

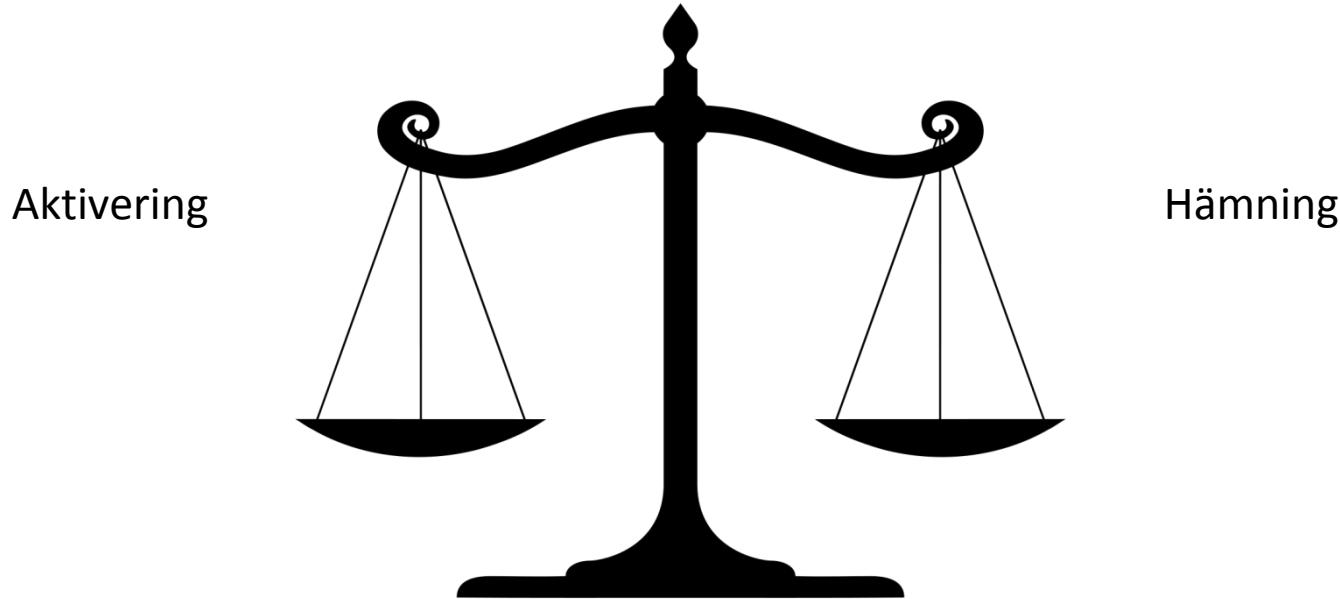
Komplementsystemet och komplementanalyser vid glomerulära sjukdomar

Lillemor Skattum, Klinisk immunologi och transfusionsmedicin
Region Skåne

Innehåll

- Komplementsystemet: aktiveringsvägar och effektorfunktioner
- Komplementanalyser
- Glomerulopatier med komplementaktivering/glomerulär komplementdeposition och primära komplementbrister associerade med glomerulonefrit

Komplementsystemet



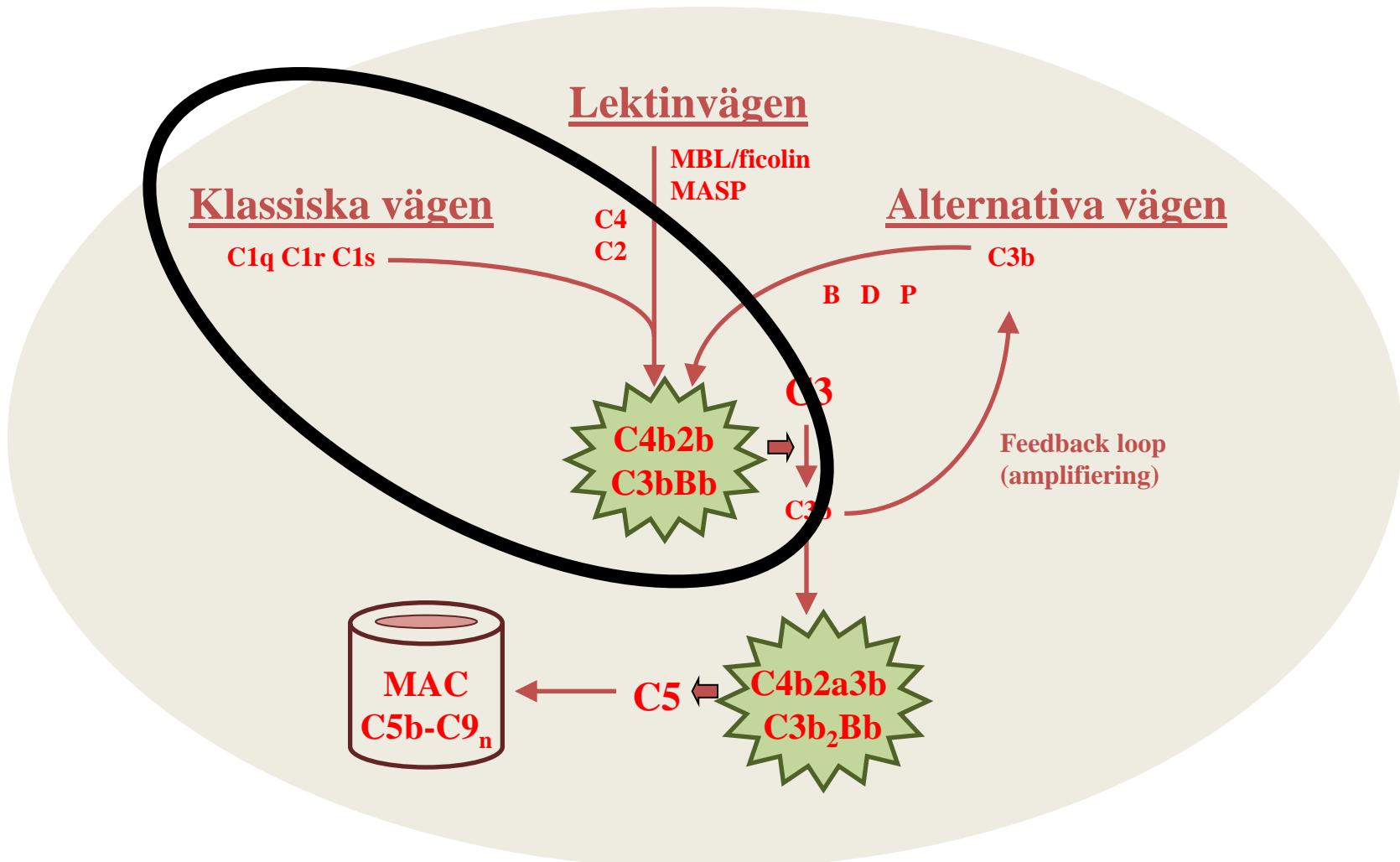
- **Fördelar:** Infektionsförsvar, reglering av adaptivt immunförsvar, hantering av apoptotiskt material, vävnadsregeneration m m
- **Risker:** Inflammation och cellskada

Komplementsystemet

- Del av det medfödda immunförsvaret
- ~ 35 plasmaproteiner och membranbundna proteiner
- Flera komplementproteiner cirkulerar som proenzymer
- Kaskadsystem, aktivering via proteolytiska klyvningssteg
- Tre huvudsakliga aktiveringsvägar

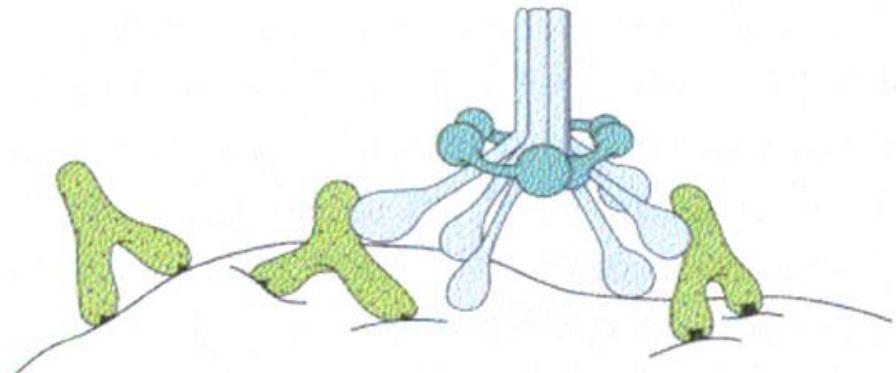
Biological effects of complement

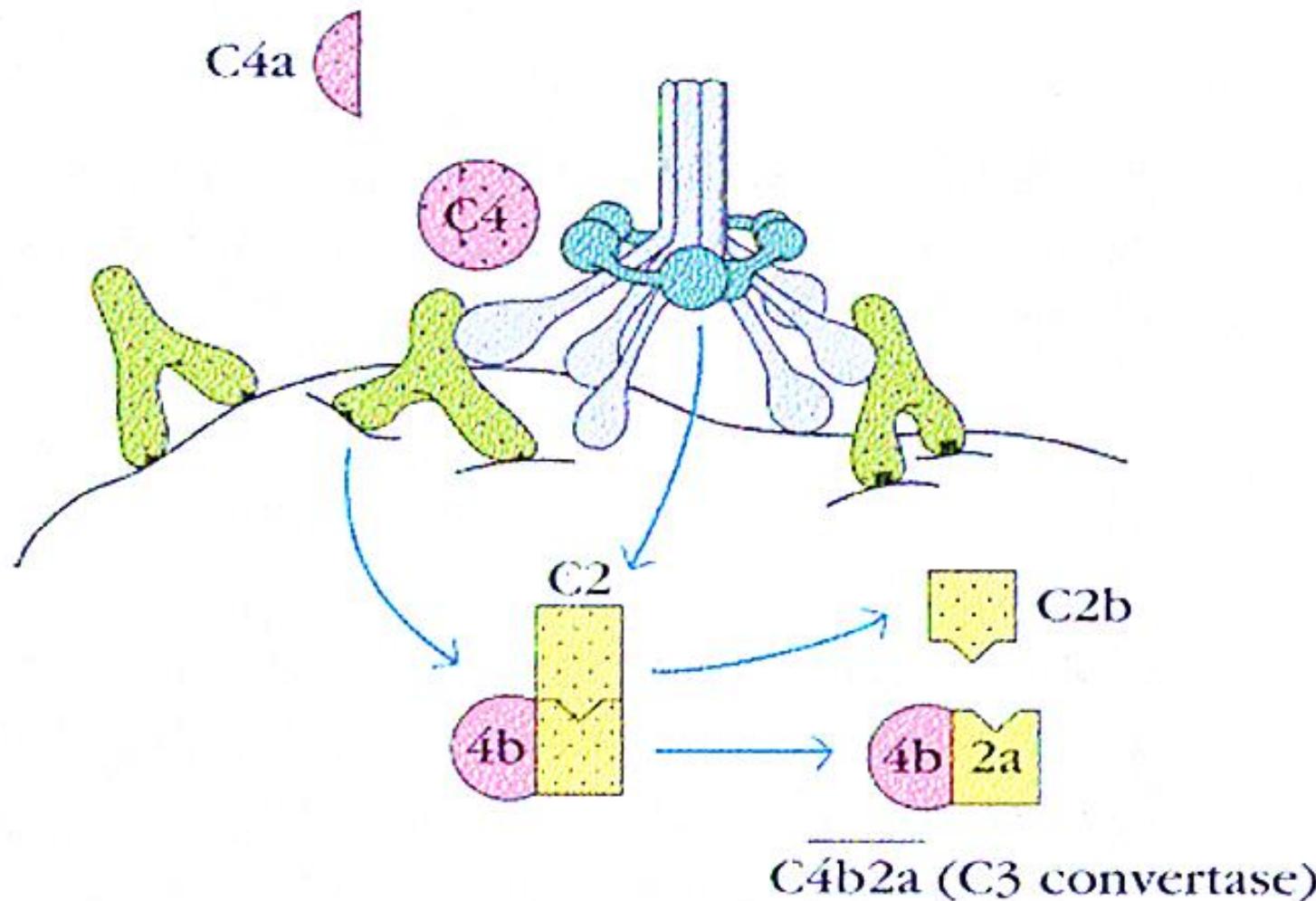
Function	Mechanism/agents
Scavenger effect	Clearance of apoptotic cell material by binding to C1q
Lymphocyte activation	Binding of antigen-bound C3d to CR2 on B cells enhance antibody production
Virus neutralisation	Coating of virus with C3b prevents cell contact
Opsonisation	Coating of microbes with mainly C3b and/or iC3b increases phagocytosis
Elimination of immune complexes	Coating of IC with C3b and/or C4b, and binding to CR1 on erythrocytes and transport to the liver and the spleen
Inflammatory response	Anaphylatoxins (C5a, C3a), Chemotaxis (C5a, C3a)
Cytolysis	Formation of the Membrane attack complex (MAC)



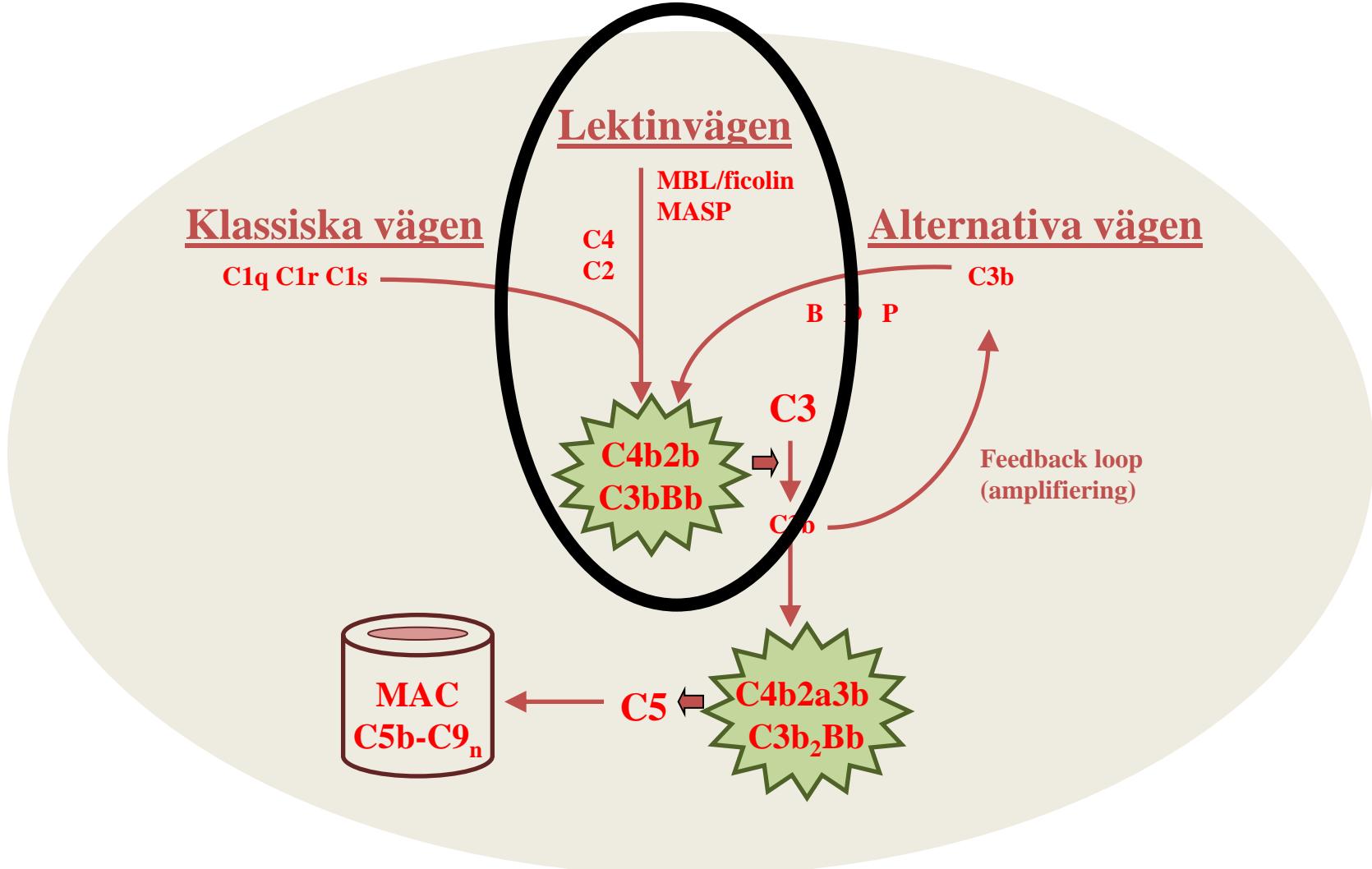
Klassiska vägen

- Aktivatorer: immunkomplex m ffa IgM eller IgG, CRP, pentraxin 3
- Beroende av Ca^{++} och Mg^{++}
- Faktorer: $C1$, $C4$, $C2$
- **$C3$ -konvertas:** $C4b2a$





Kuby J, et al, Immunology 5th ed. 2003

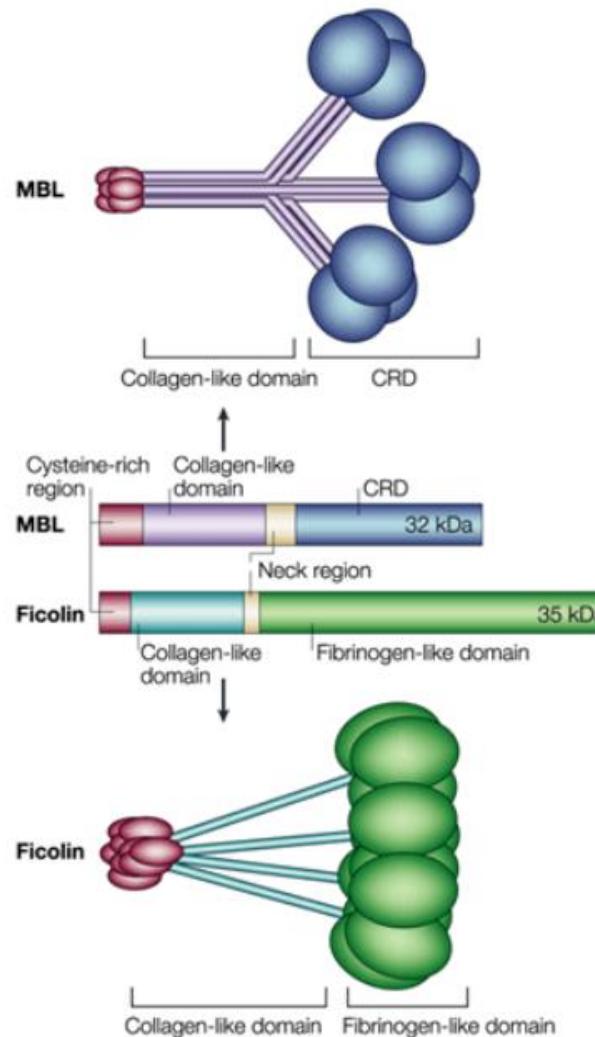


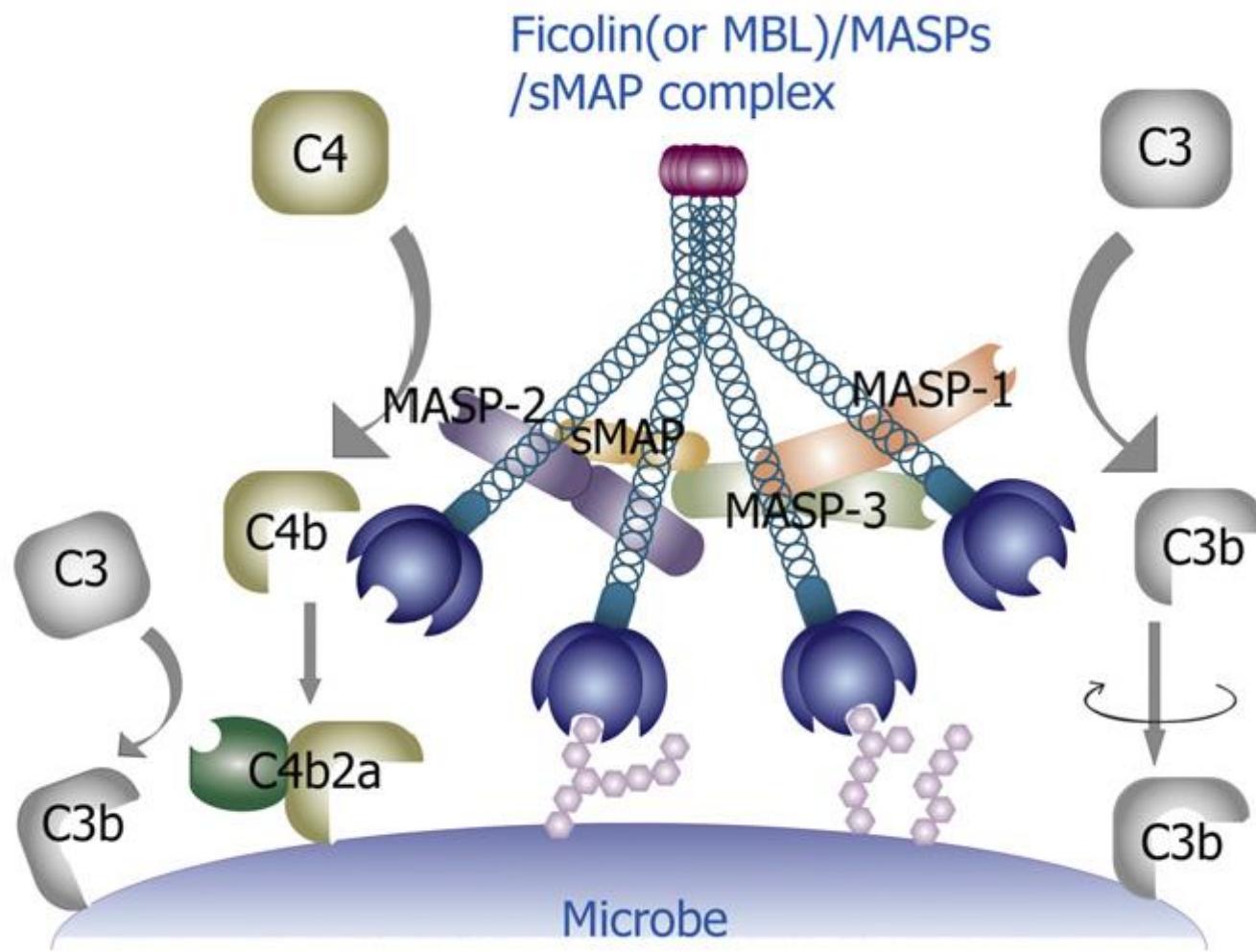
Lektinvägen

- Aktivatorer: vissa sackarider (mannos, N-acetylglukosamin, fucos m fl)
- Komplementfaktorer: mannos-bindande lektin (MBL)/ficoliner, MASP-1, -2, och -3, C4, C2
- Beroende av Ca^{++} och Mg^{++}
- **C3-konvertas:** C4b2a

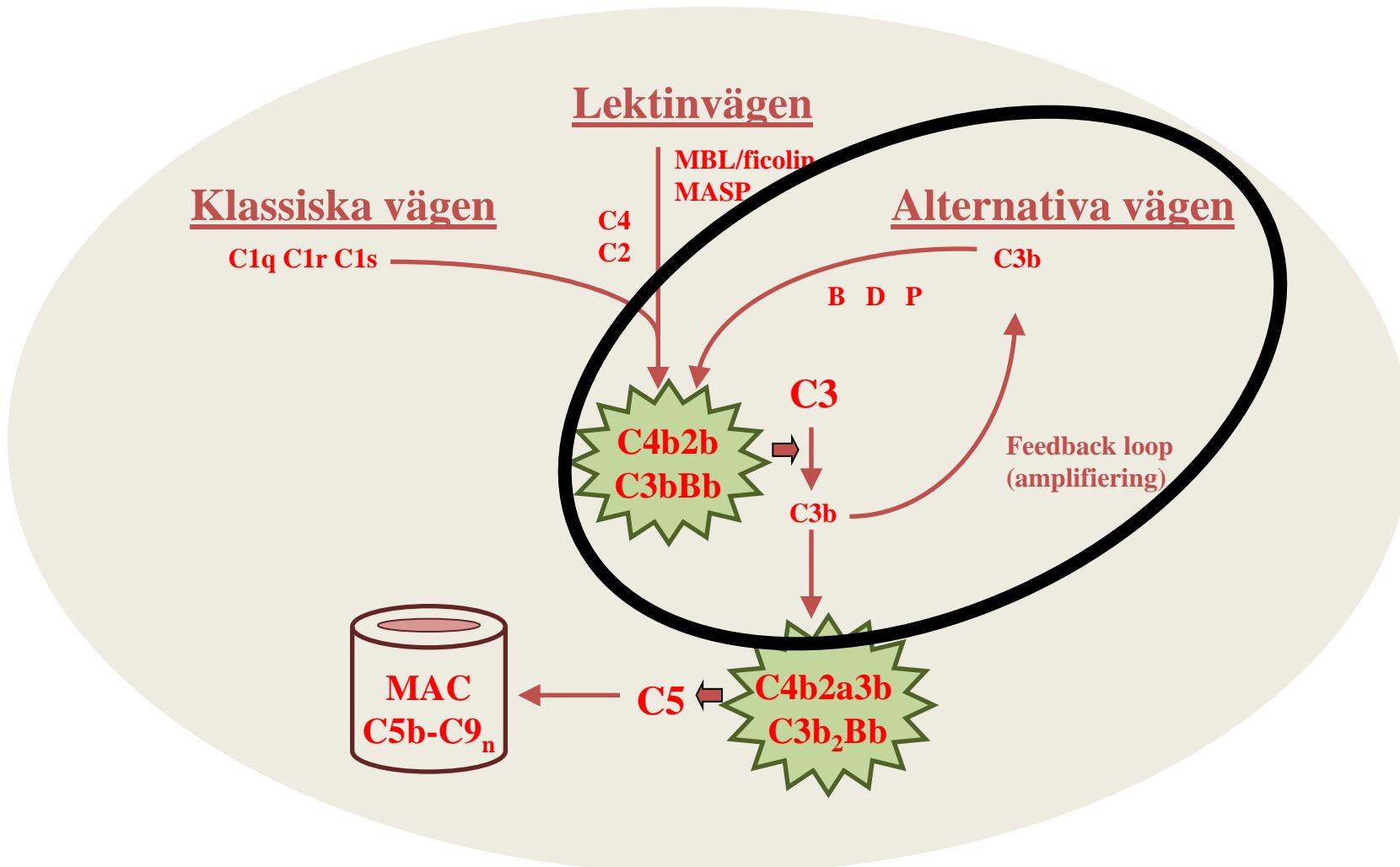
MBL and ficolins

Teizo Fujita, Nature
Reviews Immunology 2,
346-353 (May 2002)



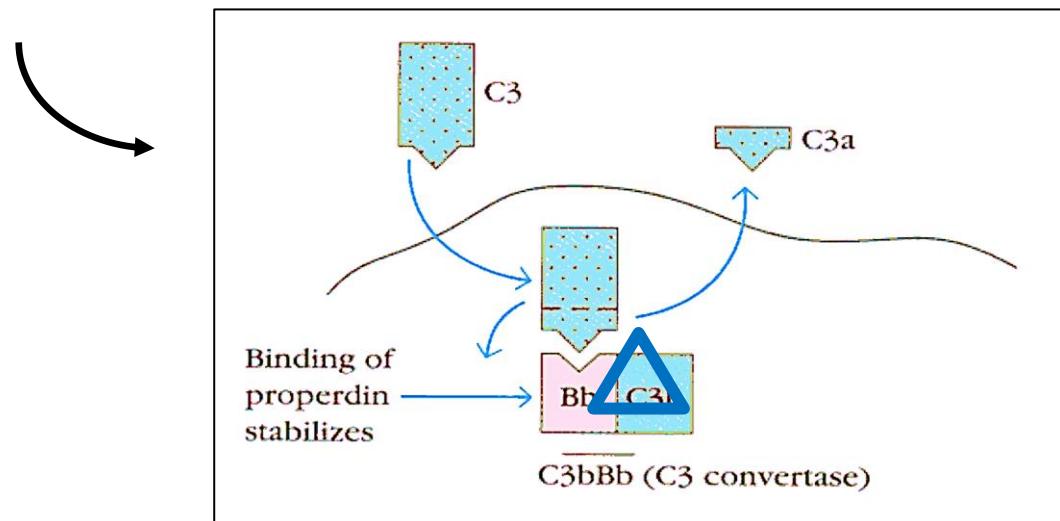
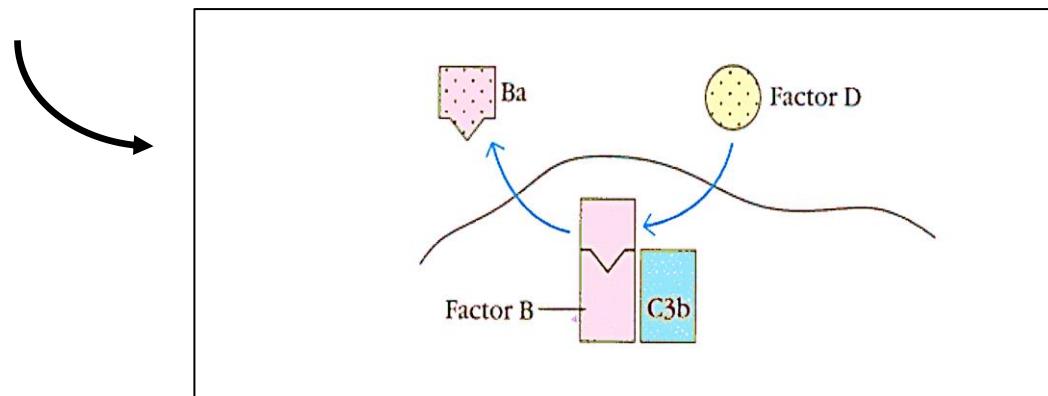
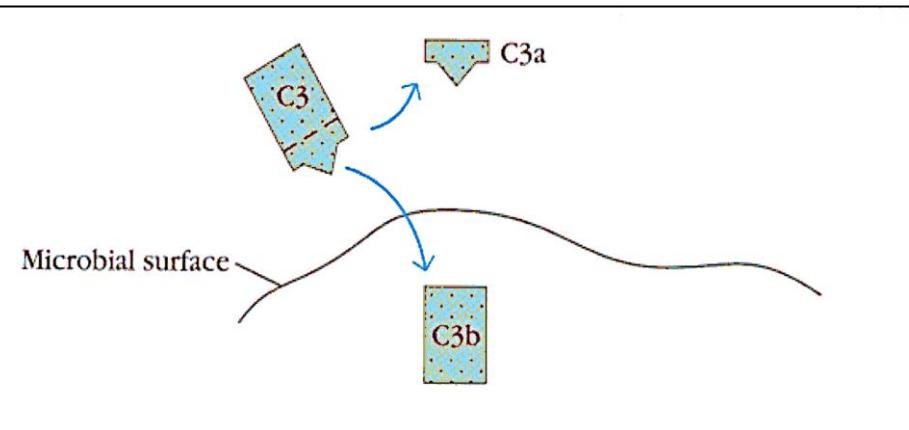


Fujita et al, Immunol Rev, 2004



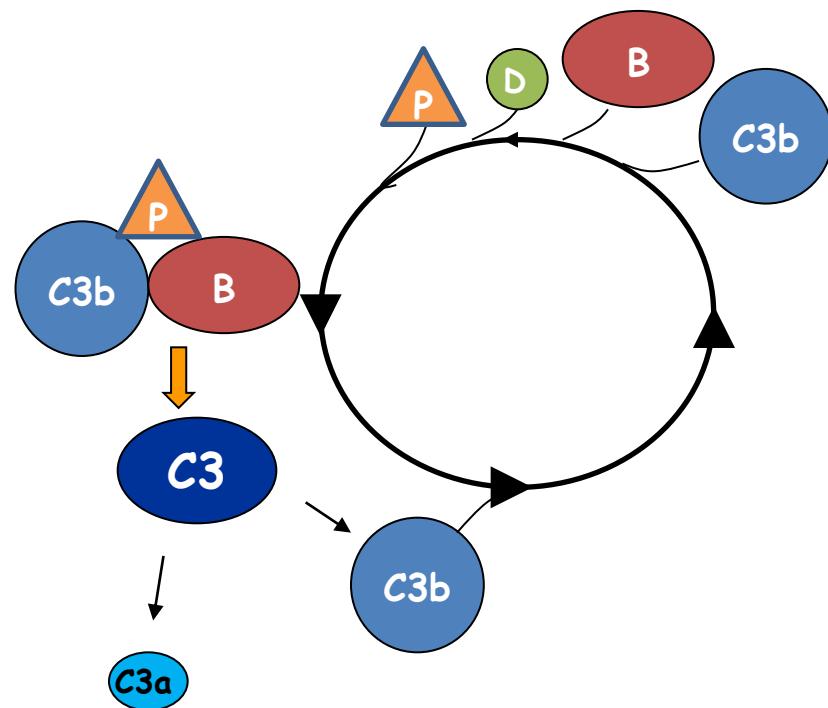
Alternativa vägen

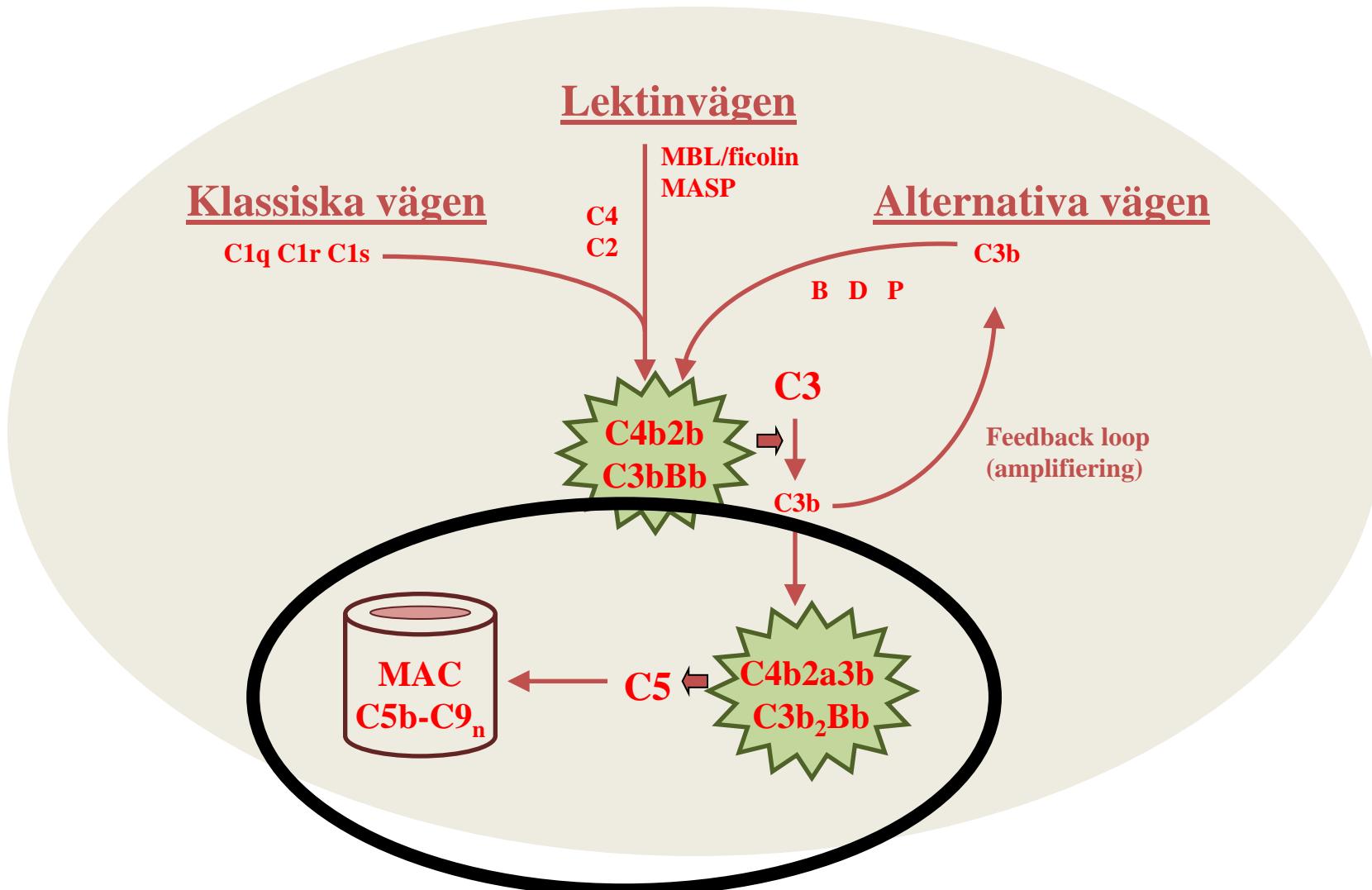
- Aktivatorer: ytor m ssk egenskaper, vissa polysackarider
- Hydrolys av $C3$ + avsaknad av hämning
- Faktorer: $C3$, B , D , properdin
- Feedback och förstärkning av övriga aktiveringsvägar
- Beroende av Mg^{++}
- $C3$ -konvertas: $C3bBb$



Alternativa vägen

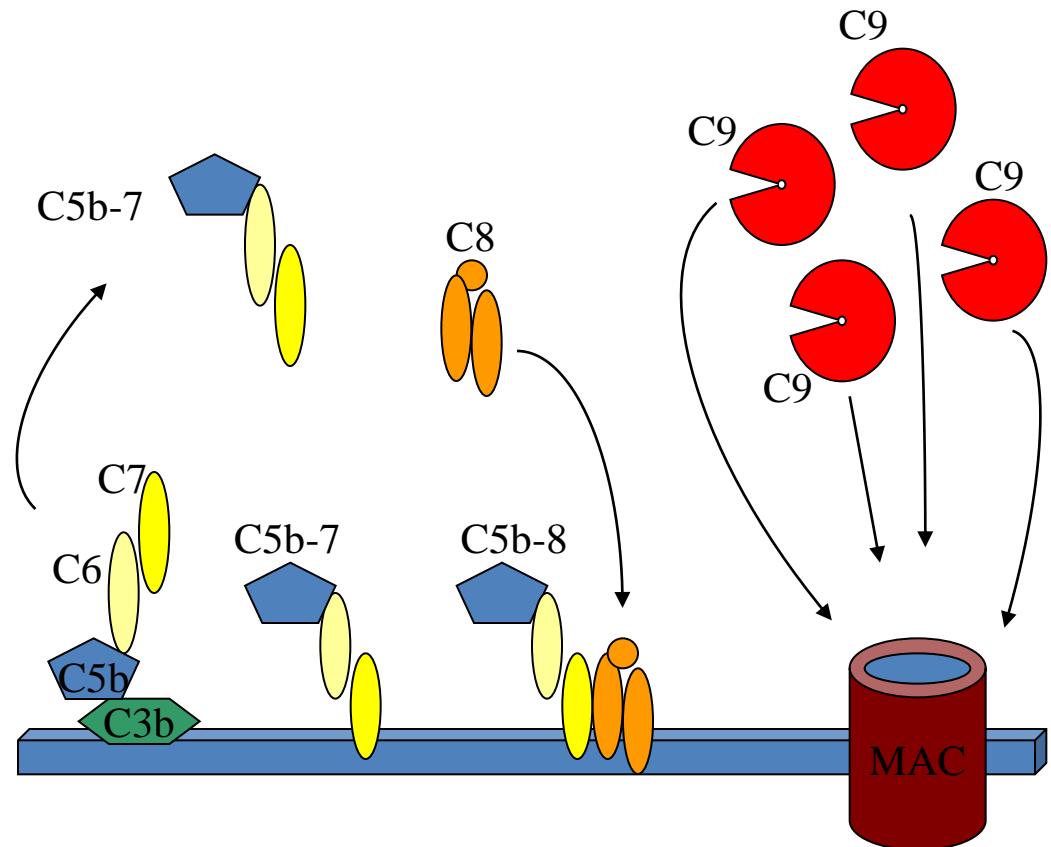
- "Amplification loop"
- Hämmare: faktor H





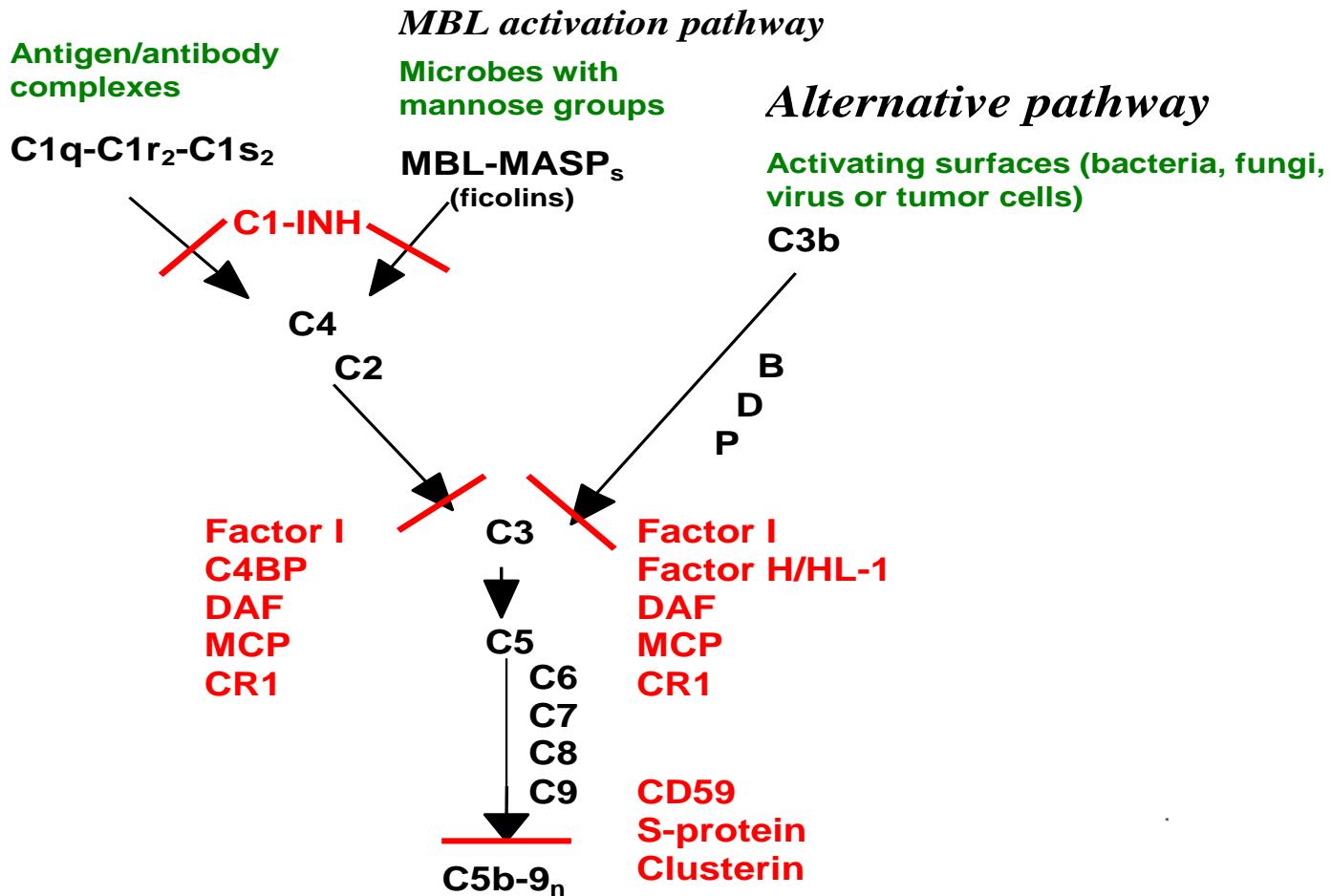
Terminala vägen

- Startar med *C5*-aktivering (genererar *C5a* och *C5b*)
- Faktorer: *C5*, *C6*, *C7*, *C8*, *C9*
- Cellytiskt komplex, MAC (*C5b-C9*) bildas

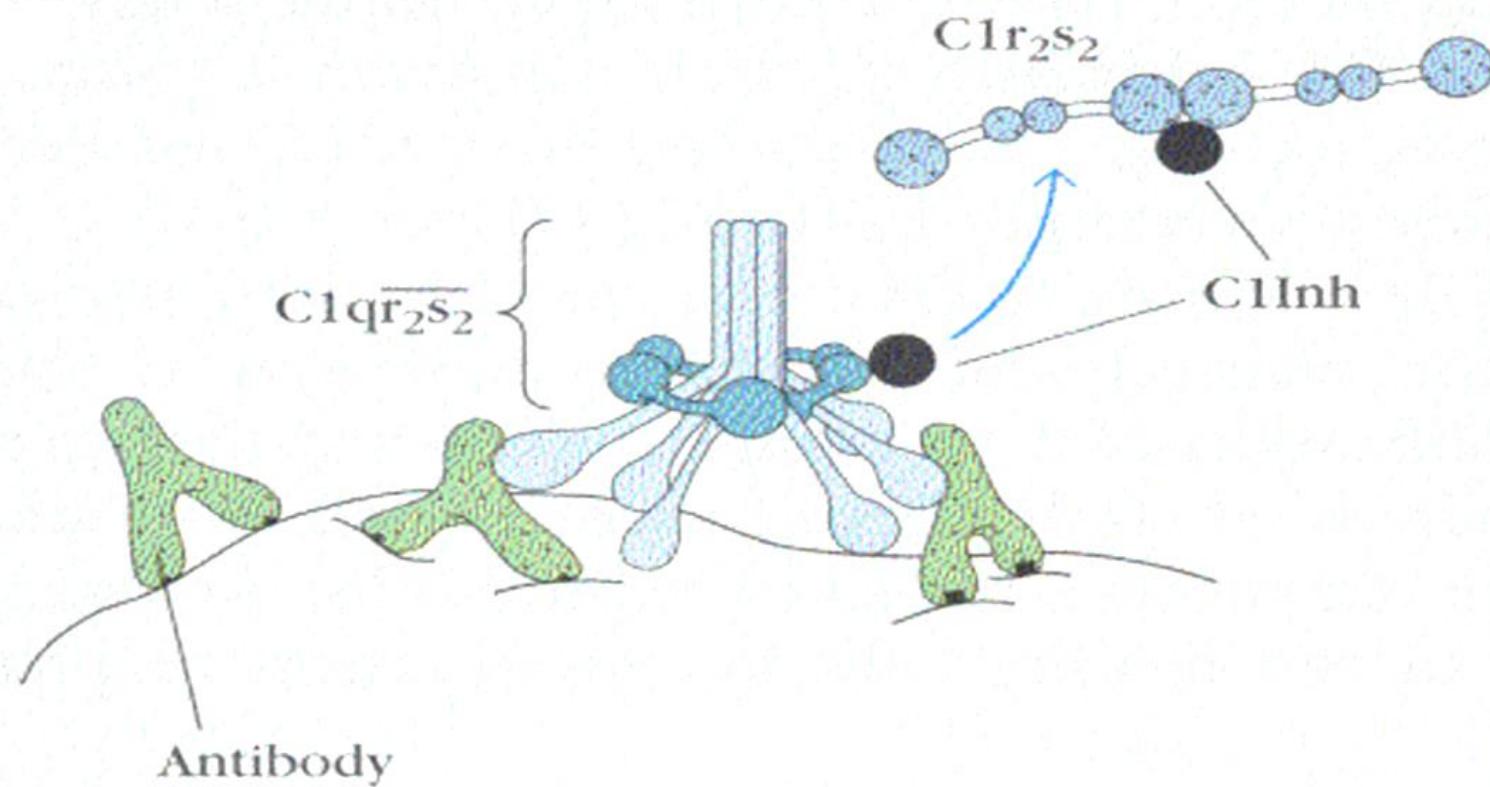


Komplementreglering

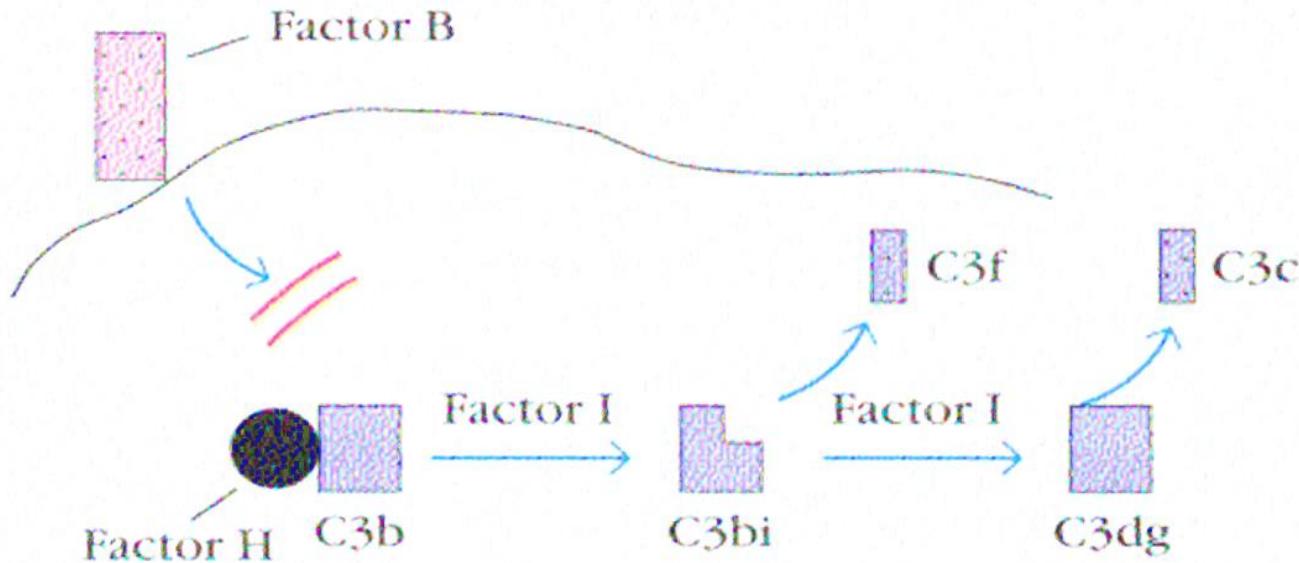
Classical pathway



Reglering av klassiska vägen



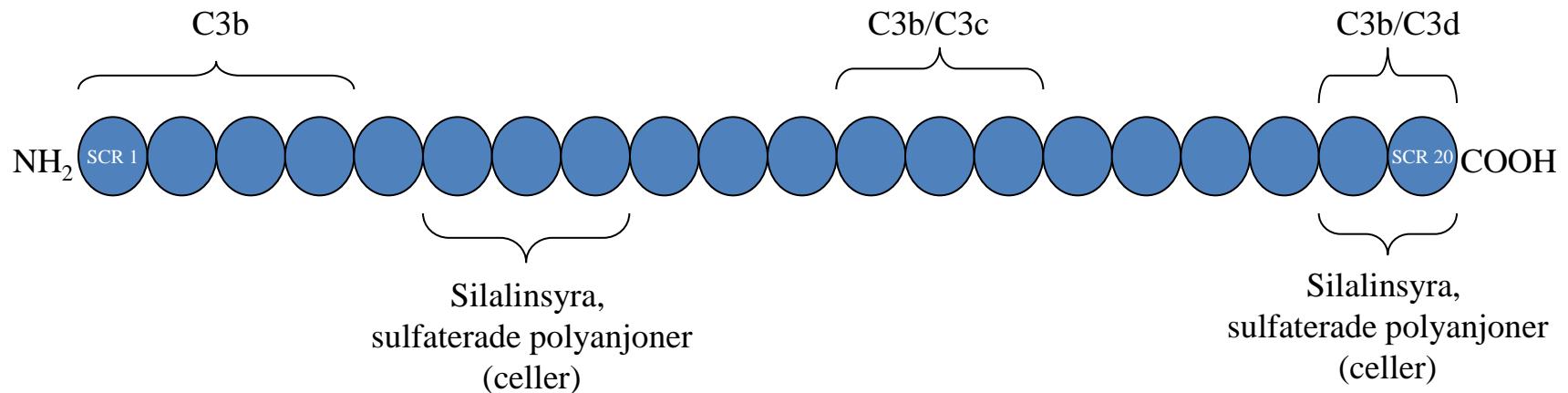
Reglering av alternativa vägen: faktor H och CFHR1-5



Faktor H och CFRH 1-5

- Faktor H:s funktioner:
 - Skyndar på sönderfall av C3-konvertaset
 - Hindrar bildning av C3-konvertas
 - Är kofaktor för faktor I vid nedbrytning av C3b
- Faktor H-relaterade proteiner 1, 2 och 5 kan bilda homo- och heterodimerer med ökad affinitet för ligander: konkurrerar med faktor H? (Goicoechea de Jorge, E., Caesar, J.J., Malik, T.H., Patel, M., Colledge, M., Johnson, S., Hakobyan, S., Morgan, B.P., Harris, C.L., Pickering, M.C., Lea, S.M., 2013. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. PNAS, 2013).

Faktor H



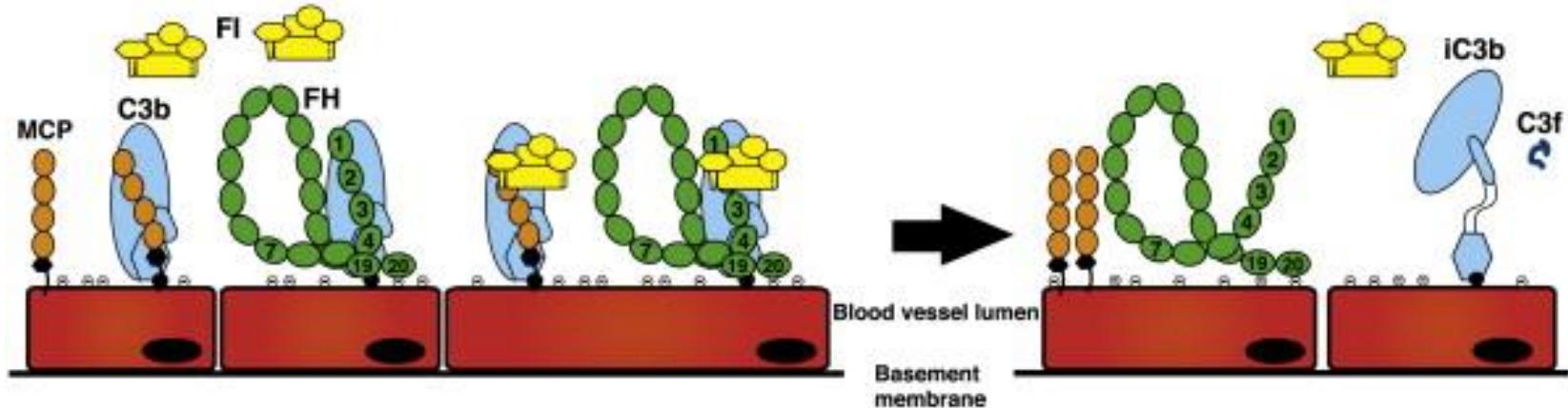
Faktor H-relaterade proteiner 1-5



SCR = short consensus repeat

Faktor I

- Serinproteas
- Inaktiverar $C3b$ och $C4b$ genom klyvning
- Kräver co-faktor: faktor H / membrane co-factor protein (MCP) / complement receptor 1 (CR1)



Sara C. Nilsson, Robert B. Sim, Susan M. Lea, Veronique Fremeaux-Bacchi, Anna M. Blom **Complement factor I in health and disease** Molecular Immunology, 2011

Laboratoriediagnostik av komplementsystemet

- Brist/dysfunktion? (predisposition)
- Komplementaktivering? (sjukdomsaktivitet)
- Autoantikroppar mot komplementproteiner? (diagnosmarkör / sjukdomsaktivitet)

Provtagning komplement

Provhantering, tänk på:

- *in vitro*-aktivering
- serum och EDTA-plasma, bör frysas om >1 dygns transporttid

Komplementanalyser vid klinisk immunologi, Region Skåne, Lund

- Länk till remiss: <file:///C:/Users/Default.Default-Dator/Desktop/immunologi.pdf>
- Prov sparar i -80°

Utredning komplementbrister

- Vilken komplementaktiveringsväg är defekt?
- Hereditär / förvärvad brist?

Förvärvad brist

Orsaker

- Komplementaktivering
- Förlust eller minskad syntes

Kännetecken

- Komplementfaktorhalt ↓
- Aktiveringsprodukter ↑
- Komplementfunktion ↓

Komplementaktivering

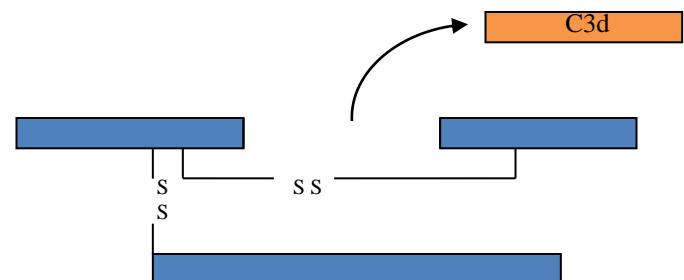
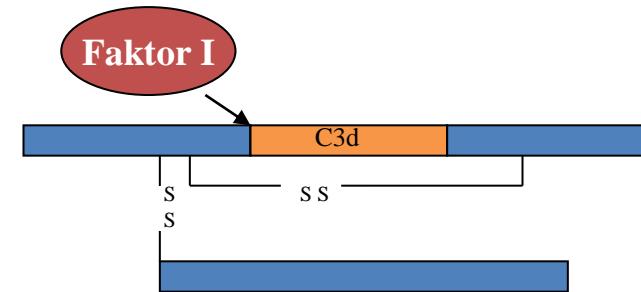
Aktiveringsprodukter gemensamma för alla aktiveringsvägar:

TCC (sC5b-C9), C3d, C3a, C5a

Aktiveringsprodukter specifika för en viss aktiveringsväg:

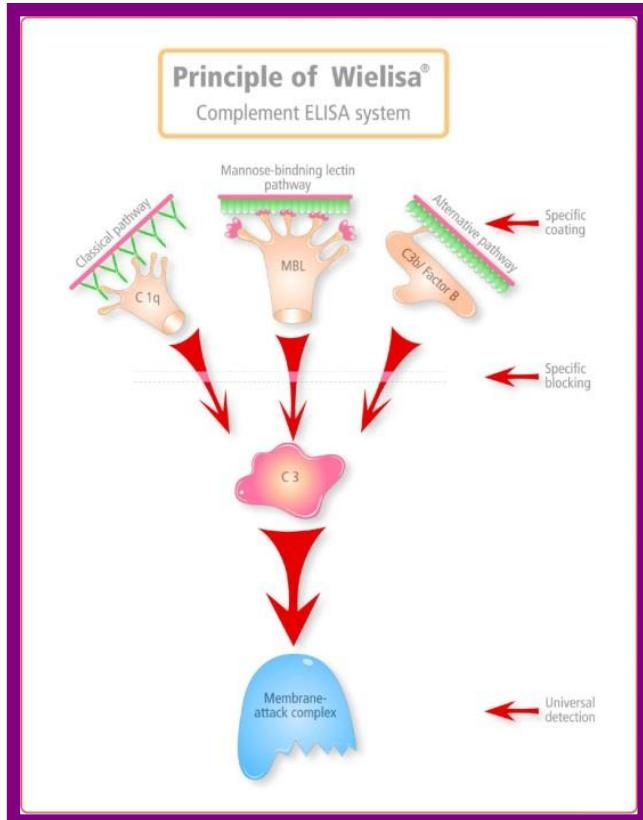
C1rs-C1 INH, C4d, C4a, Ba, C3bBbP

C3-klyvning med bildning av C3d

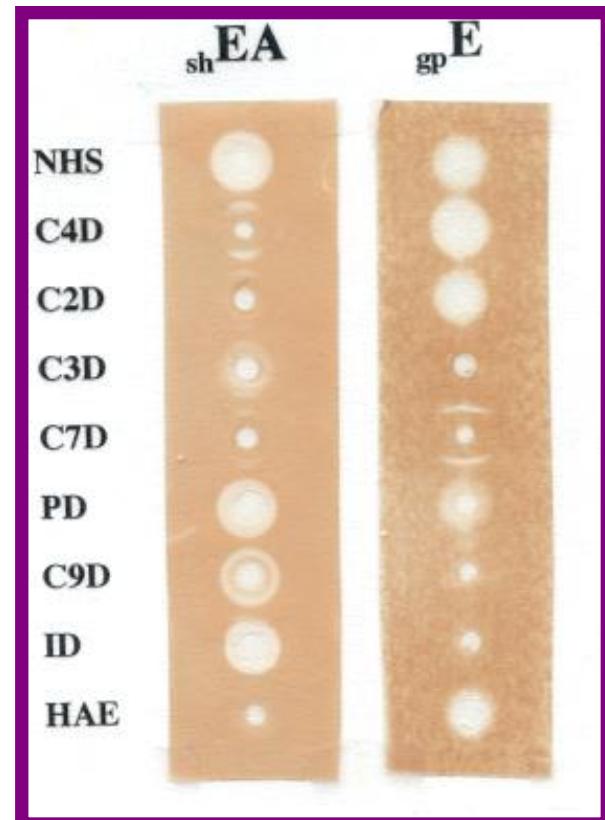


Analys av komplementfunktion

Kvantitativ funktionsanalys:
ELISA (eller hemolytiska metoder)



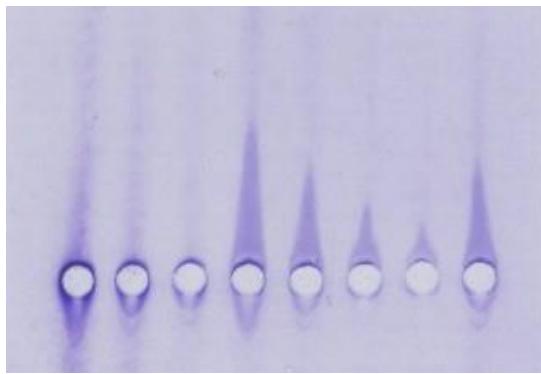
Kvalitativ funktionsanalys:
Hemolys i gel



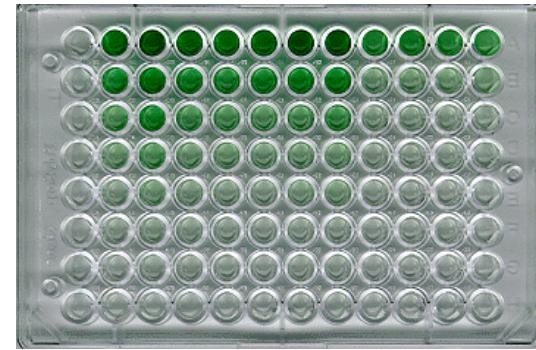
Analys av enskilda komplementfaktorer

Enskilda komplementproteiners

- Halt
- Funktion
- Genetik



Immunelektrofores ("raket")



Enzyme-linked immunoassay
(ELISA)



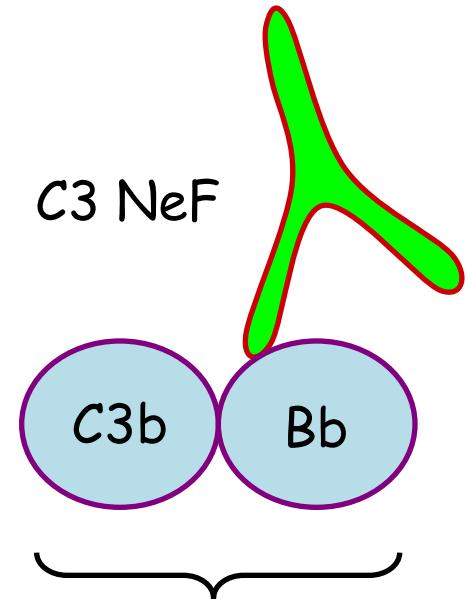
Automatiserad immunokemisk analys (ex
nefelometri)

Autoantikroppar mot komplementproteiner

- "C3 nephritic factors" - C3 NeF
- faktor H-antikroppar
- C1q-antikroppar
- (C1-inhibitor-antikroppar)
- ("C4 nephritic factors" - C4 NeF)
- (Antikroppar mot MBL)

C3 nephritic factors - C3NeF

- Autoantikroppar mot den alternativa vägens C3-konvertas ($C3bBb$)
- Förlänger halveringstid - ger ökad C3-nedbrytning
- $C3 \downarrow$, $C5 \downarrow/\rightarrow$, $C3d \uparrow$, P →, funktion av alternativa vägen ↓
- Kontinuerligt låg C3-halt



Alternative pathway
C3 convertase

Svårigheter vid analys av C3NeF

- C3NeF är heterogena
- Ingen enskild analysmetod påvisar alla C3NeF
- Många tänkbara felkällor, framför allt i funktionstester
- Koppling mellan olika C3NeF och kliniska parametrar dåligt känd
- Flera analysmetoder i kombination rekommenderas för att öka sensitiviteten (Paixão-Cavalcante D, López-Trascasa M, Skattum L, Giclas PC, Goodship TH, de Córdoba SR, Truedsson L, Morgan BP, Harris CL. Sensitive and specific assays for C3 nephritic factors clarify mechanisms underlying complement dysregulation. *Kidney Int.* 2012)

C3NeF-analys: metoder

Funktionstester

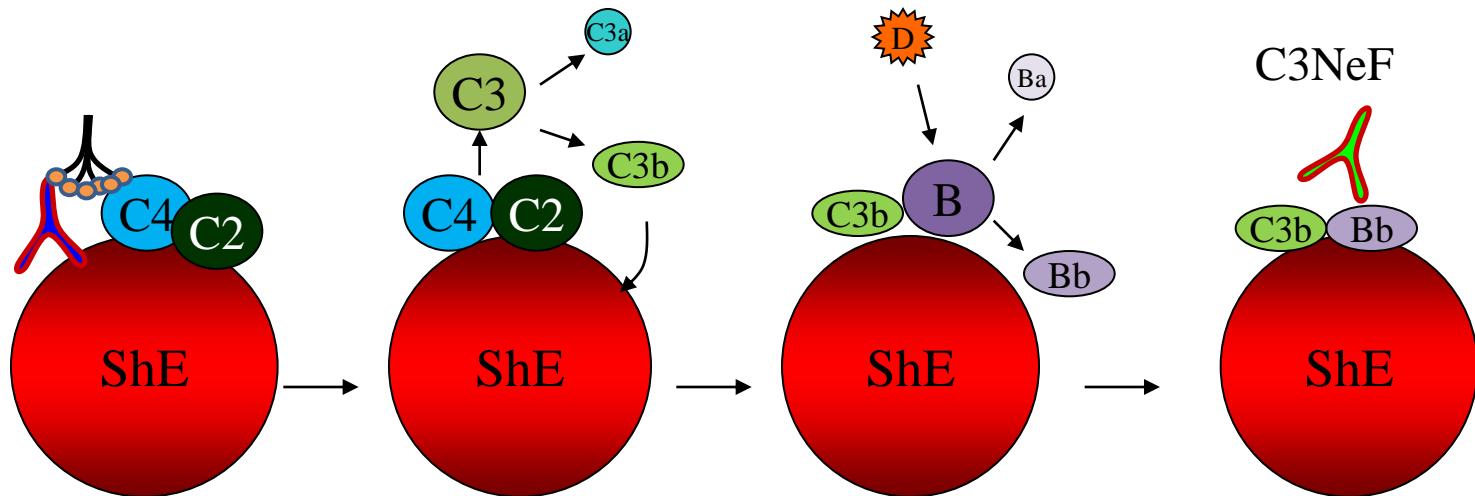
- "Klassisk" C3NeF hemolys: C3-konvertas byggs på cellytan med renade komplementfaktorer
- Hemolys enl. Rother
- Hemolys av "innocent bystander"-cell
- C3-nedbrytning i löslig fas
- Funktions-ELISA: neoepitop (Bb) påvisas efter inkubation av serum med C3, fB och fD

Antikroppspåvisning

- ELISA

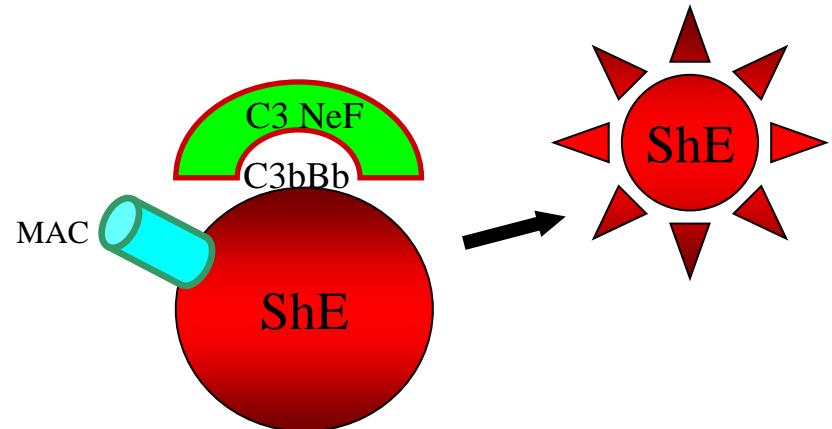
Analys av C3NeF

- "Klassisk" C3NeF hemolys-assay: C3-konvertas byggs på cellytan med renade komplementfaktorer

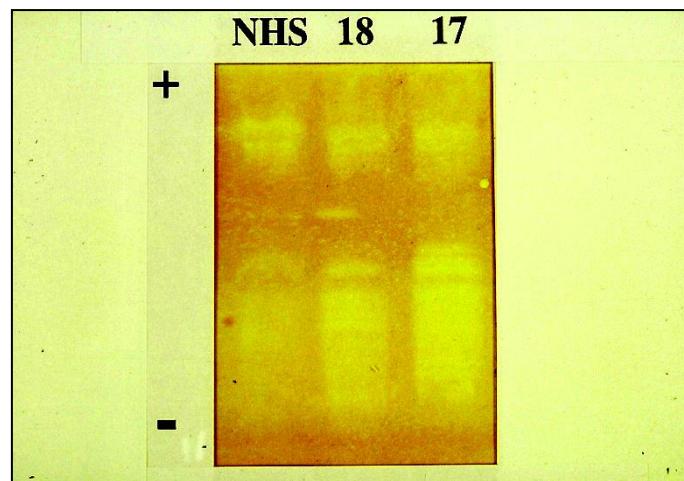


Analys av C3NeF

- Hemolytisk test osensibiliseraade
fårblodkroppar (Rother U, 1982)

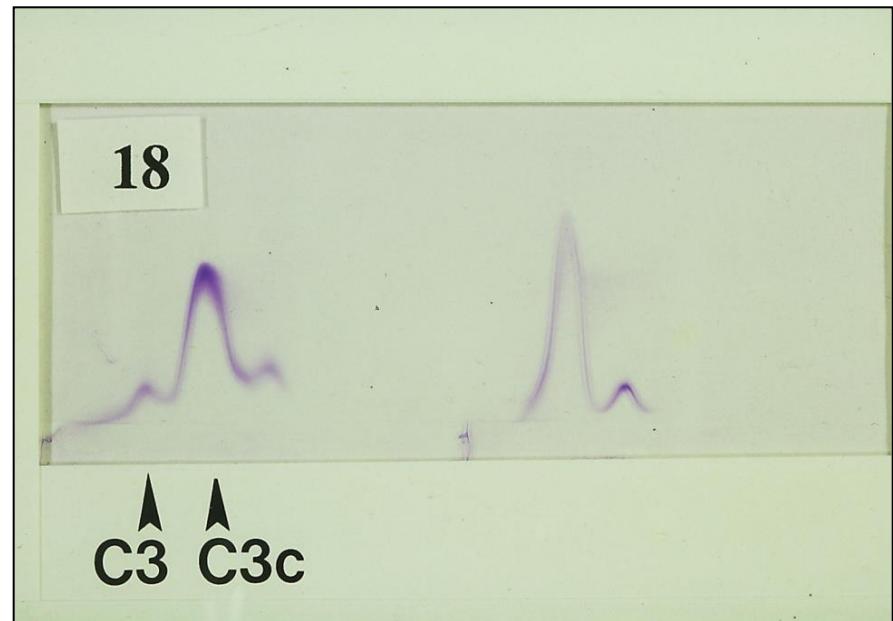


- Hemolys av "innocent bystander"-cell
efter elfores av patientprov



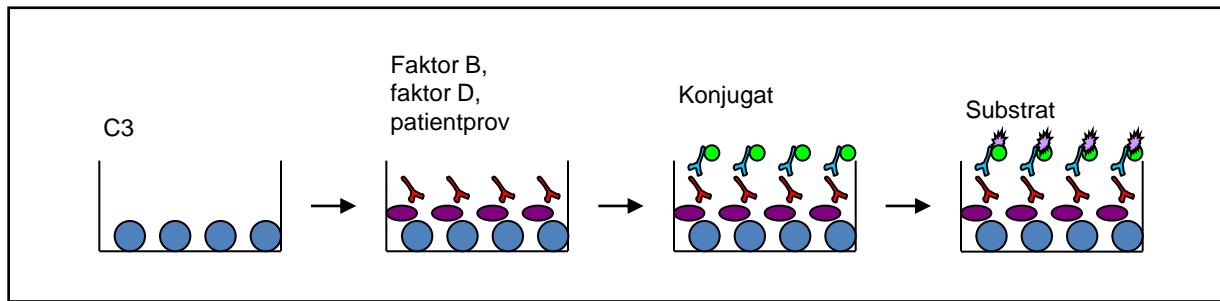
Analys av C3NeF

- C3-nedbrytning i "fluid phase"
med korsad immunelektrofores



Analys av C3NeF med ELISA

- Princip: alternativa vägens C3-konvertas byggs upp med renade komplementfaktorer i mikrotiterplatta
- Ni^{2+} i buffert
- Patientserum eller renat IgG binder till konvertas (Seino et al, J Immunol Meth 1993, Paixao-Cavalcante et al, Kidney Int 2012)



ELISA, Lund

- Mg^{2+}
- Serum värmeinaktiverat
- Stor variation mellan plattor vid högre absorbansnivåer → semikvantitativ analys
- Bakgrundskontroll: bindning till C3
- Risk för falskt positivt resultat: 1 patient med faktor H-antikroppar är svagt positiv

C3NeF

Sjukdomsassociationer

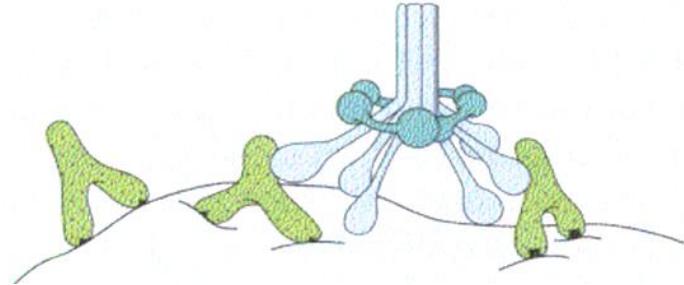
- Vissa kroniska primära glomerulonefriter m dysreglering av den alternativa vägen:
 - Dense deposit disease (tidigare: membranproliferativ glomerulonefrit, MPGN, typ II): >80 %
 - C3 glomerulonefrit
 - MPGN I/III 30-50 %
- Partiell lipodystrofi (förvärvad form)
- Enstaka fallbeskrivningar vid SLE och akut poststreptokocknephrit
- Infektionsbenägenhet ffa meningokocker
- Enstaka friska personer

Analys av faktor H-antikroppar (ELISA)

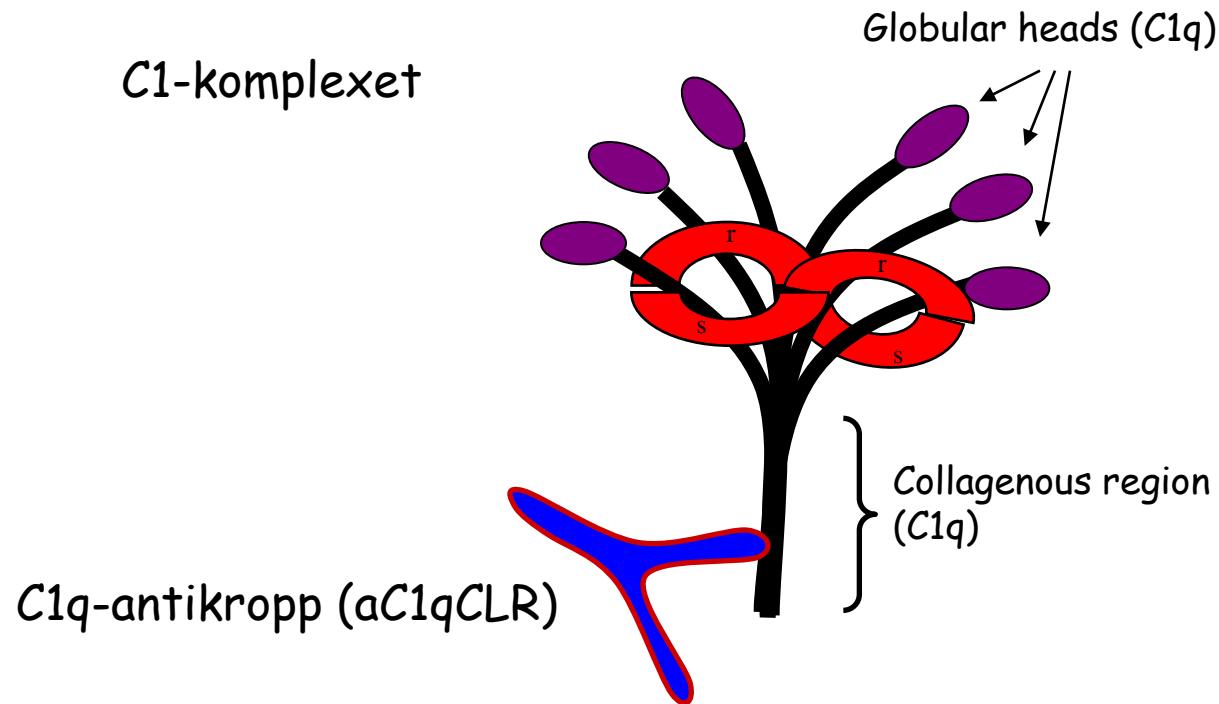
- Harmonisering mot "internationella enheter" (Watson R, Lindner S, Bordereau P, Hunze EM, Tak F, Ngo S, Zipfel PF, Skerka C, Dragon-Durey MA, Marchbank KJ. Standardisation of the factor H autoantibody assay. *Immunobiology*. 2014)
- Deltar i samarbete kring komplementstandard (pos/neg)
- Tycks kunna korsreagera i hemolystest för C3NeF (ökad hemolys)
- Hos vissa aHUS-patienter med anti-faktor H är majoriteten av antikropparna i komplex med faktor H - implikationer för analys?
- Utöver aHUS även beskrivet vid vissa reumatiska sjukdomar och C3-glomerulopati (binder N-terminala faktor H)

C1q-antikroppar

- *C1q*
 - globulär del; binder Fc (IgG och IgM) och gC1qR
 - kollagen-lik del; binder C1r/C1s och cC1qR
- Antikroppar mot den kollagenlika delen av *C1q*, ofta av subklass IgG2
- SLE: oselekterat 20-30 %, patienter m njurengagemang 60-70 %
- Hypokomplementemiskt urtikariavaskulit-syndrom, HUVS: ca 100 %, RA m vaskulit, membranproliferativ glomerulonefrit m fl



C1q-antikroppar



Glomerulopatier relaterade till komplementsystemets alternativa väg

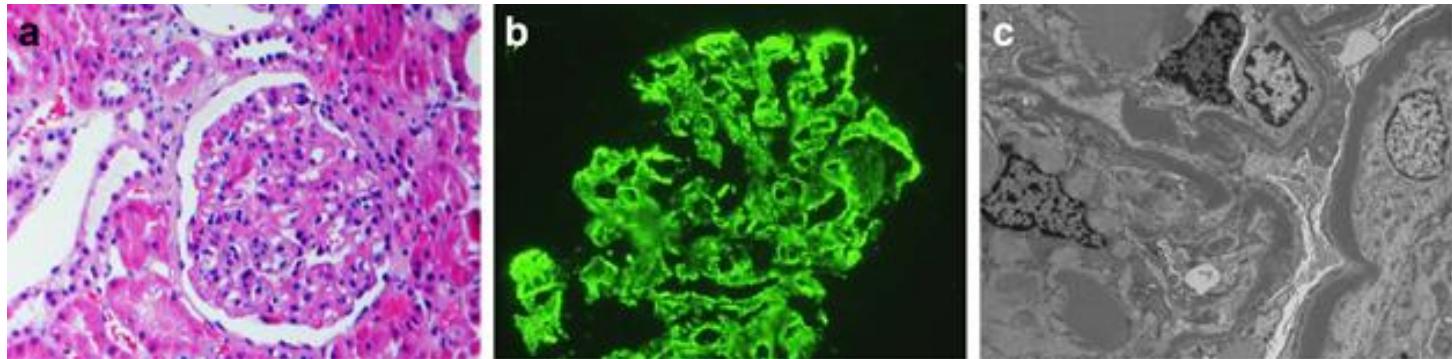
- C3-glomerulopati
- Atypiskt hemolytiskt uremiskt syndrom (AHUS) - (undergrupp)
- Poststreptokocknefrit
- ANCA-associerad glomerulonefrit

C3-glomerulopati:

Dense deposit disease och C3-glomerulonefrit

- Sällsynta kroniska glomerulonefriter
- Inlagring av *C3* i glomeruli - inga immunglobuliner
- Defekt reglering av alternativa vägen pga *C3NeF* (enstaka fall anti-faktor H eller anti-faktor B) eller brist/mutation i gener för faktor H, *CFHR1, 2, 5* och *C3*; risk för *C3*-glomerulopatier påverkas även av vanliga polymorfismer i gener för faktor H, *C3*, *CFHR5*, faktor B (Zipfel PF, Skerka C, Chen Q, Wiech T, Goodship T, Johnson S, Fremaux-Bacchi V, Nester C, de Córdoba SR, Noris M, Pickering M, Smith R. The role of complement in *C3* glomerulopathy. Mol Immunol. 2015)

Dense Deposit Disease (DDD)

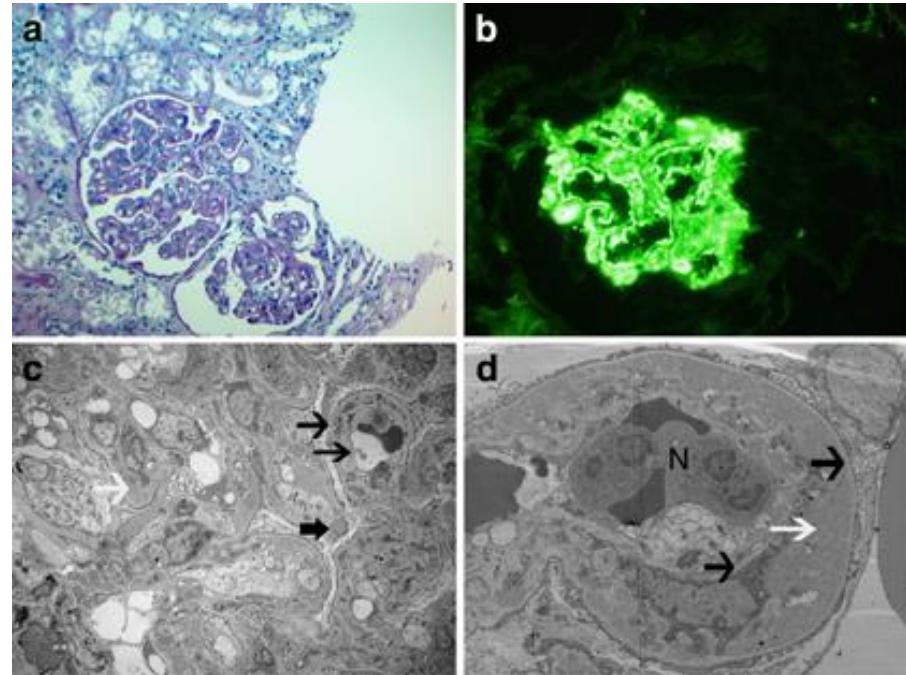


Sethi et al Kidney Int 2012

- ~50 % utvecklar terminal njursvikt inom 10 år
- C3 i glomeruli, ej Ig (immunfluorescens)
- Dense deposits (EM) innehållande C3, MAC-komponenter, CFHR5 och vitronektin i basalmembran
- Defekt reglering av alternativa vägen pga C3NeF (60-80 %) eller brist/mutation/polymorfism i komplementgener enl. föregående bild
- >90 % återfall efter transplantation
- Komplementhämnning?

C3-glomerulonefrit

- Mindre känt om prognos jmf m DDD, trol ngt bättre
- C3 i glomeruli, ej Ig (immunfluorescens)
- Inga "dense deposits"
- Defekt reglering av alternativa vägen, ev terminala vägen aktiverad mer än vid DDD
- Oklart hur många med C3NeF, ev färre än vid DDD
- Komplementhämnning?



C3 glomerulonephritis (C3GN). (a) Light microscopy (LM) shows membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) with thickened capillary walls and double contour formation (periodic acid-Schiff $\times 20$). (b) Immunofluorescence (IF) microscopy shows strong capillary wall staining for C3 ($\times 40$). (c, d) Electron microscopy (EM) shows large subendothelial deposits (white arrows), occasional subepithelial deposit (thick black arrow) with double contour formation (thin black arrows) (N, neutrophil) (c $\times 1650$, d $\times 4200$).

Komplementanalyser vid C3-glomerulopati

- Rekommenderade analyser:
 - Serumproteiner: *C3*, *C4*, faktor B, *C3d*, TCC, *C5*, (properdin), faktor H, faktor I
 - Gener: sekvensering/copy number variation av gener för faktor H, CFHR1-5, *C3*, faktor B, faktor I, MCP
 - Autoantikroppar: *C3NeF*, anti-faktor B, anti-faktor H

(Pickering MC, D'Agati VD, Nester CM, Smith RJ, Haas M, Appel GB, Alpers CE, Bajema IM, Bedrosian C, Braun M, Doyle M, Fakhouri F, Fervenza FC, Fogo AB, Frémeaux-Bacchi V, Gale DP, Goicoechea de Jorge E, Griffin G, Harris CL, Holers VM, Johnson S, Lavin PJ, Medjeral-Thomas N, Paul Morgan B, Nast CC, Noel LH, Peters DK, Rodríguez de Córdoba S, Servais A, Sethi S, Song WC, Tamburini P, Thurman JM, Zavros M, Cook HT. *C3 glomerulopathy: consensus report*. Kidney Int. 2013)

- Komplementnivåer vid *C3*-glomerulopati:
 - *C3*: varierande grad av sänkning
 - Faktor B: varierande grad av sänkning
 - *C3d*: varierande grad av ökning
 - *C5*, *C7* låga hos vissa patienter - vid låga nivåer ökning av TCC (*sC5b-C9*)
 - Properdin oftast normal nivå
 - Faktor H och faktor I inte påverkade

Defekt komplementreglering vid aHUS

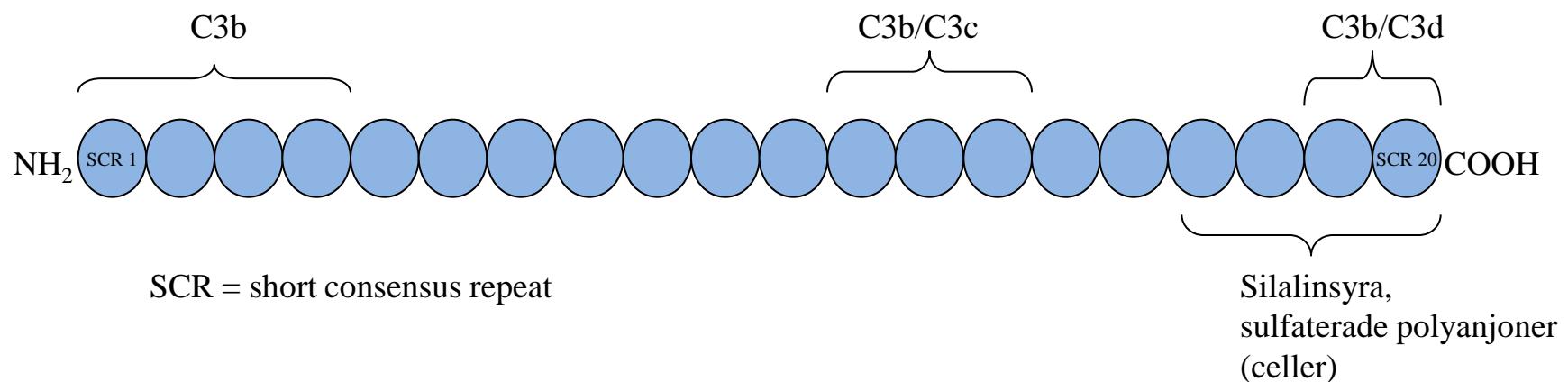
- Gäller ca 60 % av patienter med aHUS (Nester CM, Barbour T, de Cordoba SR, Dragon-Durey MA, Fremeaux-Bacchi V, Goodship TH, Kavanagh D, Noris M, Pickering M, Sanchez-Corral P, Skerka C, Zipfel P, Smith RJ. Atypical aHUS: State of the art. Mol Immunol. 2015)
- Mutationer i gener för komplementproteiner/hämmare - vanligen heterozygota mutationer m variabel penetrans (ca 50 %)
 - Faktor H hos 24-27 % (funktion ↓), **stor risk för sjukdom i transplantat**
 - *CFHR5* hos 1-4 %
 - MCP hos 5-9 % (funktion ↓) **mindre risk för sjukdom i transplantat**
 - Faktor I hos 4-8 % (funktion ↓)
 - Trombomodulin hos 5 % (funktion ↓)
 - C3 hos 2-8 % (ökad funktion ↑)
 - Faktor B hos 1-4 % (ökad funktion ↑)
- Autoantikroppar mot faktor H hos 3-6 %
 - Oftast associerat med homozygot deletion av *CFHR3* och *CFHR1* eller *CFHR1* och *CFHR4*

Komplementanalyser vid aHUS

- Rekommenderade analyser:
 - Serumproteiner: C3, komplementfunktion, TCC, faktor H, faktor B, faktor I
 - Celluttryck: MCP
 - Gener: sekvensering/copy number variation av gener för faktor H, faktor I, MCP, C5, faktor B, CFHR1-5
 - Autoantikroppar: faktor H-antikroppar, (faktor I-antikroppar)
- Nester CM, Barbour T, de Cordoba SR, Dragon-Durey MA, Fremeaux-Bacchi V, Goodship TH, Kavanagh D, Noris M, Pickering M, Sanchez-Corral P, Skerka C, Zipfel P, Smith RJ. Atypical aHUS: State of the art. Mol Immunol. 2015
- Uppföljning av eculizumab: komplementfunktion (CH50 eller ELISA)
- Komplementnivåer och uttryck vid aHUS:
 - C3 kan vara lätt sänkt (minoritet), ffa vid faktor H-mutation
 - Faktor H inte sänkt
 - MCP (CD46): mindre MCP på cellytor

Antikroppar mot faktor H vid aHUS

- Binder C-terminala delen av faktor H
- Stör faktor H:s funktion → ökad aktivering av komplement på cellytor, (sänkt C3-halt)



Acute poststreptococcal glomerulonephritis (AGN)

- **Syndrome features**

Acute nephritis 1-3(6) weeks after a streptococcal infection, mainly developing countries, children

- **Laboratory/biopsy findings**

- Alternative pathway complement activation ($C3$, $C5$ and properdin low)
- Serum $C3$ returns to normal within 6-10 weeks
- Culture/anti-streptococcal antibodies positive
- Glomerular biopsy findings: hypercellularity, deposition of $C3$ and later IgG

- **Prognosis and treatment**

- Symptomatic treatment only, self-healing
- Recurrence extremely rare: protection by specific adaptive immune response?

- **Pathogenesis**

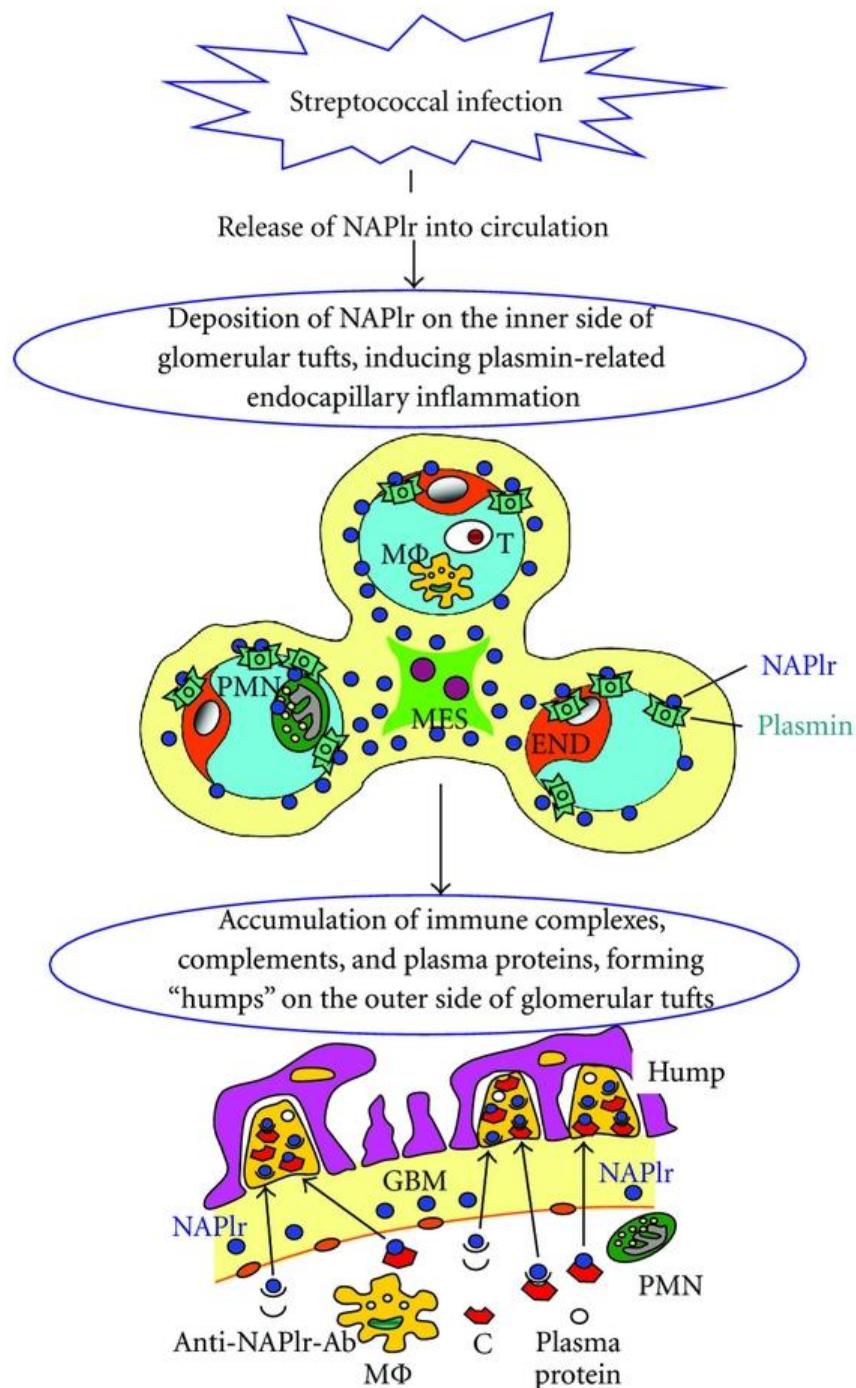
- Immune complex mediated (biopsy findings, time aspect)
- Direct/indirect damage caused by streptococcal antigens
- Certain M-types associated (e.g. M1, M12, M49, M57)
- No clear explanation for the low serum concentrations of $C3$ detected in the early stages
- Lectin pathway involvement suggested (biopsy findings)

Flera "nefritogena" streptokockproteiner är plasminogen-bindande

NAPlr
SPeB
Streptokinase

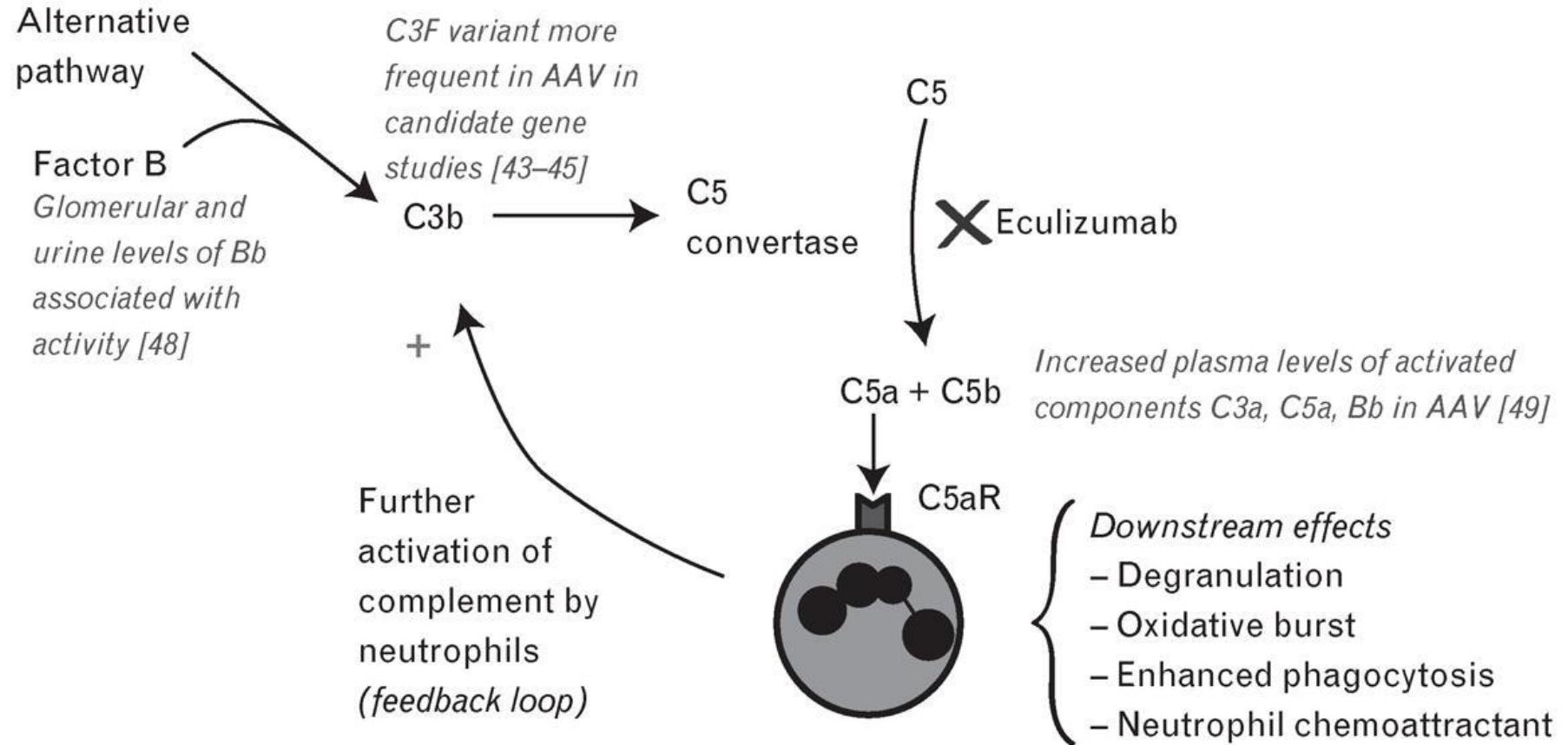
Oda T, Yoshizawa N, Yamakami K, Sakurai Y, Takechi H, Yamamoto K, Oshima N, Kumagai H. The role of nephritis-associated plasmin receptor (NAPlr) in glomerulonephritis associated with streptococcal infection. J Biomed Biotechnol, 2012.

Figure 7: Schematic representation of proposed mechanisms involved in the development of APSGN. MES: mesangial cell; END: endothelial cell; PMN: polymorphonuclear cell; MΦ: macrophage; T: T lymphocyte; GBM: glomerular basement membrane; C: complement; Anti-NAPlr-Ab: Anti-NAPlr-antibody.



Komplement vid ANCA-associerad glomerulonefrit

- Komplementaktivering via den alternativa vägen nödvändig för nefritutveckling i djurmodell för MPO-ANCA associerad GN (Xiao H et al: Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. Am J Pathol. 2007).
- Komplementproteiner syntetiseras av neutrofiler (bl a properdin, C3, faktor B)
- Supernatanter från neutrofiler stimulerade med ANCA kan aktivera komplement (Schreiber A et al: C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol. 2009).
- Komplementdeposition i glomeruli, C3 och properdin särskilt vanligt i samband med crescents (Hilhorst M et al, Limburg Renal Registry: Complement in ANCA-associated glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant. 2015).
- Komplementaktiviseringsprodukter i urin vid aktiv sjukdom (Gou SJ et al: Alternative complement pathway activation products in urine and kidneys of patients with ANCA-associated GN. Clin J Am Soc Nephrol. 2013).
- Oklart hur aktiveringen startas: neutrofilproteaser? Properdin?



Flint SM, McKinney EF, Smith KG. Emerging concepts in the pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Curr Opin Rheumatol*. 2015

Glomerulonefrit vid vissa medfödda komplementbrister

- *C3*: glomerulonefrit (bl.a. MCGN och IgAN)
- Faktor I: glomerulonefrit
- Faktor H: varierande typer av MPGN (Servais A, Noël LH, Dragon-Durey MA, Gübler MC, Rémy P, Buob D, Cordonnier C, Makdassi R, Jaber W, Boulanger E, Lesavre P, Frémeaux-Bacchi V. Heterogeneous pattern of renal disease associated with homozygous factor H deficiency. Hum Pathol. 2011)

Glomerulära sjukdomar som involverar den klassiska vägen

Immunkomplexassocierad GN:

ex SLE, kryoglobulinemi II och III, MPGN I, postinfektiöst

- Komplementprofil i serum/plasma:

Låga C4, C1q (+ ev C3) talande för aktivering via den klassiska vägen. Vid SLE även C1q-antikroppar.

- Immunfluorescens: C3 och IgG
- Aktiveringsmekanism/patogenetisk mekanism:

Immunkomplex

C1q-nefropati:

- Komplementprofil i serum/plasma: normala nivåer
- Immunfluorescens: Inlagring av C1q i mesangiet, ej mycket IgG eller C3
- Ultrastruktur: dense deposits mesangiellt
- Patogenes, roll för komplement: ??

Andra sjukdomar med glomerulär komplementdeposition

- IgA-nefropati:
 - Immunfluorescens: C3, properdin, faktor H, MBL, MASP, L-ficolin, C4d
 - Serum: C3d ofta ökat, C3 ibland lågt (sällan), ökad IgA/C3-ratio markör för progress
 - Urin (?): TCC och faktor H ↑
 - Ev. sämre prognos vid C4AO, CFHR1-CFHR3-deletion skyddar
- Henoch-Schönlein:
 - Immunfluorescens: C3 och properdin
 - Hos 5-(10?) % av H-S låg C3-halt i serum, C4B0 ökad frekvens
- Lektinvägen och alternativa vägen vid IgAN och HSPN
- Inlagring av komplementfaktorer utan hypokomplementemi vid Goodpasture

