



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **Multifaceted role of the complement system in health and disease: a focus on properdin**

Essen, M.F. van

### **Citation**

Essen, M. F. van. (2022, October 6). *Multifaceted role of the complement system in health and disease: a focus on properdin*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3466133>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3466133>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).



## **Appendices**

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum vitae

Dankwoord



## Nederlandse samenvatting

### Transplantatie

Onze nieren zijn essentieel voor het filteren van ons bloed. Dit is nodig voor het verwijderen van afvalproducten. Sommige personen kunnen nierschade ontwikkelen, waardoor de nierfunctie over de tijd kan afnemen wat uiteindelijk kan leiden tot nierfalen. Een van de mogelijke behandelopties is dialyse, waarbij het bloed buiten het lichaam gefilterd wordt. Een andere optie is transplantatie van een nier van een levende of overleden donor. Tijdens de transplantatie kan ischemie en reperfusie (IRI) schade optreden, dat plaatsvindt als het orgaan dat wordt verwijderd uit de donor, geen bloed en zuurstof meer ontvangt (ischemie) en na deze periode weer wordt aangesloten op de circulatie van de ontvanger (reperfusie). Tijdens dit proces worden er ook verschillende moleculen geproduceerd die immuuncellen aantrekken. Gezamenlijk beïnvloeden deze processen de functie van het orgaan, welke kunnen leiden tot een verlate functie of kunnen bijdragen aan acute schade van het getransplanteerde orgaan.

Het orgaan kan door het immuunsysteem van de ontvanger herkend worden als "vreemd", wat kan zorgen voor het aanzetten van verschillende immunologische processen waarbij zowel het aangeboren als het adaptieve immuunsysteem zijn betrokken. Afstoting van het getransplanteerde orgaan kan geïnduceerd worden door T-lymfocyten en antistoffen. In het geval van T-lymfocyt gemedieerde afstoting speelt de interactie tussen antigeen-presenterende cellen (APC) en T-lymfocyten een belangrijke rol. APC's zijn onderdeel van het aangeboren immuunsysteem en deze cellen kunnen onder andere dode cellen of lichaamsvreemd materiaal opnemen. In het getransplanteerde orgaan kunnen nog donor APC's aanwezig zijn die vervolgens donor antigenen presenteren aan T-lymfocyten van de ontvanger, wat leidt tot activatie van de T-lymfocyten. Deze T-lymfocyten gaan differentiëren en prolifereren en kunnen vervolgens migreren naar het getransplanteerde orgaan, wat uiteindelijk leidt tot T-lymfocyt gemedieerde afstoting.

In het geval van antistof gemedieerde afstoting kunnen antistoffen die al aanwezig waren voor de transplantatie – bijvoorbeeld door zwangerschappen, bloedtransfusies of eerdere transplantaties – weefselantigenen herkennen. Dit kan resulteren in activatie van het complement systeem, hieronder verder besproken, en leiden tot de neerslag van C4d. Om afstoting van het getransplanteerde orgaan te voorkomen, is het matchen van weefselantigenen van de donor en ontvanger belangrijk. Om de immunologische risico's op afstoting te verminderen heeft de ontvanger immunosuppressiva nodig om T- en B-lymfocyt responsen te onderdrukken.

## Het complement systeem

Het complement systeem is een belangrijk, aangeboren onderdeel van ons immuunsysteem. Meer dan 30 eiwitten, die voornamelijk door de lever worden gemaakt, spelen een rol in de activatie van dit systeem, dat is onderverdeeld in het klassieke pad, lectine pad en alternatieve pad. Verschillende processen zijn betrokken bij de activatie van de paden. Het klassieke pad wordt geactiveerd na herkenning van antistof-antigeen complexen door C1q. Het lectine pad wordt geactiveerd door de binding van MBL of ficolinen aan suikergroepen die aanwezig zijn op bijvoorbeeld het oppervlak van pathogenen. Het alternatieve pad kan spontaan worden geactiveerd, via een "tick-over" proces, wat C3(H<sub>2</sub>O) vormt. C3(H<sub>2</sub>O) kan de interactie aan gaan met factor B, dat vervolgens geknipt kan worden door factor D en zo de oplosbare convertase C3(H<sub>2</sub>O)Bb vormt. Deze convertase kan extra C3 moleculen knippen waardoor C3b wordt gevormd. C3b kan binden aan verschillende celoppervlakken, waarna factor B kan binden die wordt geknipt door factor D, wat meer C3 convertases (C3bBb) vormt en kan leiden tot extra complement activatie. Activatie van het klassieke en lectine pad leidt ook tot de formatie van een C3 convertase (C4b2a). Het knippen van C3 resulteert ook in C3a formatie, een belangrijke factor voor het aantrekken van immuuncellen. C3b kan binden aan celoppervlakken en functioneert als een opsonin, een soort vlaggetje wat aangeeft dat die cellen kunnen worden opgeruimd door fagocyten. Naarmate er voldoende complement activatie heeft plaatsgevonden, kunnen de gevormde C3 convertases de interactie aangaan met C3b, wat leidt tot de formatie van C5 convertases (C4b2aC3b voor het klassieke en lectine pad en C3bBbC3b voor het alternatieve pad). Deze C5 convertases knippen C5 in C5a, betrokken bij het halen van immuuncellen, en C5b, die de interactie aangaat met C6, C7, C8 en meerdere C9 moleculen, wat leidt tot de formatie van een porie (C5b-9) die betrokken is bij de lysis van cellen.

## Regulatie van het complement systeem

Regulatie van dit systeem is erg belangrijk, onder andere omdat het gevormde C3b geen onderscheid maakt tussen lichaamseigen en lichaamsvreemde cellen. De regulatie vindt plaats door zowel membraangebonden als oplosbare eiwitten en kan optreden tijdens bijvoorbeeld de initiatie fase of aan het eind bij de formatie van de porie (C5b-9). Een belangrijke oplosbare negatieve regulator is factor H. Factor H bestaat uit verschillende domeinen en kan daarmee binden aan het celoppervlak en kan zo (lokaal) zorgen dat de gevormde convertase uit elkaar valt (decay accelerating activity) en helpt factor I bij de verdere afbraak van C3b (co-factor activity). Het factor H gen ligt op chromosoom 1, waar ook vijf genen gerelateerd aan factor H liggen. De precieze functie van deze eiwitten is nog niet bekend. In sommige gevallen bleken ze complement activatie te remmen en in andere gevallen was er sprake van stimulatie. Alternatieve splitsing van factor H vormt het factor H-like eiwit 1 (FHL-1). De eerste zeven domeinen van FHL-1

overlappen met die van factor H, waarin de complement regulatie domeinen aanwezig zijn, terwijl de overige domeinen die betrokken zijn bij binding aan het celoppervlak juist ontbreken. Mutaties in factor H of antistoffen gericht tegen factor H kunnen resulteren in de ontwikkeling van verschillende ziektebeelden, waarbij vaak de nier is betrokken.

Naast de negatieve regulatoren bestaat er ook een positieve regulator, namelijk properdine. Properdine is ontdekt in 1954 door Louis Pillemer. Properdine kan binden aan de C3 convertase en deze stabiliseren (halfwaardetijd wordt 5-10 keer verlengd). Personen met een properdine deficiëntie zijn vaak vatbaar voor meningokokken en er is een link gelegd met middenoorontsteking en longontsteking. Zoals hierboven beschreven worden de meeste complement factoren gemaakt door de lever, maar properdine wordt met name gemaakt door myeloïde cellen. Neutrofielen bevatten een soort korrel waarin properdine zit en ook dendritische cellen kunnen properdine uitscheiden. De serum concentratie van properdine is relatief laag (5-20 µg/mL). Properdine bestaat uit zeven domeinen, die met elkaar een interactie aan kunnen gaan en vervolgens dimeer, trimeer en tetrameer vormen kunnen genereren. Onlangs heeft de generatie van kristalstructuren bijgedragen aan het inzicht in de stabilisatie van de C3 convertase door properdine. Naast de stabiliserende functie van properdine, zijn er ook aanwijzingen dat properdine direct aan oppervlakken kan binden en zo complement activatie kan faciliteren. Dit wordt verder onderzocht in dit proefschrift. Het doel van de activatie van dit systeem werd in eerste instantie gekoppeld aan de bestrijding van lichaamsvreemd materiaal zoals bacteriën en pathogenen, maar recentelijk en zoals hierboven al even kort aangeduid, blijkt dit systeem ook belangrijk te zijn bij lokale processen.

## Dit proefschrift

In dit proefschrift focussen we op de lokale rol van het complement systeem in de context van niertransplantatie en nierontsteking, waarbij properdine centraal staat. De capaciteit van immuuncellen om complement factoren zoals properdine en factor H te produceren is ook onderzocht. Daarbij hebben we bekeken of de lokaal geproduceerde properdine de interactie aan kan gaan met celoppervlakken en of dit bijdraagt aan (lokale) complement activatie.

### Complement in niertransplantatie en nierontsteking

In **hoofdstuk 2** wordt in een review de rol van het complement systeem in de ontwikkeling/progressie van nierziekten besproken waarbij de focus ligt op properdine. Properdine kon gevonden worden in serum, plasma en urine van verschillende patiënten met verschillende complement-gemedieerde nierziekten. Deze vondst van properdine is op dit moment echter nog niet specifiek gekoppeld aan een diagnose of ziektebeeld.

Verder onderzoek is hiervoor nodig en kan hopelijk ook bijdragen aan meer inzicht en ontwikkeling van zogenaamde inhibitoren om de functie van properdine te blokkeren. In **hoofdstuk 3** hebben we onderzocht of complement factoren properdine, C3d, C4d en C5b-9 aanwezig zijn in nierbiopten van transplantatie patiënten die in studieverband 10 dagen na transplantatie werden gebiopteerd. In de meeste gevallen werden deze factoren teruggevonden. Ook zagen we dat C4d en C5b-9 neerslag toeneemt naarmate het orgaan later functioneerde (de zogenaamde delayed graft function). Door naar de associatie van de verschillende complement factoren te kijken lijkt met name activatie van het klassieke en lectine pad een rol te spelen. Verder onderzoek is nodig om uit te zoeken of de aanwezigheid van deze complement factoren een rol kunnen spelen in het voorspellen van de nierfunctie na transplantatie.

### **Lokale rol van het complement systeem**

De meeste complement factoren worden gemaakt door de lever, wat zorgt voor de aanwezigheid van de verschillende complement factoren in het bloed. In **hoofdstuk 4** laten we zien dat de genexpressie van complement regulatoren factor H en FHL-1 in de lever vergelijkbaar is, maar in het serum bleek er vooral factor H aanwezig te zijn. Door de aanwezigheid van factor H en FHL-1 in nierweefsel te bekijken, zagen we dat met name het kleine FHL-1 eiwit terug te vinden was. Dit suggereert dat de verminderde aanwezigheid van FHL-1 in het serum komt door de klaring van FHL-1 door de nieren. Verder onderzoek in urine moet uitwijzen of we ook hier inderdaad meer van dit kleine FHL-1 eiwit terug kunnen vinden. Naast de productie van complement factoren door de lever, kunnen deze factoren ook door andere cellen in ons lichaam worden gemaakt. In **hoofdstuk 4 en 7** ligt de focus op de lokale productie van complement factoren. Door monocytten te isoleren uit bloed en deze vervolgens te differentiëren in macrofagen laten we zien dat deze cellen properdine, factor H en FHL-1 kunnen maken (genexpressie). We zien hierbij dat er in de myeloïde cellen een voorkeur is voor de expressie van FHL-1 in vergelijking tot factor H. Dit is anders dan wat we zagen in de lever, waar factor H en FHL-1 in een vergelijkbare hoeveelheid worden gemaakt. De macrofagen zijn ook in staat om zowel factor H als FHL-1 uit te scheiden, waarbij er meer van het FHL-1 eiwit wordt gemaakt (**hoofdstuk 4**). Dit suggereert dat er een lokale rol voor FHL-1 kan zijn in de regulatie van complement activatie. Naast factor H en FHL-1 zijn macrofagen ook in staat om properdine te maken en uit te scheiden (**hoofdstuk 4**).

In **hoofdstuk 5** hebben we onderzocht wat de aanwezigheid van properdine betekent voor de activatie van het complement systeem. Properdine kan binden aan het celoppervlak van dode cellen en door deze cellen bloot te stellen aan serum – wat alle complement factoren bevat die nodig zijn voor complement activatie – treedt activatie van het alternatieve pad op. Op cellen die niet waren gebonden door properdine was

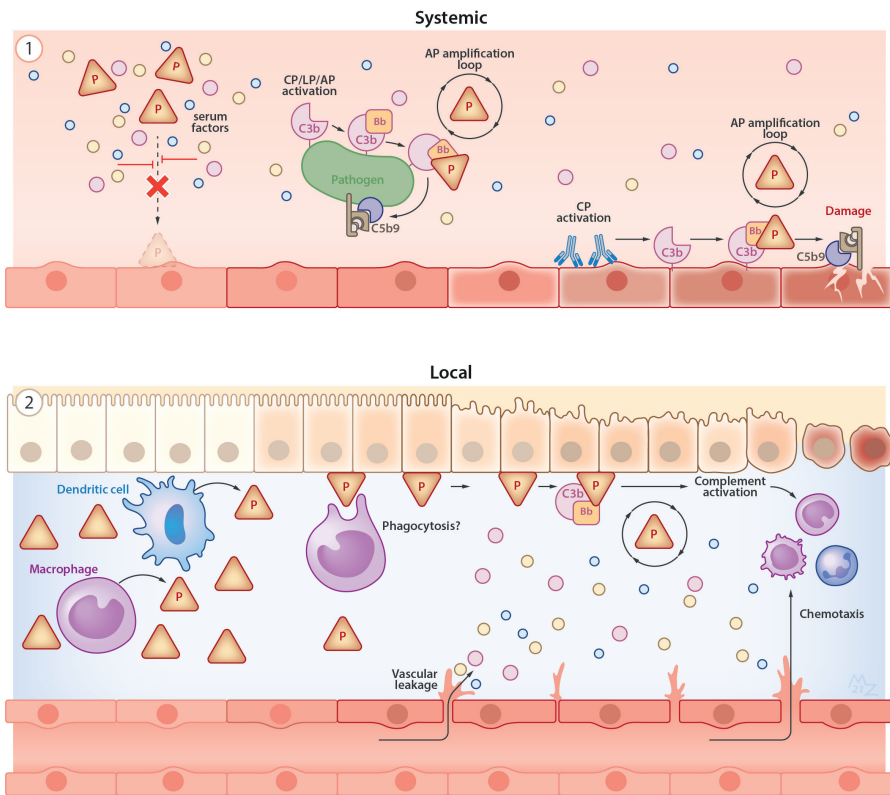
de aanwezigheid van complement activatie producten veel lager dan op de cellen die wel waren gebonden door properdine. Naast de binding aan dode cellen, werd ook gezien dat properdine kan binden aan pro- en anti-inflammatoire macrofagen, wat resulteert in een toename van complement activatie op deze celoppervlakken. De interactie van properdine lijkt via negatief geladen suikergroepen te gaan die aanwezig zijn op het celoppervlak. Door properdine te pre-incuberen met verschillende varianten van deze suikergroepen werd gezien dat met name de lengte van de suikergroep en de aanwezigheid van sulfaatgroepen belangrijk zijn voor de interactie van properdine met het celoppervlak. In dit onderzoek wordt ook beschreven dat de natuurlijke vormen van properdine (dimeer, trimeer en tetrameer) kunnen binden aan dode cellen en pro- en anti-inflammatoire macrofagen en zo bijdragen aan de activatie van het alternatieve pad van het complement systeem. Verder hebben we gezien dat er factoren in bloed zitten die in staat zijn om de properdine binding aan (cel)oppervlakken te remmen.

De lokale rol van het complement systeem in transplantatie werd voor het eerst beschreven in 2002. In de studie werden in een transplantatie model allogene nieren van een C3 deficiënte muis getransplanteerd in een wild-type ontvanger. Dit resulteerde in minder afstoting en een betere nierfunctie in vergelijking met transplantatie van wild-type nieren in wild-type ontvangers. Hierbij werd gezien dat de C3 die door de donornier wordt gemaakt invloed heeft op het succes van de transplantatie, door de regulatie van T-lymfocyt responsen. Tijdens de interactie van APC's en T-lymfocyten kunnen complement factoren lokaal worden geproduceerd. Ook hebben deze cellen complement receptoren op hun oppervlak, waardoor ze op de (lokaal gevormde) complement factoren kunnen reageren, en wat bijvoorbeeld kan resulteren in het aanzetten van T-lymfocyt reacties.

Om de lokale rol van eiwitten in de APC-T-lymfocyt interactie te onderzoeken, hebben we de eiwitproductie door dendritische cellen onderdrukt met behulp van small interfering RNA (siRNA) die in de cel kan worden gebracht door middel van transfectie. Daarbij moet men rekening houden met verschillende parameters voor het optimaliseren van het transfectie-proces. In **hoofdstuk 6** beschrijven we dat het type medium dat gebruikt wordt in siRNA experimenten celdood en activatie van dendritische cellen kan beïnvloeden. In de aanwezigheid van RPMI-medium gingen meer immature dendritische cellen dood en werden ze actiever als ze bloot werden gesteld aan het siRNA-transfectie complex. Dit was niet het geval voor dendritische cellen die zich in IMDM-medium bevonden. De dendritische cellen die bloot werden gesteld aan het siRNA-transfectie complex in RPMI waren ook beter in het activeren van T-lymfocyten, wat niet gebeurde als de cellen werden blootgesteld aan het complex in IMDM-medium. Dit geeft aan dat de keuze van het medium belangrijk is in het proces van de transfectie van primaire dendritische cellen,



en dit zou mede overwogen moeten worden bij de optimalisatie van het protocol. In **hoofdstuk 7** wordt het protocol zoals dat in **hoofdstuk 6** staat beschreven toegepast om de properdine productie door dendritische cellen te verminderen. Zowel immature als mature dendritische cellen maken properdine en de hoeveelheden werden voor ~50% gereduceerd na siRNA-transfectie. In de context van APC-T-lymfocyt interactie werden deze immature en mature dendritische cellen samen gekweekt met T-lymfocyten van een andere donor en werd bekeken of de verminderde aanwezigheid van properdine effect had op T-lymfocyt activatie en proliferatie. Onder condities die suboptimaal zijn voor T-lymfocyt activatie, zoals een verminderde APC-T-lymfocyten ratio, lijkt de afwezigheid van properdine te zorgen voor een verminderde T-lymfocyt proliferatie. Na het doormeten van de geproduceerde cytokines werd zichtbaar dat IL-17 verminderd aanwezig was als immature dendritische cellen met gereduceerde properdine secretie werden gekweekt met T-lymfocyten. Deze resultaten tonen dat properdine een lokale rol kan spelen, maar meer onderzoeken zijn nodig om dit verder uit te zoeken.



**Figuur 1: De systemische en lokale rol van properdin. (1)** Schematisch overzicht van de systemische rol van het complement systeem en properdine. **(2)** Schematisch overzicht van de lokale rol van het complement systeem en properdine.

## Conclusie

Een samenvattend overzicht van onze bevindingen wordt getoond in figuur 1. Ons bloed (systemisch) bevat factoren die de properdine binding kan remmen, om zo ongewenste complement activatie te voorkomen (**hoofdstuk 5**). Zodra er sprake is van gevaar (pathogeen) wordt het complement systeem geactiveerd, waarbij properdine de C3 convertase kan stabiliseren. Hierdoor neemt complement activatie toe en uiteindelijk wordt er een porie (C5b-9/MAC) gevormd wat zorgt voor de lysis van de pathogeen. In sommige situaties kunnen (auto)antistoffen antigenen op het (eigen) celoppervlak herkennen, waardoor het klassieke pad geactiveerd kan worden. Hierbij worden C3 convertases gevormd die opnieuw door properdine gestabiliseerd kunnen worden, wat uiteindelijk leidt tot schade (Figuur 1, panel 1). Lokaal, bijvoorbeeld in nierweefsel, kan properdine geproduceerd worden door dendritische cellen en macrofagen (**hoofdstuk 4 en 7**). Properdine kan daar binden aan veranderde/beschadigde cellen (**hoofdstuk 2,3**) en kan binden aan het oppervlak van macrofagen (**hoofdstuk 5**). Dit proces kan betrokken zijn bij het induceren van een “brug” tussen de beschadigde cellen en de immuuncellen, waardoor mogelijk fagocytose kan optreden. Als er geen fagocytose van de properdine-gebonden cellen optreedt, en er voldoende complement factoren aanwezig zijn door bijvoorbeeld lekkende bloedvaten, kan de C3 convertase worden gevormd wat zorgt voor meer complement activatie. Hierdoor worden C3a en C5a gevormd, waardoor extra immuuncellen worden gehaald. Een beter begrip van deze verschillende activatie stappen is van groot belang bij het nemen van de juiste beslissing welke (nieuwe) complement-remmende medicijnen het meest geschikt zijn om in verschillende situaties toe te passen.

