

КОМПЛЕМЕНТ - АКТИВАЦИЈА, РЕГУЛАЦИЈА АКТИВАЦИЈЕ И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ

Анђелковић З.¹, Мирић М.², Несторовић В.³, Милановић З.³, Митић Р.⁴

¹Институт за хистологију и ембриологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²Институт за патолошку физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

³Институт за физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

⁴Институт за фармакологију са токсикологијом, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

COMPLEMENT - ACTIVATION, REGULATION OF ACTIVATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Анђелковић З.¹, Мирић М.², Несторовић В.³, Милановић З.³, Митић Р.⁴

¹Institute of Histology and Embryology, Medical fakulty Priština, Kosovska Mitrovica

²Institute of Pathophysiology, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

³Institute of Physiology, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

⁴Institute of Pharmacology and toxicology, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

The complement system (complement) involves over 30 circulating and membrane-fixed proteins with an effector role in the innate and humoral immunity. These proteins help the function of antibodies to protect the organism from foreign molecules (antigens) which the term complement comes from. Soluble proteins of the complement system made mainly in the liver and circulate in blood in an inactive form. The activation of complement may be initiated in three ways (classical, alternative and lecitin pathway), and it is realized by sequential proteolysis of complement proteins (proenzymes) which become emzymes with the proteolytic activity after cleavage. Products of the activatin of complement bind to the surface of microbes or to the antibodies bound to antigens. An activated complement shows a number of biological effects, such as lysis of an attached cell, opsonization, neutralization of viruses, inflammation, clearance of immune complexes etc. In contrast of microorganisms, human cells have a number of regulatory proteins which prevent the complement activation and in that way, they regulate its activity.

Key words: Complement, Complement system, Complement activation, Antibodies, Antigens

САЖЕТАК

Комплементски систем (комплемент) обухвата преко 30 циркулишућих и мембранских протеина са ефекторном улогом у склопу урођеног и хуморалног имунитета. Ови протеини потпомажу функцију антитела у заштити организма од страних молекула (антигена), одакле и потиче назив комплемент (енгл. *complement* - допуна, комплетирање). Солубилни протеини комплементског система синтетишу се углавном у јетри и циркулишу у крви у инактивном облику. Активација комплемента може се иницирати на три начина (класични, алтернативни и лецитински пут), а остварује се путем ланчане протеолизе комплементских протеина (проензима) који после разградње постају ензими са протеолитичком активношћу. Продукти активације комплемента везују се за површину микроба или за антитела везана за антигене. Активирани комплемент испољава низ биолошких ефеката, као што су лиза нападнуте ћелије, опсонизација, неутрализација вируса, инфламација, чишћење имуних комплекса и др. За разлику од микроорганизама, људске ћелије поседују низ регулаторних протеина који спречавају активацију комплемента и на тај начин регулишу његову активност.

Кључеречи: Комплемент, Комплементски систем, Активација комплемента, Антитела, Антигени

АКТИВАЦИЈА КОМПЛЕМЕНТА

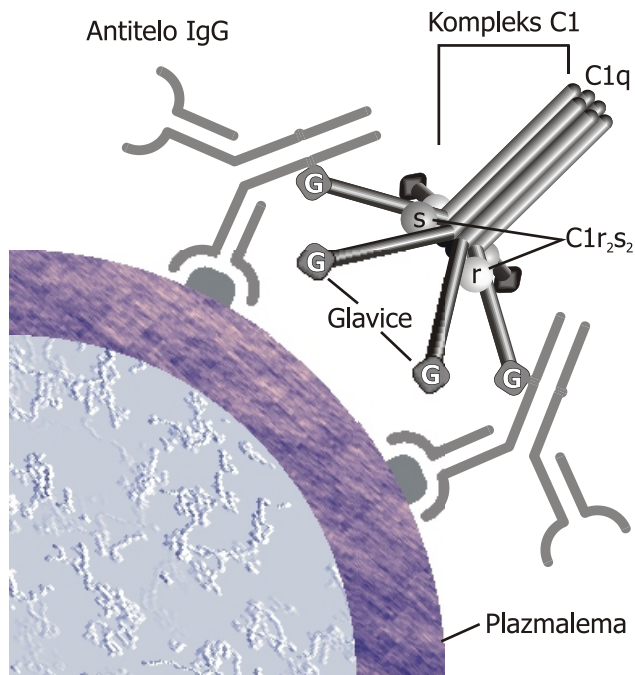
Постоје три главна пута активације комплементског система: класични, алтернативни и лецитински пут (1, 2). Код класичног пута активацију иницирају одговарајући изотипови антитела везани за антигене. Код алтернативног пута активација комплемента одвија се на површини микроба и не захтева присуство антитела, док у лецитинском путу процес покреће лецитин везан за полисахариде ћелијске

мембране микроба (3). Активација се одвија у две етапе раној и касној (4). Без обзира на пут активације, рана етапа завршава разлагањем протеина (проензима) C3 на биолошки активне фрагменте C3a и C3b; фрагмент C3b се ковалентно везује за површину стране ћелије (микроорганизама) или за антитела везана за антигене, подстичући њихову фагоцитозу или инфламаторну реакцију. Касна етапа поклапа се

код сва три пута активације, а праћена је лизом стране ћелије (3, 4).

Класични пут активације

Класични пут активације комплементског система могу покренути IgM, IgG1, IgG3 и донекле IgG2; остали имуноглобулински изотипови не поседују способност активације комплемента (5).



Слика 1. - Структура комплементске компоненте C1

Активација наступа везивањем протеина C1 за Ch2 домене IgG-а или за Ch3 домене молекула IgM. C1 је велики протеински комплекс изграђен од једне субјединице C1q и од по две субјединице C1r и C1s (6). Субјединице комплекса држе се на окупу дејством калцијумових јона, а дисоцирају у присуству цитрата, етилендиаминтетраацетилне киселине (EDTA), етиленгликолтетраацетилне киселине (EGTA) итд. (5). За препознавање везног места на Fc региону антитела одговорна је субјединица C1q (7). Она се састоји од 6 ланаца који су на једном крају комплекса приљубљени један уз други, а на другом крају дивергирају у виду зрака (8). На крају сваког ланца налази се глобуларна главица. Преко глобуларних главица остварује се контакт између компоненте C1 и везних места на молекулима IgM-а и IgG-а (9). Међутим, везна места на слободним (невезаним за антиген) циркулишућим антителима су покривена и недоступна компоненти C1, а разоткривају се тек након конформационих промена условљених везивањем антитела за антиген (8). То значи да слободна антитела не могу покренути комплементску каскадну реакцију. Процес активације покреће се у случају кад се најмање две глобуларне главице вежу за различите Fc фрагменте антитела. Како је IgG мономер, неопходно је да

C1 истовремено веже два IgG молекула која морају бити на блиском растојању. Насупрот IgG-u, IgM поседује 5 Fc региона (пентамер) тако да је за иницирање процеса довољан један молекул IgM-а (4).

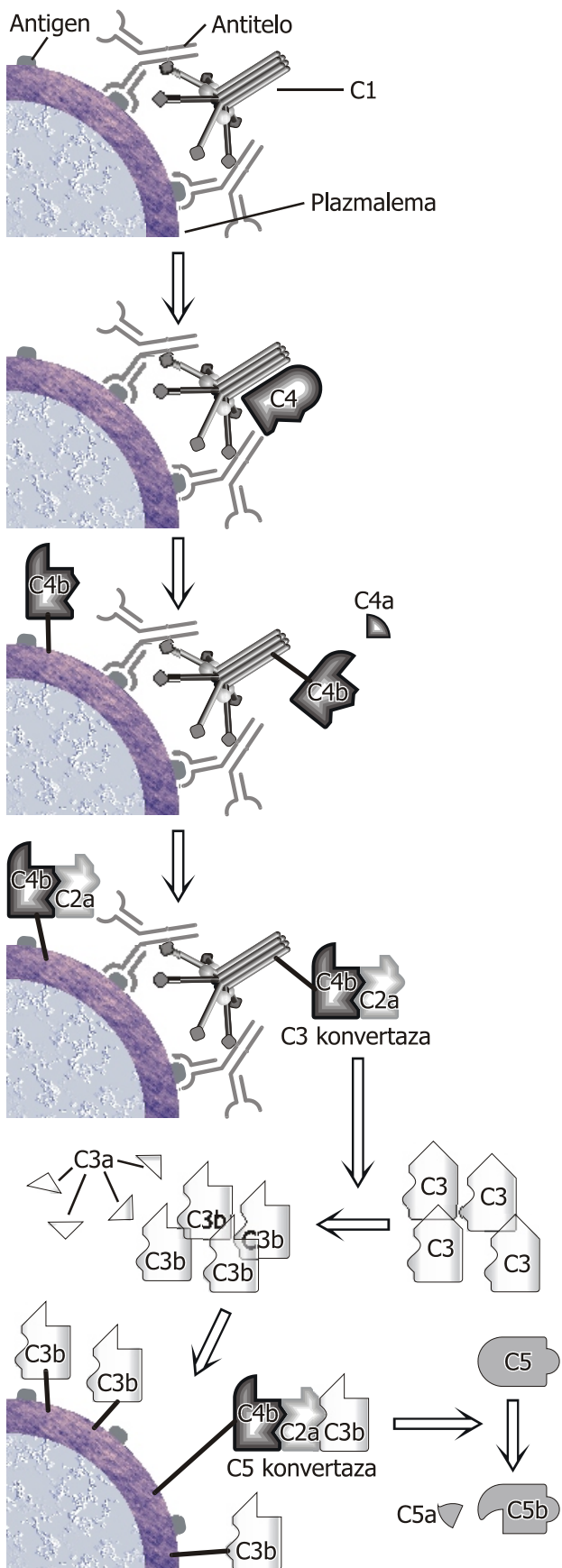
После везивања C1q за Fc регион IgG-а или IgM-а мења се конформација субјединица C1r, што доводи до разградње и активирања субјединица C1s. На тај начин проензим C1 постаје активна *serin proteaza* чији супстрати су компоненте комплемента C4 и C2 (3). Активност компоненте C1 на људским ћелијама ограничава *inhibitor C1-esteraze (C1INH)*, члан серпинске суперфамилије протеина (енгл. *serin protease inhibitor*) (5). C1INH се везује за тетрамер C1r-C1s цепајући поменути комплекс од субјединице C1q. Тиме се класични пут активације комплемента зауставља.

Табела 1. - Количености комплементског система човека.

Ознака за компоненту комплемента	Концентрација у плазми (g/ml)	Молекуларна тежина (daltoni)	Ензимска активност
C1q	180	462.000	462.000
C1r	100	92.000	92.000
C1s	110	86.000	86.000
C2	25	117.000	117.000
C3	1200	185.000	185.000
C4	640	206.000	206.000
C5	80	180.000	180.000
C6	75	120.000	120.000
C7	55	110.000	110.000
C8	80	163.000	163.000
C9	50	71.000	71.000
MBL	0.1-5	540.000	540.000
MASP ₁	?	94.000	94.000
MASP ₂	?	90.000	90.000
C3b	трагови	170.000	170.000
faktor D	2	25.000	25.000
faktor B	200	93.000	93.000
Properdin	25	220.000	220.000
C1INH	25	110.000	110.000
faktor I	35	88.000	88.000
faktor H	500	150.000	150.000
SP40,40	50	80.000	80.000
S-protein	500	83.000	83.000
C4a	1,6	12.000	12.000
C4d	8,9	30.000	30.000
C3a	0,6	11.000	11.000
iC3b	8,5	170.000	170.000
C5a	0,01	11.000	11.000
Bb	0,4	60.000	60.000

MBL-маноза-везујући лецитин; MASP₁ и MASP₂-маноза-везујуће серин естеразе удружене са протеинима; C1INH-инхибитор C1-естеразе

Активирани C1 цепа проензим C4 на већи фрагмент C4b и мањи фрагмент C4a (8). C4b се ковалентно везује за плазмалему ћелије за чију мембрану су везана антитела. Следећа компонента комплемента, означена као C2, гради комплекс са C4b уз учешће магнетијумових јона (5). Субјединица C1s разграђује и компоненту C2 на два фрагмента C2a и



Слика 2. - Класични путј активације комплемента

C2b. Фрагмент C2b ослобађа се у циркулацију, док C2a остаје везан за C4b градећи комплекс C4b2a који делује као протеолитички ензим (2). Овај ензим назван је **C3 конвертаза класичног пута** јер је његов супстрат компонента C3. Активно место C3 конвертазе налази се на фрагменту C2a и оно разлаже C3 на два дела: C3a и C3b. C3a је мали пептид који се ослобађа у екстрацелуларни матрикс, док се C3b везује за површину ћелије (3). Тиме завршава рана етапа у активацији комплемента. Стотине молекула C3b, везане за ћелијску мембрану, поспешују фагоцитозу опсонизованих микроорганизама (4). Део молекула C3b везује се за C3 конвертазу чинећи комплекс C4b2a3b, назван **C5 конвертаза класичног пута** (10, 11). C5 конвертаза је активан ензим који делује на компоненту C5, а та реакција означава почетак касне етапе активације комплемента.

Депозицију C4b на плазмалеми онемогућава *C4b-везујући протеин (C4bBP)*, члан RCA суперфамилије протеина (од енгл. *regulator of complement activation*) (5). C4bBP истискује C2a из комплекса C4b2a, а затим служи као кофактор за ензим крвне плазме назван *фактор I*. Фактор I разграђује молекуле C3b и C4b везане за плазмалему нападнуте ћелије. Као продукти деловања фактора I најпре настају iC3b и iC4b (i од инактиван), а затим и фрагменти C3d, C3dg, C4d и C4dg. Ови фрагменти не учествују у даљем току активације комплемента, али се могу везати за комплементске рецепторе CR3 и CR2 (10, 11). Контрола C4b2a на плазмалеми успоставља се 2-5 минута после активације C1 компоненте. Са друге стране, циркулишући фрагмент C4a брзо се инактивира дејством *serum karboksipeptidaze N* (5).

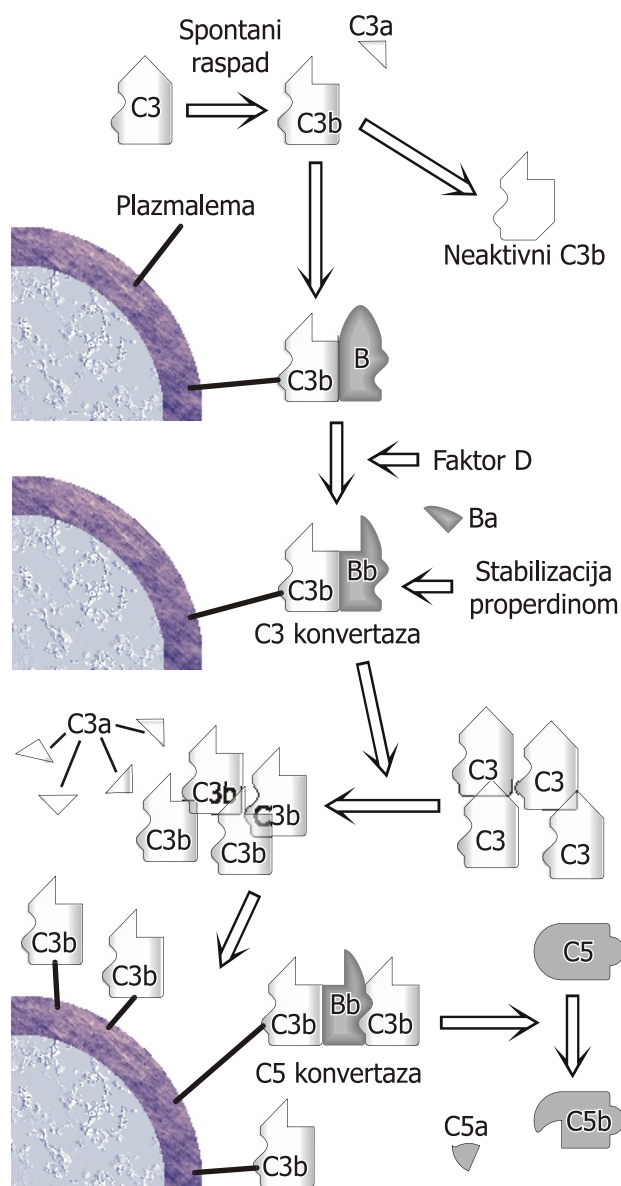
Касна етапа активације комплемента почиње разградњом компоненте C5, а завршава формирањем **комплекса који напада мембрану** (енгл. *membrane attack complex MAC*) и лизом нападнуте ћелије. C5 конвертаза цепа C5 на C5a и C5b. Фрагмент C5b чини нуклеус за формирање MAC-а (12). За њега се редом везују компоненте C6, C7, C8 и C9 које немају ензимску активност. Најпре се гради комплекс C5a6, доцније C5a67 који се уграђује у спољашњи лист плазмалеми, а затим се придружује компонента C8 која проузрокује конформационе промене комплекса и његову пенетрацију у дубину липидног двослоја (2). C5b-8 комплекс служи као рецептор за C9. Компонента C9 је серумски протеин који полимеризује на месту споја са комплексом C5b-8. Полимеризацијом C9 у ћелијској мембрани настају поре (канал), дијаметра 10 nm, кроз које дифундују вода и електролити (12). Улазак воде у цитоплазму праћен је бубрењем и прскањем ћелије (1, 4). Поред осмоске лизе, инфлуксом калцијумових јона MAC може покренути и механизам програмиране ћелијске смрти (апоптозе).

Формирање MAC-а инхибира мембрански протеин *CD59* (13). Овај протеин експримује се на везици људских ћелија на којима бива везан за гликозилфосфатидилинозитол плазмалеми. CD59 спреча-

ва везивање C9 молекула за C5b-8 комплекс. CD59 није присутан на површини микроорганизама тако да се они не могу заштитити од литичког деловања МА-С-а. У течној фази за комплексе C5b6, C5b-7 и C5b-8 могу се везати *S-protein (vitronektin)* или *S40,40 (klusterin)* и спречити њихову интеракцију са плазмалемом (5, 13).

Алтернативни пут активације

Алтернативни (пропердински) пут активације комплемента остварује се без учешћа антиген-антитело комплекса и без компоненти C1, C4 и C2 (3, 14). Пошто у овом случају активација не зависи од специфичне имунолошке реакције, алтернативни пут активације комплемента може се сврстати у неспецифичну одбрамбену реакцију организма.



Слика 3. - Алтернативни пут активације комплемента

Алтернативни пут заснива се на непрестаном спонтаном, али спором распадању компоненте C3 на фрагменте C3a и C3b. Како C3 поседује унутрашњу тиоестарску везу, пептид C3b може се ковалентно везати за протеине и полисахариде ћелијске мембране. У присуству магнезијумових јона за C3b везује се протеин плазме означен као *фактор В* (14). Други протеин плазме, назван *фактор D*, испољава протеолитичко дејство на фактор В откидајући од њега мали фрагмент Ba (3). Већи фрагмент фактора В, означен као Bb, остаје везан за C3b и са њим гради комплекс C3bBb. Овај комплекс поседује протеолитичку активност и зове се **C3 конвертаза алтернативног пута** (4). Полуживот комплекса C3bBb износи свега око 5 минута, али се може значајно продужити уколико се за њега веже *пропердин*. C3 конвертаза разграђује молекуле C3, услед чега настају нови фрагменти C3b који се везују за плазмалему. Поједини фрагменти C3b везују се за C3 конвертазу градећи комплекс C3bBb3b познат под именом **C5 конвертаза алтернативног пута**. Овај ензим делује на исти супстрат као истоимени ензим класичног пута тако да се у касној етапи активације комплемента алтернативни и класични пут поклапају (14).

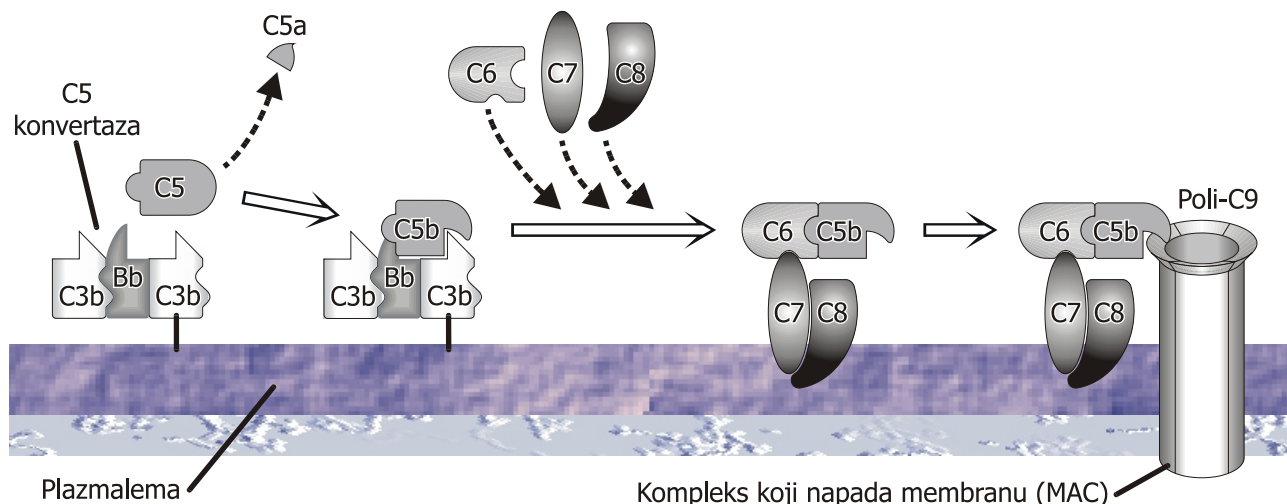
Склапање компоненти C3 конвертазе и C5 конвертазе на површини људских ћелија спречава низ регулаторних протеина, међу којима су најзначајнији *мембрански кофактор протеин (MCP или CD-46)*, *комплементски рецептор тип I (CRI)*, *фактор убрзавања распада* (енгл. *decay accelerating factor* или *DAF*), протеин плазме *фактор H* итд. (13). Регулаторни протеини везују се за Bb фрагмент C3 конвертазе и тако блокирају даљу прогресију комплементске каскаде. MCP, CR1 и DAF синтетишу се у људским ћелијама, али не и у микроорганизама (4). Због тога регулаторни протеини селективно инхибирају активацију комплемента у људским ћелијама. Поред тога, ћелијска мембрана сисара садржи доста *сијаличне киселине* која брзо инактивира C3b везан за плазмалему тако да спонтани распад C3 нема штетан утицај на ћелије сопственог организма (8).

Лецитински пут активације

Лецитински пут активације комплемента сличан је класичном путу, премда се одвија у одсуству антитела (15, 16). Код овог пута ланчана реакција започиње везивањем *маноза-везујућег лецитина* (енгл. *mannose-binding lectin* или *MBL*) за карбохидратне резидеу на површини микроба (15, 17). MBL има структуру сличну C1q, а комплементску каскаду покреће активацијом C1r-C1s комплекса или протеолитичким дејством на компоненту C4 уз помоћ *маноза-везујућих серин естераза удружених са протеинима (MASP₁ и MASP₂)* (17).

КОМПЛЕМЕНТСКИ РЕЦЕПТОРИ

Комплементски рецептори смештени су на плазмалемима различитих ћелијских типова људског



Слика 4. - Касна етапа у активацији комплемента

организма. Они везују фрагменте комплемента (најчешће фрагменте компоненте C3) преко којих комплементски систем испољава биолошку активност (18, 19). Рецептори су сврстани у 4 групе (типа).

Комплементски рецептори тип 1 (CR1 или CD35) налазе се на мембрани еритроцита, леукоцита, макрофага и фоликулских дендритских ћелија (FDC). Они имају висок афинитет за C3b и C4b (19). Фагоцити користе CR1 за везивање и интернализовање честица обложених поменутих фрагментима.

Комплементски рецептори тип 2 (CR2 или CD21) експримују се на В-лимфоцитима, FDC и неким епителним ћелијама (3). Они везују C3d, C3dg и iC3b који настају распадањем фрагмента C3b под утицајем фактора I (5). Везивањем поменутих фрагмената за CR2 В-лимфоцита стимулише се хуморални имуни одговор, а везивањем за рецепторе FDC обезбеђује се «хватање» имуних комплекса у герминативним центрима лимфних фоликула. CR2 користи Epstein-Barr вирус као пут којим инфицира В-лимфоците и епителне ћелије.

Комплементски рецептори тип 3 познати су под различитим именима (CD11b/CD18, Mac-1, Mol, ОКМ-1), а експримују се на мононуклеусним фагоцитима, гранулоцитима, мастоцитима и NK ћелијама (2, 18). Рецептори садрже један - и један -ланац и припадају интегринској фамилији рецептора. CR3 на фагоцитним ћелијама испољавају висок афинитет за iC3b и промовишу фагоцитозу микроба обложених овим фрагментом комплемента. Поред тога, CR3 олакшавају везивање фагоцита за ендотелне ћелије и њихову екстравазацију као одговор на деловање хемотаксичних фактора.

Комплементски рецептори тип 4 (CR4) експримују се на активираним В-лимфоцитима, цитотоксичним Т-лимфоцитима, тромбоцитима, а нарочито на дендритским ћелијама, услед чега служе као њихов маркер (18). CR4 имају готово идентичну структуру и функцију као CR3.

БИОЛОШКА УЛОГА КОМПЛЕМЕНТА

Значај комплементског система огледа се у поспешивању фагоцитозе, неутрализацији појединих вируса, стимулацији инфламаторне реакције, уклањању имуних комплекса, повећању продукције имуноглобулина и у лизи нападнутих ћелија (4, 20). Све ове биолошке ефекте проузрокују фрагменти комплементских компоненти настали у појединим фазама активације комплемента, изузев ћелијске лизе која је последица дејства MAC-а (21).

Стимулација фагоцитозе је последица опсонизације микроба. Највећи значај у опсонизацији придаје се пептидима C3b, iC3b и C4b (22). Ове опсонине препознају CR1, CR3 и CR4 макрофага и гранулоцита, што олакшава фагоцитовање микроба обложених поменутих фрагментима C3 и C4 компоненте комплемента. Поред опсонизације, ови фрагменти могу **неутралисати поједине вирусе** (нпр. ретровирус тип С, лентивирус, HIV-1) и спречити њихово приањање за ћелије домаћина (23).

Фрагменти комплемента C5a, C4a и C3a изазивају **акутну запаљењску реакцију**, сличну анафилактичној реакцији, због чега се зову *анафилатоксини* (23, 24). Они се везују за специфичне рецепторе мастоцита и неутрофила, из чијих гранула се ослобађају вазоактивни медијатори као што су хистамин и серотонин (24). Ове супстанце, са своје стране, повећавају проток крви и пермеабилност крвних судова у непосредној околини жаришта реакције. Најпотентнији медијатор дегранулације мастоцита је C5a који је око 20 пута ефикаснији од C3a, односно око 2500 пута од C4a.

Нековалентним интеракцијама са Fc регионом јукстапозиционираних антитела комплемент **спречава формирање имуних комплекса**, а уједно учествује у растварању већ постојећих комплекса (5). Иначе, имуни комплекси таложе се махом у кожи и бубрезима где могу узроковати инфламацију и оште-

ћење околних ћелија. Велики значај у **чишћењу имуних комплекса** имају еритроцити. Они својим рецепторима CR1 везују циркулишуће имуне комплексе обложене пептидима C3b и C4b и исте транспортују до јетре и слезине, где их предају мононуклеусним фагоцитима (5, 24).

Везивањем C3d за CR2 В-лимфоцита покреће се **хуморални имуни одговор**. Наиме, C3d обезбеђује други сигнал при активацији лимфоцита (први сигнал настаје везивањем антигена за Ig-рецепторе В-ћелија) (25). Уједно, антигени опсонизовани са C3d задржавају се у герминативним центрима лимфних фоликула, где их FDC користе за дуготрајну стимулацију В-лимфоцита. На тај начин обезбеђује се **матурација афинитета**, односно продукција клонова В-лимфоцита са високим афинитетом за опсонизовани антиген (4, 25).

И најзад, уколико се на некој ћелији активирају сви протеини одговорни за формирање MAC-а наступиће **лиза нападнуте ћелије** (26). Иако веома делотворан, овај механизам деловања комплементског система одговоран је за уништавање само појединих врста микроорганизама (нпр. neisseria) (4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Medzhitov R., Janeway C.J.: Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343:338-344.
2. Rother K., Till G.O.: *The Complement System*. New York, Springer-Verlag, 1988.
3. Walport M.J.: Complement. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344:1058-1066.
4. Abbas A.K., Lichtman A.H.: *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders, Philadelphia, 2003; 326-343.
5. Benjamini E., Coico R., Sunshine G.: *Immunology, a short course*. Wiley-Liss, New York-Toronto, 2000; 253-274.
6. Tominson S.: Complement defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 1993; 5:83-89.
7. Muller-Eberhard H.J.: Molecular organization and function of the complement system. *Annu. Rev. Biochem.* 1988; 57:321-347.
8. Andreis I., Čulo F., Marušić M., Taradi M.: *Imunologija*. Medicinska knjiga, Zagreb, 1998; 184-192.
9. Ravetch J.V., Bolland S.: IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19:275-290.
10. Carroll M.C.: The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 535-568.
11. Fearon D.T.: Cellular receptors for fragments of the third component of complement. *Immunol. Today* 1984; 5:105-110
12. Morgan B.P.: Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem. J.* 1989; 264:1-14
13. Smith G.P., Smith R.A.: Membrane-targeted complement inhibitors. *Molec. Immunol.* 2001; 38:249-255
14. Pingburn M.K., Muller-Eberhard H.J.: The alternative pathway of complement. *Springer Semin. Immunol.* 1984; 7:163-192
15. Ikeda K., Sannoh T., Kawasaki N., Kawasaki T., Yamashima I.: Serum lecithin with known structure activates complement through the classical pathway. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:7451-7454.
16. Matsushita M., Fujita C.: Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serin protease. *J. Exp. Med.* 1992; 176:1497-1502.
17. Peterson S.V., Thiel S., Jensenius J.C.: The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Molec. Immunol.* 2001; 38:133-149.
18. Schifferli J.A., Paccaud J.P.: Complement and its receptor: a physiological transport system for circulating immune complexes. *Contrib. Nephrol.* 1989; 69:1-8.
19. Krych-Goldberg M., Atkinson J.P.: Structure-function relationships of complement receptor type I. *Immunol. Rev.* 2001; 180:112-122.
20. Medzhitov R., Janeway C.J.: Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 2000; 243:89-97.
21. Volanakis J.E., Frank M.M.: *The Human Complement System in Health and Disease*. New York; Marcel Dekker, 1998.
22. Grawford K., Alper C.A.: Genetics of the complement system. *Rev. Immunol.* 2000; 2:323-338.
23. Cooper N.R., Nemerow G.R.: Complement and infectious agents: a tale of disguise and deception. *Complement Inflamm.* 1989; 6:249-258.
24. Hugli T.E.: Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin. Immunol.* 1984; 7:193-219.
25. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2003; 1456-1457.
26. Barington R., Zhang M., Fischer M., Carroll M.C.: The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 2001; 180:5-15.