). Routine blood tests for liver function revealed no evidence of liver disease in these patients. Signed informed consent for participation in the study was obtained from all the subjects, and the research was approved by the ethics committee of ISCIII, Madrid, Spain.

Sequencing of *SERPINA1* Gene

DNA was extracted from peripheral blood using standard methods. The coding

Article

Clinical Significance of *SERPINA1* Gene and Its Encoded Alpha1-antitrypsin Protein in NSCLC

Evrin Ercetin ^{1,2}, Sarah Richtmann ^{3,4}, Beatriz Martinez Delgado ⁵, Gema Gomez-Mariano ⁵, Sabine Wrenger ^{1,2}, Elena Korenbaum ⁶, Bin Liu ^{1,2}, David DeLuca ^{1,2}, Mark P. Kühnel ⁷, Danny Jonigk ⁷, Kadriya Yuskaeva ³, Arne Warth ⁸, Thomas Muley ^{3,4}, Hauke Winter ^{3,9}, Michael Meister ^{3,4}, Tobias Welte ^{1,2}, Sabina Janciauskiene ^{1,2,*} and Marc A. Schneider ^{3,4,†}

¹ Department of Respiratory Medicine, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany

² Biomedical Research in Endstage and Obstructive Lung Disease Hannover (BREATH), Member of the German Center for Lung Research (DZL), 30625 Hannover, Germany

³ Translational Research Unit, Thoraxklinik at Heidelberg University Hospital, 69126 Heidelberg, Germany

⁴ Translational Research Center Heidelberg (TLRC), Member of the German Center for Lung Research (DZL), 69120 Heidelberg, Germany

⁵ Department of Molecular Genetics, Institute of Health Carlos III, Center for Biomedical Research in the Network of Rare Diseases (CIBERER), 28220 Majadahonda (Madrid), Spain

⁶ Institute of Biophysical Chemistry and Anatomy, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany

⁷ Institute of Pathology, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany

⁸ Institute of Pathology, Heidelberg University Hospital, D-69120 Heidelberg, Germany

⁹ Department of Surgery, Thoraxklinik at Heidelberg University Hospital, D-69126 Heidelberg, Germany

* Correspondence: Janciauskiene.sabina@mh-hannover.de

† These authors contributed equally.

Received: 8 August 2019; Accepted: 2 September 2019; Published: 4 September 2019

Abstract: High expression of *SERPINA1* gene encoding acute phase protein, alpha1-antitrypsin (AAT), is associated with various tumors. We sought to examine the significance of *SERPINA1* and AAT protein in non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients and NSCLC cell lines. Tumor and adjacent non-tumor lung tissues and serum samples from 351 NSCLC patients were analyzed for *SERPINA1* expression and AAT protein levels. We also studied the impact of *SERPINA1* expression and AAT protein on H1975 and H661 cell behavior, *in vitro*. Lower *SERPINA1* expression in tumor but higher in adjacent non-tumor lung tissues ($n = 351$, $p = 0.016$) as well as higher serum levels of AAT protein ($n = 170$, $p = 0.033$) were associated with worse survival rates. Specifically, in NSCLC stage III patients, higher blood AAT levels (>2.66 mg/mL) correlated with a poor survival ($p = 0.002$). Intriguingly, levels of serum AAT do not correlate with levels of C-reactive protein, neutrophils-to-leukocyte ratio, and do not correlate with *SERPINA1* expression or AAT staining in the tumor tissue. Additional experiments *in vitro* revealed that external AAT and/or overexpressed *SERPINA1* gene significantly improve cancer cell migration, colony formation and resistance to apoptosis. *SERPINA1* gene and AAT protein play an active role in the pathogenesis of lung cancer and not just reflect inflammatory reaction related to cancer development.

Keywords: alpha1-antitrypsin; *SERPINA1*; lung cancer; inflammation; acute phase proteins; apoptosis; migration

1. Introduction

Lung cancer is divided in non-small cell lung cancer (NSCLC, 85% of all lung cancers) and small cell lung cancer (SCLC, 15% of all lung cancers). NSCLC can be further classified into the main

histological groups such as large-cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC), squamous cell carcinoma (SQCC), and adenocarcinoma (ADC) [1]. Lung cancer is a leading cause of cancer-related death worldwide [2] because the majority of patients are diagnosed at a late-stage of the disease, making successful treatment more difficult and survival outcomes poor [3]. Moreover, invasiveness and metastasis are major threats to successful treatment of lung cancer. In the metastatic process of lung carcinomas, many mechanisms and involved genes/proteins have been identified, but the breakthrough is still not achieved. The treatments for lung cancer have improved recent years, and therefore the identification of prognostic factors is of great importance because they can contribute to clinical decision making and help to individualize treatments for this heterogeneous patient population.

A systemic inflammatory response is more and more being recognized as a prognostic factor in cancer patients. The hallmarks of cancer-related inflammation include inflammatory cells and inflammatory mediators, tissue remodeling and angiogenesis factors, similar like those seen in chronic inflammatory conditions or in tissue repair [4]. For example, several studies have shown that neutrophil-to-lymphocyte ratio has a prognostic value in predicting the survival of patients with NSCLC [5,6]. The increased levels of circulating acute phase proteins are also considered as prognostic factors for a poor survival in various cancers. For instance, C-reactive protein (CRP) is negatively associated with lung cancer outcome. The Rotterdam Study [7] demonstrated that high levels (>3 mg/L) of CRP are associated with an increased incidence of lung cancer. Moreover, elevated CRP levels are considered as an independent and significant prognostic indicator in patients with NSCLC [8–10]. Other acute phase proteins, including haptoglobin, alpha-2 macroglobulin and alpha1-antitrypsin (AAT) are also suggested as suitable targets for therapeutic and biomarker discoveries in cancer [11,12].

Alpha-1-antitrypsin (AAT), encoded by *SERPINA1* gene, is an acute phase glycoprotein mainly (by 80%) synthesized in human liver and is a major blood protein after albumin and the immunoglobulins [13]. The promoter of the *SERPINA1* is responsive to the IL-6 and IL-1 pathways, and to hypoxia [14]. The AAT is an archetype member of SERPIN (serine protease inhibitor) superfamily and best characterized as a controller of lung tissue damage through its inhibitory effect on neutrophil serine proteases [15]. Recent findings support AAT's broader role in modulating acute inflammatory processes via protease inhibitory and non-inhibitory mechanisms. In general, the biological role of AAT seems to be one of maintaining homeostasis and improving tissue repair and regeneration. It is proposed that during chronic inflammation, which is a driving force in cancer development, increased levels and functional activity of AAT may favor cancer progression. Several studies demonstrated that higher levels of AAT correlate with more advanced cancer stages [16]. A high level of AAT in breast cancer patients has been associated with poor clinical prognosis [17]. Elevated serum levels of AAT have been reported in patients with lung cancer as compared to those without lung cancer [18,19]. Some studies have shown that patients with *SERPINA1* expression in their tumor cells have worse prognosis than those without expression [20]. So far, the associations between clinical prognosis of NSCLC patients and *SERPINA1* expression and AAT levels in tumor and adjacent non-tumor tissues as well as serum AAT concentrations have not been reported. It is also of interest to clarify whether *SERPINA1* gene and AAT protein play an active role in the pathogenesis of lung cancer or just reflect inflammatory reaction related to cancer development.

2. Results

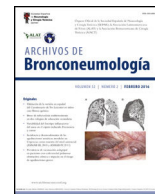
2.1. *SERPINA1* Gene Expression Is Lower in NSCLC Tumors as Compared to the Normal Adjacent Lung Tissue and Prognostic for Patients' Survival

To get an insight of *SERPINA1* expression in NSCLC, in a first step, *SERPINA1* gene expression was analyzed in a cohort of tumor and adjacent non-tumor tissues of the lung obtained from 351 patients (Table 1). In general, *SERPINA1* expression was significantly lower in tumor tissues than in adjacent normal lung tissue. A high variability in expression levels was detected in both, ADC and



ARCHIVOS DE Bronconeumología

www.archbronconeumol.org



Original Article

miR-320c Regulates *SERPINA1* Expression and Is Induced in Patients With Pulmonary Disease

Nerea Matamala^a, Beatriz Lara^b, Gema Gómez-Mariano^a, Selene Martínez^a, Irene Vázquez-Domínguez^c, Álvaro Otero-Sobrino^a, Antonio Muñoz-Callejas^a, Elena Sánchez^a, Cristina Esquinas^{d,e}, Ana Bustamante^f, Sergio Cadenas^g, Sergio Curi^h, Lourdes Lázaroⁱ, María Teresa Martínez^j, Esther Rodríguez^e, Marc Miravittles^e, María Torres-Duran^k, Inés Herrero^l, Francisco Javier Michel^m, Silvia Castilloⁿ, José M^a Hernández-Pérez^o, Ignacio Blanco^d, Francisco Casas^p, Beatriz Martínez-Delgado^{a,*}

^a Molecular Genetics Unit, Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

^b Respiratory Medicine Department, Coventry University Hospital, Coventry, UK

^c Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Madrid, Spain

^d Registro Español de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina (REDAAT), Fundación Española de Pulmón, Respira, SEPAR, Barcelona, Spain

^e Servicio de Neumología, Hospital Universitari Vall d'Hebron/Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain

^f Servicio de Neumología, Hospital de Sierrallana, Torrelavega, Cantabria, Spain

^g Servicio de Neumología, Hospital Clínico Universitario de Salamanca, Spain

^h Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Spain

ⁱ Servicio de Neumología, Complejo Asistencial Universitario de Burgos, Spain

^j Servicio de Neumología, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, Spain

^k Servicio de Neumología, Hospital Álvaro Cunqueiro, EOXI Vigo, Pneumovigo I+i, IIS Galicia Sur, Spain

^l Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain

^m Servicio de Neumología, Hospital Universitario Donostia, País Vasco, Spain

ⁿ Unidad de Neumología infantil y Fibrosis quística, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Spain

^o Servicio de Neumología, Hospital General de la Palma, Canarias, Spain

^p Servicio de Neumología, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2019

Accepted 11 March 2020

Available online xxx

Keywords:

microRNA

miR-320c

Alpha-1 antitrypsin deficiency

Lung disease

Inflammation

ABSTRACT

Introduction: Alpha-1 antitrypsin deficiency (AATD) is a genetic condition resulting in lung and liver disease with a great clinical variability. MicroRNAs have been identified as disease modifiers; therefore miRNA deregulation could play an important role in disease heterogeneity. Members of miR-320 family are involved in regulating of multiple processes including inflammation, and have potential specific binding sites in the 3'UTR region of *SERPINA1* gene. In this study we explore the involvement of miR-320c, a member of this family, in this disease.

Methods: Firstly in vitro studies were carried out to demonstrate regulation of *SERPINA1* gene by miR-320. Furthermore, the expression of miR-320c was analyzed in the blood of 98 individuals with different AAT serum levels by using quantitative PCR and expression was correlated to clinical parameters of the patients. Finally, HL60 cells were used to analyze induction of miR-320c in inflammatory conditions.

Results: Overexpression of miR-320 members in human HepG2 cells led to inhibition of *SERPINA1* expression. Analysis of miR-320c expression in patient's samples revealed significantly increased expression of miR-320c in individuals with pulmonary disease. Additionally, HL60 cells treated with the pro-inflammatory factor lipopolysaccharide (LPS) showed increase in miR-320c expression, suggesting that miR-320c responds to inflammation.

Conclusion: Our findings demonstrate that miR-320c inhibits *SERPINA1* expression in a hepatic cell line and its levels in blood are associated with lung disease in a cohort of patients with different AAT serum levels. These results suggest that miR-320c can play a role in AAT regulation and could be a biomarker of inflammatory processes in pulmonary diseases.

© 2020 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: bmartinezd@isciii.es (B. Martínez-Delgado).

El miR-320c regula la expresión del gen *SERPINA1* y se induce en pacientes con enfermedad pulmonar

RESUMEN

Palabras clave:

microARNs
miR-320c
Déficit de alfa-1 antitripsina
Enfermedad pulmonar
Inflamación

Introducción: La deficiencia de alfa-1 antitripsina (DAAT) es una condición genética que produce enfermedad pulmonar y hepática con una gran variabilidad clínica. Los microARN se han identificado como modificadores de la gravedad de algunas enfermedades y su desregulación podría desempeñar un papel en la heterogeneidad de esta enfermedad. Los miembros de la familia miR-320 regulan múltiples procesos, incluyendo la inflamación, y tienen lugares de unión en la región 3'UTR del gen *SERPINA1*. En este estudio exploramos la implicación del miR-320c, un miembro de esta familia, en la DAAT.

Métodos: Primero se realizaron estudios in vitro para demostrar la regulación del gen *SERPINA1* por parte del miR-320. Además, se analizó la expresión de miR-320c en la sangre de 98 individuos con diferentes niveles de AAT mediante PCR cuantitativa y se correlacionó con los parámetros clínicos. Por último, se utilizaron células HL60 para analizar la inducción de miR-320c en condiciones inflamatorias.

Resultados: La sobreexpresión del miR-320 en células HepG2 inhibía la expresión del gen *SERPINA1*. El análisis de expresión de miR-320c en los pacientes reveló una expresión significativamente aumentada en los casos con enfermedad pulmonar. Por otro lado, las células HL60 tratadas con LPS como factor proinflamatorio mostraron un aumento de expresión de miR-320c, lo que sugiere que este miARN responde a procesos inflamatorios.

Conclusión: Nuestros resultados demuestran que el miR-320c inhibe la expresión de *SERPINA1* en células hepáticas y que sus niveles en sangre están asociados con la presencia de enfermedad pulmonar en pacientes con diferentes niveles de AAT. Esto sugiere que el miR-320c desempeña un papel en la regulación de los niveles de AAT y podría ser un biomarcador de inflamación en enfermedades pulmonares.

© 2020 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Introduction

Human alpha-1 antitrypsin (AAT) is one of the most important serine proteinase inhibitor primarily synthesized and secreted by hepatocytes.¹ The protein exerts its major function in the lungs, where it protects the alveolar tissue from proteolytic damage produced mainly by neutrophil elastase.² In addition to its role as antiprotease, AAT has important anti-inflammatory and immunomodulatory properties.³

AAT is a polymorphic protein and small variations in its three-dimensional structure affect its susceptibility to polymerization and intracellular retention, and also modify its anti-elastase capacity.⁴ Some authors have hypothesized that polymers can also cause inflammation by themselves.^{5,6} Accumulation and degradation of abnormal protein cause reduced AAT levels in the serum characteristic of the AAT deficiency (AATD). AATD is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) which mainly manifest as lung emphysema and occasionally, neutrophilic panniculitis and systemic vasculitis.⁷

The most common and physiologically normal allele is the M allele, while Z (Glu342Lys) and S (Glu264Val) mutations are the most common deficiency variants.⁸ Homozygous ZZ individuals present with severe AAT deficiency (serum levels usually < 57 mg/dl).⁹ Homozygous SS and composite heterozygous (SZ) have a mild and moderate deficiency (range of serum levels measured by nephelometry in our laboratory: 70–105 and 45–80 mg/dl, respectively).^{10,11}

AAT deficiency (AATD) is not a disease in itself; instead it is a genetic predisposition to develop lung or liver disease mainly in the presence of environmental factors such as inhaled toxins like tobacco smoke. Even among deficient individuals with similar tobacco exposure, high clinical heterogeneity has been observed, ranging from asymptomatic to severe lung disease.^{12–14} Then, it is reasonable to hypothesize that additional genetic factors that influence gene expression may also be involved in disease presentation.¹⁵

In recent years, the role of different molecules participating in DNA transcription and RNA translation into proteins has become of interest to explain clinical variability in genetic conditions and

also for their potential use as biomarkers.^{16,17} MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that play a crucial role in post transcriptional regulation. Through the binding to the 3' untranslated region (UTR), miRNAs inhibit translation of target messenger RNAs (mRNAs).¹⁸ miRNAs are involved in many biological processes and abnormal miRNA expression has been associated with various lung diseases such as COPD, asthma and lung cancer.^{19,17} Because miRNAs are potent disease modifiers,²⁰ miRNA deregulation could play an important role in the phenotypic heterogeneity of AATD. In this context, specific miRNAs could serve as biomarkers in the diagnosis, prognosis and treatment of AATD. Nevertheless, the regulation of *SERPINA1* expression by miRNAs has been poorly investigated. According to databases, hundreds of miRNAs are predicted to target *SERPINA1* 3'UTR, but only one, miR-940, has been experimentally validated so far.²¹ In addition, few studies have explored the role of miRNAs in the pathogenesis of AATD.^{19,17,22,23}

The miR-320 family of miRNA has been associated with lung disease.^{24–28} It comprises a group of 6 mature miRNAs encoded by sequences on chromosomes 8 (miR-320a-5p and -3p), 1 (miR-320b), 18 (miR-320c), 13 (miR-320d), X (miR-320e) and 19 (miR-320e) (<http://www.mirbase.org/>). All of them, except miR-320a-5p, share the seed sequence and are predicted to target *SERPINA1* 3'UTR (according to TargetScan database).

In the present study we aim to explore whether miR-320c, as a representative member of miR-320 family, could be implicated in AAT regulation and AATD pathogenesis, contributing to explain clinical heterogeneity in the patients.

Materials and methods

Growth and maintenance of cell lines

Human promyelocytic leukemia cells (HL60), human hepatoma cells (HepG2) and human embryonic kidney cells (HEK293T) were grown in RPMI-1640 (HL60) or DMEM (HepG2 and HEK293T) (Sigma-Aldrich), both supplemented with 10% FBS (Hyclone), 1% penicillin/streptomycin (Lonza) and 0.5% fungizone



Tesis doctoral
Gema Gómez Mariano

DEFICIT DE ALFA 1 ANTITRIPSINA
IMPLICACIONES DE NUEVAS VARIANTES GENÉTICAS
Y DESARROLLO DE ORGANOIDES DE HÍGADO COMO MODELO DE
ENFERMEDAD

