

normal and autoimmune sera. *Annuaire de l'Universite de Sofia "St. Kliment Ohridski"*, livre 4, partie I, tome 96, 17 – 24.

**СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ И
КОНГРЕСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА**

1. Dimitrov, I. D., M. Radanova, K. Popov, S. Lacroix-Desmazes, S. Kaveri, V. Frémeau-Bacchi, L. Roumenina. Heme inhibits the classical component pathways by direct binding to C1q. Annual Meeting of the French Society for Immunology, 24 – 26 November, 2010, Marseille, France

2. Dimitrov, T., M. Radanova, R. Boyadzhieva, D. Vankova, D. Ivanova. Genotype distribution and allele frequencies of six SNPs in C1q gene cluster in Bulgarian cohort. IX International Congress of Medical Sciences, 13 – 16 May, 2010, Sofia, Bulgaria

3. Radanova, M., L. Roumenina, T. Argirova, D. Ivanova. Anti-C1q globular head domain antibodies from SLE patient inhibit the C1q binding to IgG and CRP. 15th International Summer School on Immunology, 5 – 12 September, 2009, Hvar, Croatia

4. Radanova, M., L. Roumenina, K. Popov, D. Ivanova, V. Frémeau-Bacchi, J. Dimitrov. Complement system regulation by Fe(III) Protoporphyrin IX. 34th FEBS Congress, 4 – 9 July, 2009, Prague, Czech Republic

5. Vasilev V., I. Tsacheva, B. Deliyska, V. Stoianova, M. Radanova, M. Chorbadjieva, S. Petrova. Autoantibodies against the globular fragments of the individual chains of C1q in lupus nephritis. European Renal Association Meeting, May 10-13, 2008 Stockholm, Sweden

6. Radanova M., I. Tsacheva, L. Roumenina, T. Argirova, M. Kojouharova. Analysis of the specificity of the anti-C1q autoantibodies against globular regions of C1q. 3th International Congress of Medical Sciences, 13 – 16 May, 2004, Sofia

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ”
КАТЕДРА ПО БИОХИМИЯ МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА И
НУТРИГЕНОМИКА

Мария Атанасова Раданова

**ПРОУЧВАНЕ НА МОЛЕКУЛНИ ЕФЕКТИ ОТ
ИНХИБИРАНЕТО НА C1q
ПРИ БОЛНИ С ЛУПУСЕН НЕФРИТ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен “доктор”
(научна специалност 10.06.10 - Биохимия)

Научни ръководители:

Доц. Диана Иванова, дб

Доц. д-р Валентин Икономов, дмн

Научен консултант:

Доц. д-р Боряна Делийска, дмн

Рецензенти:

Доц. д-р Добрин Паскалев, дм

Доц. Димитър Ковачев, дб

Варна
2011

Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна и насочен за защита пред Научно жури.

Дисертационният труд обхваща 143 страници, 41 фигури и 13 таблици. Цитирани са 160 заглавия.

Дисертантката е главен асистент в Катедрата по Биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна.

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в:

- Катедрата по Биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна;
- Катедра Биохимия при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“;
- INSERM U872, екип 13 и екип 16, Париж, Франция
- Националната референтна лаборатория за изследване на белтъците от системата на комплемента при Европейската болница „Жорж Помпиду“, Париж, Франция;
- INSERM U845 при Болница “Некер”, Париж, Франция.

Експерименталната работа по дисертационния труд е финансирана в рамките на два научно-изследователски проекта:

1. “Изследване на пациенти от Североизточна България за C1q дефицити и наличието на C1q антитела.”, финансиран от фонд “Научни изследвания” при Русенски университет “Ангел Кънчев”, 2001/2002 – 2003/2004 уч. год., с ръководител гл. ас. М. Раданова
2. “Връзка на мутации и полиморфизми в гените за C1q компонента на системата на комплемента със Системния лупус еритематодес.”, по Програмата “РИЛА” за българо-френско научно сътрудничество, договор № DO-02-17/03.12.2008, 2008 – 2010 год., с ръководител доц. Д. Иванова, дб.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на от часа в

Материалите във връзка със защитата са на разположение в библиотеката на Медицински университет – Варна, ул. “Марин Дринов” №55, гр. Варна

3. За първи път са открити антитела срещу глобуларния фрагмент на C1q (анти-gC1q антитела) в пациенти с доказана лупусна нефропатия.

4. Открит е специфичен инхибиращ ефект на анти-gC1q антителата върху взаимодействието на C1q с прицелните му молекули – IgG и CRP.

5. За първи път е установен инхибиторен ефект на хема върху IgG- и CRP-медираната комплементна активация чрез директно свързване с C1q.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

Radanova M., Vasilev V., Deliyska B., Kishore U., Ikononov V., and Ivanova D. (2011) Anti-C1q autoantibodies specific against the globular domain of the C1qB-chain from patient with lupus nephritis inhibit C1q binding to IgG and CRP. *Immunobiology* (подадена за печат след първа рецензия).

1. Roumenina L. T., Radanova M., Atanasov B. P., Popov K. T., Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S., Fremeaux-Bacchi V. and Dimitrov J. D. (2011) Heme interacts with C1q and inhibits the classical complement pathway. *J Biol Chem* 286, 16459-69. (IF – 5,328)

2. Tsacheva I., Radanova M., Todorova N., Argirova T. and Kishore U. (2007) Detection of autoantibodies against the globular domain of human C1q in the sera of systemic lupus erythematosus patients. *Mol Immunol* 44, 2147-51. (IF – 3,742)

3. Deliyska B., I. Tsacheva, M. Radanova, V. Stoianova, M. Tchorbadjieva and Dobрева. N. (2007) Lupus nephritis sera contain autoantibodies that recognize epitopes within the globular fragment of C1q. *Med Pregl* 60 Suppl 2, 25-7.

4. Раданова, М., Л. Руменина, Ив. Цачева. C1q – една удивителна молекула. Силистра: Издателство и печатница “Ритг”, 2006. – 68 с., ISBN-10: 954-759-145-2

5. Radanova, M., I. Tsacheva, T. Argirova and Kojouharova. M. (2005) Interaction of recombinant globular head regions of C1q with

По отношение на генетичните дефекти, като инхибитори на C1q, само полиморфизмите не се отразяват значително върху експресията и функционалната активност на C1q и на настоящия етап не може да се твърди, че имат значение за появата и развитието на СЛЕ и лупусен нефрит.

От изложените в настоящата дисертация резултати произтичат следните изводи:

ИЗВОДИ

1. Полиморфизмите rs587585, rs292001, rs294179 и rs631090 в гените за C1q като генетичен ефект не се отразяват съществено върху нивата и функционалната активност на молекулата.

2. Новооткрита мутация, препятстваща свързването на C1r и C1s към C1q в C1 компонента на системата на комплемента, води до функционален C1q дефицит.

3. Автоантитела срещу глобуларния фрагмент на C1q (анти-gC1q антитела) се откриват в серуми на пациенти с лупусна нефропатия, но не и в серуми на здрави доброволци.

4. Анти-gC1q антитела, насочени към В-веригата на C1q, имат инхибиторен ефект върху взаимодействията на C1q с негови прицелни молекули.

5. Хемът може да се разглежда като ендегенен ефектор, който в условия на неуместно комплементно активиране инхибира взаимодействията на C1q и модулира комплементната активация.

ПРИНОСИ

1. За първи път са получени данни за алелните честоти за четири различни полиморфизма (rs587585, rs292001, rs294179 и rs631090) в гените за C1q в здрави доброволци и в пациенти с лупусен нефрит от България и е установена липса на корелация между алелните честоти и риска от развитие на заболяването.

2. За първи път е открит и характеризирани функционален дефицит на C1q, асоцииран с нормални плазмени нива на C1q.

Въведение.....	5 стр.
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	7 стр.
I. РЕЗУЛТАТИ.....	9 стр.
Търсене на полиморфизми (SNPs) в гените за C1q, асоциирани с ниски плазмени нива на C1q.....	9 стр.
Определяне на хемолитичната активност на комплемента и нивата на C1q, C3 и C4 в плазмата при здрави доброволци и пациенти с лупусен нефрит.....	9 стр.
Скриниране за четири предварително избрани полиморфизми в гените за C1q.....	10 стр.
Подбор на полиморфизми в гените за C1q.....	10 стр.
Определяне на алелните честоти на избраните полиморфизми сред здравите доброволци и пациентите със СЛЕ.....	10 стр.
Изследване на зависимост между наличието на даден генотип и плазмените нива на C1q.....	11 стр.
Хаплотипен анализ на избраните полиморфизми.....	12 стр.
Търсене на мутации в гените за C1q, асоциирани с ниски плазмени нива или променена функционална активност на C1q.....	13 стр.
Новооткрита мутация в гените за C1q, водеща до променена функционална активност на протеина.....	13 стр.
Анализ на комплементните белтъци.....	13 стр.
Генетичен анализ.....	14 стр.
Формиране на активен C1 комплекс.....	15 стр.
Функционални тестове на мутантния C1q.....	15 стр.
Активиране на системата на комплемента върху късни апоптотични клетки.....	16 стр.
I. ДИСКУСИЯ.....	18 стр.
Мутации и полиморфизми (SNPs) в гените на C1q като ендеогенни фактори, понижаващи плазмените нива на C1q или неговата функционална активност.....	18 стр.
II. РЕЗУЛТАТИ.....	22 стр.
Изследване на серуми от пациенти със СЛЕ за наличие на анти-C1q антитела.....	22 стр.
Оптимизиране на условията за провеждане на скрининга за анти-C1q антитела.....	22 стр.
Скрининг на серуми от здрави доброволци и пациенти със СЛЕ за анти-C1q антитела.....	22 стр.
Анти-gC1q антитела в серумите на здравите доброволци и пациенти със СЛЕ.....	23 стр.
Изследване на антигенната специфичност на анти-gC1q антителата в избрани серуми.....	27 стр.
Характеризиране на функционалната активност на откритите анти-gC1q антитела.....	29 стр.
III. ДИСКУСИЯ.....	33 стр.
Анти-C1q антителата като инхибитори на взаимодействията на C1q с прицелни молекули.....	33 стр.
III. РЕЗУЛТАТИ.....	38 стр.
Инхибиране на функциите на C1q от хем.....	38 стр.
Инхибиране на класическия път за активиране на системата на комплемента от хем.....	38 стр.
Инхибиране на взаимодействията на C1q с IgG и CRP от различни металопорфирини.....	40 стр.
Взаимодействие на C1q с хем.....	41 стр.
III. ДИСКУСИЯ.....	43 стр.
Хемът като инхибитор на взаимодействията на C1q с прицелни молекули.....	43 стр.
ИЗВОДИ.....	46 стр.
ПРИНОСИ.....	46 стр.
СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА.....	47 стр.
СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ И КОНГРЕСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА.....	48 стр.

Използвани съкращения

анти-gC1q антитела	– анти-C1q антитела, насочени срещу GHR
анти-C1q антитела	– анти-C1q антитела, насочени срещу CLR
двДНК	– двойно верижна ДНК
КЕНИ	– Комисия по етика на научните изследвания
СЛЕ	– Системен лупус еритематодес
ЦИК	– циркулиращи имунни комплекси
ACR	– Americal College of Rheumatology
Ag-Ab	– антиген-антитяло
Arg	– аргинин
B2S	– бетулин дисулфат
CEPS	– Conformational Epitope Prediction Server
CLR	– Collagen-Like Region – колагеноподобен район
CRP	– C-reactive Protein – C-реактивен протеин
DMSO	– диметилсулфоксид
ELISA	– Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ензимосвързан имуносорбентен анализ
F2S	– 9,9-бис(4'-хидроксифенил)флуорен дисулфат
gC1q	– глобуларен фрагмент на C1q
ghA, ghB, ghC	– globular head A, B, C – рекомбинантни глобуларни фрагменти на A-, B- и C- веригите на C1q
GHR	– Globular Head Region – глобуларен район на C1q
Gly	– глицин
HPIX	– хематопорфирин IX
HRP	– Horse Reddish Peroxidase – пероксидаза от хрян
His	– хистидин
HUVEC	– Human Umbilical Vein Endothelial Cells – човешки ендотелни клетки от пъпна връв
IgG	– Immunoglobulin G – Имуноглобулин от клас G
IgM	– Immunoglobulin M – Имуноглобулин от клас M
LMW-C1q	– Low Molecular Weight-C1q – нискомолекулен C1q
LPS	– Lipopolysaccharide от <i>E. coli</i> – липополизахарид
Lys	– лизин
MAC	– Membrane Attack Complex – мембрано-атакуващ комплекс
NHS	– Norml Human Sera – сборен нормален серум
PBS	– Phosphate Buffered Saline – фосфатен буфер, съдържащ 0,145M NaCl
pIgG	– polymeric IgG – полимерен IgG
PnC	– pneumococcal C-polysaccharide – пневмококов C-полизахарид
PP	– протопорфирин
PTX3	– Prototypic Long Pentraxin 3 – прототипен дълъг пентраксин
RFI	– Relative Fluorescence Intensity – относителна флуоресцентна интензивност
SAP	– Serum Amyloid P – серумен амилоид P
Ser	– серин
SNP	– Single Nucleotide Polymorphism – единичен нуклеотиден полиморфизъм
Tyr	– тирозин

2010; Petry et al., 1995) и C1q инхибитор (хондроитин-4 сулфат) (Galanakis and Ghebrehiwet, 1994) могат да осуетят вредните ефекти, които могат да възникнат в резултат от неуместно комплементно активиране. В много случаи обаче тези инхибитори са недостатъчни да предотвратят комплементната атака, затова е необходимо разработването на синтетични инхибитори на първите етапи от комплементната каскада (Peypus et al., 2006; Roos et al., 2001; 2002).

На основата на получените резултати може да се твърди, че хемът е ендегенен отрицателен регулатор на активацията на комплемента по класическия път. И наистина, в случаите, когато се откриват високи нива хем, например при малария и исхемия/реперфузия, ролята на системата на комплемента, активирана по класическия път, е много малка (ако изобщо има такава) (Pawluczko-wycz et al., 2007). Ето защо, хемът, който се освобождава при тъканни увреждания, по всяка вероятност модулира активирането на комплементната каскада по класическия път. Затова синтетични молекули със структура, подобна на хема, биха могли да се използват като бъдещи терапевтични агенти.

Поставената цел на настоящия дисертационен труд беше да се проучи действието на три ендегенни механизма на инхибиране на C1q при болни с лупусен нефрит: наличието на генетичен дефект – мутация или полиморфизъм в гените за C1q; наличието на анти-C1q автоантитела и взаимодействието на C1q с хема, с оглед изясняване на ролята на C1q в патогенезата на СЛЕ.

Известно е, че молекули, взаимодействащи с GHR на C1q могат да инхибират комплементната активация (Roos et al., 2002). Такива от разглежданите ендегенни инхибитори са анти-gC1q автоантителата и хема. В условия на патология те могат да ограничат уврежданията на собствените тъкани. Ето защо 70% от серопозитивните, за анти-gC1q антитела, пациенти бяха в ремисия. Докато молекули, свързващи се с CLR на C1q, като анти-C1q автоантителата не могат да ограничат комплементната активация, но напротив водят до нейното засилване. Но ролята на всеки инхибитор на C1q в патогенезата на СЛЕ трябва да се разглежда по отношение на това в какъв етап от развитието на болестта се включва. Защото анти-gC1q антителата макар и да инхибират комплементната атака, ако възникнат в началото на болестта биха могли да провокират сериозни тъканни увреждания поради инхибиране на C1q функциите при чистенето на апоптотични клетки и имунни комплекси.

инхибират C1q (фиг. 19, А). Тези резултати показват, че металният йон в молекулата на порфирините играе съществена роля за наблюдаваната инхибиторна активност.

Известно е, че други хетероциклени съединения, подобни в структурно отношение на хема, могат да инхибират функциите на C1q. Така неконюгираният билирубин (продукт от разграждането на хема) във високи концентрации при увреждания на черния дроб или при хемолитична анемия свързва C1q и инхибира класическия път за активация на комплемента (Arriaga et al., 1999; Basiglio et al., 2007). Освен това, синтетични хетероциклени съединения, като бисфенил дисулфати, сулфатирани стероиди и тритерпеноиди, също инхибират комплементната каскада на нива C1q (Bugeeva et al., 2005; 2007). Две от тези съединения – бетулин дисулфат (B2S) и 9,9-бис(4'-хидроксифенил)флуорен дисулфат (F2S) са изучени детайлно от Roumenina и сътр (2007). Авторите установяват, че B2S и F2S, свързвайки се с gC1q, инхибират взаимодействието му с IgG и CRP чрез модулиране на електростатичните свойства на белтъка. B2S и F2S възпрепятстват както правилната макродиполна ориентация на C1q към прицелните молекули, така и ротацията на gC1q. Това обяснява много по-силния им инхибиторен ефект, когато се анализира активацията на комплемента, в сравнение с директното свързване. Свързващите места за хема в молекулата на C1q, предсказани чрез докинг, са различни от тези, предсказани за B2S и F2S, но ефектът върху преориентацията на векторите на електричните моменти на gC1q е подобен (Roumenina et al., 2011). Затова може да се твърди, че хемът е ендегенен ефектор, който променя свързващите свойства на C1q чрез модулиране на неговите физико-химични характеристики.

Системата на комплемента играе парадоксална роля в развитието и експресията на имунния отговор. От една страна, участва в защитата на организма срещу бактериални инфекции, но от друга активирането на системата на комплемента при различни патологични състояния води до увреждане на собствени тъкани. Известно е, че неуместното активиране на комплемента води до тъканни увреждания в условия на остро възпаление, исхемия/реперфузия, трансплантация, мозъчен инсулт, инфаркт на миокарда, хемолитична анемия, имунокомплексни заболявания, малария и др. (del Zoppo, 1999; Griselli et al., 1999; Pawluczko-wycz et al., 2007; Weiser et al., 1996). Няколко естествени инхибитора на първите етапи от комплементната каскада по класическия път, като C1 инхибитор (Castellano et al.,

Комплементът е сложна система с изключително значение за поддържане на функционалната цялост на организма. Тя е съставена от над 30 белтъка и се активира чрез поредица от отделни актове на междумолекулно разпознаване. Комплементът е отговорен не само за защитата от инфекции, но и за засичане на сигнали за опасност в организма – т.е. тя разпознава както патогени, така и променени или увредени собствени структури. Системата на комплемента се активира по три пътя: класически, лектинов и алтернативен.

Обект на настоящата дисертация е C1q – разпознаваща молекула на класическия път на системата на комплемента, която взаимодейства с широк набор от прицелни молекули, като ги разпознава или пряко чрез глобуларния си фрагмент (GHR), или чрез посредничеството на IgG или CRP. Чрез взаимодействието си с прицелните молекули C1q осъществява важна връзка между вроденния и придобития имунитет и играе съществена роля в поддържането на имунологичната толерантност към собствени структури.

Функционалната значимост на C1q може да се обобщи с участието ѝ в три важни физиологични процеса:

- ✓ Активиране и модулиране на системата на комплемента по класическия път: C1q осъществява активирането на комплемента чрез свързване с лиганди от повърхността на бактерии или вируси или с антиген – антитяло комплекси (имунни комплекси) чрез Fc участъка на влизащите в тях имуноглобулинови молекули от клас G и M.
- ✓ Предотвратяване на образуване и отстраняване на вече възникнали имунни комплекси, причина за възпаления и тъканни увреждания: C1q предотвратява оформянето на големи имунокомплексни мрежи. Патологични състояния, като Системен лупус еритематодес (СЛЕ), са свързани с тъканно отлагане на имунни комплекси.
- ✓ Отстраняване на апоптотични клетки: C1q е в състояние да се свърже с апоптотичните клетки не само директно, но и чрез – RTX3, CRP, SAP, както и естествен IgM. C1q участва в тези взаимодействия с глобуларния фрагмент (GHR).

Влиянието на инхибитори или инхибиторни механизми върху C1q може да повлияе изпълнението на посочените важни биологични функции и да създаде условия на C1q дефицит в организма, при които да се натрупат апоптотични клетки и имунни комплекси, кои-

то да отключат автоимунно заболяване. Затова дефицитът на C1q – генетичен или функционален се определя като най-силният рисков фактор за развитие на СЛЕ. Пациенти със СЛЕ с лупусна нефропатия развиват вторичен C1q дефицит, дължащ се на C1q изразходване по време на острата фаза на заболяването или на генерирането на автоантитела срещу C1q.

Известно е, че C1q има както анти-възпалителна, така и провъзпалителна активност, като се явява фактор, отговорен за значителните тъканни увреждания, например при лупусния нефрит. В този случай инхибирането на C1q и комплементната активация може да предотврати последващите бъбречни усложнения. Така физиологични инхибиторни ефекти върху функционалната активност на C1q при патологични състояния могат да доведат до потискане на неадекватно и неконтролирано активиране на комплементната каскада.

Противоречивата роля на C1q в патологията на лупусния нефрит определи интереса ни към изследване на влиянието на три ендеогенни инхибиторни механизма върху биологичните функции на белтъка. Значението на проучванията в тази област се крие от една страна във факта, че неконтролираното активиране на комплементната каскада е отговорно за бъбречните увреждания при лупусния нефрит и е част от патогенезата при СЛЕ. Но от друга страна инхибирането на важни функции на C1q, като чистенето на апоптотични клетки и имунни комплекси, също води до развитието на СЛЕ и гломерулонефрит.

Основната цел на настоящия десертационен труд е да се проучи действието на три ендеогенни механизма на инхибиране на C1q при пациенти с лупусен нефрит с оглед изясняване на ролята на C1q в патогенезата на СЛЕ.

Трите ендеогенни инхибиторни механизма бяха:

- ✓ Наличие на генетичен дефект – мутация или полиморфизъм в гените за C1q, водещ до потисната експресия на молекулата или до нарушена функционална активност;
- ✓ Наличие на анти-C1q автоантитела като инхибитори на взаимодействието на C1q с негови прицелни молекули;
- ✓ Взаимодействие на C1q с хема като инхибитор на активацията на комплемента по класическия път.

Специфичното свързване на хема с C1q е оценено чрез добавяне на нарастващи концентрации хемин (0 – 20,5 μM) в кювети, съдържащи 0,4 μM C1q. Като контрола е използван фосфатен буфер. Кривата е построена като функция на разликата в абсорбциите при 395 nm на C1q/хемин и хемин (ΔC1q/хемин-Ахемин) от моларната концентрация на хемина. (B.) Детекция на свързването на хема с C1q чрез биосензорни измервания. Профилите в реално време на взаимодействието са генерирани чрез инжектиране на нарастващи концентрации на хемин (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 и 1 μM) върху имобилизиран C1q. Асоциацията и дисоциацията на хемина към C1q е проследена за 7 и 10 мин., съответно.

III. ДИСКУСИЯ

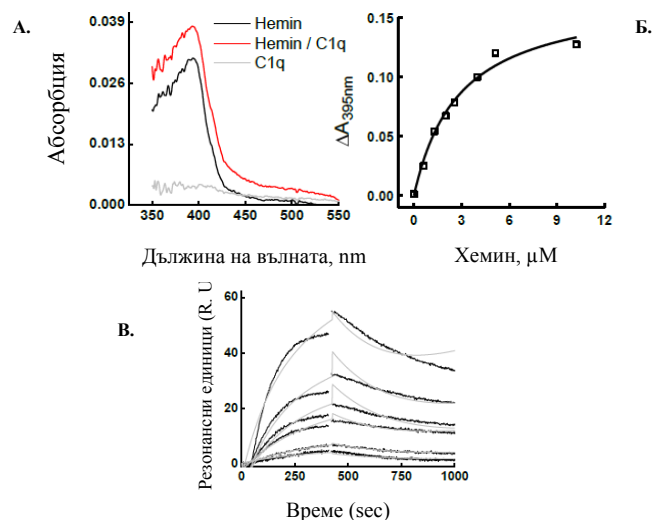
Хемът като инхибитор на взаимодействията на C1q с прицелни молекули

Резултатите показват, че хемът може да инхибира IgG- и CRP-медираната комплементна активация чрез директно свързване с C1q (фиг. 18). Инхибиторният ефект на хема е в резултат на промени в молекулярния механизъм на взаимодействията на C1q с негови прицелни молекули. Спектроскопските и биосензорните анализи показваха, че хемът и C1q се свързват в микромолярно съотношение, като две молекули хем свързват директно всеки от шестте gC1q домена (фиг. 20). Спектралните данни получени, чрез абсорбционна и флуоресцентна спектроскопия (в INSERM U872) показаха, че липсата на промени в абсорбционите максимуми вероятно означава, че хемът се свързва с повърхността на белтъка. Известно е, че хемът е с хидрофобна природа и взаимодейства с хидрофобни участъци от белтъчните молекули, с участъци богати на ароматни аминокиселини (Roumenina et al., 2011). В молекулата на C1q ароматните аминокиселинни остатъци са съсредоточени в глобуларните домени (Gabogaud et al., 2003; 2004). С цел да се потвърдят получените експериментални резултати беше извършен молекулен докинг на хема към gC1q, при което се установи, че хемът се свързва близо до Trp^{A122} свързващия участък в А-веригата и в близост до Trp^{C190} за свързващия участък за С-веригата (Roumenina et al., 2011).

Беше установено, че не само хемът е в състояние да инхибира взаимодействията на C1q с IgG и CRP. Co(III)PP, Mg(II)PP и Zn(-II)PP също показаха потенциална инхибиторна активност върху взаимодействията на C1q (фиг. 19, А). От друга страна, порфирина, съдържащи Sn(IV), Mn(III) и Cr(III) йони или без метални йони, като хематопорфирин IX (HPIX), показаха много по-слаб потенциал да

използването на спектроскопски методи. UV/Vis абсорбционният спектър на окислен хем показва увеличение на моларния екстинкционен коефициент в областта на Soret (при 400 nm) в присъствие на C1q (фиг. 20, А). Титруването на C1q с увеличаване на концентрацията на хемин (при 12-кратен излишък на хем) доведе до съществено увеличение на абсорбцията в областта на Soret. Тези данни показаха, че хеминът се свързва с C1q молекулата и че всяка молекула C1q свързва 12 молекули хемин (т.е. 2 молекули хемин за gC1q).

За да бъде потвърдено и по друг експериментален начин свързването на хемина с C1q, както и да бъде характеризирани кинетиката на това взаимодействие, беше приложен метод, основан на повърхностния плазмонен резонанс. Инжектирането на хемин върху имобилизиран C1q доведе до концентрационно-зависимо взаимодействие между хемин и C1q (фиг. 20, Б). Оценката на кинетичните параметри на това взаимодействие разкри, че хеминът и C1q се свързват в границите от 1 до 2 μM. Взаимодействието се характеризираше с бавна асоциация, $k_a = 3,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и относително бърза дисоциация, $k_d = 3,44 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.



Фиг. 20. Свързване на хема с C1q. (А.) Абсорбционен спектър (350-550 nm) на 0,2 μM C1q, на 0,2 μM C1q, предварително инкубиран за 5 мин. с 0,8 μM хемин и на 0,8 μM хемин. Абсорбционният спектър е измерван във фосфатен буфер, рН 7,4 при 20 °C чрез кювети с 1 cm оптичен път. (Б.)

За изпълнение на поставената цел бяха формулирани следните задачи:

1. Да се изследва представителна извадка от здрави доброволци и пациенти със СЛЕ за наличие на генотип, асоцииран с ниски плазмени нива на C1q при подбрани полиморфизми в гените за C1q.
2. Да се изследват пациенти със СЛЕ за мутации в гените за C1q, асоциирани с ниски плазмени нива или променена функционална активност на C1q.
3. Да се извърши скрининг на серуми от пациенти със СЛЕ за наличие на анти-C1q автоантитела и анти-gC1q автоантитела.
4. Да се изследва антигенната специфичност на откритите анти-gC1q антитела и да се характеризира тяхната функционална активност.
5. Да се изследва влиянието на хема върху способността на C1q да активира системата на комплемента.
6. Да се проследи влиянието на различни порфирини върху взаимодействието на C1q с негови прицелни молекули.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛИ

1. Химикали с качество “за анализ”, произведени от фирмите: Difco, Fluka, Gibco, Merck, Calbiochem, Pharmacia, Serva, Sigma-Aldrich, Macherey-Nagel, Frontier Scientific, Baxter, Madtera, Quidel и др.
2. *E. coli* щам BL21, носещ рекомбинантни плаزمиди: pKBM-ghA, pKBM-ghB, pKBM-ghC с нуклеотидните последователности за глобуларните райони на А, В- и С-веригите.
3. Антитела и ензимни конюгати

ПАЦИЕНТИ И ЗДРАВИ ДОБРОВОЛЦИ

Бяха изследвани 196 здрави доброволци. На базата на ревизираните диагностични критерии на АСР от 1997 год. бяха подбрани 62 пациенти с диагностициран Системен лупус еритематодес (СЛЕ). От тях 46 бяха с биопсично диагностицирана лупусна нефропатия.

Настоящото проучване стартира след разрешение от КЕНИ при Медицински университет – Варна.

МЕТОДИ

ПРЕПАРАТИВНИ МЕТОДИ

1. Пречистване на C1q от човешка плазма.
2. Експресия и пречистване на рекомбинантни химерни аналози на А-, В-, С-веригите на C1q (ghA-MBP; ghB-MBP; ghC-MBP).
3. Получаване на модулспецифични антитела.
4. Изолиране на геномна ДНК.

АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ

1. Полиакриламидна гелна електрофореза в присъствие на натриев додецилфосфат (SDS – PAGE).
2. CH50 тест.
3. Ензимно – свързан имуносорбентен анализ (ELISA):
 - за определяне нивото на C1q;
 - за определяне нивата на C3 и C4;
 - за определяне нивото на анти-C1q антитела;
 - за определяне на инхибиторния ефект на модулспецифични автоантитела върху взаимодействията на C1q с CRP и IgG;
 - за C3 депозиция при активиране на системата на комплекта по класическия път в присъствие на хем;
 - за формирането на C1 комплекс;
 - за регистриране на взаимодействията на C1q с негови прицелни молекули.
4. Поточна цитометрия за изследване на активиране на системата на комплекта върху късни апоптотични клетки.
5. Real Time PCR за анализ на честотата на SNP.
6. Секвениране за търсене на мутации в гените за C1q.
7. Метод за проследяване на межумолекулните взаимодействия в реално време основан на повърхностния плазмонен резонанс (Biacore 2000).
8. Абсорбционна спектроскопия.
9. Статистически анализи чрез статистически софтуер GraphPad Prism 5.01.

БИОИНФОРМАТИЧНИ МЕТОДИ

1. SNPStats за определяне на честотата на SNP.
2. PyMOL за визуализация на структурата на gC1q.
3. CEPS за определяне на антигенните детерминанти на gC1q.

свързването на C1q с mCRP, pCRP и IgG1 е определен в реално време чрез метод основан на повърхностния плазмонен резонанс. C1q (0,1μM) е експониран на нарастващи концентрации на металопорфирини (0-30μM) и инжектиран в системата за 5 мин. върху предварително имобилизирани IgG, mCRP и pCRP. На графиката е показан % остатъчно свързване на C1q като функция от концентрацията на порфирини. Свързването на нативен C1q е прието за 100 %. Всички разтвори на металопорфирините са в DMSO с изключение на Mg(II)PP, който е разтворен във вода. Профили в реално време на взаимодействието на нативен и третиран с хематин C1q с IgG1, pCRP и mCRP (Б.). C1q (0,1μM) е експониран на нарастващи концентрации на металопорфирини или само в разтворител. Профилите са генерирани чрез инжектиране в системата на нарастващи концентрации на C1q (5; 2,5; 1,25; 0,625, 0,312 и 0,156nM) върху сензорни чипове, предварително имобилизирани с IgG1, mCRP и pCRP. Зависимото от времето свързване на C1q при посочените условия е представено в резонансни единици.

При третиране на C1q с хемовия аналог – хематопорфирин IX (порфирин със сходна на хема структура, но лишен от централен железен йон и с модифицирани винилни групи), бе наблюдаван значително по-слаб инхибиторен ефект върху взаимодействията на C1q с IgG1 и CRP (фиг. 19, А). Беше изследвана също и ролята на металните йони в молекулата на металопорфирините в процесите на инхибиране на C1q взаимодействията. Co(II)PP, Mg(II)PP и Zn(II)PP показаха силен инхибиторен ефект върху взаимодействията на C1q с неговите прицелни молекули, докато експонирането на C1q на Sn(IV)PP, Mn(III)PP и Cr(III)PP доведе до слабо инхибиране на взаимодействията му (фиг. 19, А). Ni(II)PP имаше междинен инхибиторен ефект върху свързването на C1q с IgG и CRP.

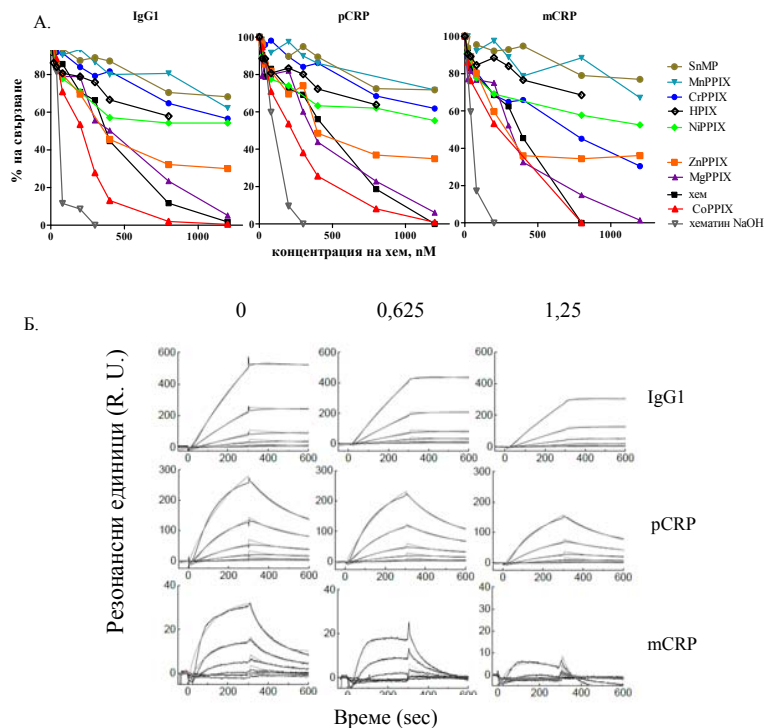
Възможността хемът да предизвиква промени в IgG и CRP, които после да се отразяват на C1q взаимодействията, беше проверена чрез претретиране на свързаните с IgG и CRP повърхности на сензорните чипове с много висока концентрация на хемин. Получените свързващи профили след последващо инжектиране на C1q бяха идентични с тези при свързване на C1q върху нетретирани повърхности, което показва, че хемът не повлиява структурата на имобилизираните IgG и CRP .

Взаимодействие на C1q с хем

На базата на получените резултати беше изказана хипотеза, че инхибирането на взаимодействията на C1q с негови прицелни молекули вероятно се дължи на директно свързване на хема с C1q. Специфичната структура на хема позволи тази хипотеза да бъде проверена чрез

Инхибиране на взаимодействията на C1q с IgG и CRP от различни металопорфирини

Механизмът на металопорфирин-медираното инхибиране на системата на комплемента по класическия път беше проучен чрез изследване взаимодействията на C1q с негови прицелни молекули – IgG1 и CRP в реално време чрез метод основан на повърхностния плазмонен резонанс. При това изследване бяха използвани пентамерната и мономерната форми на CRP, тъй като и за двете се предполага, че имат физиологично значение и са в състояние да взаимодействат с C1q (Biro et al., 2007; Eisenhardt et al., 2009a; 2009b; Ji et al., 2006; 2007). Експонирането на C1q на нарастващи концентрации на хем показва концентрационнoзависимо намаляване на свързването на C1q с IgG1 и с CRP (фиг. 19).



Фиг. 19. Инхибиране на взаимодействието на C1q с IgG1 и с CRP от различни порфирини. (А.) Инхибиторен ефект на различни порфирини върху

Търсене на полиморфизми (SNPs) в гените за C1q, асоциирани с ниски плазмени нива на C1q

Определяне на хемолитичната активност на комплемента и нивата на C1q, C3 и C4 в плазмата при здрави доброволци и пациенти с лупусен нефрит

От изследваните 62 пациенти с диагностициран Системен лупус еритематодес (СЛЕ) 46 бяха с биопсично доказана лупусна нефропатия. Известно е, че лупусният нефрит може да се развие или като резултат от наследствен C1q дефицит, или в резултат от засилена активация на комплемента по класическия път.

Наследственият C1q дефицит се характеризира, освен с много ниски нива или липса на C1q в плазмата, и с отсъствие на комплементна хемолитична активност, трайно ниски или нормални C3 нива и нормални нива на C4.

Активността на лупусният нефрит при пациенти без мутация или полиморфизъм в гените за C1q корелира с ниски плазмени нива на C3, C4 и C1q. Това се обяснява със засилена активация на системата на комплемента по класическия път, при която C1q в плазмата се изчерпва.

За нито от един от подобрите 46 пациенти не беше дефинирана причина за лупусната нефропатия от клиницистите, провеждали лечението. Затова в настоящото изследване беше поставена задача да бъдат определени плазмените нива на C1q, C3 и C4, както и хемолитичната активност на комплемента (CH50) при 46-те пациенти. За да могат да бъдат оценени количествено получените данни, трябваше да бъдат определени референтните граници за C1q, C3, C4 и CH50 в 196 здрави доброволци. Данните са представени в табл. 1.

Табл. 1. Референтни граници за CH50, C1q, C3 и C4 в българската извадка от 196 здрави доброволци.

мест	Норма в българската извадка
CH50	99% (SD = ±23%)
C1q	59 – 178 µg/ml (± 2SD, n = 196)
C3	612 – 1444 µg/ml (± 2SD, n = 196)
C4	84 – 396 µg/ml (± 2SD, n = 196)

Установени бяха относително ниски стойности за CH50 теста при болшинството от пациентите със СЛЕ – средна стойност 43%

(SD = ±13%), при очаквана ниска хемолитична активност в тази група. От изследваните 46 пациенти с лупусна нефропатия за 38 бяха получени данни за хемолитична активност на комплемента, като 39% от тях (11 на брой) имаха CH50 в долните граници на нормата. В плазмата на пациентите бяха установени C3 нива в границите на нормата, като само при един пациент имаше нива на C3 под нормата. Получените по-ниски нива на C4 при пациентите, в сравнение с тези при здравите доброволци, предполагаха и ниски нива на C1q, което би потвърдило засилена активация на комплемента по класическия път. Затова следващата задача беше изследване на нивата на C1q в тези пациенти. Намерени бяха C1q нива при пациентите, значително по-ниски от тези при здравите доброволци ($p < 0.0001$), като понижените нива на C1q при пациентите с лупусен нефрит се съпътстваха с понижени нива на C4 в плазмата.

Скриниране за четири предварително подбрани полиморфизма в гените за C1q

Подбор на полиморфизми в гените за C1q

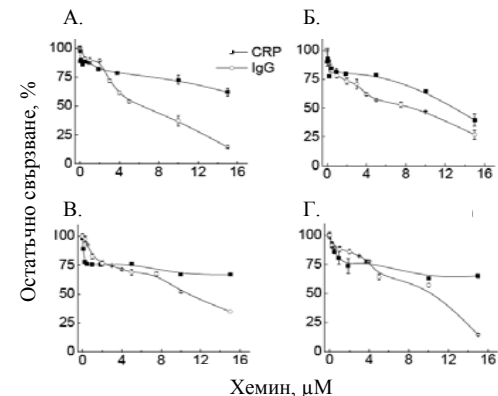
Бяха избрани 4 полиморфизма (SNPs) в C1q генния кластер за A-, C- и B-веригите на C1q, за които по литературни данни е открита асоциация с развитие на СЛЕ и ниски нива на C1q (Martens et al., 2009). В табл. 2 са представени данни за номера, алелите и локализацията на избраните четири SNPs. Здравите български доброволци и пациенти със СЛЕ бяха изследвани за посочените SNPs.

Табл. 2. Номер, алели и локализация на изследваните четири SNPs в гените за трите вериги на C1q.

rs SNP	алели	Локализация
rs587585	T/C	5' края на C1qA гена, покрива C1qA промоторния район
rs292001	A/G	2 интрон на C1qA гена, покрива част от C1qA гена
rs294179	C/T	3' края на C1qC гена
rs631090	T/C	2 интрон на C1qB гена, покрива част от C1qB гена

Определяне на алелните честоти на подбраните полиморфизми сред здравите доброволци и пациентите със СЛЕ

Честотите на срещане на отделните генотипове за всеки един от четирите подбрани SNPs бяха сравнени в двете изследвани групи – здрави доброволци и пациенти със СЛЕ (фиг. 1, А-Г).



Фиг. 18. Инхибиране на активирането на системата на комплемента по класическия път от хемин. Способността на нативен и изложен на хемин C1q да свързва IgG-съдържащи имунни комплекси или CRP и да активира системата на комплемента е оценена чрез ELISA. C1q (0,1μM) е експониран на нарастващи концентрации хемин (0-15μM) и инкубиран с имобилизирани имунни комплекси (тетанус токсин – анти-тетанус токсин антитела от приготвянето на IVIg) и PnC-свързан CRP. C1q-дефицитен серум е добавян като източник на комплементни белтъци. (А.) C1q свързване; (Б.) C3 депозиция, отчитана чрез анти-C3 антитела; (В.) Формиране на МАС; (Г.) sC5b-9 освобождаване, измерен чрез Quidel ELISA kit. Резултатите за нативния C1q са приети за 100%.

Инхибирането на C3 депозицията върху IgG-съдържащите имунни комплекси достигна повече от 80% при 15μM хемин и до 50% при 6μM хемин. Депозицията на C3 при CRP беше около 60% в присъствие на 15μM хемин (фиг. 18, Б). IgG-съдържащите имунни комплекси активираха терминалните етапи от комплементната активация по-силно от PnC-CRP. При 15μM хемин беше наблюдавано повече от 50% инхибиране на формирането на МАС (фиг. 18, В) и sC5b-9 (фиг. 18, Г) при IgG-съдържащи имунни комплекси. Инхибирането на терминалните етапи от комплементната активация при PnC-CRP, в сравнение с тези при IgG-съдържащите имунни комплекси, беше по-слабо.

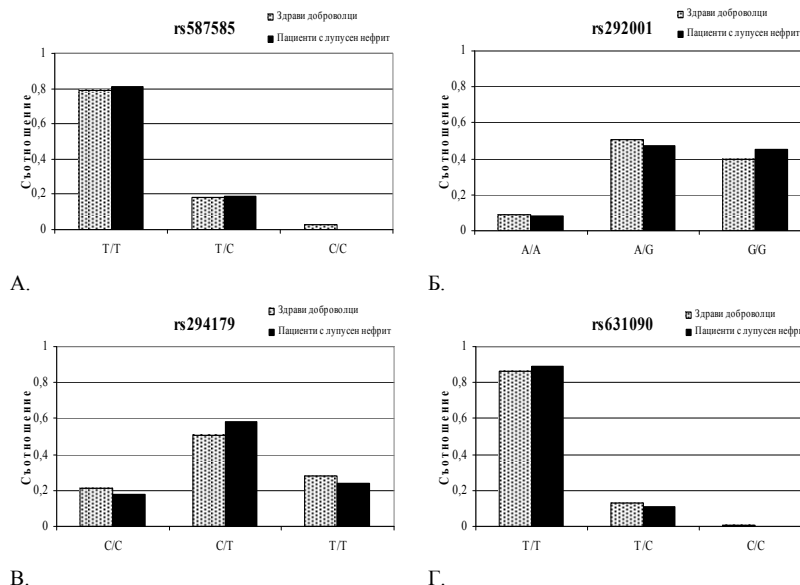
и латералната повърхност на В-веригата (фиг. 17). Фактът, че анти-ghA и анти-ghC антителата показаха по-слаб инхибиращ ефект или липса на такъв върху свързването на C1q с IgG и CRP (фиг. 15 и 16), предполага, че техните епитопи вероятно са локализирани далеч от прицелните свързващи места. Те, по всяка вероятност, лежат на латералната повърхност на ghA и ghC, като така gC1q връхът и латералната повърхност на В-веригата остават свободни за взаимодействие с IgG и CRP.

III. РЕЗУЛТАТИ

Инхибиране на функциите на C1q от хем

Инхибиране на класическия път за активиране на системата на комплемента от хем

Предходни изследвания на Dimitrov и стр. (2007) установиха, че разпознаването на прицелните молекули IgG, IgM и CRP от C1q може да бъде инхибирано от свободен хем, подобно на инхибирането от анти-C1q антителата. С цел да се установи влиянието на хема върху способността на C1q да активира системата на комплемента бяха сравнени нативен и третиран с хем C1q. Като прицелни молекули за C1q бяха подбрани IgG-съдържащи имунни комплекси (тетанус токсин – анти-тетанус токсин антитела от приготвянето на IVIg) и CRP (PnC-CRP (Agrawal et al., 2001)), а като източник на комплементни белтъци беше използван C1q-дефицитен серум. Хемин 15µM доведе до инхибирането с повече от 90% на свързването на C1q с имунните комплекси и с около 30% на взаимодействието на C1q с PnC-CRP (фиг. 18, А). Експонирането на C1q на различни концентрации хемин (окислена форма на хем) доведе до намаляване на депозицията на C3, редукция на депозицията на мембрано-атакуващия комплекс (MAC) и намаляване на формирането на sC5b-9 (фиг. 18).

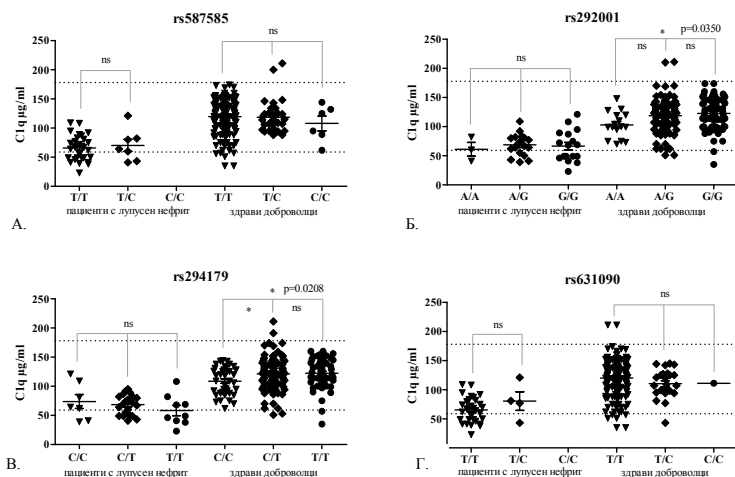


Фиг. 1. Данни за честотата на срещане на отделните генотипове при rs587585 (А.), rs292001 (Б.), rs294179 (В.) и rs631090 (Г.) в двете изследвани групи: здрави доброволци и пациенти с лупусен нефрит.

При направеното проучване не беше установена статистически значима разлика между генотиповете на пациентите и здравите доброволци при нито един от четирите SNPs, което не дава основание да се твърди, че даден генотип се асоциира със СЛЕ в тази извадка. Данните от литературата са противоречиви и също често са получени на базата на малки СЛЕ кохорти. За да се даде по-ясен отговор за асоциацията на SNPs в C1q с развитието на СЛЕ, беше изследвана и зависимостта между наличието на определен генотип и плазмените нива на C1q.

Изследване на зависимост между наличието на даден генотип и плазмените нива на C1q

Анализирани бяха двете изследвани групи - на здравите доброволци и на пациентите със СЛЕ за асоциации между нивата на C1q в плазмата и честотата на срещане на отделните генотипове за всеки един полиморфизъм (фиг. 2, А-Г).



Фиг. 2. Асоциация между отделните генотипове при rs587585 (А.), rs291001 (Б.), rs294179 (В.), и rs631090 (Г.) и нивото на C1q в плазмата на пациентите със СЛЕ и здравите доброволци. С хоризонтални пунктирани линии са посочени нормалните нива на C1q (59 – 178 µg/ml (± 2SD)).

Представените резултати за здравите доброволци показват, че генотипове при някои от полиморфизмите са асоциирани с по-ниски плазмени нива на C1q. В изследваната извадка от здрави доброволци при rs292001 беше установена статистически значима зависимост ($p=0,0350$) между по-ниски нива на C1q и наличието на A/A генотип (фиг. 2, Б). За 294179 генотип C/C беше асоцииран с по-ниски нива на C1q в плазмата ($p=0,0208$) (фиг. 2, В). Въпреки намерените зависимости, от фиг. 2 е видно, че по-ниските нива на C1q, асоциирани с посочените генотипове, бяха в границите на нормата за изследваната кохорта. При пациентите със СЛЕ не беше открита статистически значима зависимост между нивата на C1q в плазмата и наличието на определен генотип.

Хаплотипен анализ на избраните полиморфизми

Хаплотипният анализ беше проведен с помощта на програмата – SNPStats на Зеното по биостатистика и биоинформатика на “Каталунския институт по онкология”, Испания.

Хаплотипният анализ позволи да бъдат установени най-често срещаните хаплотипи сред пациентите и здравите доброволци. За

племена по класическия път, но и да се потиснат процесите, свързани с разтварянето и клирънс на циркулиращите имунните комплекси, което да доведе до тяхната преципитация и увреждащо действие в бъбреците. Наличието на анти-gC1q антитела би могло да пречи на C1q да изпълнява физиологичните си функции, такива като клирънс на апоптотични клетки, имунни комплекси, активиране на системата на комплемента по класическия път и други, тъй като ангажират глобуларния участък на молекулата. Предположението е, че анти-gC1q антитела, подобно на анти-CLR антитела, също участват в патогенезата на СЛЕ, но вероятно по различен механизъм. И едните, и другите антитела водят до “изчерпването” на C1q и затрудняват неговите биологични функции. За да може да се дискутира вероятното биологично действие на анти-gC1q антителата в серумите на изследваните пациенти с лупусен нефрит, не беше достатъчно само да се установи тяхното съществуване, афинитет на свързване и степен на припокриване на епитопите, които разпознават. Затова бяха проведени допълнителни експерименти за характеризиране на функционалната активност на анти-gC1q антителата, чрез които беше изследвано наличието на инхибиторен ефект на антителата върху взаимодействията на глобуларния фрагмент на C1q с негови прицелни молекули (IgG и CRP). Резултатите от **фиг. 15, А и Б** демонстрират водещата роля на анти-ghV антителата в инхибирането на C1q взаимодействията с IgG и CRP. Тези резултати дадоха възможност да се предположи, че антигенните детерминанти на анти-gC1q антитела вероятно са локализирани върху апикалната и латералната повърхност на В-веригата. Знае се, че свързващите за IgG и CRP места в молекулата на C1q се припокриват. Показано е, че са локализирани на върха на gC1q, като се формират с участието на трите вериги на C1q и латералната повърхност на В-веригата (Gadjeva et al., 2008; Kojouharova et al., 2004; Roumenina et al., 2006). Регистрираният инхибиторен ефект на анти-ghV антителата и наличната информацията за очертаванията на IgG и CRP свързващите места в C1q позволиха да бъдат определени границите на епитопите на анти-gC1q антитела – между Tyr¹⁷⁵ на апикалната повърхност през Arg¹⁰⁸ и Arg¹⁰⁹, както и Arg¹¹⁴, Arg¹²⁹ и His¹¹⁷ по латералната повърхност на В-веригата. Теоретичното предсказване на антигенните детерминанти на gC1q чрез използването на CEPs показва добро припокриване между предсказаните антигенни детерминанти и IgG/CRP-свързващи места, в подкрепа на хипотезата за локализирането на епитопите на анти-gC1q антитела главно върху апикалната

да се обяснят или с възможността да се регистрират анти-C1q анти-тела, насочени срещу CLR участък на C1q, или с възможността да се регистрират анти-gC1q антитела, които разпознават антигенна(и) детермината(и) в глобуларния участък на C1q, образуван в резултат от кооперативен ефект на А-, В- и С- веригите. Не е ясно как точно конформацията на нативната C1q молекула оказва влияние върху разположението на глобуларните части при имобилизирането на молекулата. Възможността в тези серуми да има антитела, разпознаващи обща(и) антигенна(и) детерминанта(и) за А- и В-веригите, беше проверена чрез изолиране на модулспецифични антитела и изследване на тяхната кръстосана реактивност. Модулспецифичните анти-ghA и анти-ghB антитела от серуми №37 и №45 бяха титрувани с намаляващи концентрации на рекомбинантните “глави” при анализ на специфичността на взаимодействията им. Резултатите от **фиг. 12** и **13** сочат, че се касае за специфично разпознаване, защото антителата взаимодействат по различен начин с отделните рекомбинантни “глави” и взаимодействието има концентрационозависим характер. Това потвърди предположението, че в серумите на пациенти със СЛЕ най-вероятно се съдържат различни популации анти-gC1q автоантитела. По всяка вероятност изолираните модулспецифични анти-ghA и анти-ghB антитела от серум №37 разпознават епитоп(и), образуван(и) с участието на трите глобуларни “глави” на C1q (**фиг. 12**). Но при пациент №45 анти-ghA и анти-ghB антителата разпознават различни антигенни детерминанти (**фиг. 13**). Вероятно gC1q доменът съдържа различни епитопи за анти-gC1q автоантителата и при различните пациенти тези антитела се характеризират с различна специфичност по отношение на тези епитопи.

Функционалната активност на C1q, свързана с активиране на системата на комплемента по класическия път, се обезпечава от участието му в две междумолекулни взаимодействия: с имунните комплекси (комплекси на антигени с антитела от класовете IgM, IgG1, IgG2 и IgG3) и с (C1r–C1s)₂. Тези два акта на междумолекулното разпознаване демонстрират двата основни етапа при иницирането на класическия път за активация на комплемента. Първото от тези взаимодействия се осъществява от глобуларния фрагмент на C1q, а второто – от колагеноподобния. Първото взаимодействие повишава афинитета на C1q във второто взаимодействие с порядък, вследствие на конформационни промени. При инхибиране на първото междумолекулно разпознаване може да се повлияе не само иницирането на каскадата от реакции за активиране на системата на ком-

пациентите с лупусен нефрит това беше хаплотип TGTT (rs587585, rs292001, rs294179 и rs631090) с честота 0.4518. За здравите доброволци най-често срещаният хаплотип беше също TGTT с честота 0.4875. Тези два хаплотипа, обаче не бяха обвързани с промяна в нивата или функционалната активност на C1q. Хаплотип CGCC при пациентите с лупусен нефрит беше асоцииран с ниски нива на C1q (Difference=53.08 95%CI=9.82–96.35, P=0.22), на C3 (Difference=216.82 95%CI=206.86–226.78, P<0.0001) и на C4 (Difference=117.07 95%CI=10.88–223.26, P=0.038). При пациентите беше установен още един хаплотип с ниска честота (0.0263), асоцииран само с ниски нива на C3 – TACC (Difference=125.31 95%CI=106.87–143.75, P<0.0001).

При здравите доброволци нямаше хаплотип, обвързан с ниски нива на C1q. Но два хаплотипа – CATT и TACC бяха асоциирани с ниски нива на C3 (Difference=106.71 95%CI=103.77–109.64, P<0.0001), (Difference=145.23 95%CI=144.6–145.86, P<0.0001) и с ниски нива на C4 (Difference=15.65 95%CI=1.3–29.99, P=0.034), (Difference=87.64 95%CI=83.71–91.56, P<0.0001). Други два хаплотипа сред здравите доброволци бяха асоциирани само с ниски нива на C3: CACT (Difference=72.62 95%CI=66.62–78.62, P<0.0001) и CGTT (Difference=9.96 95%CI=4.43–15.49, P=0.00054). Честотата на срещане на тези хаплотипове беше много ниска.

Търсене на мутации в гените за C1q, асоциирани с ниски плазмени нива или променена функционална активност на C1q

Извършено беше детайлно проучване на базата данни на Националната референтна лаборатория за изследване на белтъците от системата на комплемента при Европейската болница “Жорж Помпиду”, Париж, Франция и беше открит пациент с нормални нива на C1q, C3, C2 и C4, но с отсъствие на комплементна хемолитична активност (CH50=0). Този пациент е бил диагностициран с невронален лупус, страдал е от множество инфекции, и е починал на 35 год. вследствие на септичен шок.

Новооткрита мутация в гените за C1q, водеща до променена функционална активност на протеина

Анализ на комплементните белтъци

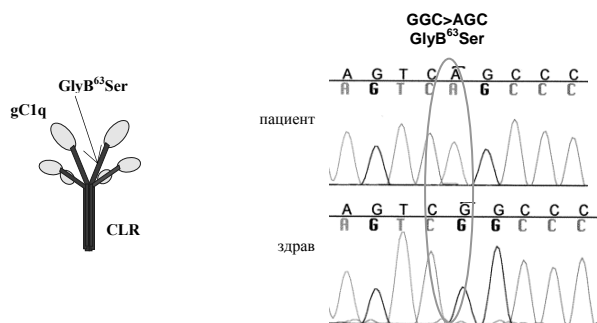
При подбрения пациент хемолитичната активност в серума се възстановяваше при добавяне на пречистен C1q. С цел установява-

не на причините за липсата на хемолитична активност на C1q, плазмата на пациента беше изследвана, освен за нива на C1q, C3, C2 и C4, също и за нива на терминалните комплементни компоненти (C5, C6, C7, C8 и C9). Бяха проведени и функционални тестове за C1 и C2. Установени бяха нормални нива на всички комплементни белтъци и нормална функционална активност на C2, за разлика от тази на C1, оценена като <10% при норма 60 – 140%.

За да се провери дали само C1q има отношение към много ниската функционална активност на C1, беше изследвана хемолитичната активност на плазмата след добавяне на C1q-, C1r- или C1s-дефицитни плазми. При добавянето на C1r- и C1s-дефицитните плазми измереното CH50 беше в норма, но добавянето на C1q-дефицитна плазма не доведе до възстановяване на хемолитичната активност. Тези резултати дадоха основание за твърдението, че липсата на функционална активност на C1 комплекса се дължи само на проблем в молекулата на C1q, а не на C1r или C1s. Беше изказана хипотеза за наличие на функционален C1q дефицит с природа, различна от досега цитираната в литературата.

Генетичен анализ

За да се установи, дали липсата на функционална активност на C1q е генетично детерминирана, беше секвениран C1q генният кластер. Беше открита мутация в екзон 3 на В-веригата (GGC>AGC), водеща до замяна на Gly със Ser в областта на “пречупването” на шестте колагеноподобни участъка спрямо централното “стъбло” на молекулата (фиг. 3).



Фиг. 3. Секвениране на гените за C1q. Представен е фрагментът, показващ мутацията в В-веригата на C1q при изследвания пациент, сравнен със здрав донор.

ректно отношение на тези антитела към активността на лупусния нефрит (фигурата не е показана в автореферата). Резултатите от изследването на малка група от пациентите (15/46, около 33%) показваха, че са необходими допълнителни проучвания относно връзката между наличието на анти-gC1q антитела и фазата на развитие на лупусния нефрит. Много са въпросите и неизвестните около анти-gC1q антителата и тяхната роля в патогенезата на лупусния нефрит. В резултат на настоящите изследвания за първи път е докладвано за наличието на антитела, разпознаващи глобуларния район на C1q (Tsacheva et al., 2007) и в литературата е въведено понятието ”анти-gC1q антитела”.

Като позитивни за анти-gC1q антитела бяха определени 19 пациенти (19/46, 41,30%) с лупусен нефрит. Десет от тях (52,63%) показаха висок процент на свързване само с трите рекомбинантни “глави” на C1q. Вероятно в тези серуми се регистрират анти-gC1q антитела, насочени срещу епитопи в глобуларните фрагменти на C1q, които остават скрити в нативната форма на молекулата. Слабото преобладаване на анти-ghA и анти-ghC антителата в лупусните пациенти (фиг. 9) вероятно се дължи на експонирането на неоепитопи в А- и С-веригите при ангажирането на В-веригата във взаимодействията на C1q с негови лиганди. Според “waste-disposal” хипотезата на Walport за възникването на СЛЕ, C1q при тези пациенти е ангажиран в процесите на клирънс на апоптотични клетки и имунни комплекси чрез В-веригата си. Така достъпни остават поради конформационни промени в молекулата А- и С-веригите. При сравнение между пациентите в активна фаза на заболяването с тези в ремисия беше установено, че при пациентите с активен лупусен нефрит преобладават анти-ghB и анти-ghC, за разлика от пациентите в ремисия, които са положителни само за анти-ghA (фиг. 10). Тъй като количествата на анти-ghB и анти-ghC при пациентите с активен лупусен нефрит са съпоставими (фиг. 10), възможно е регистрираните автоантитела да разпознават общ/и за В- и С- веригите епитоп/и.

В хода на изследването интерес предизвикаха анти-C1q антителата, които разпознаваха както нативната молекула на C1q, така и един или повече от нейните глобуларни модули. При изследване на антигенната специфичност на анти-gC1q антителата бяха изолирани модулспецифични антитела от серумите на двама пациенти с лупусен нефрит в активна фаза на заболяването (№37 и №45). Тези пациенти бяха позитивни за анти-ghA, анти-ghB и анти-C1q антитела (фиг. 11). Високите нива на анти-C1q антитела могат

2011), докато липсата на анти-C1q антитела е обвързана с липса на активен гломерулонефрит (Sinico et al., 2005). В литературата се приема, че анти-C1q антителата са необходимо, но не достатъчно условие за възникване на бъбречни увреждания, защото при редица пациенти със СЛЕ с високи титри на анти-C1q антитела не се развива гломерулонефрит. В настоящото изследване обаче всички СЛЕ пациенти, позитивни за анти-C1q антитела, бяха с доказан лупусен нефрит. Според Trouw и сътр. (2004a), гломерулонефрит не се развива в пациенти, които имат само анти-C1q антитела. Анти-C1q антителата могат да бъдат патогенни за бъбреците само в комбинация с C1q-съдържащи имунни комплекси. А според хипотезите на Fliegman и Daha (2007) СЛЕ пациенти с анти-нуклеозомни, анти-двДНК антитела и анти-C1q антитела могат да не развият гломерулонефрит, защото количеството на локално представения C1q не е достатъчно, за да провокира комплементна активация. Това показва, че вероятно патологичната роля на анти-C1q антителата не се състои толкова в активирането, колкото в усиляването на активирана вече комплементна атака.

Резултатите, представени на **фиг. 7**, потвърждават литературните данни по отношение на относителния дял на положителните за анти-C1q антитела пациенти спрямо всички изследвани 62 пациенти. Положителни за анти-C1q антитела бяха около 23% (14 пациенти) от изследваните СЛЕ пациенти, всички с биопсично доказан лупусен нефрит, като 86% от тях бяха в активна фаза на заболяването. Сред пациентите със СЛЕ без бъбречни усложнения нивото на анти-C1q антитела беше твърде ниско, което корелира с известните в литературата данни (Trendelenburg et al., 1999).

Нивата на анти-C1q антителата са обратнопропорционално обвързани с нивата на C1q, C3 и C4 в серума при пациенти с активен лупусен нефрит (Hogvath et al., 2001; Siegert et al., 1993). В настоящото изследване това беше потвърдено за десет от 14-те серопозитивни за анти-C1q антитела пациенти.

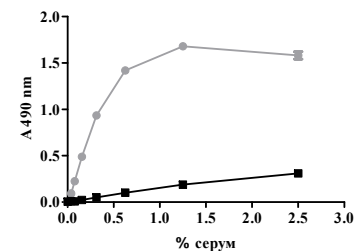
Анти-C1q антитела насочени срещу глобуларния фрагмент на C1q бяха регистрирани само в СЛЕ пациенти с доказан лупусен нефрит (**фиг. 8**). Изследваните пациенти без нефритни усложнения бяха отрицателни за анти-gC1q антитела. Само трима (30%) от 10-те серопозитивни за анти-gC1q антитела бяха в активна фаза на заболяването. Затова не може да се твърди, че тези антитела участват в активирането на лупусния нефрит. Проследяването на промените в титрите на анти-gC1q антителата във времето също не показва ди-

Счита се, че този участък е отговорен за свързването и активацията на сериновите протеинази – C1r и C1s (Bally et al., 2009; Pflieger et al., 2010). Освен тази нова мутация, беше установено също, че пациентът е хомозиготен по А алела на rs9334 полиморфизъм в С-веригата на C1q, както и че е хомозиготен по А алела на rs172378 в А-веригата.

Беше изказана хипотеза, че липсата на функционална активност на мутантния C1q се дължи на невъзможността на молекулата да свърже и активира C1r₂-C1s₂.

Формиране на активен C1 комплекс

За да се провери хипотезата, че намереният мутантен C1q не може да генерира формирането на C1 комплекс, беше конструиран ELISA. При този анализ беше използвана постановката за доказване на C1q антиген в плазма, но вместо анти-C1q антитела, беше използван античовешки C1r серум. Получените резултати бяха сравнени с резултатите от изследване на сборен нормален серум (NHS) (фиг. 4).



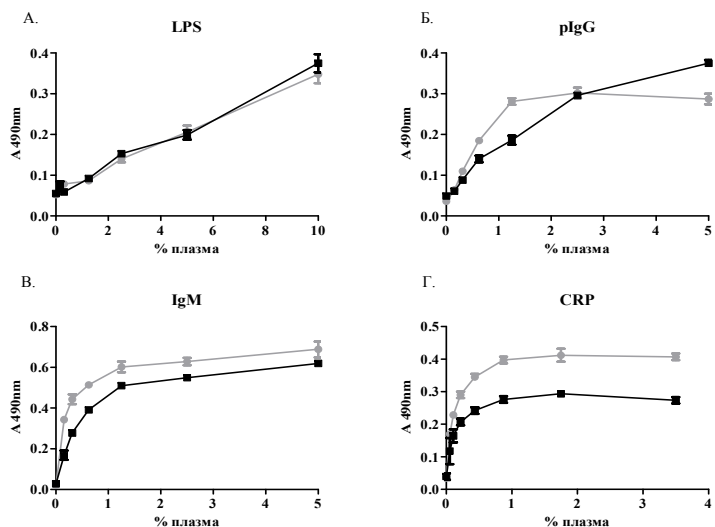
Фиг. 4. Формиране на активен C1 комплекс. Анти-C1q антитела са имобилизирани върху ELISA платки и инкубирани с разредени в различна степен серум от пациента и сборен нормален серум (NHS). Реакцията е развита с кози анти-C1s антитела. Използван е заешки HRP-конюгат IgG. (резултатите на пациента са представени с черна крива, а тези за NHS – в сиво)

От фиг. 4 е видно, че C1 комплексът беше детектиран в NHS, но не и в серума на пациента с мутация в C1q, което още веднъж потвърждава, че при този пациент няма активен C1 комплекс.

Функционални тестове на мутантния C1q

С цел да се установи дали новооткритата мутация се отразява на способността на C1q да разпознава и свързва лигандите си, бяха из-

следвани взаимодействията на мутантния C1q с LPS, pIgG, IgM и CRP (фиг. 5, А-Г).



Фиг. 5. Свързване на мутантния C1q с прицелни молекули. Свързващата способност на C1q от изследвания пациент е оценена чрез ELISA. Прицелните молекули LPS от *E. coli* (А.), pIgG (Б.), IgM (В.) и CRP (Г.) са имобилизирани като тест антигени и инкубирани с различни разреждания на плазма от пациента и нормална пул плазма. Използван е анти-C1q HRP-конюгат IgG.

По отношение на взаимодействието с LPS не беше установена разлика в поведението на нормалния и мутантния C1q (фиг. 5, А). Взаимодействието на мутантния C1q с CRP беше значително по-слабо от това на C1q от здрави донори (фиг. 5, Г). Беше установено, че при взаимодействието със CRP мутантният C1q свързва прицелната си молекула с 30% по-слабо в сравнение с нормалния белтък. Слабо намаление на свързването при мутантния белтък беше наблюдавано при взаимодействието му с IgM (фиг. 5, В).

Активирание на системата на комплемента върху късни апоптотични клетки

За да се установи, дали мутантният C1q е в състояние да свързва късни апоптотични ендотелни клетки и да активира системата на

Анти-C1q антителата като инхибитори на взаимодействията на C1q с прицелни молекули

Анти-C1q антителата могат да участват или във формирането на циркулиращи имунни комплекси, които да се отложат в бъбреците, или във формирането на имунни комплекси локално в гломерулната базална мембрана. Освен това, чрез намеса в активацията на комплемента по класическия път анти-C1q антителата могат да попречат на разтварянето на имунните комплекси и така да опосредстват натрупването им в бъбреците. В допълнение, анти-C1q антителата могат да бъдат патологични чрез смущаване на клирънса на апоптотичните клетки, като така да инициират автоимунитет или задълбочаване на автоимунното възпалително състояние.

Бяха проведени четири последователни ELISA, при които имобилизираните съответно ghA, ghB, ghC и C1q бяха инкубирани със серумите на 196 здрави доброволци и серум на пациент със СЛЕ в качеството му на положителна контрола. Беше работено в условията на висока концентрация на NaCl (PBS/0,75M NaCl), за да бъдат регистрирани главно комплекси антиген-антитяло. При използването на ghB, ghA и ghC като тест антигени не бяха регистрирани серопозитивни за анти-gC1q антитела здрави доброволци (фиг. 8, А-В). Концентрацията на анти-C1q антитела беше висока само при пет от изследваните здрави доброволци. Известно е, че повечето естествени автоантитела имат нисък афинитет и се характеризират с полиспецифичност. При естествените автоантитела може да се очаква някакво доловимо действие, само ако концентрацията им е значителна, което не може да се твърди за анти-C1q антитела при петте здрави доброволци.

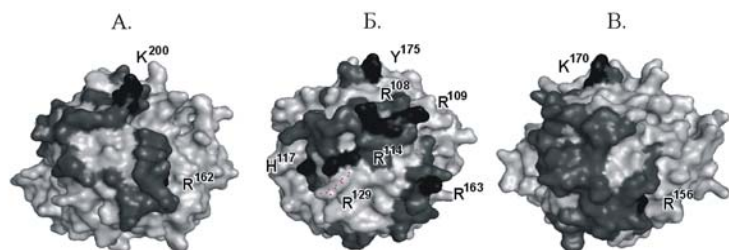
Приблизително от 20% до 50% от пациентите със СЛЕ имат високи серумни нива на анти-C1q автоантителата срещу колагеноподобния район (CLR) (Mok et al., 2010 ; Schaller et al., 2009). Редица изследвания показват връзка между присъствието на анти-C1q автоантителата срещу колагеноподобния район (CLR) и развитието на активен гломерулонефрит при пациентите със СЛЕ (Fang et al., 2009; Martens et al., 2009; Mok et al., 2010; Moura et al., 2009; Siegert et al., 1999). Установено е, че покачането на титрите на тези анти-C1q антитела предшества бъбречните усложнения при СЛЕ и се свързва с пролиферативната форма на нефритните състояния (Marfo et al., 2005; Sinico et al., 2005; Trendelenburg et al., 2006; Wu et al.,

и 2 в С-веригата се припокриха с известни участъци в gC1q за свързване с IgG и CRP. Всички аминокиселинни остатъци, за които по литературни данни е доказано участието им в свързващите участъци за IgG и CRP в gC1q (с изключение единствено на Arg^{B129}), влизат в пределите на предсказаните теоретично антигенни детерминанти. За останалите теоретично предсказани антигенни детерминанти на настоящия етап няма емпирични доказателства (табл. 4).

Теоретично предсказаните антигенни детерминанти бяха визуализирани чрез PyMOL (фиг. 17).

Табл. 4. Предсказани чрез CEPS антигенни детерминанти в gC1q, за които няма литературни данни за участие в свързването на C1q с IgG и със CRP.

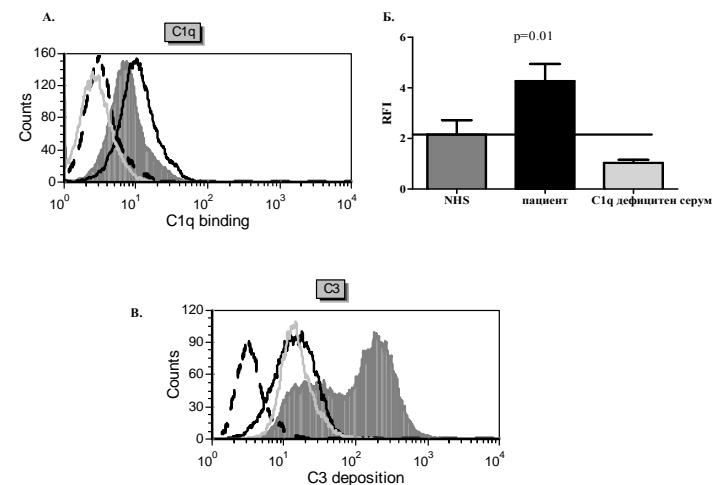
Предсказани антигенни детерминанти в А-веригата	Предсказани антигенни детерминанти в В-веригата	Предсказани антигенни детерминанти в С-веригата
A_100-RNPMGGN-107	B_92-TQK-94	C_89-KFQ-91
A_123-QNH-125	B_188-KIEQG-192	C_99-QTHQPPAPNSLIRFNAVL-116
A_172-NKGL-175	B_201-DKNS-204	C_124-DTSTGKFTCKVP-135
A_186-QIQGGDQ-192	B_208-MEG-210	C_182-RIQVGEE-188
A_206-QGSE-209		C_194-NDYY-197
		C_201-GIQGSD-206



Фиг. 17. Глобуларният домен на C1q – gC1q. Показани са повърхностите на ghA (А.), ghB (Б.), и ghC (В.). Предсказаните антигенни детерминанти във всяка от веригите на C1q са отбелязани в тъмно сиво. Аминокиселинните остатъци, за които е известно участието им във взаимодействието на C1q с IgG и CRP и се припокриват с антигенните детерминанти, са изписани и отбелязани в черно. Един аминокиселинен остатък, участващ в IgG взаимодействието, не се припокрива с предсказаните антигенни детерминанти – означен е с точки (Б). Фигурите са генерирани чрез програмата PyMOL.

комплемента по класическия път, беше приложен тест за свързване на C1q и депозиция на C3 върху апоптотични клетки. При опитите бяха използвани апоптотични ендотелни клетки от пъпна връв – HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) чрез третиране със стауспорин.

Резултатите са представени като хистограми от един репрезентативен експеримент и като средна относителна флуоресцентна интензивност – RFI (Relative Fluorescence Intensity) за четири независими експеримента (фиг. 6, Б).



Фиг. 6. Характеризиране на стауспорин-третираните HUVEC в етап на късна апоптоза. Представени са свързване на C1q върху апоптотичните клетки (А.), средна относителна флуоресцентна интензивност (RFI) за четири независими експеримента (Б.) и депозиция на C3 (В.) върху апоптотичните клетки. С прекъснат контур е представена изотипната контрола (белязана с неспецифично антияло), с тъмно сиво – свързването на специфичното анти-C1q антияло или анти-C3 антияло от сборен нормален серум (NHS), със сив контур – C1q-дефицитен серум, а с черен контур – серумът на пациента с мутантен C1q.

При изследване на свързването на мутантния C1q към апоптотичните клетки беше установено, че мутантния C1q свързва почти два пъти по-силно късните апоптотични клетки в сравнение със сбор-

ния нормален серум (фиг. 6, Б), докато при C1q-дефицитния серум не беше установено взаимодействие с апоптотичните клетки (фиг. 6, В). От друга страна, при сборния нормален серум беше детектирана силна C3 депозиция, за разлика от резултата за пациента, чиято депозиция на C3 беше сравнима с тази при C1q-дефицитния серум (фиг. 6, В).

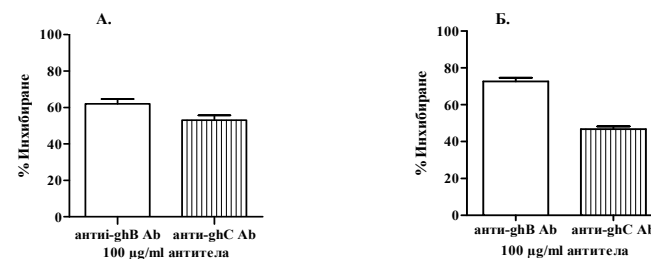
1. ДИСКУСИЯ

Мутации и полиморфизми (SNPs) в гените на C1q като ендегенни фактори, понижаващи плазмени нива на C1q или неговата функционална активност

Наследственият C1q дефицит, макар и рядко срещаш се, е много силен рисков фактор за развитие на СЛЕ (>90%); освен това е асоцииран с усложнения в заболяването и развитие на гломерулонефрит. C1q дефицитите се характеризират с отсъствие на хемолитична активност на комплемента. Това се дължи или на отсъствие на C1q молекула, или на експресия на нискомолекулен C1q белтък с нарушени функции (Marquart et al., 2007; Petry et al., 1995). В литературата понастоящем са описани приблизително около 20 фамилии с C1 (C1q, C1r, C1s) дефицити, но по отношение на асоциацията на отделни полиморфизми в гените за C1q с патогенезата на СЛЕ има само единични данни. За първи път през 2003 Raila и сътр. съобщават, че при пациенти с кожен лупус, хомозиготни за полиморфизма C1qA-Gly70 GGA (rs172378), се откриват понижени серумни нива на C1q. Но изследвания върху СЛЕ кохорти правят само четири изследователски групи (Chew et al., 2008; Martens et al., 2009; Namjou et al., 2009; Rafiq et al.). Martens и сътр., както и Rafiq и сътр., подбират изследваните от тях полиморфизми чрез Tagger SNPs selection algorithm, достъпен в Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>). Избраните от Martens и сътр. полиморфизми покриват важни участъци от трите C1qA, C1qC и C1qB гени. Затова полиморфизмите, изследвани в настоящата работа, са четири от петте селектирани от Martens и сътр. Четирите подбрани полиморфизма са изследвани за първи път в България в група от пациенти със СЛЕ с лупусна нефропатия (38 на брой) и в група от здрави доброволци (196 на брой).

При сравнение между установените алелни честоти на 4-те SNPs (rs587585, rs292001, rs294179 и rs631090) в изследваните български

100µg/ml (фиг. 16, Б). Получените резултати подкрепят хипотезата, че анти-ghB антителата имат водещата роля в инхибирането на C1q взаимодействията с IgG и със CRP.



Фиг. 16. Инхибиране на взаимодействието на C1q със CRP (А.) и на C1q с IgG (Б.) от анти-gC1q антитела – анти-ghB и анти-ghC, изолирани от пациент №42 със СЛЕ с доказана нефропатия. За 100% свързване бе прието взаимодействието на C1q със CRP или с IgG в отсъствие на анти-gC1q антитяло.

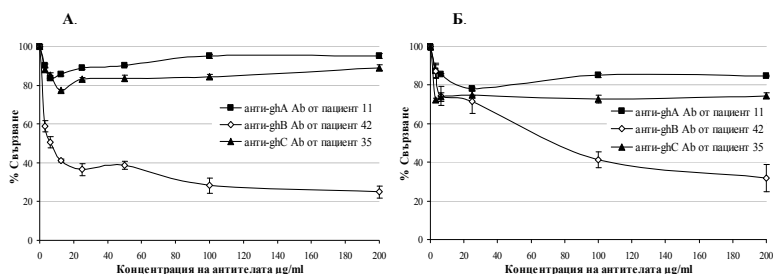
Беше проведено теоретично изследване с цел търсене на припокриване между предсказани антигенни детерминанти върху gC1q и аминокиселинни остатъци, участващи в местата на свързване на gC1q с IgG и CRP, локализиращи експериментално (табл. 3).

Табл. 3. Предсказани чрез CEPS антигенни детерминанти и аминокиселинни остатъци, участващи в свързването на C1q с IgG и със CRP по литературни данни.

Предсказани антигенни детерминанти	АК, участващи в IgG- и CRP- свързващите участъци в gC1q	Литературни източници
A_158-RGQVRRS-164	Arg ¹⁶²	(Kojouharova et al., 2004)
A_198-DPKKKGH-203	Lys ²⁰⁰	(Gadjeva et al., 2008)
B_102-TINVPIRRDDQTIK-114	Arg ¹⁰⁸ , Arg ¹⁰⁹ , Arg ¹¹⁴	(Kojouharova et al., 2004; Roumenina et al., 2006; Zlatarova et al., 2006)
B_117-HVI-119	Lys ¹¹⁷	(Kojouharova et al., 2004; Roumenina et al., 2006)
B_159-RGREKAK-166	Arg ¹⁶³	(Kojouharova et al., 2004; Zlatarova et al., 2006)
B_175-VNNTF-178	Tyr ¹⁷⁵	(Roumenina et al., 2006; Zlatarova et al., 2006)
C_156-RSGVK-160	Arg ¹⁵⁶	(Kojouharova et al., 2004; Zlatarova et al., 2006)
C_169-SKT-171	Lys ¹⁷⁰	(Roumenina et al., 2006)

Бяха предсказани 7 антигенни детерминанти в А-веригата, 8 в В-веригата и 9 в С-веригата. От тях само 2 в А-веригата, 4 в В-веригата

то C1q – CRP. Анти-ghA от пациент №11 и анти-ghC антителата от пациент №35 показаха слаба инхибиторна активност върху C1q – IgG взаимодействието, за разлика от анти-ghB модулспецифичните антитела, които инхибираха C1q – IgG взаимодействието дозозависимо. Беше изчислено, че за 50% инхибиране на взаимодействието между C1q и IgG са необходими приблизително десет молекули анти-ghB антитела за всяка C1q молекула.



Фиг. 15. Инхибиране на взаимодействието на C1q с CRP (А) и на C1q с IgG (В) от анти-gC1q антитела, изолирани от пациенти със СЛЕ с доказана нефропатия. CRP и IgG са имобилизирани в концентрация 40µg/ml и инкубирани с C1q (40µg/ml). C1q е предварително инкубиран с модулспецифични анти-ghA, анти-ghB и анти-ghC антитела от три различни пациенти в концентрации: 200µg/ml; 100µg/ml; 50µg/ml; 25µg/ml; 12,5µg/ml; 6,25µg/ml; 3,125µg/ml и PBS). Образованите комплекси са установени чрез биотинилирани анти-човешки C1q антитела и стрептавидин IgG, конюгиран с пероксидаза. Резултатите са представени като процент на свързване в присъствие на инхибитор, като взаимодействието на C1q със CRP или IgG в отсъствие на модулспецифични анти-gC1q антитела се приема за 100%.

От пациент №42, позитивен не само за анти-ghB антитела, но също и за анти-ghC антитела (фиг. 16), бяха изолирани и модулспецифични анти-ghC антитела, изследвани за инхибиторен ефект върху взаимодействията на C1q с IgG и със CRP. Беше установено, че анти-ghB антителата от пациент №42 в концентрация 100µg/ml инхибират до 73% взаимодействието на C1q със CRP. Анти-ghA и анти-ghC антителата от същия пациент също инхибираха взаимодействието на C1q със CRP, но ~39% и ~47%, съответно (фиг. 16, А). Анти-ghB антителата показаха по-силен инхибиторен ефект на взаимодействието C1q – IgG в сравнение с анти-ghA и анти-ghC антителата. Беше установено, че взаимодействието C1q – IgG се инхибира приблизително на 59% от анти-ghB антителата, на 15% от анти-ghA антителата и на 55% от анти-ghC антителата в концентрация

здравни доброволци, представители на европейската раса, и публикуваните в Базата данни: “International HapMap Project” (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) данни за алелните честоти на същите полиморфизми при други кохорти здрави доброволци, представители на европейската раса, на монголоидната раса и на негро-австралоидната раса, беше установено, че българската здрава кохорта е типичен представител на европейската раса. Получените данни за rs587585 и rs631090 при българската кохорта потвърдиха установените разлики между европейската и монголоидната раси и между европейската и негро-австралоидната раси, съответно (фигурите не са представени в автореферата).

По литературни данни, при полиморфизма rs587585 С алелът се асоциира с ниски нива на C1q и ниска хемолитична активност на комплемента (Martens et al., 2009). Този SNP се намира в промоторния район на C1qA гена, а полиморфизъм в този регулаторен район при мишки от породата New Zealand Black също е свързан с ниски нива на C1q и развитие на лупусен нефрит (Miura-Shimura et al., 2002). Martens и сътр. откриват връзка между активността на СЛЕ и полиморфизма rs292001, а rs631090 се асоциира с ниски нива на C1q, но не и с усложнения при развитието на СЛЕ.

При направените анализи за асоциация на определен генотип на подбраните четири полиморфизма с развитие на лупусен нефрит не бяха открити статистически значими разлики между генотипното разпределение в здравите доброволци и изследваните пациенти с лупусен нефрит (фиг. 1, А-Г). Получените данни за липса на асоциация между rs587585, rs292001, rs294179 и rs631090 и развитието на лупусен нефрит при пациенти с СЛЕ от европейската раса се доклаждат за първи път.

Асоциацията между четирите полиморфизма и нивата на C1q също беше изследвана (фиг. 2). При здрави доброволци беше установена зависимост между наличието на генотипове А/А и С/С и по-ниски нива на C1q за rs292001 (фиг. 2, Б), и rs294179 (фиг. 2, В), съответно. Но намерените по-ниски нива на C1q, асоциирани с посочените генотипове, бяха в границите на нормата за изследваната кохорта. Установената липса на асоциация между нивата на C1q в плазмата и двата полиморфизма – rs292001 и rs294179 при пациентите със СЛЕ беше в потвърждение на резултатите на Martens и сътр. Този резултат може да бъде обяснен с малкия брой на пациентите. За Т/Т генотиповете при rs587585 и rs631090 беше намерена само тенденция към асоциация с по-ниски нива на C1q. Наблюда-

ваните зависимости в настоящото изследване се нуждаят от потвърждение в по-голяма група пациенти с лупусен нефрит.

При хаплотипния анализ беше установено, че най-често срещаният хаплотип сред пациентите с лупусен нефрит и здравите доброволци беше TGTT (rs587585, rs292001, rs294179 и rs631090) с честота на срещане 0.4518 и 0.4875 съответно. Martens и сътр. също посочват като най-често срещан хаплотип при здрави и при пациенти TGTT (rs587585, rs292001, rs294179 и rs631090). С ниски нива на C1q, C3 и C4 при пациентите с лупусен нефрит беше асоцииран хаплотип CGCC, а само с ниски нива на C3 – хаплотип TACC. В литературата на този етап няма подобни данни, за да се направи сравнение на получените резултати.

В литературата са известни два типа C1q дефицити:

I тип - Пълен C1q дефицит, при който в плазмата няма C1q.

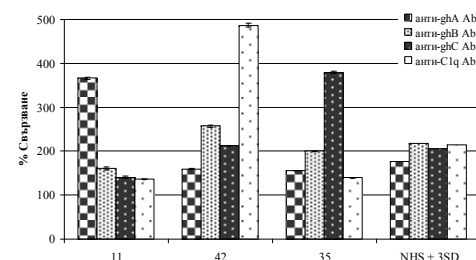
II тип - Функционален C1q дефицит, при който в плазмата се открива функционално неактивна C1q молекула.

Известно е, че при функционалните C1q дефицити се синтезира C1q, но функционалната му активност е нарушена. В цитираните в литературата случаи на функционален C1q дефицит при пациенти със СЛЕ се установяват увеличени количества на нефункционален LMW-C1q (LMW-C1q – low molecular weight C1q) и ниски нива, а в някои случаи и липса на нормален C1q. В серуми от здрави индивиди също се открива LMW-C1q, но в много по-ниски нива. Понастоящем е установена молекулната основа на два типа функционален C1q дефицит (Petry et al., 1995; 1997). При открития в настоящото изследване случай на C1q дефицит бяха намерени нормални нива на C1q, но липса на хемолитична активност. Беше прието, че вероятно се касае за трети, нов тип функционален дефицит. Секвенирането показва мутация в екзон 3 на В-веригата (GGC>AGC), при която Gly се замества със Ser в областта на “пречупването” на шестте колагеноподобни участъка спрямо централното “стъбло” на молекулата. Счита се, че този преход е отговорен за свързването и активацията на сериновите протеинази – C1r и C1s. Известно е, че при активиране на системата на комплемента C1q първоначално се свързва чрез върха на глобуларния си домен (GHD) за прицелните молекули, но веднага след това глобуларният домен се завърта по посока на латералната повърхност на В-веригата. Това преориентиране на глобуларния домен на C1q води до нарастване на ъгъла в областта на “пречупването” на шестте колагеноподобни участъка спрямо централното “стъбло” (Roumenina et al., 2005) и така по всяка вероят-

но фичните анти-ghB антитела от същия серум свързваха главно ghB и ghA, а ghC – твърде слабо (фиг. 13, Б). Сходни резултати бяха получени и чрез Dot blot, когато антигените бяха имобилизирани на нитроцелулозна мембрана.

Характеризиране на функционалната активност на откритите анти-gC1q антитела

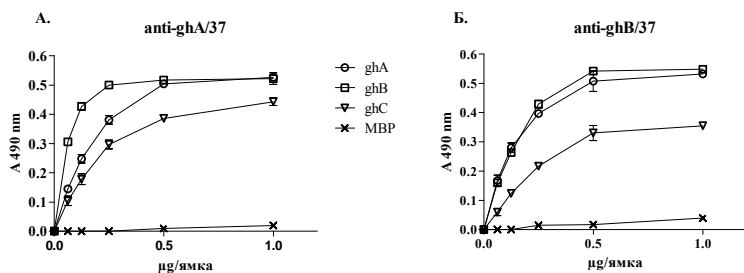
От три подбрани серума на пациенти с лупусен нефрит (№11, №42 и №35), бяха изолирани модулспецифични анти-ghA, анти-ghB и анти-ghC антитела и тествани за инхибиращ ефект върху взаимодействията на C1q с две от прицелните му молекули – IgG и CRP. Пациент №11 беше с преобладаващо високи нива на анти-ghA антитела, пациент №42 беше серопозитивен за анти-ghB антитела, а пациент №35 – за анти-ghC антитела. От трите серума само №42 беше серопозитивен за анти-C1q антитела, разпознаващи CLR на C1q (фиг. 14).



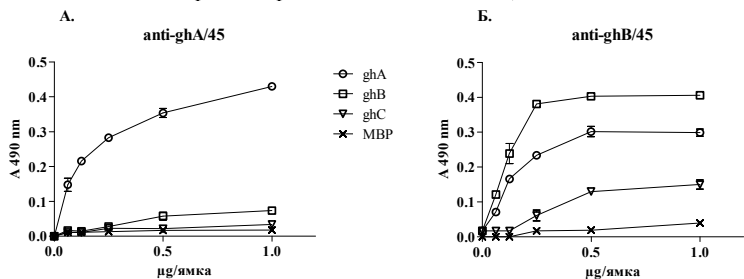
Фиг. 14. Нива на анти-gC1q и анти-C1q антитела в СЛЕ серуми №11, №42 и №35, определени чрез ELISA. ghA, ghB, ghC и C1q са имобилизирани в концентрация 20µg/ml и инкубирани със серуми №11, №42 и №35 (1:100 в PBS/0,75M NaCl). Образованите комплекси са установени със заешки анти-човешки IgG, конюгиран с алкална фосфатаза. Резултатите са представени като процент на свързване спрямо сборния нормален серум (NHS), чиято абсорбция е приета за 100%.

Беше установено, че анти-ghB антитела от пациент №42 инхибират значително взаимодействието на C1q с имобилизиран CRP (фиг. 15, А), докато анти-ghA от пациент №11 и анти-ghC антителата от пациент №35 имат много слаб инхибиторен ефект. Беше изчислено, че за 50% инхибиране на взаимодействието на една молекула C1q със CRP са необходими приблизително две молекули анти-ghB антитела. Получените резултати за инхибирането на C1q – IgG взаимодействието (фиг. 15, Б) бяха подобни на тези за взаимодействие-

на рекомбинантните “глави” – 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 $\mu\text{g}/\text{ямка}$ (фиг. 12 и фиг. 13).



Фиг. 12. Определяне взаимодействието на модулспецифични анти-ghA от СЛЕ серум №37 и модулспецифични анти-ghB от серум №37 с ghA, ghB и ghC чрез ELISA. GhA, ghB, ghC и C1q са имобилизирани в концентрация 2 $\mu\text{g}/\text{ямка}$ и инкубирани с анти-ghA (А.) и с анти-ghB (Б.) в PBS/0,75M NaCl за една нощ на 4°C. Образованите комплекси са установени с кози античовешки IgG, конюгиран с пероксидаза. Като контрола е изследван MBP.



Фиг. 13. Определяне взаимодействието на модулспецифични анти-ghA от СЛЕ серум №45 и модулспецифични анти-ghB от серум №45 с ghA, ghB и ghC чрез ELISA. GhA, ghB, ghC и C1q са имобилизирани в концентрация 2 $\mu\text{g}/\text{ямка}$ и инкубирани с анти-ghA (А.) и с анти-ghB (Б.) в PBS/0,75M NaCl за една нощ на 4°C. Образованите комплекси са установени с кози античовешки IgG, конюгиран с пероксидаза. Като контрола е изследван MBP.

Модулспецифичните анти-ghA и анти-ghB антитела от серум №37 показаха сходни закономерности на свързване с рекомбинантните ghA, ghB и ghC (фиг. 12). Те разпознаваха рекомбинантните ghA и ghB с по-голям афинитет, в сравнение с ghC.

Модулспецифичните анти-ghA антитела от серум №45 свързваха изключително само ghA, докато взаимодействието им с ghB и ghC беше незначително (фиг. 13, А). В сравнение с тях модулспеци-

ност осигурява механичния стрес, необходим за активирането на C1r₂-C1s₂ (Arlaud et al., 2002). Ето защо аминокиселинната замяна Gly^{B63}Ser (фиг. 3) в областта на “пречупването” на колагеновите участъци би могла да е причина за промяна в структурата им, повлиявайки ротацията на глобуларния домен на C1q. Нещо повече замяната беше локализирана между Lys^{B61} и Lys^{B65} на C1q, които са отговорни за формирането на C1r-свързващия участък (Bally et al., 2009; Pflieger et al., 2010). Така, чрез установяването на тази мутация, бяха получени още данни в подкрепа на хипотезата за ключовата роля на района на “пречупването” в молекулата на C1q за формирането на C1 комплекс (фиг. 4).

От фиг. 5 се вижда, че мутантният C1q запазва своите антигенни свойства на нативен белтък, тъй като се разпознава от различни поликлонални анти-C1q антитела. Свързването на мутантния C1q с таргетните молекули (LPS, pIgG, IgM и CRP) показва, че в този белтък е относително запазена целостта на глобуларния домен (GHD). По-слабото свързване на мутантния C1q с IgM и CRP (фиг. 5, В и Г) може да се обясни със слаби структурни промени в GHD на C1q в резултат на установената мутация.

Нормално C1q разпознава и свързва различни молекули по повърхността на апоптотични клетки и участва в тяхната опсонизация (Korb and Ahearn, 1997; Nauta et al., 2002; Navratil et al., 2001). Проблем при опсонизацията на апоптотичните клетки, т.е. липса на депозиция на C3, пречи на тяхната фагоцитоза (Fraser et al., 2009) и така се създават условия за развитие на СЛЕ (Walport, 2002). Любопитно е, че мутантният C1q силно свързваше късни апоптотичните клетки (фиг. 6, А и Б), като това не може да се обясни с по-силното му свързване с IgM или CRP (фиг. 5, В и Г). Слабо позитивният резултат за C3 депозицията при пациента се обяснява с депозиция след активиране на лектиновия път на системата на комплемента, тъй като при разреждането на серумите в началото на експеримента беше елиминирано активирането по алтернативния път (фиг. 6, В). Може да се обобщи, че мутантният C1q беше в състояние да свързва апоптотични клетки, белтъчни и бактериални лиганди, но тези взаимодействия не се последваха от активация на комплемента по класическия път и депозиция на C3.

Известно е, че сам по себе си C1q не е достатъчен да осигури чистене на апоптотични клетки в условия на отсъствие на възпалителни цитокини. Последващата депозиция на C3 и точното, правилно взаимодействие с различните рецептори на повърхността на фа-

гоцитиращите клетки са важни и задължителни за поддържане на автоотолерантността. Вероятно наблюдаваното силно свързване на мутантния C1q се дължи на структурна промяна в GHD, като последица от мутацията.

Известно е, че C1q участва в чистенето и на увредени неврони в ЦНС при неврологични увреждания и невродегенеративни разстройства (Chu et al., 2010; Stevens et al., 2007). Затова 11% от пациентите с C1q дефицит развиват невронален лупус (Bowness et al., 1994; Tsuge et al., 2010). Такава е диагнозата и на пациента с мутантен C1q. Пациентите с C1q дефицит страдат често и от тежки инфекции, включително септицемия (Bowness et al., 1994). Пациентът с описаната мутация е починал вследствие на септичен шок.

II. РЕЗУЛТАТИ

Изследване на серуми от пациенти със СЛЕ за наличие на анти-C1q антитела

Оптимизиране на условията за провеждане на скрининга за анти-C1q антитела

Използваният метод за регистриране на взаимодействието Ag – Ab беше ELISA. Преодоляването на взаимодействията на C1q с циркулиращи имунни комплекси (ЦИК) е възможно чрез повишаване на концентрацията на NaCl в средата, в която се извършва анализа, над физиологичната (Siegert et al., 1999). Kohro-Kawata и сътр. (2002) твърдят, че 2M NaCl пречи на свързването на имунните комплекси с C1q, но взаимодействието Ag – Ab, макар и да се потиска, се осъществява. В резултат от проведен експеримент за определяне на оптималната концентрация на NaCl в средата, беше прието като условие за последващите изследвания за наличие на анти-C1q антитела: PBS с 0,75M NaCl – концентрация, намаляваща във висока степен взаимодействието с имунните комплекси и непотискаща силно взаимодействието Ag – Ab.

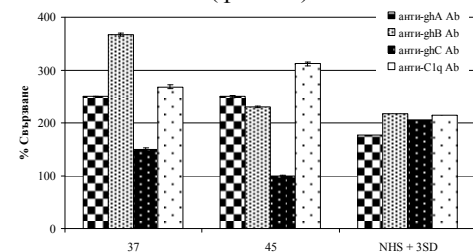
Скрининг на серуми от здрави доброволци и пациенти със СЛЕ за анти-C1q антитела

С цел да се изготви контрола – сборен нормален серумен пул (NHS) за сравнение при изследване на пациентите със СЛЕ за наличие на анти-C1q антитела, бяха проведени ELISA, при които имоби-

От фиг. 10 се вижда, че пациентите в активна фаза на лупусния нефрит бяха серопозитивни за анти-gC1q и анти-C1q антитела, като от анти-gC1q антителата слабо преобладаваха анти-ghB и анти-ghC C1q антителата, докато пациентите в ремисия бяха позитивни само и единствено по отношение на антитела срещу А-веригата на C1q.

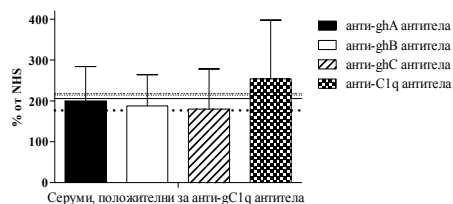
Изследване на антигенната специфичност на анти-gC1q антителата в избрани серуми

С цел да се изясни ролята на регистрираните анти-gC1q в патогенезата на лупусния нефрит бяха подбрани серуми на пациенти в активна фаза на заболяването, позитивни за анти-C1q антитела и при двата типа ELISA – с използване на нативна C1q молекула и при имобилизиране на рекомбинатните аналози на глобуларните А-, В-, и С-вериги. Серуми №37 и №45 показаха повишена абсорбция спрямо нормалната контрола по отношение на три от четирите антигена (ghA, ghB и C1q). Антителата в серум №37 показва висок процент на свързване с В- веригата на C1q, а в серум №45 от анти-gC1q преобладаваха анти-ghA антителата. По отношение на С-веригата и в двата СЛЕ серума процентът на свързване на анти-C1q антитела беше относително нисък (фиг. 11).



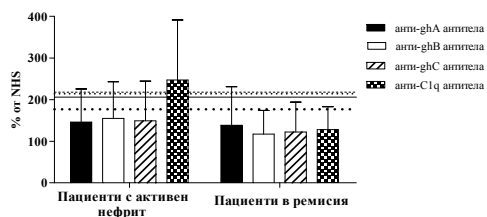
Фиг. 11. Определяне нивата на анти-C1q антитела в СЛЕ серуми №37 и №45 чрез нативна C1q молекула и нейните рекомбинатни химерни аналози – ghA, ghB и ghC чрез ELISA. ghA, ghB, ghC и C1q са имобилизирани в концентрация 20µg/ml и инкубирани със серуми №37 и №45 (1:100 в PBS/0,75M NaCl). Образованите комплекси са установени със заешки анти-човешки IgG, конюгиран с алкална фосфатаза. Резултатите са представени като процент на свързване спрямо сборния нормален серум (NHS), чиято абсорбция е приета за 100%.

За да се докаже специфичността на взаимодействията на анти-ghA и анти-ghB модулспецифичните антитела, изолирани от серум №37 и серум №45, те бяха титрувани с намаляващи концентрации



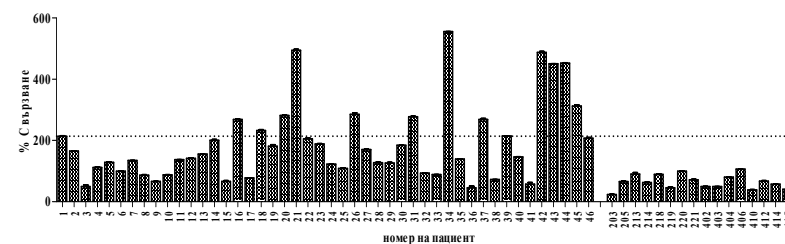
Фиг. 9. Средни стойности на анти-C1q антителата срещу рекомбинантни химерни аналози на А, В и С “главите” на C1q и нативна C1q молекула в серумите на пациенти с лупусен нефрит, положителни за анти-gC1q антитела. С хоризонтални прави са представени горните референтни граници (сборен нормален серум плюс 3SD), над които серумите са положителни за антитела срещу трите рекомбинантни белтъка и нативната C1q молекула (** за ghA, _ за ghB, __ за ghC и ... за C1q). Резултатите са представени като процент на свързване спрямо сборния нормален серум (NHS), чиято абсорбция е приета за 100%.

Беше сравнено също съотношението на отделните типове анти-gC1q и анти-C1q антитела, регистрирани при изследването на пациентите с активна форма на лупусния нефрит и на пациентите в ремисия. На фиг. 10 са представени обобщени резултати от всички кръвни проби на пациентите с оглед фазата на активност на заболяването.



Фиг. 10. Сравнение между средните стойности на анти-C1q антителата срещу рекомбинантни химерни аналози на А, В и С “главите” на C1q и нативна C1q молекула в серумите на пациенти с активен лупусен нефрит и пациенти в ремисия. С хоризонтални прави са представени контролните граници (сборен нормален серум плюс 3SD), над които серумите са положителни за антитела срещу трите рекомбинантни белтъка и нативна C1q молекула (** за ghA, _ за ghB, __ за ghC и ... за C1q). Резултатите са представени като % на свързване спрямо сборния нормален серум (NHS), чиято абсорбция е приета за 100%.

лизираният C1q беше инкубиран със серумите на здравите доброволци (196 на брой). Пет (2,55%) от изследваните 196 здрави доброволци бяха серопозитивни за анти-C1q антитела. 14 (22,58%) от изследваните 62 пациенти със СЛЕ бяха положителни за анти-C1q антитела (фиг. 7). Всичките 14 серума бяха от пациенти с биопсично доказан лупусен нефрит, а дванадесет от тях – в активна фаза на лупусния нефрит по време на вземане на кръвната проба (пациенти с номера: 16, 18, 20, 21, 26, 34, 37, 39, 42 – 45). Сред пациентите със СЛЕ без бъбречни усложнения нямаше положителни за анти-C1q антитела (на фиг. 7 са представени с номера: 203, 205, 213, 214, 218 – 221, 402 – 404, 406, 410, 412, 414 и 415).



Фиг. 7. Определяне нивата на анти-C1q антитела в серуми на пациенти със СЛЕ чрез нативна C1q молекула чрез ELISA. C1q е имобилизиран в концентрация 20µg/ml, инкубиран със серуми от пациенти със СЛЕ (1:100 в PBS/0,75M NaCl). Образованите комплекси са установени със заешки античовешки IgG, конюгиран с пероксидаза. Изследвани са 46 пациенти със лупусен нефрит и 16 пациенти със СЛЕ без бъбречни увреждания. С пунктирна линия е посочена горната референтна граница (сборен нормален серум плюс 3SD), над която серумите са положителни за анти-C1q антитела (214%). Резултатите са представени като процент на свързване спрямо сборния нормален серум, чиято абсорбция е приета за 100%.

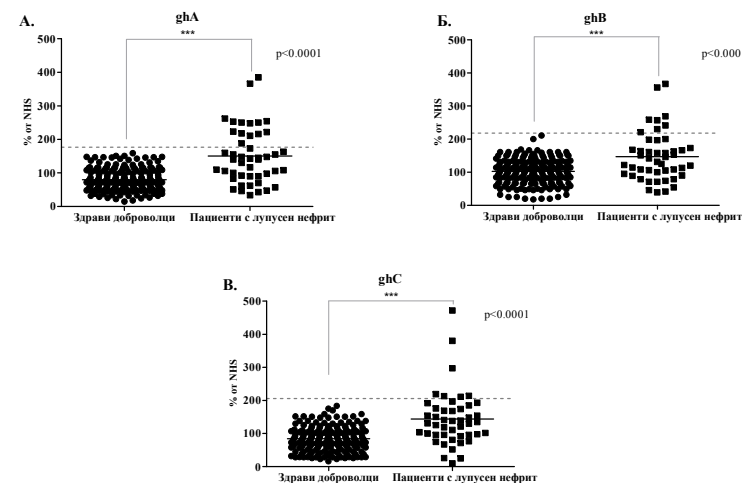
Анти-gC1q антитела в серумите на здравите доброволци и пациенти със СЛЕ

В литературата с термина „анти-C1q автоантитела“ се обозначава антитела, насочени срещу колагеноподобния район (CLR) на C1q, където те разпознават най-вероятно конформационни епитопи. Методите, с които е доказано това, обаче не изключват и наличието на анти-C1q автоантитела срещу глобуларния район (GHR) на C1q (анти-gC1q антитела). Причината за липсата на данни за анти-gC1q антитела в литературата до този момент вероятно се дължи на нис-

ката разтворимост на GHR и на склонността му да агрегира в лабораторни условия. Наличието на рекомбинантни аналози на глобуларните фрагменти на А-, В- и С-веригите на C1q с доказана функционална активност позволи те да бъдат използвани в ролята на модел на глобуларните “глави” на C1q за скрининг на серуми (от здрави доброволци и пациенти със СЛЕ) за наличие на анти-C1q антитела срещу GHR. Въпросът, дали високата концентрация на NaCl анулира еднозначно взаимодействието на C1q и имунните комплекси, стои още по-остро при изследване на взаимодействието на Ab с глобуларните “глави”, които осъществяват свързването с имунните комплекси при функционирането на комплемента. Затова тези опити бяха проведени също в условия на висока концентрация на NaCl (PBS/0,75M NaCl). Първоначално скринингът за анти-gC1q антители започна с използването на имобилизирана ghB-MBP (20µg/ml) (фиг. 8, Б). Изборът на ghB може да се обясни с установената водеща роля на В “главата” в процесите на свързване на C1q с IgG. По-малък принос за свързването с IgG има ghC, а най-малък – ghA (Kojouharova et al., 1998).

Същевременно, отделните полипептидни вериги (А-, В-, С-) имат различен дял в изграждането на IgG-свързващия участък в глобуларните “глави” на C1q. Затова, с цел да се получи допълнителна информация за ролята на ghA и ghC при взаимодействието на C1q с IgG, серумите на здравите доброволци и пациентите бяха изследвани също и за наличие на анти-ghA и анти-ghC C1q антитела (фиг. 8).

Всички пациенти със СЛЕ, както и 196-те здрави доброволци бяха изследвани за анти-gC1q антитела чрез рекомбинантните аналози на А-, В-, С- “главите” на C1q. В изследваната група здрави доброволци не бяха установени позитивни за анти-ghB, анти-ghA и анти-ghC C1q антитела (фиг. 8). Пациентите със СЛЕ без лупусен нефрит бяха негативни за анти-gC1q автоантитела. Като позитивни за анти-gC1q антитела бяха определени 19 пациенти с лупусен нефрит (19/46, 41,30%). От тях само 9 бяха позитивни и за анти-C1q антитела. Останалите 10 от 18-те пациенти имаха антитела, разпознаващи епитопи само в глобуларните фрагменти на C1q. В серумите на тези пациенти не бяха регистрирани антитела, разпознаващи нативната молекула на C1q. Седем от 10-те пациенти бяха в ремисия, а само три от тях бяха в активна фаза на заболяването. От 14-те серума, положителни за анти-C1q антитела (фиг. 7), пет (№1, №20, №26, №39 и №43) не разпознаваха като антиген глобуларните “глави” на C1q.



Фиг. 8. Определяне нивата на анти-gC1q антитела в серуми на здрави доброволци и пациенти с лупусен нефрит чрез рекомбинантни химерни аналози на А- (А.), В- (Б.) и С-веригите (В.) на C1q (ghA, ghB и ghC) чрез ELISA. GhA, ghB и ghC са имобилизирани в концентрация 20µg/ml и инкубирани със серуми от пациенти с лупусен нефрит и здрави доброволци (1:100 в PBS/0,75M NaCl). Образованите комплекси са установени със заешки анти-човешки IgG, конюгиран с алкална фосфатаза. С хоризонтална права е представена горната референтна граница (сборен нормален серум плюс 3SD), над която серумите са положителни за антитела срещу трите рекомбинантни белтъка. Резултатите са представени като процент на свързване спрямо сборния нормален серум (NHS), чиято абсорбция е приета за 100%.

Беше сравнено съотношението между средните стойности на анти-ghA, анти-ghB анти-ghC и анти-C1q антителата в 19-те серопозитивни за анти-gC1q антитела пациенти с лупусен нефрит (фиг. 9).

От трите групи анти-gC1q антитела слабо преобладават анти-ghA антителата (фиг. 9). При десет от тези пациенти лупусният нефрит е бил в активност по време на вземането на кръвната проба (пациенти с номера: 11 – 13, 16, 18, 21, 34, 37, 42, 44 и 45). Не беше открита обаче корелация между активността на заболяването и нивата на определен тип анти-gC1q антитела (анти-ghA, анти-ghB или анти-ghC) в тези пациенти.