

XXXII. OTDK Biológia Szekció

A H-faktorra rokon humán CFHR5 fehérje szerepe: komplementgátlás helyett komplementaktiválás

készítette:

Zöldi Miklós

Biológus

MSc I. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem

témavezető:

Dr. Józsi Mihály Krisztián

tudományos főmunkatárs

MTA-ELTE „Lendület” Komplement Kutatócsoport

ELTE Immunológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIAI INTÉZET



Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	3
A komplementrendszer és alternatív útvonala	3
Az emberi H-faktor molekulacsalád	5
A CFHR5 fehérje és kapcsolata betegségekkel.....	8
Pentraxinok	9
Célkitűzések.....	9
Felhasznált anyagok és módszerek	10
Eredmények.....	12
Diskusszió.....	18
Összefoglaló.....	22
Summary	23

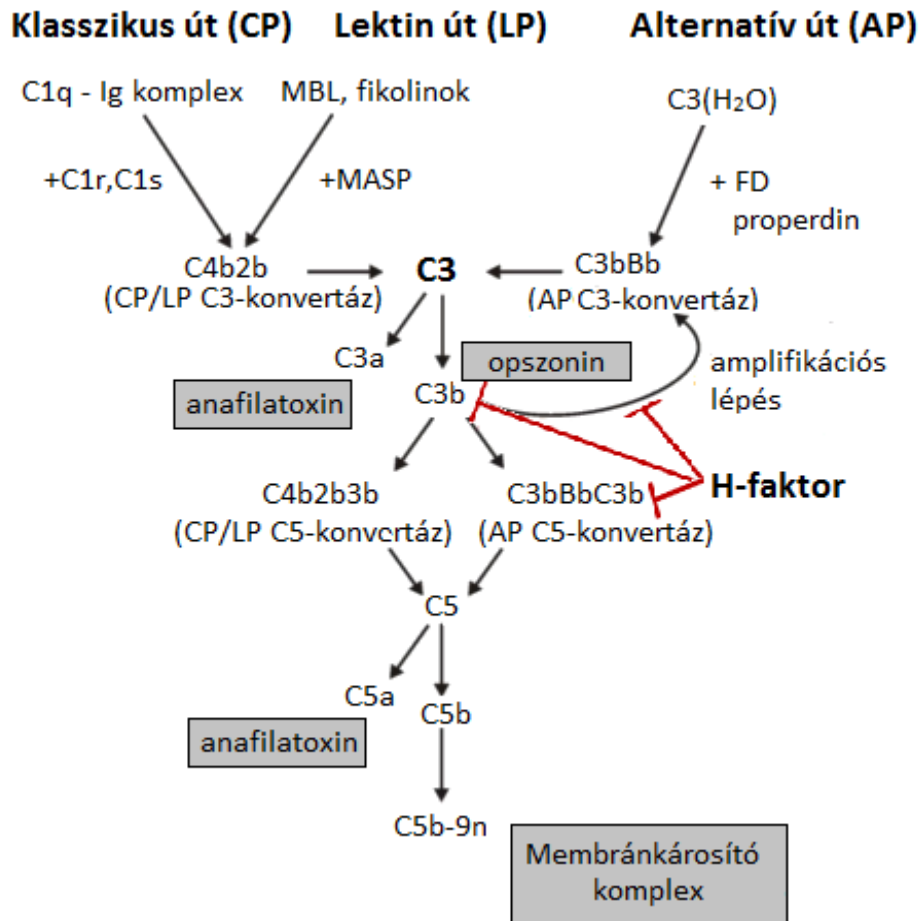
Bevezetés

A komplementrendszer és alternatív útvonala

A több mint 30 komponensből álló komplementrendszer szervezetünk egyik legősibb humorális eleme (1. ábra). Aktivációját követően különböző enzimek kaszkádszerűen hasítják és aktív formává alakítják egymást, illetve egyes komponenseket. A folyamat során fagocitózist elősegítő opszoninok (C3b, C4b), valamint gyulladást serkentő, az erek permeabilitását növelő, neutrofilekre kemoattraktáns anafilatoxinok (C5a, C3a) szabadulnak fel, a kaszkád végén pedig kialakulhat a célsejt membránjába fúródó, annak lízisét okozó membránkárosító komplex. A komplementrendszer így a kórokozók elleni védekezésünk egyik leghatékonyabb eleme: a kórokozóval találkozva azonnal aktiválódik, az aktiváció helyszínére vonzza a fagocitákat, melyeknek fagocitikus hatékonyságát sokszorosára növeli, de akár egymaga is képes bizonyos patogének (például Gram-negatív baktériumok) elpusztítására. Hidat képez a veleszületett és az adaptív immunitás között, és a patogének, apoptotikus sejtek és immunkomplexek eltávolításán túl számos nem immunológiai (angiogenezis, szinapszisok érése, lipid metabolizmus) szerepe is van (Ricklin és mtsai., 2010).

Három különböző útvonalon aktiválódhat, mely útvonalak későbbi szinteken, a C5b felszabadulásától (illetve a lektin és klasszikus útvonal esetében már a C3-konvertáz kialakulásától) kezdve azonos lefutásúakká válnak. A lektin útvonal felismerő molekulái (pattern recognition molecules - PRMs), a mannóz-kötő lektin (MBL) és fikolinok patogénekre jellemző bizonyos szénhidrát egységeket ismernek fel. A klasszikus útvonal a lektinnekkel strukturálisan homológ PRM, a C1q ellenanyagokhoz való kötődésével aktiválódik, bár a C1q önmaga is képes bizonyos mintázatokat felismerni, illetve aktiválódhat endogén PRM-ek, mint a C-reactive protein (CRP) vagy a pentraxin 3 (PTX3) molekulákhoz való kötődése által. A lektin és klasszikus útvonalak által felismerhető mintázatok számát tehát a mintázatfelismerő molekulák specificitása korlátozza. Ezzel szemben a komplementaktiváció zöméért felelős alternatív útvonal által felismerhető mintázatok száma szinte végtelen, hisz az útvonal központi tagja, a C3b nem szelektív módon bármilyen targetfelszínhez, idegen és saját sejtekhez egyaránt kötődik. Az alternatív útvonal aktivációját saját sejteken azonban megakadályozzák a szervezet komplementregulátor molekulái, mely

regulátorok a kórokozókról viszont hiányoznak, illetve apoptotizáló sejtjeinken kevésbé expresszálódnak, szabad utat engedve a komplementaktivációnak. Az alternatív útvonal aktivációja így nem csak bizonyos molekularészletekre korlátozódik, a felismerhető spektrum sokkal szélesebb, gyakorlatilag "minden, ami nem (egészséges) saját" (Ricklin és mtsai., 2010).



1. ábra: A komplementrendszer aktiválódásának útvonalai és a H-faktor szerepe. A rendszer központi molekulája a C3, melynek a C3-konvertázok általi hasításával C3a anafilatoxin és C3b keletkezik. A C3b a targetfelszínhez kötődve az alternatív útvonal további C3-konvertáz enzimeit hozza létre, a C3-konvertázokhoz kötődve pedig az enzim szubsztrátspecifitását a C5 felé tolja el. Opszonikus tulajdonságú, a célsejtet beborítva annak fagocitózist segíti elő. A H-faktor kofaktorként a C3b I-faktor általi proteolízist segíti, az alternatív út C3- és C5-konvertázának létrejöttét gátolja és gyorsítja a már létrejött enzimek szétesését. A properdin az alternatív út C3-konvertázának stabilizálásához szükséges. Ig - immunglobulin, MBL - mannóz-kötő lektin, MASP - MBL-asszociált szerin proteáz, FD - D-faktor (Kopp és mtsai., 2012, nyomán).

A kaszkád központi molekulájának, az inert C3-nak egy kis része folyamatosan aktiválódik a tioészter kötésének hidrolízise révén, a keletkező C3(H₂O) - mely a C3b szerkezeti homológja - a kötődött, majd a D-faktor által hasított B-faktorról (Bb) egy átmeneti

C3-konvertáz enzimet alakít ki, mely a C3 molekulát a kisebb C3a és nagyobb C3b fragmentumra hasítja. A C3b az úgynevezett tick-over mechanizmussal folyamatosan próbára teszi a sejteket, és ha megfelelő felszínen amin- vagy szénhidráts csoportokhoz kötődik, aktiválja az alternatív útvonalat. Az alternatív út C3-konvertáz enzimének (C3bBb) viszont részét képezi maga a produktum, a C3b is. A keletkező C3b így újabb és újabb C3-konvertázokat alakíthat ki, a rendszer rövid időn belül felerősödik. E pozitív visszacsatoló mechanizmus miatt az alternatív út a komplementaktiváció 80-90 százalékáért felelős, még akkor is, ha eredetileg a klasszikus vagy lektin útvonal aktiválódott. Ha pedig a targetfelszínen a C3-konvertázok denzitása megfelelően magas szintet ért el, az újonnan keletkező C3b már az alternatív út (és ha aktiválódott, a klasszikus és lektin út) C3-konvertázához fog kötődni, az enzim szubsztrátspecifitását így a C3 molekuláról a C5 felé tolja el. A C5 hasításával szabadul fel a fő anafilatoxin, a C5a és a membránkárosító komplex inicializálásához szükséges C5b (Ricklin és mtsai., 2010).

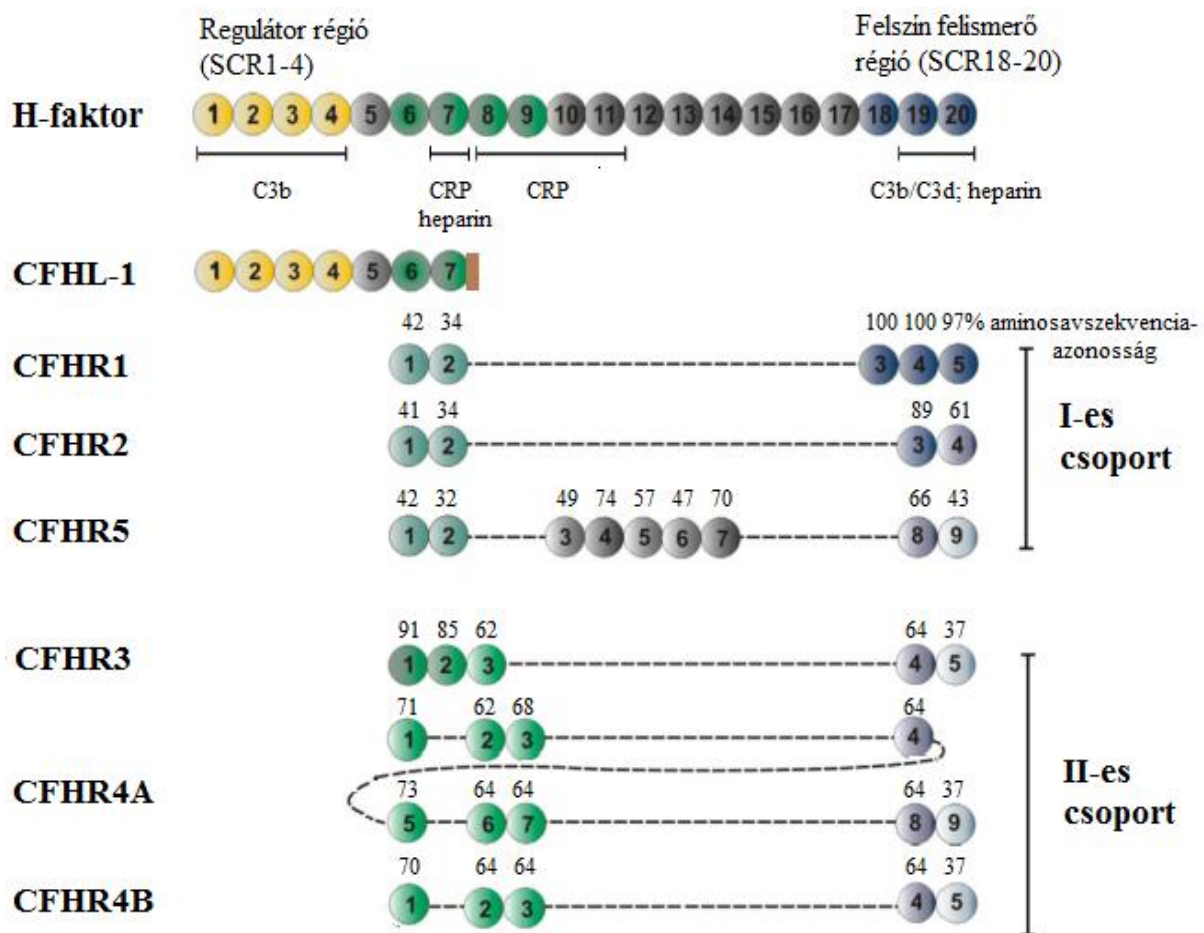
Az emberi H-faktor molekulacsalád

Egy kontrollálatlan amplifikációs lépés során olyan mennyiségű C3b keletkezne, mely már a környező saját, egészséges sejteket is károsíthatná - ezt akadályozzák meg a szervezet komplementszabályozó fehérjéi. Az alternatív út legfőbb szolubilis regulátora, a H-faktor (FH) körülbelül 250 µg/ml-es koncentrációban van jelen a plazmában. A B-faktossal kompetálva az alternatív út C3-konvertázának (C3Bb) kialakulását gátolja, illetve a már létrejött C3/C5 konvertázok szétesését gyorsítja. Az I-faktor kofaktoraként pedig a keletkező C3b hasítását és így annak a konvertázenzim létrehozására már képtelen inaktív (iC3b) formává alakítását segíti elő (1. ábra). Kofaktoraktivitása elengedhetetlen az amplifikációs lépés megfelelő szabályozásában - a H-faktorban bekövetkező mutációk vagy a molekula ellen termelődő autoantitestek különböző vese- és szembetegségeket (mint például az időskori makuladegeneráció) okoznak (Kopp és mtsai., 2012).

A H-faktor hús, egyenként kb. 60 aminosavból álló globuláris ún. short consensus repeat (SCR) doménből épül fel. A regulátor funkcióit az N-terminális SCR1-4 domének biztosítják. A C-terminális SCR19-20 doménjeivel képes a C3b közelében lévő felszíni polianionokhoz, glükózaminoglikánokhoz (heparin) és szíalsavhoz kötődni, aminek következtében a saját sejtek felszínén gátolja a komplementrendszer aktiválódását. A H-faktor ligandumai kórokozók sejtjein nincsenek jelen, ám több kórokozó expresszál H-faktort

megkötő fehérjét, így ezek a kórokozók a gazdaszervezet saját arzenálját felhasználva csendesítik le felszínükön a komplementrendszer aktivációját (Kopp és mtsai., 2012).

Az emberi H-faktor molekulacsaládba tartozik még a H-faktor egy alternatív splicing révén képződő variánsa, a 7 N-terminális SCR doménnel rendelkező CFHL-1 is, mely a H-faktorhoz hasonló regulátorszereppel bír. Ezzel szemben a H-faktorról rokon ún. Complement Factor H-related, azaz CFHR fehérjék szerepe jórészt még tisztázatlan. A CFHR fehérjék 4-9 SCR doménből épülnek fel, és a H-faktor bizonyos SCR doménjeivel különböző mértékben (~32-100%) mutatnak aminosavszekvencia-azonosságot (2. ábra). N-terminálisuk a H-faktor SCR 6-10 doménjeivel, C-terminálisuk pedig az SCR 18-20 doménekkel homológ. Plazmabeli koncentrációjukról kevés az adat, 5 µg/ml a CFHR5 50-100 µg/ml a CFHR1 koncentrációja (Józsi és Zipfel, 2008; Skerka és mtsai., 2013).



2. ábra: A H-faktor molekulacsalád. A H-faktor alternatív splicing variánsa, a CFHL-1 7 SCR doménje a H-faktoréval azonos, C-terminálisán 4 egyedi aminosavat hordoz. A CFHR fehérjék SCR doménjei a H-faktor egyes SCR doménjeivel különböző mértékben homológok, a domének felett feltüntetett számok az aminosavszekvencia-azonosságot jelzik százalékosan. A H-faktor ligandumainak főbb kötőhelyei a domének alatt vannak feltüntetve. CFHR - Complement Factor H-related, CRP - C-reactive protein (Józsi és Zipfel, 2008; Skerka és mtsai., 2013, nyomán).

A CFHR1, CFHR2 és CFHR5 fehérjék N-terminális doménjei (SCR1-2) erősen konzerváltak, és dimerizálódásra képesek, így a fehérjék homo- és heterodimerként vannak jelen a plazmában. A CFHR3 és CFHR4 fehérjék - a H-faktorhoz hasonlóan - dimerizációra nem képesek (Goicoechea de Jorge és mtsai., 2013).

A CFHR fehérjéknek eltérő szerepeket tulajdonítottak, az irodalmukban több ellentmondás is található. Mindegyikük képes a C3b/C3d kötésére, némelyeknek egyéb ligandumuk (heparin, C-reactive protein, mikrobiális proteinek) is ismert. Ugyan nem rendelkeznek a H-faktor regulátorfunkciót biztosító SCR1-4 doménjeivel, a C3b-kötés képessége hatással lehet a H-faktor kofaktorhatásának befolyásolására: szinergistán hatva a H-faktor kofaktoraktivitását növelhetik, ahogy azt a CFHR3 és CFHR4 fehérjéknél leírták (Hellwage és mtsai., 1999), vagy antagonistaként a H-faktoral homológ C-terminális doménjeik következtében kompetálhatnak a H-faktoral ligandumuk kötéséért, így a H-faktor általi komplementgátlás mértékét csökkenthetik, ezáltal az aktivációt fokozzák (Goicoechea de Jorge és mtsai., 2013). Ez utóbbi feltételezések szerint különösen előnyös lehet a gazdaszervezet számára olyan patogéneknél, melyek komplementrendszer előli menekülési stratégiájuk részeként megkötik a H-faktort. A CFHR fehérjék így önmagukat "feláldozván" a H-faktor helyett kötődhetnek a patogénhez, melynek ebből nem származna előnye, hisz a CFHR fehérjéknek fiziológiás koncentrációban önmagukban nincsen komplementreguláló hatásuk (Józsi és Zipfel, 2008).

A CFHR fehérjéknek a H-faktortól független szerepük is lehet. A CFHR4 fehérjén felépülhet az alternatív út C3-konvertáz enzime, és az alternatív útvonalat aktiválhatja (Hebecker és Józsi, 2012). A CFHR1 a C5 (és C3b) kötésével a membránkárosító komplex felépülését a vitronectinhez hasonló hatékonysággal gátolja. E tulajdonságának következtében a patogéneknek akár előnyös is lehet a CFHR1 megkötése (Heinen és mtsai., 2009).

Bizonyos felszínek - így a vese glomeruláris alapmembránja, illetve a szem Bruch-membránja - a szervezet szolubilis regulátoraiban bekövetkező mutációkra érzékenyek, mivel integráns komplementgátló fehérjékkel - a sejtekkel ellentétben - nem rendelkeznek. A H-faktorban és CFHR fehérjékben bekövetkező mutációk is különböző szem- és vesebetegségekkel asszociáltak. A CFHR fehérjék szerepe összetett, hisz például ugyanaz a mutáció, a CFHR3 és CFHR1 deléciója H-faktor autoantitestek képződését és az atípusos hemolitikus urémiás szindróma (aHUS) kialakulását elősegíti, míg az időskori makuladegeneráció (AMD) kialakulásának valószínűségét csökkenti (Józsi és Zipfel, 2008).

A CFHR5 fehérje és kapcsolata betegségekkel

A 62 kDa-os CFHR5 fehérje 9 SCR doménből áll, melyek a H-faktor SCR 6-7, 10-14 és 19-20 doménjeivel homológok (2. ábra) (McRae és mtsai., 2001). A CFHR5-nek gyenge kofaktoraktivitását írták le, azonban az aktivitás mértéke és a fehérje plazmabeli koncentrációja (5 µg/ml) is töredéke a H-faktorénak (McRae és mtsai., 2005). Glomeruláris szklerózissal jellemezhető vesebetegségekben, mint a fokális glomeruláris szklerózis, IgA nefropátia vagy lupus nephritis esetében a glomerulusokban kimutatott felhalmozódása viszont helyi komplementreguláló szerepére enged következtetni - lokálisan koncentrációja pedig jóval meghaladhatja a plazmaszintbeli értékét. A másik négy CFHR fehérje nem alkot immundepozitokat (Murphy és mtsai., 2002).

Azon ritka glomerulonephritiseket, melyekben a komplementaktiválódás komponensei ellenanyagok nélkül vannak jelen a glomerulusokban, összefoglaló nevükön C3 glomerulonefropátiáknak hívjuk, melyek közé a Dense Deposit Disease (DDD/MPGN II), C3 glomerulonephritis és a CFHR5 nefropátia tartozik.

A DDD nevét a glomeruláris alaphártya elektronendzzé válásáról kapta. Hasonló háttérrel, ám az alaphártya elektronendzzé válása nélkül jellemezhető a C3 glomerulonephritis (Gale és Pickering, 2011). A CFHR5-nek három allélikus variánsát is leírták, melyek gyakoribbak a DDD-ben szenvedő betegeknél (Abrera-Abeleda és mtsai., 2006). A csupán 2010-ben leírt CFHR5 nefropátiában - az említett két másik vesebetegséggel szemben - a plazma C3 szintje normális, a komplementszabályozás tehát csak a glomeruláris felszínen szenved zavart. A CFHR5 génben a 2. és 3. exon (SCR 1-2 kódolásáért felelős) duplikálódik, így egy mutáns, 11 SCR doménből álló CFHR5 (CFHR5₁₂₁₂₋₉) fehérje jön létre (Gale és mtsai., 2010). A mutáns fehérje trimereket vagy akár oligomereket is képezhet, a betegek szérumának komplementgátlást csökkentő ("dereguláló") hatása jelentősebb (Goicoechea de Jorge és mtsai., 2013). Bizonyos CFHR5 mutációk az intravasculáris hemolízissel, trombocitopéniával és veseelégtelenséggel jellemezhető atípusos hemolitikus urémiás szindrómával (aHUS) asszociáltak (Monteferrante és mtsai., 2007). Az eddigiekkel ellentétben az időskori makuladegeneráció (AMD) kialakulásában viszont valószínűleg nem játszanak szerepet a CFHR5 fehérje mutációi (Narendra és mtsai., 2009).

A CFHR5-nek (és CFHR2-nek) a *Borrelia* CRASP fehérjéihez való kötődését is leírták, ám a CFHR fehérjék megkötése nem nyújt hatékony védelmet a patogénnek a komplementaktiváció ellen (Siegel és mtsai., 2010).

Pentraxinok

A pentraxinok szolubilis ligandumfelismerő molekulák, melyek közé a C-reactive protein (CRP), Serum amiloid-P (SAP) és Pentraxin 3 (PTX3) tartozik. C-terminálisukon egy 200 aminosavas pentraxin domént hordoznak. A hosszú pentraxinok - így a PTX3 is - a rövid pentraxinokban nem megtalálható N-terminális domént is tartalmaznak.

A PTX3-at - a legtöbb komplementkomponenssel ellentétben - nem a máj, hanem lokálisan fibroblasztok, endotél sejtek, periferiális leukociták és egyéb sejtípusok (adipocita, kondrocita, mesangiális sejtek) termelik citokinek (IL-1, TNF- α), TLR-agonisták vagy mikrobiális komponensek hatására. Ekkor plazmaszintje 2 ng/ml-ről 200-800 ng/ml-re is emelkedhet. Polimorfonukleáris sejtek PTX3-at is raktároznak granulumaikban. A krónikus vesebetegségeken kívül emelkedett PTX3 szint figyelhető meg cardiovasculáris betegségek és rheumatoid arthritis esetén is (Bottazzi és mtsai., 2010).

Az oktamer szerkezetű PTX3 apoptotikus sejtekhez és egyes patogénekhez is kötődik, C1q, mannóz-kötő lektin és fikolin-2 megkötésével a komplementrendszer klasszikus és lektin útvonalának aktiválására képes (Deban és mtsai., 2011). Komplementregulátorok (H-faktor, C4BP) megkötésével az apoptotikus sejtek csendes (C5a anafilatoxin és terminális komplex kialakulása nélküli) eltávolítását teszi lehetővé gyulladások, szöveti sérülések során (Braunschweig és Józsi, 2011; Deban és mtsai., 2008). A PTX3 tehát a lokális gyulladásos folyamatok egy endogén modulátora. Bizonyos gyulladásos betegségek markere is lehet, és CRP-vel szembeni előnye, hogy a komplementaktiváció és gyulladás elsődleges helyéről is információt nyújt (Deban és mtsai., 2011). aHUS-os betegeknél a H-faktor SCR20 doménjében bekövetkező mutációk, illetve az e domén ellen termelődő autoantitestek a H-faktor-PTX3 interakciót gátolhatják (Kopp és mtsai., 2012).

Célkitűzések

Munkacsoportunk elsőként mutatta ki a PTX3-at a CFHR5 egy új ligandumaként. Terveink között szerepelt ezen kölcsönhatás jellemzése, illetve az alábbi kérdésekre szerettünk volna választ kapni:

- a) a CFHR5 a PTX3 mely doménjéhez kötődik?
- b) a CFHR5 kompetál-e a H-faktorról a PTX3 kötéseért és befolyásolja-e a H-faktor komplementgátló funkcióját?

- c) a CFHR5 befolyásolja-e a PTX3, illetve H-faktor extracelluláris mátrixhoz (ECM) való kötődését?
- d) a CFHR5-kötött PTX3 képes-e még egyik fő ligandumának, a C1q-nak a megkötésére, illetve szerepet játszik-e a PTX3 a C1q CFHR5-höz való kötődésében?
- e) eltér-e a vad típusúhoz képest a CFHR5 nefropátiában jelen levő mutáns CFHR5 PTX3-hoz való kötődése ?
- f) a CFHR5 fehérjén képes-e felépülni a C3-konvertáz enzim?
- g) bakteriális komplement inhibitorok gátolják-e a CFHR5-kötött konvertáz enzim kialakulását?

Ezen kérdések megválaszolásával azt reméltük, hogy a CFHR5-nek a komplementrendszer szabályozásában betöltött szerepéről pontosabb képet alkothatunk, valamint a CFHR5-tel asszociált betegségek háttérmechanizmusaira egy lehetséges választ adhatunk.

Felhasznált anyagok és módszerek

Rekombináns fehérjék előállítása

A rekombináns humán CFHR-1, H-faktor SCR8-14, CFHR4B fehérjét a pBSV-8His Baculovirus expressziós vektort használva *Spodoptera frugiperda* (Sf9) sejtekben expresszáltuk, majd nikkel-affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A rekombináns CFHR5 és PTX3 fehérjét az R&D Systems-től vásároltuk, a PTX3 fragmentumokat Kenji Daigo-tól (Tokiói Egyetem), a CFHR fragmentumokat Susan M. Lea-tól (Oxfordi Egyetem), a mutáns CFHR5-öt Matthew C. Pickeringtől (Imperial College, London) kaptuk.

ELISA esszék

A humán plazmából származó CFHR5 PTX3-hoz való kötődéséhez TBS-ben (10 mM Tris, 140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4) hígított 25%-os normál humán szérumot (Sigma-Aldrich) adtunk 5 µg/ml immobilizált PTX3-hoz, illetve zselatinhoz 1 órán át 37 °C-on. A kötött fehérjét SDS-mintapufferrel (60 mM, 1% SDS, 10% glicerin, brómfenolkék) eluáltuk, majd 10%-os SDS-PAGE gélen szeparáltuk. A CFHR5 fehérjét Western blot analízissel, anti-CFHR5 (R&D Systems) ellenanyaggal tettük láthatóvá. A CFHR5 és tisztított H-faktor (Merck) immobilizált PTX3-hoz, illetve zselatinhoz való kötődését ELISA

(Enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel mértük. A detektáláshoz és vizualizáláshoz kecske anti-FH (Merck) - ami a H-faktort és a CFHR5-öt egyaránt felismeri - és tormaperoxidázzal (HRPO) konjugált anti-kecske ellenanyagot (Dako), majd szubsztátként 3,3',5,5'-tetrametilbenzidint (Sigma-Aldrich) használtunk. A reakciót 2N H₂SO₄ oldattal állítottuk le, a kötődés erősségét ELISA-leolvasóval mértük a 450 nm-en mutatott abszorbancia alapján.

A PTX3 CFHR-fragmentumokhoz való kötődésének mérésére 5 µg/ml CFHR-fragmentumot immobilizáltunk, 3% BSA-val blokkoltuk, majd 10 µg/ml PTX3-mal inkubáltuk. A kötődött PTX3-at biotinilált anti-PTX3, majd HRP-konjugált streptavidinnel (R&D Systems) detektáltuk.

A PTX3 és C3b mutáns és vad típusú CFHR5-höz való kötődésének összehasonlítására 10 µg/ml rekombináns CFHR5 fehérjét immobilizáltunk, BSA-val való blokkolás után 10 µg/ml PTX3-at, illetve C3b-t pipettáztunk az egyes lyukakba. A kötődést az előbb leírtak szerint anti-PTX3 és HRPO-konjugált kecske anti-C3-mal (Cappel) mértük.

A C1q (10 µg/ml) kötődését 5 µg/ml immobilizált PTX3-hoz emelkedő CFHR5 és H-faktor koncentráció mellett mértük. A detektáláshoz anti-C1q (Merck) ellenanyagot használtunk. A C1q CFHR5-kötött PTX3-hoz való kötődésének mérésére 5 µg/ml CFHR5-öt és kontrollként zselatint immobilizáltunk, majd 5 µg/ml PTX3-mal inkubáltuk és 25, illetve 50 µg/ml C1q-t adtunk hozzá. A kötődött C1q-t anti-C1q-val detektáltuk.

A kompetíciós esszékhöz MaxGelt (1:30; Sigma-Aldrich) és PTX3-at (30 nM) immobilizáltunk, blokkolás után 50 µg/ml H-faktorról inkubáltuk a CFHR5 emelkedő koncentrációi mellett vagy CFHR5 nélkül. A kötődött H-faktort monoklonális ellenanyaggal (A254, Quidel) detektáltuk, mely a CFHR5 fehérjét nem ismeri fel.

C3b inaktivációs esszé

A H-faktor kofaktoraktivitásának vizsgálatára MaxGelt (1:30), zselatint (10 µg/ml) és PTX3-at (30 nM) immobilizáltunk, majd 20 µg/ml CFHR5-tel preinkubáltuk 1 órán át szobahőn. Mosás után adtunk hozzá 50 µg/ml koncentrációban H-faktort 1 órára, majd újabb mosás után 50 µl-ben 140 nM C3b-t és 220 nM I-faktort pipettáztunk az egyes lyukakba, és 37 °C-on inkubáltuk 1 órán át. A reakciót redukáló SDS-mintapufferrel állítottuk le. A mintákat 10%-os géltre vittük fel, elektroforézissel szeparáltuk, majd nitrocellulóz membránra vittük át. A C3 fragmentumait HRPO-konjugált kecske anti-C3-mal detektáltuk.

C3-konvertáz esszé

A CFHR5-kötött alternatív út C3-konvertáz kialakulását és detektálását a már leírtak szerint (Hebecker és Józsi, 2012) végeztük: az immobilizált CFHR5 fehérjét 30 percen át 37 °C-on 5 µg/ml C3b-vel, majd szintén 30 percen át 37 °C-on B-faktorról (2 µg/ml), D-faktorról (0,1 µg/ml) és properdinnel (4 µg/ml) inkubáltuk. A konvertáz felépülését anti-B-faktor ellenanyaggal mértük, aktivitásának méréséhez pedig 10 µg/ml C3-at adtunk, és 1 órát 37 °C-on inkubáltuk. A keletkező C3a mennyiségét C3a ELISA kittel (Quidel) kvantifikáltuk.

Komplementaktivációs esszé és a bakteriális eredetű komplement inhibitorok hatása

Nunc microtiter lemezen immobilizáltunk 5 µg/ml CFHR5, CFHR4A és HSA fehérjéket, 3% BSA-val való blokkolás után 5 mM Mg²⁺-EGTA (csak alternatív út aktiválódik) vagy 5 mM EDTA oldatban hígított 10%-os normál humán szérummal inkubáltuk 30 percig 37 °C-on. A C3b, B-faktor és P-faktor (properdin) kötődését a megfelelő ellenanyagokkal mértük.

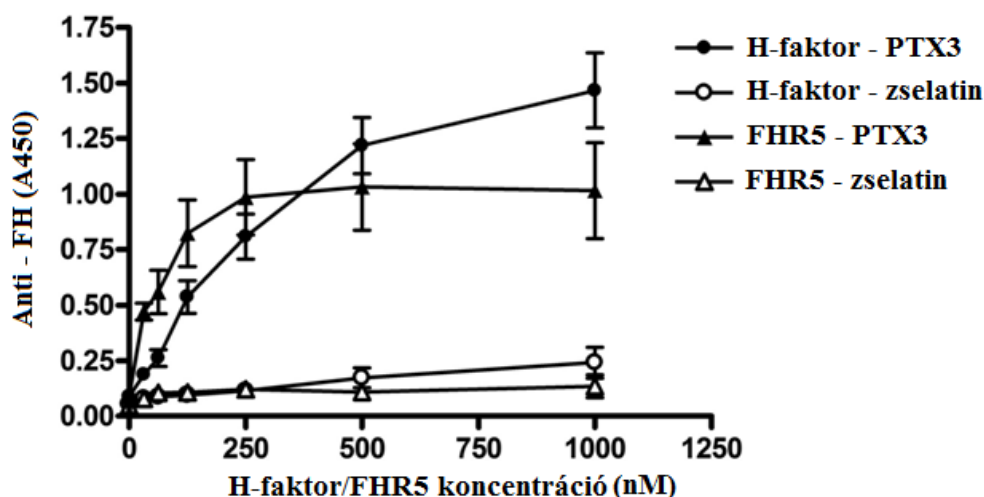
A bakteriális eredetű komplement inhibitorok hatásának tanulmányozására 5 µg/ml CFHR5-öt és HSA-t immobilizáltunk, BSA-val blokkoltuk, majd az 5 mM Mg-EGTA-t tartalmazó pufferben hígított 5% normál humán szérumhoz 20 µg/ml koncentrációban inhibitorokat (Efb-C, Efb-C-RENE, SCIN-A, Ehp; Brian V. Geisbrechtől, Kansas State University, Manhattan) adva 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. A C3b, B-faktor és P-faktor mennyiségét az előbbieket szerint mértük.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez a GraphPad Prism szoftver 4.00 verzióját használtuk. A $p < 0.05$ értéket vettük statisztikailag szignifikáns értéknek.

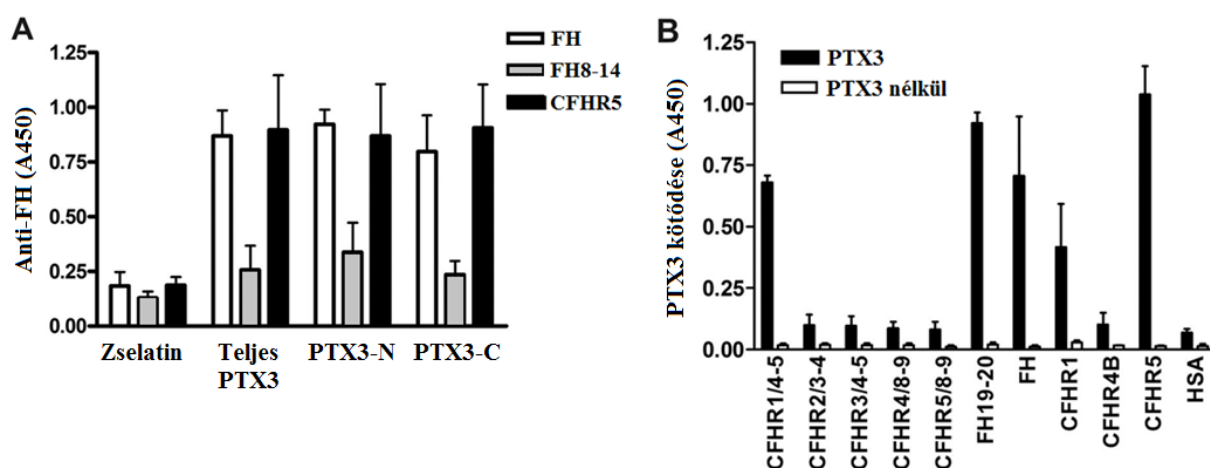
Eredmények

A H-faktor molekulacsaládból a H-faktor és a CFHR1 PTX3-hoz való kötődése már ismert volt (Deban és mtsai., 2008; Kopp és mtsai., 2012). Munkacsoportunk PTX3-at humán szérummal inkubálva, majd a kötött proteinek eluálva és azokat Western blot analízissel vizsgálva kimutatta a CFHR5 kötődését is. Rekombináns fehérjéket használva ELISA módszerrel kimutattuk, hogy a CFHR5 erősebben kötődik a PTX3-hoz, a H-faktorhoz képest hamarabb eléri a telítési koncentrációt (3. ábra). Mindkét kölcsönhatás Ca²⁺ ionokat igényel, ellentétben a PTX3 C1q-hoz és apoptotikus sejtekhez való kötődésével (ábra nem mutatja).



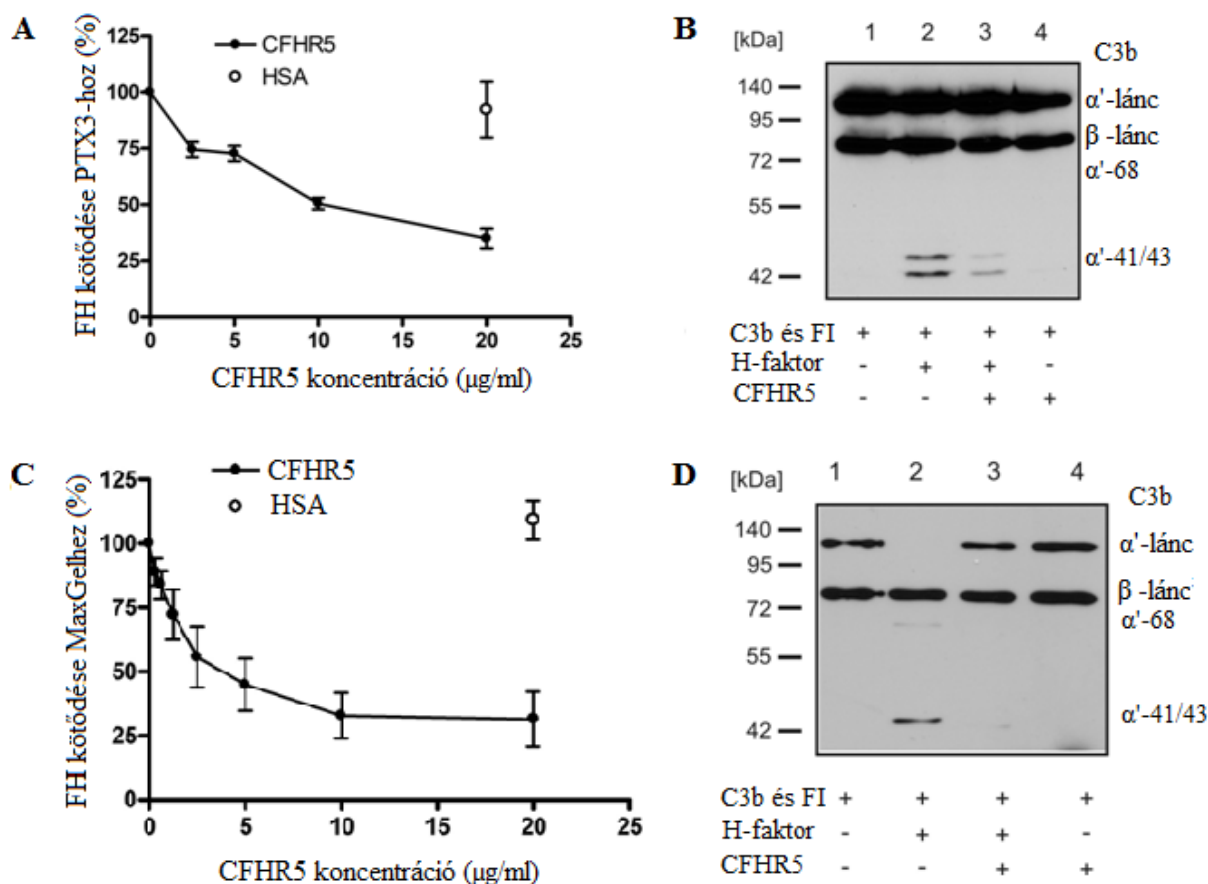
3. ábra: A H-faktor és CFHR5 kötődése immobilizált PTX3-hoz. Mindkét ligandumot anti-H-faktor ellenanyaggal detektáltuk. Negatív kontrollként zselatint immobilizáltunk. A CFHR5 hamarabb éri el telítési koncentrációját, mint a H-faktor. Az ábrán négy kísérlet átlagát és a középérték standard hibáját (SEM) tüntettük fel.

A H-faktor SCR19-20 doménjeivel a PTX3 N-terminálisához, SCR7 doménjén keresztül pedig a PTX3 C-terminálisához kötődik (Deban és mtsai., 2008). Ahogy a H-faktor, úgy a CFHR5 is mindkét rekombináns PTX3-fragmentumhoz, az N- és C-terminális doménhez egyaránt hasonló erősséggel kötődik (4.A ábra). Negatív kontrollként a H-faktor SCR8-14 doménjeit használtuk, mely az SCR7 és 19-20 domének hiánya miatt nem kötődött a PTX3-hoz. A CFHR5 C-terminális kötőhelye nem egyezik a H-faktoréval, ugyanis a H-faktor SCR19-20 doménjeivel homológ SCR8-9 domének nem kötődnek a PTX3-hoz (4.B ábra).



4. ábra: A) A CFHR5 és H-faktor kötődése a PTX3 egyes doménjeihez. A CFHR5 – hasonlóan a H-faktorhoz – a PTX3 N- és C-terminális fragmentumához is hasonló erősséggel kötődik. PTX3-N és PTX3-C - a PTX3 N-, illetve C-terminális fragmentuma, FH8-14 - a H-faktor SCR8-14 doménjei. **B) PTX3 kötődése az immobilizált CFHR fragmentumokhoz.**

A CFHR5, valamint a CFHR2, CFHR3 és CFHR4 C-terminális doménjei a H-faktor SCR 19-20 doménjeivel való homológiájuk ellenére nem kötődnek az immobilizált PTX3-hoz, a CFHR1 SCR4-5 doménjei viszont igen. A „/” jel mögötti számok a megfelelő SCR-eket mutatják. Az adatok négy (A), illetve három (B) kísérlet abszorbanciaátlagát és szórását (SD) mutatják.



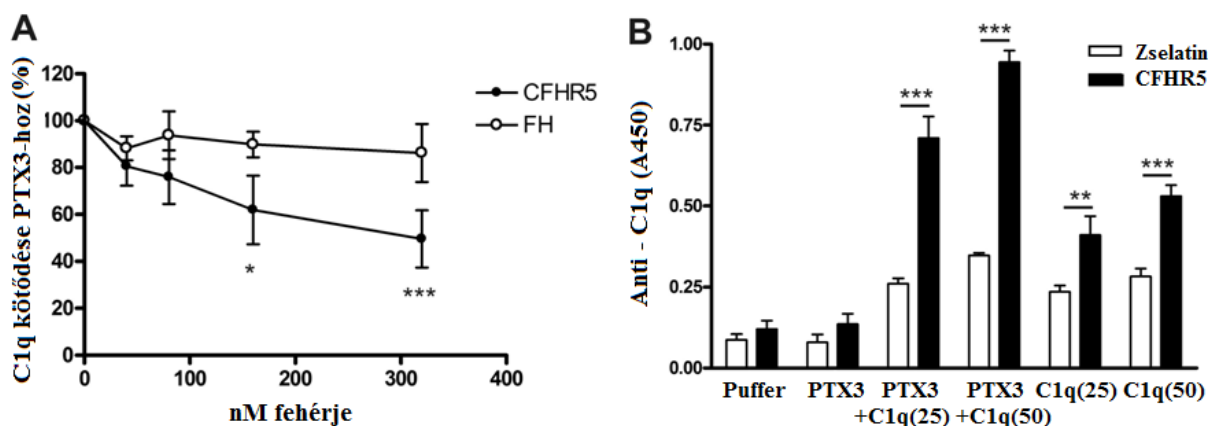
5. ábra: A CFHR5 és H-faktor kompetíciója PTX3-on (A és B ábra) és az ECM-et modellező MaxGel-en (C és D ábra). A CFHR5 kompetál a H-faktort a PTX3 és MaxGel kötéseért, így csökkenti a H-faktor kofaktoraktivitását mind PTX3-hoz, mind az ECM-hez kötődve. A CFHR5 önmagában nem rendelkezik kofaktoraktivitással. HSA - humán szérumban albumin, FI - I-faktor, α'-lánc és β-lánc - a C3b két lánc, α'-68, α'-41/43 - az α' lánc hasításakor keletkező fragmentumok. A) és C): a CFHR5 nélküli H-faktor kötődést vettük 100%-nak. Az adatok négy kísérlet átlagát és szórását (SD) mutatják. B) és D) A blot három kísérlet eredményét reprezentálja.

Felmerül a kérdés, hogy a H-faktor és a CFHR5 kompetál-e egymással a PTX3 kötéseért? Emelkedő CFHR5-koncentráció mellett adtunk H-faktort immobilizált PTX3-hoz. A CFHR5 már fiziológiás koncentrációban is dóziszfüggően gátolta a H-faktor kötődését (5.A ábra). A PTX3-kötött H-faktor kofaktoraktivitással bír az I-faktor általi C3b-hasításban. Az α'- és β-láncból álló C3b intakt α'-láncát az I-faktor hasítja és kisebb α'-fragmentumok keletkeznek. CFHR5 adásával a H-faktor kofaktoraktivitása lecsökken, a C3b proteolízisével keletkező fragmentumok szintje jelentősen kevesebb. A CFHR5 önmagában az általunk

vizsgált 20 µg/ml-es koncentrációban nem rendelkezett kofaktoraktivitással, így a két fehérje együttes adásakor tapasztalható kofaktoraktivitás-csökkenést az okozta, hogy a PTX3-ról leszorított H-faktor molekulák aktivitását a CFHR5 egyáltalán nem kompenzálta (5.B ábra).

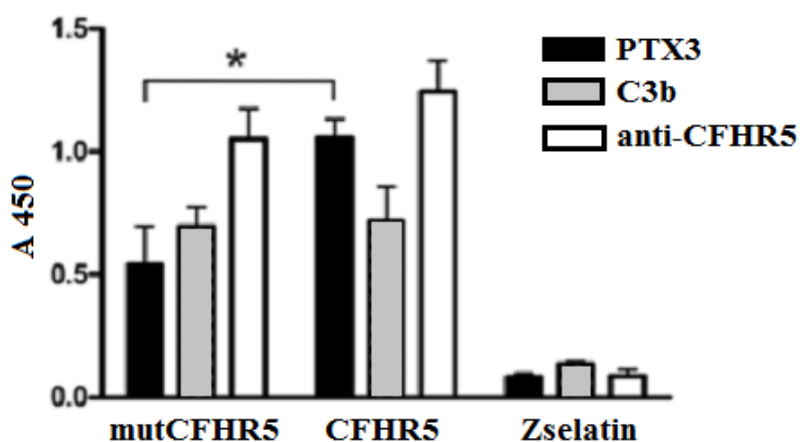
Némely szolubilis komplementregulátor (FH, CFHL-1, CFHR1) az extracelluláris mátrixhoz (ECM) is kötődik. Kimutattuk, hogy a CFHR5 is kötődik az ECM-et modellező MaxGelhez, ezáltal pedig – az előző kísérlettel hasonló módon – a H-faktor felszínhez való kötődését gátolja és annak kofaktoraktivitását csökkenti (5.C és D ábra). Emellett a CFHR5 - ellentétben a H-faktor, CFHL-1 és CFHR1 fehérjékkel – a PTX3 MaxGelhez való kötődését is elősegíti (ábra nem mutatja).

Megvizsgáltuk, hogy a CFHR5-PTX3 kölcsönhatás mennyiben befolyásolja ezen fehérjék fő ligandumaihoz (C3b, illetve C1q) való kötődését. CFHR5 fehérjét immobilizálva mértük a PTX3 kötődését emelkedő C3b-koncentráció mellett. A C3b dózisfüggően kötődött a CFHR5-höz, és (egészen 50 µg/ml-ig) nem befolyásolta a PTX3 kötődését (ábra nem mutatja). PTX3-at immobilizálva a C1q kötődését emelkedő CFHR5 és H-faktor koncentráció mellett mértük. Míg a H-faktor nem befolyásolta az interakciót, a CFHR5 részlegesen gátolta a C1q kötődését (6.A ábra). A kísérletet megfordítva, CFHR5-öt immobilizálva is vizsgáltuk a C1q kötődését PTX3 mellett. A C1q önmagában is kötődik a CFHR5-höz, a CFHR5-kötött PTX3-on át azonban még nagyobb mértékben, tehát a C1q CFHR5-höz való kötődését a PTX3 elősegíti (6.B ábra).



6. ábra: A CFHR5-PTX3 interakció hatása a klasszikus útvonalat aktiváló C1q kötésére. **A)** A CFHR5 a C1q immobilizált PTX3-hoz való kötődését részlegesen gátolja, míg a H-faktor nem befolyásolja. Az eredmények négy független kísérlet átlaga ± SD. * $p < 0.05$ és *** $p < 0.001$, kétszemponyos varianciaanalízis (two-way ANOVA). **B)** A C1q önmagában is kötődik az immobilizált CFHR5-höz, PTX3 jelenlétében viszont még erősebben. Negatív kontrollként zselatint immobilizáltunk. Zárójelben a koncentrációk szerepelnek µg/ml dimenzióban. Az eredmények négy független kísérlet átlaga + SD. ** $p < 0.01$ és *** $p < 0.001$, egyszemponyú varianciaanalízis (one-way ANOVA).

A CFHR5 nefropátiában előforduló mutáns CFHR5₁₂₁₂₋₉ fehérjét immobilizálva vizsgáltuk a PTX3 és C3b kötését a vad típusú CFHR5 fehérjéhez viszonyítva. A mutáns PTX3-kötő képessége jelentősen kisebb volt a vad típuséhoz képest, míg a C3b-t hasonló mértékben kötötte (7. ábra). A kísérletet fordítva, a PTX3-at immobilizálva is elvégeztük, és hasonló eredményre jutottunk (ábra nem mutatja). Annak elkerülése végett, hogy a mutáns CFHR5 fehérjét az ellenanyag kisebb affinitással ismerné fel, és a kisebb abszorbancia jelet tévesen a mutáns fehérje gyengébb PTX3 kötésének tulajdonítanánk, előzőleg megvizsgáltuk, hogy az anti-CFHR5 ellenanyag a mutáns és vad típusú fehérjét is hasonló affinitással köti (7.ábra).

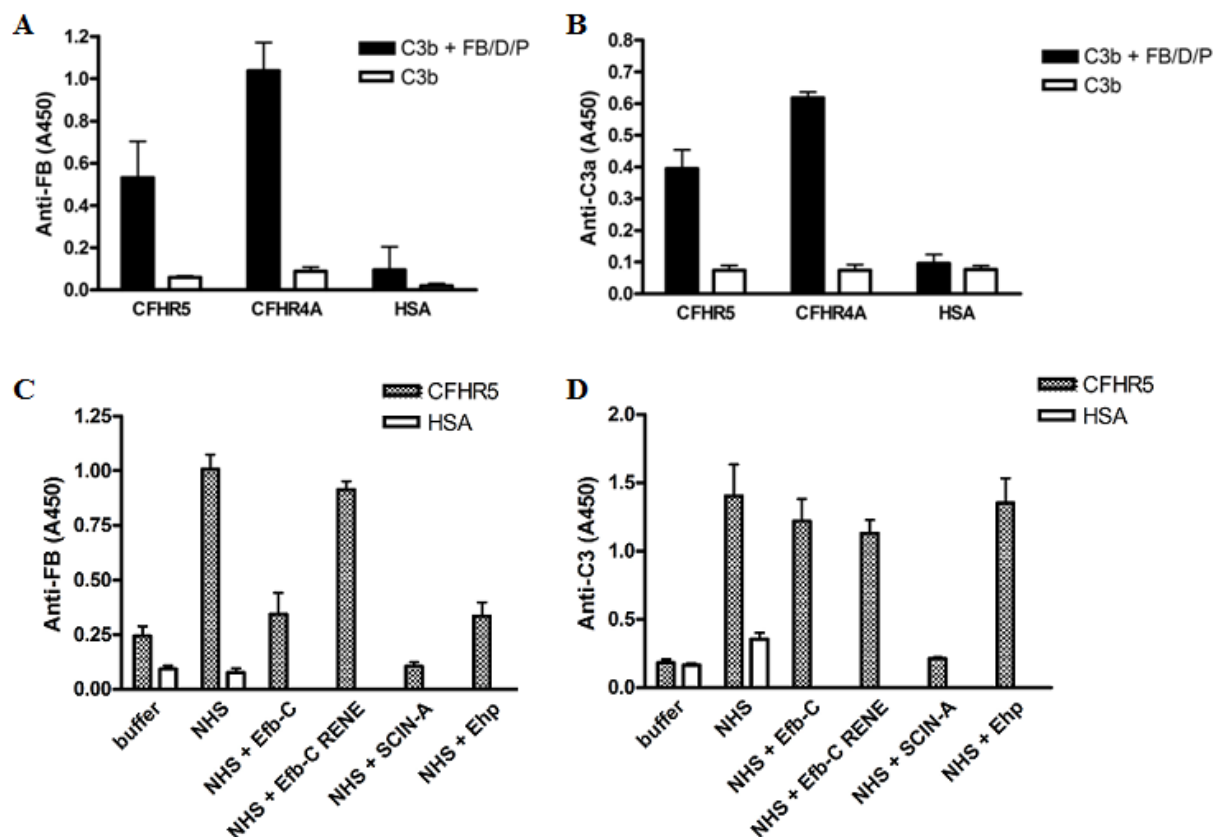


7. ábra: A mutáns CFHR5₁₂₁₂₋₉ C3b és PTX3 kötése. Az immobilizált mutáns CFHR5₁₂₁₂₋₉ (mutCFHR5) a C3b-t hasonló mértékben köti a vad típusú CFHR5-höz képest, PTX3-kötő képessége viszont jelentősen gyengébb. A detektáláshoz anti-PTX3-at és HRPO-val konjugált anti-C3 ellenanyagot használtunk. Az eredmények négy független kísérlet átlaga + SD. * $p < 0.05$, egyszempontú varianciaanalízis (one-way ANOVA).

Nemrég írták le, hogy a CFHR4A fehérjén képes összeállni az alternatív út C3-konvertáz enzime, a C3bBb. Megvizsgáltuk, hogy vajon a CFHR5 is képes-e megfelelő felszínt biztosítani a konvertáz kialakulásához. CFHR5 fehérjét immobilizálva C3b-vel, majd B-, D- és P-faktorral inkubálva anti-B-faktorral mértük a kialakult konvertáz mennyiségét. A kísérletet megismételtük úgy is, hogy a tisztított komplement fehérjék helyett humán szérumot használtunk, és hasonló eredményre jutottunk (ábra nem mutatja). Ugyan a CFHR4A-hoz viszonyítva kisebb mennyiségben, de a CFHR5 fehérjén is felépül a C3-konvertáz enzim (8.A ábra). A konvertáz aktivitását hozzáadott C3 hozzáadása után C3a ELISA kittel mértük (8.B ábra).

Különböző bakteriális eredetű inhibitorok, így a *Staphylococcus aureus* SCIN-A (staphylococcal complement inhibitor-A), Efb (extracellular fibrinogen-binding) és Ehp (Efb-

homologous protein) fehérjéi interferálnak a C3bBb létrejöttével vagy aktivitásával, így az alternatív út általi komplementaktivációt gátolják (Lambris és mtsai., 2008).



8. ábra: Az immobilizált CFHR5 megfelelő felszínt biztosít a C3-konvertáz kialakulásához, amit a *S. aureus* egyes szekretált molekulái gátolnak. A) Immobilizált CFHR5 és CFHR4 fehérjékhez a C3b-t és a konvertáz létrejöttéhez szükséges faktorokat (B-, D- és P-faktor) adtunk. Az eredmények öt független kísérlet abszorbanciaértékeinek átlagát és szórását (SD) mutatják. FB/D/P - B-faktor/D-faktor/P-faktor (properdin) B) A felépült konvertázt a C3 komponenssel inkubáltuk, majd a képződött C3a mennyiségét mértük. Az eredmények három független kísérlet átlagát + SD mutatják. A konvertáz felépülésének bakteriális komplement inhibitorokkal való gátlásához az immobilizált CFHR5 fehérjét humán szérummal és inhibitorokkal inkubáltuk, majd a konvertázt anti-FB (C) és anti-C3 (D) ellenanyagokkal detektáltuk. Az eredmények négy független kísérlet átlagát és a középértékek standard hibáját (SEM) mutatják. HSA - humán szérum albumin, NHS - normál humán szérum, Efb-C - Extracellular fibrinogen-binding protein C-terminálisa, Efb-C RENE - negatív kontroll, az Efb-C mutánsa, mely a C3b kötésére nem képes, SCIN-A - staphylococcal complement inhibitor-A, Ehp - Efb-homologous protein.

CFHR5 immobilizálásával, majd normál humán szérum hozzáadásával a bakteriális inhibitorok jelenlétében, illetve anélkül anti-FB (8.C ábra), anti-C3 (8.D ábra) és anti-FP (ábra nem mutatja) ellenanyagokkal mértük a konvertáz felépülését. Az általunk vizsgált bakteriális inhibitorok mind gátolták a CFHR5-kötött C3-konvertáz felépülését is. Az Efb-C és Ehp csak a B-faktor, míg a SCIN-A a B-faktor mellett a C3b és a properdin kötődését is megakadályozta. Az Efb-C egy kettős aminosavcserés (R131E, N138E) funkcióképtelen

mutánsa (Efb-C RENE), mely a C3b kötésére nem képes, a konvertáz felépülését sem befolyásolta (8.C ábra).

Diszkusszió

A komplementrendszer a veleszületett immunrendszer részeként hatékony védelmet nyújthat a kórokozók azonnali eliminálása révén (1. ábra). Ezen kívül részt vesz a gyulladás kialakításában, apoptotikus és tumorossá fajult sejtek eltávolításában is. Bármelyik úton is aktiválódott, az alternatív út és annak amplifikációs lépése beindul, az aktiváció nagy mértékben felerősödik. A kontrollálatlan mértékű komplementaktiváció viszont már a saját, egészséges sejteket is károsíthatná. Ezt akadályozzák meg a szervezet komplementszabályozó fehérjei. Az alternatív útvonal szolubilis regulátora, a H-faktor az említett amplifikációs lépést gátolja, az I-faktor kofaktoraként a C3b hasításában vesz részt, továbbá a C3bBb konvertáz létrejöttét akadályozza, szétesését gyorsítja.

A H-faktorral szemben a hozzá strukturálisan hasonló öt H-faktorral rokon (CFHR) fehérje szerepe már kevésbé tisztázott. A CFHR1-nek a C5-konvertáz szintjén (Heinen és mtsai., 2009), a CFHR5-nek pedig a C3-konvertáz szintjén (McRae és mtsai., 2005) tulajdonítottak gyenge gátló aktivitást, ám mások ezt fiziológiás koncentrációban nem tapasztalták (Goicoechea de Jorge és mtsai., 2013). A CFHR4 a rajta felépülő C3-konvertázzal az alternatív útvonalat aktiválja (Hebecker és Józsi, 2012). A CFHR1, CFHR2 és CFHR5 a C3b kötéséért a H-faktorral kompetálnak és annak reguláló hatását csökkentik (deregulálás), ami dimerizálódásuk során még kifejezettebb lehet (Goicoechea de Jorge és mtsai., 2013). A CFHR1 számos patogénhez képes kötődni (Józsi és Zipfel, 2008). Újabban a CFHR2 és CFHR5 *Borrelia* CRASP fehérjeihez való kötődését is leírták, ám a CFHR fehérjék megkötése nem nyújt hatékony védelmet a patogénnek a komplementaktiváció ellen (Siegel és mtsai., 2010). Munkánkban a CFHR5 fehérje komplementszabályozó szerepével foglalkoztunk.

A 9 SCR doménből álló CFHR5 a H-faktor SCR 6-7, 10-14 és 19-20 doménekkal mutat nagyfokú (32-74%) aminosavszekvencia-azonosságot (2. ábra), így képes a H-faktor azon ligandumaihoz (C3b, iC3b, heparin és CRP) kötődni, melyek kötőhelyei e doménekben lokalizáltak (McRae és mtsai., 2005). A pentraxinok közé tartozó PTX3-at és az ECM-et munkacsoportunk a CFHR5 új ligandumaiként mutatta ki (3. ábra). Mivel a H-faktor az SCR7 és SCR19-20 doménjein keresztül is kötődhet a PTX3 C-, illetve N-terminális

fragmentumához (Deban és mtsai., 2008), megvizsgáltuk, hogy vajon a CFHR5 is kötődik-e mindkét PTX3 doménhez? A CFHR5 szintén kötődik a PTX3 mindkét terminálisához (4.A ábra), de a kötőhelyek nem feleltethetők meg a H-faktornál leírt helyeknek, ugyanis az SCR19-20 doménekkel homológ SCR8-9 a PTX3-hoz nem kötődik (4.B ábra). Az, hogy a CFHR1-en kívül semelyik másik CFHR fehérje C-terminálisa - még a H-faktoriala CFHR5-nél nagyobb mértékben homológ CFHR2 - sem kötődik a PTX3-hoz (4.B ábra), tovább erősíti azt a feltételezést, hogy a CFHR5 SCR8-9 doménjeinek a PTX3 kötésében nincsen szerepe.

A CFHR5-nek a H-faktor másik PTX3-kötő doménjével, az SCR7-tel homológ SCR2 doménje csak 32%-ban mutat aminosavszekvencia-azonosságot, így nem valószínű, hogy PTX3-kötő képességét megtartotta. E domén megfeleltethető a CFHR1 SCR2 doménjével, mellyel viszont nagy mértékben, 85 %-ban homológ. A CFHR1 C-terminálisához kötődő C18 jelű ellenanyaggal a CFHR1 PTX3-hoz való kötődése teljesen gátolható (Kopp és mtsai., 2012), és a CFHR1 eleve kisebb mértékben kötődik a PTX3-hoz, mint a H-faktor, így a CFHR1-nek feltehetően csak egy, a C-terminális doménekben található PTX3 kötőhelye van, N-terminális SCR2 doménje a PTX3 kötésében nem vesz részt. A CFHR5 SCR2 doménjének a H-faktor SCR7-tel mutatott kisfokú, illetve a CFHR1 SCR2-vel mutatott nagyfokú hasonlósága így e domén PTX3-kötő szerepét is kizárja. Valószínűbb, hogy a H-faktoriala egyáltalán nem megegyező - így a középső, CFHR5-ben egyedi SCR3-7 - domének felelősek a PTX3 kötéséért, ezt ezen fragmentum rekombináns fehérjeként történő előállítása után tervezzük vizsgálni. A CFHR5 a CRP-t szintén az SCR3-7 (5-7) doménekeken keresztül köti (McRae és mtsai., 2005). A CRP és PTX3 kötőhelyek átfedését bizonyíthatná a PTX3-kötött CFHR5 gyengébb CRP kötése, illetve ennek fordítottja. A CFHR5 nefropátiával asszociált mutáns CFHR5₁₂₁₂₋₉ gyengébb PTX3 kötésének magyarázata lehet az oligomerizáció következtében a dimerizációs domén melletti PTX3 kötőhelyek elfedése (7. ábra). Mivel a mutáns CFHR5₁₂₁₂₋₉ C3b-kötő képessége nem változott a vad típuséhoz képest, a CFHR5 C3b kötőhelye a dimerizációs doménektől távol, a molekula C-terminálisán lehet. E kötőhely tehát megegyezhet a H-faktoréval, hisz az a C3b-t – a CFHR fehérjékben nem megtalálható SCR1-4 domének kivételével – a C-terminális SCR19-20 doménjein keresztül köti.

A CFHR5 a PTX3 és MaxGel kötéséért a H-faktoriala kompetál és annak reguláló hatását csökkenti (5. ábra). A PTX3-nak normális körülmények közt valószínűleg nincs szerepe az apoptotikus sejtek eltávolításában. Gyulladás során szérumbeli koncentrációja azonban több százszorosára emelkedik, lokálisan koncentrációja pedig ennél jóval magasabb is lehet, és ekkor már részt vesz az apoptotikus sejtek csendes, terminális komplex és C5a anafilatoxin generálása nélküli eltávolításában. A gyulladást a pH csökkenése kíséri, és

alacsonyabb pH-n a komplementaktiváló C1q kevésbé, míg a komplementreguláló H-faktor, FHL-1 és C4BP erősebben kötődnek a PTX3-hoz (Kopp és mtsai., 2012). Gyulladás során tehát a komplementgátlás helyeződik előtérbe. A gátlás mértékét a CFHR5 a H-faktorral való kompetíciója révén csökkentené, ám alacsonyabb pH-n a CFHR5 is gyengébben kötődik a PTX3-hoz, így csak kevésbé gátolhatja a H-faktor regulátor funkcióját (ábra nem mutatja).

A CFHR5 és H-faktor PTX3 kötőhelyei átfednek, hisz a fehérjék kompetálnak egymással, de a kötőhelyek nem teljesen azonosak, mivel csak a CFHR5 gátolja részlegesen a C1q kötődését PTX3-hoz, a H-faktor erre nem képes. Az immobilizált PTX3 CFHR5 és C1q kötőhelyei részlegesen átfednek (6.A ábra). Az interakciót megfordítva, CFHR5-t immobilizálva a C1q PTX3 jelenlétében még erősebben képes kötődni, mint PTX3 jelenléte nélkül (6.B ábra). Hogy a C1q a PTX3-on át kötődik erősebben a CFHR5-höz, vagy a kötődött PTX3 úgy változtatja meg az immobilizált CFHR5 konformációját, hogy annak C1q kötőhelyei elérhetőbbé válnak a C1q számára, ELISA kísérletekkel nem tudjuk eldönteni.

A CFHR5 a komplementgátlás csökkentése mellett közvetlenül is aktiválhatja a komplementrendszer alternatív útvonalát, hisz képes rajta a funkcionálisan is aktív C3bBb konvertáz felépülni (8.A és B ábra). A konvertáz felépülését különböző bakteriális eredetű komplement inhibitorok gátolhatják (8.C és D ábra). Mivel a CFHR4A SCR8-9 doménjeivel kötődik a C3b C3d részéhez (Hebecker és mtsai., 2012), és a CFHR5 C-terminálisa a CFHR4 C-terminálisával homológ, valószínűleg a C3b is a C3d részével kötődik az immobilizált CFHR5-höz. A *S. aureus* komplement inhibitorának, az Efb-C-nek (Extracellular fibrinogen-binding protein C-terminális doménje) kötőhelye ugyan a C3d TED (Thioester containing domain) doménjében található (Hammel, Sfyroera, Pyrpassopoulos, Ricklin és mtsai., 2007), a C3b CFHR5-höz való kötődését nem akadályozza. Az Efb-C-C3d interakció a C3b TED doméntól távolabb eső doménjeiben konformációs változást idéz elő, amivel a B-faktor Ba fragmentumának C3b-hez való kötődését megakadályozza (Chen és mtsai., 2010). Az Efb-C R131E, N138E (RENE) mutánsa, mely a C3d-hez nem kötődik, a konvertáz felépülését sem befolyásolja. Az Ehp (Efb homologous protein) szintén a C3 C3d részéhez kötődik (Hammel, Sfyroera, Pyrpassopoulos és mtsai., 2007). Az Efb-C-vel való homológiája ellenére működési mechanizmusa más, hisz C3b-hez kötődve a B-faktor kötődését segíti és így a C3bB prokonvertázt stabilizálja, melyet a D-faktor képtelen aktív konvertázzá alakítani (Jongerus és mtsai., 2010). A CFHR5-kötött C3b B-faktor kötését viszont érdekes módon akadályozta, tehát a bakteriális inhibitorok hatása különbözhet a CFHR5-kötött C3-konvertázon az "eredeti" alternatív út C3-konvertázán kifejtett hatásuktól. A SCIN-A (Staphylococcal complement inhibitor-A) nem a TED doménhez, hanem a C3b ellentétes részén levő

doménjeihez (MG6-7) kötődik (Roosjakkers és mtsai., 2009), és B-faktoral kompetálva annak C3b kötését gátolja, sőt még a C3b CFHR5-höz való kötődését is megakadályozza.

Nemrég mind a PTX3-at, mind a CFHR5-öt a glomeruláris ECM-mel asszociált fehérjékként írták le (Byron és mtsai., 2014), így a CFHR5 PTX3-mal való kölcsönhatása fontos lehet azon vesebetegségek megértéséhez, melyeknél a komplementrendszer megfelelő szabályozása szenved zavart. A CFHR5 nefropátiával asszociált mutáns CFHR5 gyengébb PTX3-kötő képessége a betegség patomechanizmusában nem feltétlenül játszik szerepet, hisz a betegségben az alternatív útvonal a glomerulusokban túlaktiválódik, és a mutáns fehérjének PTX3-on a H-faktoral szembeni gyengébb kompetitor képességének a H-faktor általi erősebb komplementregulációt kellene eredményeznie. Elképzelhető, hogy a mutáns fehérje a glomeruláris ECM valamely komponenséhez viszont éppen, hogy erősebben kötődik és ott a H-faktoral jobban kompetál. Ezt munkacsoportunk a jövőben szeretné majd megvizsgálni.

Összegzésképpen: munkacsoportunk kimutatta, hogy a CFHR5 amellet, hogy a C3b kötéseért a H-faktoral kompetál, három mechanizmuson keresztül is aktiválhatja a komplementrendszert vagy aktiválódásának mértékét növelheti: (1) a H-faktornak a PTX3-hoz és ECM-hez való kötődésének gátlásával, (2) a klasszikus útvonalat aktiváló C1q fokozott kötődésének biztosításával és (3) az alternatív útvonalbeli C3-konvertáz felépülésének elősegítésével. Ezen funkciói hozzájárulhatnak a CFHR5 fehérjével asszociált betegségek és a fehérje szerepének pontosabb megértéséhez.

Összefoglaló

A veleszületett immunrendszer részeként a komplementrendszernek fontos szerepe van a fertőzések elleni védekezésben. Túlzott mértékű aktivációját és a saját szövetek károsítását szervezetünk komplementszabályozó fehérjéi akadályozzák meg.

A komplementaktiváció egyik legfőbb gátló fehérjéje a H-faktor. A vele szerkezetileg rokon CFHR fehérjék szerepe azonban még jórészt tisztázatlan. Mivel a CFHR5 génváltozatai vesebetegségekkel (pl. CFHR5 nefropátia, atípusos hemolitikus urémiás szindróma) asszociáltak, illetve a fehérje a betegek veseglomerulusaiban felhalmozódik, célunk a fehérje funkciójának megértése volt. Kimutattuk, hogy a CFHR5 liganduma a gyulladás során fokozottan termelődő pentraxin 3 (PTX3). A ligandum kötéseért a H-faktorial kompetál, annak reguláló hatását csökkenti mind pentraxinhoz, mind az extracelluláris mátrixhoz kötődve. A CFHR5 nefropátiával asszociált mutáns CFHR5 viszont gyengébben kötődik a PTX3-hoz. A CFHR5-höz kötődik a komplementrendszer klasszikus útvonalát aktiváló C1q, a kötődés mértéke a PTX3 CFHR5-höz való kötődésével pedig még nagyobb. A CFHR5 fehérjén felépülhet az ún. alternatív komplement út C3-konvertáz enzime, melynek kialakulását eredményeink szerint egyes bakteriális eredetű komplement inhibitorok befolyásolják.

A CFHR5 szerepe tehát - szemben a H-faktorial - a komplementaktiváció fokozása: a H-faktorial való kompetíciója révén a komplementgátlás mértékét csökkenti, a C1q fokozott kötődését biztosítja és a C3-konvertáz felépülésének elősegítésével az alternatív útvonalat aktiválja.

Summary

The complement system, a major humoral part of innate immunity has an important role in the protection of the host against infections. The excessive activation of the complement system, which could potentially harm the healthy tissues of the host too, is inhibited by complement regulator proteins.

One of the most important complement regulator proteins is factor H. However, the roles of the structurally homologous CFHR proteins are mostly unexplained. Because certain variations of the CFHR5 gene are associated with rare kidney diseases (e. g. CFHR5 nephropathy, atypical hemolytic uremic syndrome) and the protein was found in glomerular immune deposits in the affected patients, our aim was to understand the function of the CFHR5 protein. We identified pentraxin 3 (PTX3), a protein which is upregulated upon inflammatory conditions, as a novel ligand of CFHR5. CFHR5 competes with factor H for the binding of its ligands, and in this way decreases the cofactor activity of factor H on PTX3 and on the extracellular matrix. The mutant CFHR5 protein, which is associated with CFHR5 nephropathy, shows weaker binding to PTX3 compared to the wild type protein. CFHR5 allows the binding of the complement activation initiator molecule C1q, and binding of PTX3 to CFHR5 resulted in increased C1q binding. Moreover, CFHR5 provides an adequate platform for the assembly of the alternative pathway C3-convertase, which can be inhibited by certain bacterial complement inhibitor proteins.

Thus, the role of CFHR5 - opposite to factor H - is the enhancement of complement activation: due to its competition with factor H, the CFHR5 protein decreases the level of complement inhibition, allows enhanced binding of C1q and can directly activate the alternative pathway of the complement system by serving as a platform for the assembly of the C3-convertase.