

补体系统及其糖基化*

赵菲^{1,3)**} 党刘毅²⁾ 赵璇^{3,4)} 李可^{3)**}

¹⁾ Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Jena 07745, Germany;

²⁾ Department of Molecular Biotechnology, Ghent University, Ghent 9000, Belgium;

³⁾ 西安交通大学第二附属医院, 西安 710004; ⁴⁾ 商洛市中心医院检验科, 商洛 726000)

通讯作者简介

李可, 男, 1977年8月出生, 医学博士, 西安交通大学光华特聘教授, 博士生导师, 西安交通大学第二附属医院科研实验中心主任, 陕西省生物治疗与转化医学工程研究中心副主任, 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队主要成员。主要致力于固有免疫系统对获得性免疫的调控研究, 尤其是补体系统对各种免疫细胞功能的调节, 以及补体在肿瘤、感染性疾病中的作用。

赵菲, 女, 德国耶拿大学生物与药学院免疫学博士。主要从事补体系统在肾脏疾病(包括C3肾小球肾病和非典型性溶血性尿毒综合征)中的发病机制研究, 尤其是自身抗体以及补体蛋白糖基化缺失对补体系统激活和调控的影响。

摘要 补体系统是固有免疫系统的重要组成部分, 同时也是连接固有免疫和适应性免疫系统的重要桥梁。补体系统由30多种蛋白质组成, 且其中绝大多数都经过糖基化修饰。近年来对补体系统的研究, 不断揭示出补体系统在抗击病原微生物入侵和维持有机体生理稳态过程中发挥着重要作用。然而补体系统需要严格的调控, 不论是激活不足、抑或是过度激活都可能引起疾病的发生。本文概述了近年来对于补体系统的激活、调控和功能研究的最新进展, 并首次从糖生物学角度对补体系统蛋白质组分的糖链结构及糖链对相应蛋白质功能的影响进行了综述和小结。

关键词 补体, 糖基化, 糖蛋白, 调控, H因子
学科分类号 R392

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0320

补体系统是一个高效的识别和效应系统, 旨在摧毁入侵的病原微生物并清除受损的宿主细胞。补体系统由30多个不同的血浆蛋白及膜蛋白(包括调节蛋白及受体蛋白)组成, 这些补体蛋白大多数是糖基化蛋白, 它们共同形成了一个高度调节的蛋白酶级联反应体系。而糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 蛋白质糖基化在很多重要的生物学过程(如细胞黏附、分子转运和清除、受体激活、信号转导等)中发挥着关键作用。本文从补体系统的激活、调控和生物学功能三个不同方面对补体系统的最新研究进行了概述, 并首次从糖基化的角度对补体系统蛋白质的糖链结构和糖链对蛋白质功能的影响进行了小结。

1 补体系统

1.1 补体系统激活通路

当补体系统被激活时, 即产生3种效应功能:

- 对靶细胞的调理作用;
- 对靶细胞的裂解;
- 释放促炎性细胞因子诱导炎症反应的发生。这些效应功能使得补体系统可以识别并清除入侵微生物。

* 陕西省自然科学基金重点项目(2016YFJZ0020), 国家自然科学基金面上项目(81470548)资助。

** 通讯联系人. Tel: 029-87678329

赵菲. E-mail: feizhao821@outlook.com

李可. E-mail: ke.li@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-08-01, 接受日期: 2017-09-30

物, 清除凋亡或被修饰的自身细胞, 并募集免疫细胞到炎症发生部位. 补体系统的激活以级联反应方式发生, 可以分为 4 个主要步骤: a. 起始阶段;

b. C3 转化酶激活和扩增; c. C5 转化酶激活; d. 末端通路激活(图 1).

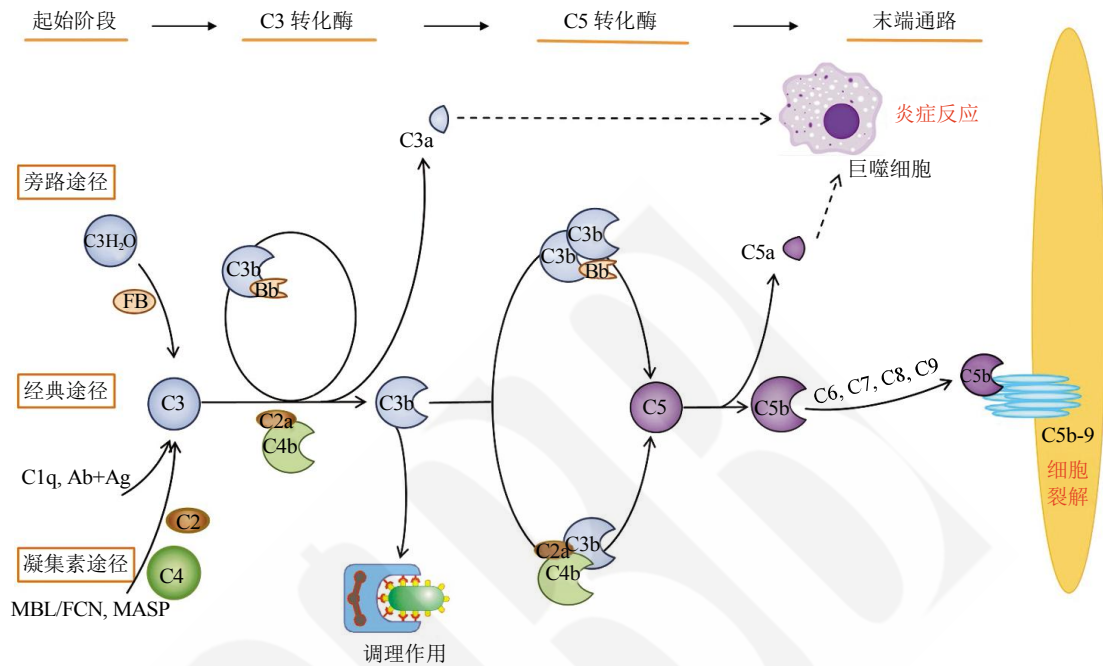


Fig. 1 Complement activation cascade

图 1 补体系统的激活通路

补体系统的激活包括: a. 起始阶段; b. C3 转化酶激活和扩增; c. C5 转化酶激活; d. 末端通路激活 4 个不同阶段. 在起始阶段, 三种不同途径可启动补体激活: 旁路途径、经典途径及凝集素途径. 每个途径均顺序激活并生成 C3 转化酶, C3 转化酶裂解 C3 生成切割产物 C3a 和 C3b, 其中 C3b 附着于临近表面, 可用于: a. 表面吞噬调理作用; b. 通过旁路途径启动补体级联放大回路; c. 结合 C3 转化酶形成 C5 转化酶. C5 转化酶裂解 C5 生成 C5a 和 C5b, C5b 结合 C6、C7、C8、C9 形成膜攻击复合物, 可在膜表面形成小孔, 从而裂解入侵微生物. C3a 和 C5a 是有效的过敏毒素和趋化因子, 可促进炎症反应, 并募集吞噬细胞到炎症发生位点, 促进微生物清除.

1.1.1 起始阶段

补体系统的起始可通过 3 种不同途径: 即旁路途径、经典途径以及凝集素途径(图 1)^[1-3]. 旁路途径通过自发的“tick-over”反应水解 C3 而激活. C3 水解形成活化的 C3(H₂O), C3(H₂O)可结合 B 因子形成 C3(H₂O)Bb^[4]. C3(H₂O)Bb 对 C3 具有切割活性, 切割 C3 形成 C3a 和 C3b 两种产物, C3b 进一步结合 B 因子则产生旁路途径 C3 转化酶 C3bBb, 从而激活旁路途径. 由于 C3(H₂O)不稳定且反应活性较低, 在正常生理条件下, C3(H₂O)Bb 仅持续产生小量的 C3b^[5-8]. 经典途径通过 C1q 的球状头部识别抗原-抗体复合物得到激活. 也可通过 C1q 与 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)的结合而得到激活^[9]. 凝集素途径则通过甘露糖结合凝集素(mannan-binding lectin, MBL)或纤维胶凝蛋

白(ficolin, FCN)与靶细胞表面的甘露糖(或相关糖)或 N-乙酰葡萄糖胺结合而得到激活. 经过特异性的识别和结合后, C1q 相关丝氨酸蛋白酶 C1r 和 C1s 以及甘露糖结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶(MASP1 和 MASP2)被激活. 激活的 C1s 和 MASP2 裂解 C4, 并产生含有 C2 结合位点的 C4b 片段, 与 C4b 结合的 C2 可进一步被 C1r 或 MASP2 切割成 C2a 和 C2b. 在此过程中, C2b 被释放而 C2a 仍然结合在 C4b 上并形成活化的经典/凝集素途径 C3 转化酶 C4bC2a.

1.1.2 C3 转化酶阶段

C3 转化酶是一种能够快速裂解 C3 形成调理素 C3b 和过敏毒素 C3a 的酶复合物. 当 C3 被裂解, 硫酯结构域就在 C3b 表面暴露出来, 使得该蛋白能共价地结合于靶细胞表面. C3b 与靶细胞表

面的结合可实现三大功能. 首先, 细胞表面沉积的 C3b 作为调理素可被补体受体(CR1)或巨噬细胞表面的补体受体免疫球蛋白超家族(CRIg)结合. C3b 与 CR1 或 CRIg 的结合促使靶细胞被吞噬或转移. 第二, C3b 沉积可形成一个平台, 促进生成更多的 C3 转化酶从而持续扩增补体系统的激活. 第三, C3b 有助于形成 C5 转化酶并激活下游补体通路.

1.1.3 C5 转化酶和末端激活

两种 C5 转化酶(C3bBbC3b 或 C4bC2aC3b)均由 C3 转化酶(C3bBb 或 C4bC2a)加一个额外的 C3b 组装生成. C5 转化酶裂解 C5, 释放强效过敏毒素 C5a 并生成 C5b. C5b 通过募集 C6、C7、C8 及 C9 到靶细胞表面, 并插入 C9 复合物形成小孔(被称为膜攻击复合物)启动末端途径的激活. 这些末端补体复合物最终引起靶细胞的裂解^[9-10].

1.1.4 过敏毒素 C5a 和 C3a

C5a 和 C3a 是有效的过敏毒素. 他们结合多种白细胞如巨噬细胞, 中性粒细胞及非免疫细胞表面的相应受体(C5aR/ C3aR). 结合后, C5a 和 C3a 激发急性炎症反应, 增加血管通透性, 增加免疫细胞渗出, 推动促炎症介质释放. 此外, C5a(C3a 也一样, 但程度较轻)对巨噬细胞、激活态 T 细胞和 B 细胞以及肥大细胞有趋化活性, 可募集这些免疫细胞到补体激活的位点.

1.2 补体系统在维持机体稳态和清除病原微生物方面的作用

在生理条件下, C3 可自发转化为具有生理活性的 C3(H₂O), 从而持续激活旁路途径^[4]. 生成的 C3b 或快速在液相由补体 H 因子和 I 因子灭活或共价连接到附近的细胞表面^[11-13]. 在完整的宿主细胞表面, 沉积的 C3b 由膜表面调节因子(如 CD46、CD55、CR1、C4BP)或液相募集的补体调节因子(如 H 因子)迅速灭活^[14-19], 从而使宿主细胞免受补体系统攻击. 在凋亡细胞表面, 由于补体调节因子的低表达和膜结构的改变, 沉积的 C3b 未完全灭活. 因此, 旁路途径在凋亡细胞表面的部分激活, 从而促进吞噬细胞清除凋亡细胞. 此外, 经典途径和凝集素途径也在凋亡细胞表面得到激活. 经典途径和凝集素途径的起始因子结合于凋亡细胞并与吞噬细胞相互作用, 诱发免疫耐受并阻止对自身抗原的免疫反应^[10, 20-22]. 通过这样复杂的补体激活和调控, 凋亡细胞在不进一步激活固有和适应性免疫反应的情况下得到清除. 而在入侵微生物的表面, 补体系统得到完全激活. 由旁路途径自发生成的 C3b

快速在微生物表面沉积, 并与 B 因子和 D 因子相互作用生成 C3 转化因子, 从而级联放大补体系统的活化^[23-24]. 同时, 补体系统释放的过敏毒素(C3a 和 C5a)募集吞噬细胞到感染病灶处并激活白细胞、内皮细胞及血小板, 触发适应性免疫反应. 此外, 末端途径补体活化产物可形成膜攻击复合物直接裂解入侵的微生物. 因此, 微生物可迅速被激活的补体系统清除. 综上所述, 补体系统在自身细胞表面不激活, 在凋亡细胞表面部分激活, 在入侵微生物表面完全激活, 从而在维持机体稳态及清除病原微生物中发挥着重要作用^[24].

1.3 补体系统调控

补体系统是一个复杂的固有免疫监督系统, 它在维持宿主内稳态和防御微生物中起着至关重要的作用. 然而, 补体系统需要严格调控. 不论是激活不足抑或是过度刺激补体都可能对宿主产生有害影响, 引起微生物易感性增加(如脓毒症)或者自身免疫性疾病的发生(如系统性红斑狼疮、风湿性关节炎、阿尔茨海默病、非典型性溶血性尿毒综合症等)^[25]. 此外, 补体活化不能区分自身和非自身表面. 因此需要调节因子以保护自身组织免受补体系统的攻击. 目前, 在血浆中, 在细胞膜表面均发现了多种可调节补体活化状态、促进自我保护的补体系统调节因子. 这些调节因子可在补体活化的各个阶段, 同时在液相及宿主细胞表面调控补体激活. 然而, 迄今为止, 仅有 2 个天然补体系统激活因子被发现. 下面, 我们将集中介绍几个代表性补体系统调节因子和激活因子.

1.3.1 H 因子及 H 因子相关蛋白家族

H 因子是旁路途径的主要血浆调节因子, 它的编码区位于常染色体 1q32. H 因子由 20 个短串联重复结构域(SCR)组成, 主要在肝脏中产生. 它是一个巨大的蛋白(155 ku), 在血浆循环中的平均浓度为 500 mg/L^[26-27]. 作为主要的血浆调节因子, H 因子具有多种调节功能, 包括: a. 促 C3b 灭活; b. 抑制 C3 转化酶的组装; c. 促进 C3 转化酶加速衰变. 研究表明, H 因子 N 端的前 4 个 SCR 主要负责这三种调节功能^[28-29]. 此外, H 因子还通过结合于宿主细胞协助区分自我和非我表面, 形成自我识别. 这种自我识别功能主要由 H 因子 C 端的 SCR 19~20 负责: SCR 19~20 既可结合于宿主细胞表面的硫酸肝素和糖胺聚糖(GAGs)也可结合于 C3b/C3d^[30-33]. 除此之外, SCR 6~7 是另一个宿主细胞表面糖胺聚糖的识别区域^[34]. 一旦 H

因子结合于宿主细胞表面的离子碳水化合物(硫酸肝素或糖胺聚糖)或 C3b, H 因子就展示出促 C3b 灭活和促 C3 转化酶衰变的功能, 从而阻断自我细胞表面的 C3 转化酶激活。

H 因子的剪切突变体——H 因子样蛋白(factor H like protein 1, FHL-1)含有 H 因子的前 7 个 SCRs (SCR1~7)具备促 C3b 灭活和促 C3 转化酶衰变的补体系统调节功能。而且 FHL-1 也可通过 SCR6~7 结合于宿主细胞表面的硫酸肝素, 从而识别自我表面^[35]。

H 因子相关蛋白(complement factor H related proteins, CFHR)由位于 FH 基因下游的基因编码, 也位于染色体 1q32^[36]。CFHR 蛋白的补体调节功能是在近些年中逐步被发现的。CFHR1 包含 5 个 SCRs, 在人血浆中表现为 2 种糖基化形式(即包含 1 条 N-糖链的 CFHR1 α 和包含 2 条 N-糖链的 CFHR1 β)^[37]。它与 H 因子竞争结合 C3b 和硫酸肝素, 但缺乏促 C3b 灭活和促 C3 转化酶衰变的功能^[38-39]。在 C5 转化酶阶段, CFHR1 可抑制 C5 的切割和末端途径 C5b-9 的形成, 因而有效调节 C5 转化酶的活性。综上所述, CFHR1 可抑制 H 因子在细胞表面的调节活性并抑制 C5 转化酶活性, 目前被归为补体系统调节因子^[40]。CFHR2 有 4 个 SCRs, 并且其 C 端的 2 个 SCRs 均可结合 C3b。与 C3b 结合的 CFHR2 仍允许 C3 转化酶的形成, 但形成的 C3 转化酶不切割其底物 C3, 因而 CFHR2 抑制 C3 转化酶的激活^[41-42]。CFHR3 和 CFHR4 可结合 C3b 和硫酸肝素, 显示出增强的促 C3b 灭活功能^[43-45]。

1.3.2 备解素(properdin)

备解素是目前最为熟知的补体系统激活因子。不同于大多数其他补体系统调节因子, 备解素可由多种细胞生成, 如中性粒细胞、单核细胞、T 细胞和骨髓祖细胞^[46]。备解素作为补体系统激活因子, 它可以: a. 结合 C3 转化酶, 稳定 C3 转化酶并将其半衰期延长至 5~10 倍^[47]; b. 结合于多种细胞表面, 募集 C3b 和 B 因子形成 C3 转化酶, 并作为旁路途径起始的平台^[48-49]。

1.3.3 CFHR5

CFHR5 最近被发现具有补体激活功能^[50]。CFHR5 是 H 因子相关蛋白中的一个, 它包含 9 个 SCRs。CFHR5 可在液相中与 C3b/C3 转化酶相互作用, 级联放大 C3 转化酶。此外, CFHR5 可锚定补体激活因子备解素到细胞表面并原位激活补体

系统^[51]。

2 补体系统与糖基化

2.1 蛋白质糖基化

蛋白质糖基化(glycosylation)是指将糖链通过共价方式连接到目标蛋白分子上的过程, 是在生物界普遍存在的一种蛋白质翻译后修饰。几乎所有的膜蛋白和分泌蛋白都含有糖基化修饰, 只有极少数的蛋白质例外, 如小分子的多肽性激素、胰岛素、胰高血糖素等^[52-53]。蛋白质糖基化在很多重要的生物学过程中发挥着关键作用, 包括细胞黏附、分子转运和清除、受体激活、信号转导等^[54]。

糖蛋白一般含有一个或多个糖链, 按照蛋白质上糖链的连接方式, 可分为 N-、O- 及 C-糖蛋白^[55]。一般来讲, N-连接糖基化通常发生于特定的氨基酸位点 Asn-X-Ser/Thr (X 是指脯氨酸 Pro 以外的任何氨基酸)中的天冬酰胺上。通常含有 1 个五糖的核心结构区域, 在此基础上可以形成高甘露糖型(high- or oligomannose)、复杂型(complex)和杂合型(hybrid)糖链结构, 其末端可以由 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖(gal)或唾液酸(sialic acid)等进行修饰^[56]。常见的 O-连接糖链通常可以根据起始的第一个单糖进行分类。比如, 黏蛋白型 O-糖基化(mucin-type O-glycosylation)由 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)起始, 其作为第一个单糖连接到丝氨酸或苏氨酸上并且之后可以被拓展为不同类型的糖链结构^[57]。O-糖链可以包含各种不同核心和末端糖链结构, 其末端通常经岩藻糖化和唾液酸化修饰。其他常见类型的 O-糖链包括 O-甘露糖(O-mannose)、O-岩藻糖(O-fucose)、O-半乳糖(O-galactose)和通常发生在细胞核质中的 O-乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)糖链等^[58]。另外, 在特定的蛋白上也存在其他的糖基化连接, 比如 C-甘露糖基化。C-甘露糖基化是由特定的甘露糖转移酶, 将 α 甘露糖通过吡咯 C2 碳原子连接到 Trp-X-X-Trp (X 代表任意氨基酸)保守位点的第一个色氨酸上的一种独特的糖基化^[59]。

2.2 糖基化与疾病

由于蛋白质糖基化修饰的高度复杂性及其在诸多生物学过程中的基础性影响, 任何微小的糖基化结构改变都会对细胞的正常生命活动造成深刻的影响^[53]。目前, 多种癌症中都发现了糖基化的改变, 包括乳腺癌、肠癌、肝癌、皮肤癌和卵巢癌, 癌症相关的糖基化在很多文献中都有详细的阐述^[53, 58, 60]。同时, 越来越多的其他疾病也被发现与

糖基化的改变相关, 这类疾病通常被称作先天性糖基化缺陷 (congenital disorders of glycosylation)^[61].

先天性糖基化缺陷是一大类由于糖基化修饰的改变导致的遗传学疾病. 由于糖链结构的高度不均一性, 临床上先天性糖基化缺陷的范围也非常广泛, 从几乎正常的表型到非常严重的多器官功能失调, 涉及到很多不同的表现形式^[62]. 先天性糖基化缺陷涉及到 N-糖基化过程, 如甘露糖基转移酶 VIII 缺陷 (CDG-Ig)、甘露糖基转移酶 I 缺陷 (CDG-Ik)、甘露糖基转移酶 VII/IX 缺陷 (CDG-IL), 也有 O-糖基化过程, 比如 O-甘露糖基转移酶 1 缺陷 (Walker-Warburg syndrome)、O-甘露糖基- β 1, 2-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 1 缺陷 (muscle-eye-brain disease). 当然, 先天性糖基化缺陷也会有 N-糖基化和 O-糖基化同时失调的情况^[61, 63]. 另外, 糖基化的改变也可能引起免疫相关的疾病. 比如, 研究发现白细胞分子黏附缺陷 II 型 (LAD II), 主要表现为反复感染及严重的精神和生长迟滞, 即是由于 GDP-甘露糖-4, 6-脱氢酶的活性损伤造成的 GDP-岩藻糖合成缺陷引起的^[64]. 阵发性夜间血红素尿症 (PNH) 是由于粒细胞和 B 淋巴细胞上的 GDP 锚的生物合成缺陷引起的, 其表现为反复发作的血管内溶血^[65]. 需要注意的是, 糖基化相关的疾病不仅涉及到糖基转移酶和糖基化酶的改变, 偶然发生的某些蛋白的糖基化改变也可能导致糖基化疾病的发生, 最近在对一个人类疾病数据库中糖蛋白突变分析表明, 糖基化发生改变的蛋白质中氨基酸突变的概率比随机突变概率要更高一些^[54]. 然而, 目前尚没有对于由补体系统糖基化改变而引起的疾病的研究.

2.3 补体蛋白的糖基化

补体系统糖蛋白一般是在肝脏细胞、巨噬细胞或淋巴组织中合成的. 它们可能包含由 1~8 个不同的 N-糖基化位点 (图 2): 例如, C1q 单体只有一个 N-糖基化位点, 而 C2 及 H 因子都包含 8 个 N-糖基化位点. 另一些补体蛋白, 如在宿主细胞表面的 DAF 和 CD59 则包含 O-糖链. 大多数在肝脏中合成的补体蛋白 (如 C1r、C1s、C2、C3、C4、C5、C6、C8、C9、B 因子、I 因子及 C4BP) 都含有复杂型双天线糖链并伴有不同程度的唾液酸化. 其中 C3 仅含有高甘露糖型糖链^[66]. 有些补体蛋白包含低丰度的核心岩藻糖, 例如, 与 C1s 蛋白相连的糖链中仅有 17% 的糖链含有核心岩藻糖. 与其他在肝脏中合成的补体蛋白相比, C4BP (A 链) 及三聚

C8 的 α 链和 β 链唾液酸化程度都较低, 这表明在这两种蛋白质中, 唾液酸转移酶与糖基化位点的接触更少更难. 在淋巴组织中合成的补体蛋白包括 C1q、备解素及 C7. 与肝脏中合成的补体蛋白相似, 这些由淋巴组织合成的补体蛋白也包含复杂型双天线糖链. 不同的是, 这些淋巴组织合成的蛋白 (C1q、备解素及 C7) 无不是核心岩藻糖化的, 不像肝脏中合成的补体蛋白核心岩藻糖化程度较低.

2.4 糖基化对补体蛋白功能的影响

补体系统由 30 多个不同的血浆蛋白及膜蛋白构成, 这些蛋白大部分都是糖基化蛋白. 然而, 对于蛋白质糖基化在补体系统激活及调控中作用的研究是有限的. 在此, 我们对 H 因子、B 因子及 I 因子的糖链对其功能的影响做一小结.

2.4.1 糖链参与调节 B 因子和 C3b 的相互作用

B 因子是一个球状蛋白, 包含 Ba 和 Bb 两个部分 (图 2). Ba 片段包括 3 个短串联重复结构域 (SCR1~3), Bb 片段包括 1 个 vWF-A 结构域, 和 1 个丝氨酸蛋白酶 (SP) 结构域 (图 2). 当结合 C3b 之后, B 因子经过一系列构象变化并呈现出 V 形结构, 其中 Ba 部分在打开的位置^[67]. B 因子上有 4 个潜在 N-糖基化位点, 这 4 个位点均包含唾液酸化的复杂型双天线糖链. 其中糖基化位点 N260 位于与 C3b 相互作用位点附近, 同时靠近 Mg^{2+} 结合裂^[68]. 对于 N260 和 D254 的双突变研究表明, 当除去 N260 上的寡糖链后, B 因子对 C3b 的结合活性增强^[69]. 该结果显示 N-糖链可能参与调控 B 因子对 C3b 的结合. 此外, 另一个 B 因子的 N-糖基化位点 N353 靠近 D 因子对 B 因子的切割位点, 有可能对 D 因子的切割作用产生一定的空间位阻从而下调该切割过程, 从而抑制补体系统激活.

2.4.2 糖链与 H 因子对自身细胞识别

H 因子是一个 N-糖基化蛋白, 包含复杂型、双天线双唾液酸化、非岩藻糖基化糖链^[70]. H 因子可通过与宿主细胞表面的唾液酸 / 糖胺聚糖的离子相互作用从而区分宿主细胞以及病原微生物^[71-73]. 非激活的自身结构 (宿主细胞) 已被证明富含唾液酸 / 糖胺聚糖, 如硫酸肝素. 这些阴离子结构 (唾液酸 / 糖胺聚糖) 被认为提高了 H 因子对细胞表面沉积的 C3b 的亲水性, 从而增加了 H 因子对自身细胞的结合并对自身细胞表面的补体激活产生调控. 然而, H 因子上的糖链对于该离子识别过程的功能性影响仍是未知的.

一项研究分别比较了野生型 H 因子和去糖基

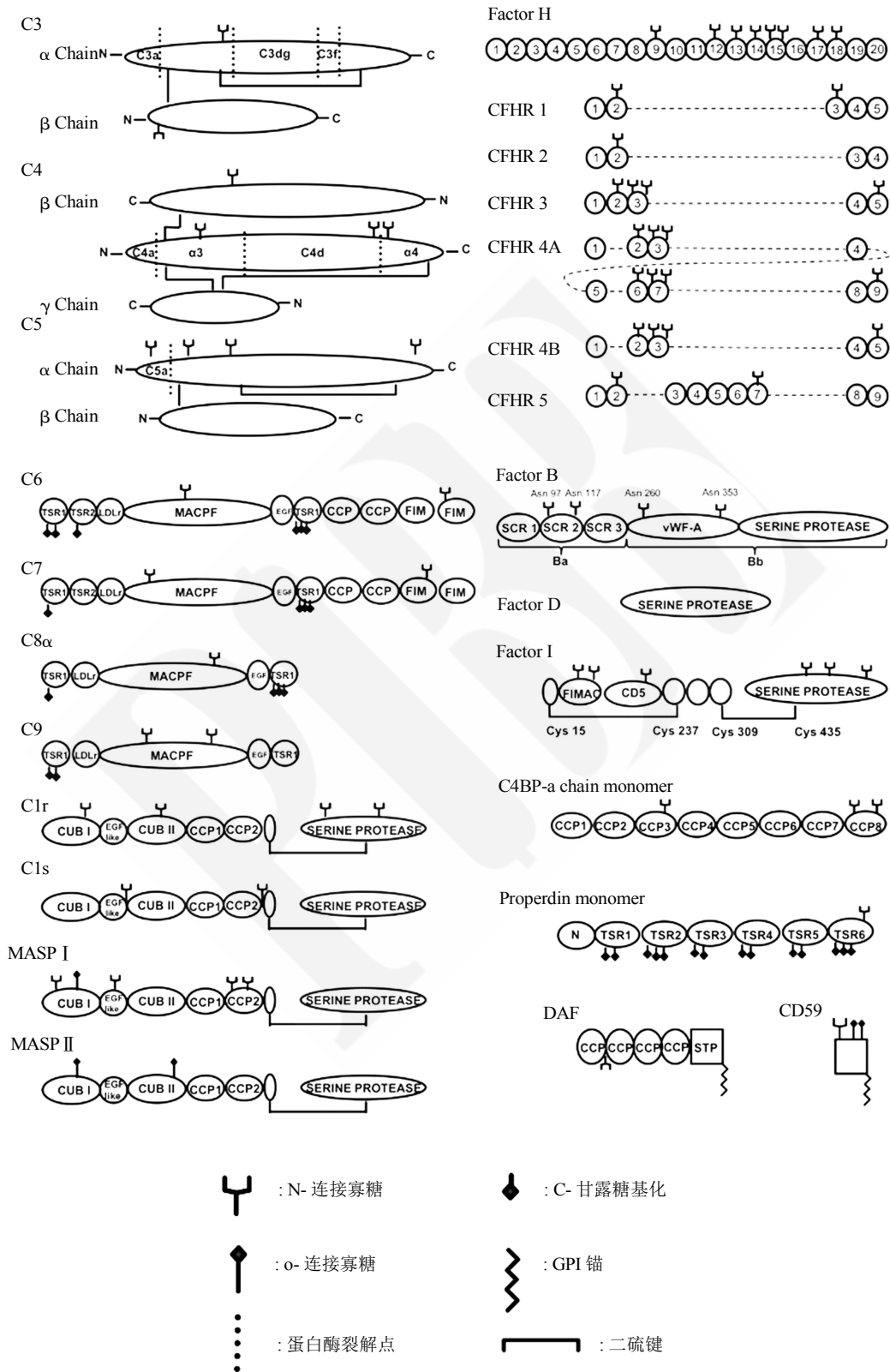


Fig. 2 Domain organization of proteins in the complement cascade and their potential glycosylation sites

图 2 补体通路蛋白质结构域及其潜在糖基化位点示意图

化 H 因子在兔红细胞和羊红细胞表面对 C3 转化酶衰变的影响. 实验结果表明, 去糖基化 H 因子对 C3 转化酶的衰变有更强的促进功能, 该结果在兔 / 羊红细胞上均得到证实^[74]. 然而, 从未有人直接验证过野生型 / 去糖基化 H 因子对硫酸肝素直接结合效力有没有差异. 此外, 结构分析表明, 糖基化对于 H 因子的折叠和正确构象的形成不是必需的^[75]. 综上所述, H 因子上的糖链结构对 H 因子生物学功能的影响仍是一个有趣的、尚待发掘的问题.

2.4.3 糖链与 I 因子的切割活性

I 因子是一种具有高度底物特异性的酶, 它可以在特定辅助因子(C4BP、H 因子、CD46、CR1) 的作用下切割 C4b 或 C3b 形成无活性的切割产物^[76-77]. I 因子以重度 N-糖基化的异二聚体形式在血浆中循环, 其两条单链由二硫键相连, 每条单链分别包含 3 个 N-寡糖侧链(图 2). I 因子主要包含复杂型双天线糖链, 其中 46%是双唾液酸化的, 26%是单唾液酸化的糖链^[78]. 由于 I 因子与 H 因子及 C3b 的相互作用主要是离子性的, I 因子上具有的带负电荷的糖链可能影响它与辅助因子的相互作用^[79], 例如: Ullman 等^[80]的研究表明, 含有中性寡聚岩藻糖链的重组 I 因子与纯化的天然人源 I 因子相比, 只有 55%的切割活性. 然而, 另一项研究表明, 天然的 I 因子和去糖基化 I 因子, 有着相似的水解 C3(NH₃)的功能^[80-81]. 因此, 糖链对于 I 因子的生物学功能有何影响仍然需要进一步探究.

除以上三种补体蛋白外, 有研究表明, 小鼠 C4 蛋白糖基化缺失会导致其血清的溶血活性下降^[82], 而 CD59 上的糖链可能影响 CD59 在细胞膜上的极化并保护 CD59 免受蛋白酶分解^[83], MCP, 即 CD46 可保护细胞免受补体介导的细胞溶解, 其结构域 CCP-2、CCP-4 上的糖基化修饰对于该保护功能是必需的, 其 STP 结构域上的 O-糖基化对该过程稍有影响, 而 CCP-1 上的糖基化是无影响的^[84]. 以上研究进一步表明糖基化修饰对于补体系统蛋白质功能可能有着深刻影响, 但目前我们对于补体系统糖基化和其功能的了解仍处于起步阶段, 还有非常广阔的空间有待探索.

3 小结和展望

补体系统是固有免疫系统的重要组成部分, 此外补体蛋白还可通过与多个免疫细胞的通讯来协调免疫反应, 因而补体系统是连接固有免疫和适应性免疫系统的重要桥梁. 补体系统在清除病原微生

物、维持机体稳态等方面有着重要作用. 然而补体系统需要严格调控, 补体系统失调有可能引起感染性或是自身免疫性疾病的发生. 补体系统由 30 多种蛋白组成, 且其中绝大多数是糖基化蛋白. 糖基化是一种重要且广泛存在的蛋白质翻译后修饰, 糖基化对于蛋白质折叠、构象形成、稳定性等方面有着重要的影响. 补体系统组分的糖基化及其对相应蛋白质功能的影响在近近年来得到了越来越多的重视. 本文从补体系统的激活、调控及功能方面对补体系统研究的新进展进行了概述, 并首次从糖基化角度描述了补体系统蛋白及糖链对补体系统蛋白质功能的影响. 虽然目前对于补体蛋白糖基化的研究仍处于起步阶段, 但是现有的研究已经显示出糖链结构对于补体系统蛋白质功能有着不可忽视的影响, 暗示着这一领域的广阔发展前景.

参 考 文 献

- [1] Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, *et al.* New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Molecular Medicine*, 2011, **17**(3-4): 317-329
- [2] Zipfel P F, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature Reviews Immunology*, 2009, **9**(10): 729-740
- [3] Merle N S, Church S E, Fremeaux-Bacchi V, *et al.* Complement system Part I-molecular mechanisms of activation and regulation. *Frontiers in Immunology*, 2015, **6**: 262
- [4] Pangburn M K, Schreiber R D, Müller-Eberhard H J. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *The Journal of Experimental Medicine*, 1981, **154**(3): 856-867
- [5] Isenman D E, Kells D I C, Cooper N R, *et al.* Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry*, 1981, **20**(15): 4458-4467
- [6] Li K, Gor J, Perkins Stephen j. Self-association and domain rearrangements between complement C3 and C3u provide insight into the activation mechanism of C3. *Biochemical Journal*, 2010, **431**(1): 63-72
- [7] Nishida N, Walz T, Springer T A. Structural transitions of complement component C3 and its activation products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(52): 19737-19742
- [8] Rodriguez E, Nan R, Li K, *et al.* A Revised mechanism for the activation of complement C3 to C3b: a molecular explanation of a disease-associated polymorphism. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, **290**(4): 2334-2350
- [9] Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, *et al.* Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 2010, **11**(9): 785-797
- [10] Walport M J. Complement. *New England Journal of Medicine*, 2001, **344**(15): 1140-1144

- [11] Sahu A, Kozel T, Pangburn M. Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochemical Journal*, 1994, **302** (2): 429–436
- [12] Law S, Dodds A W. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Science*, 1997, **6**(2): 263–274
- [13] Manderson A P, Pickering M C, Botto M, *et al.* Continual low-level activation of the classical complement pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, 2001, **194**(6): 747–756
- [14] Liszewski M K, Post T W, Atkinson J P. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annual Review of Immunology*, 1991, **9**(1): 431–455
- [15] Harris C L, Pettigrew D M, Lea S M, *et al.* Decay-accelerating factor must bind both components of the complement alternative pathway C3 convertase to mediate efficient decay. *The Journal of Immunology*, 2007, **178**(1): 352–359
- [16] Hasan R J, Pawelczyk E, Urvil P T, *et al.* Structure-function analysis of decay-accelerating factor: identification of residues important for binding of the *Escherichia coli* Dr adhesin and complement regulation. *Infection and Immunity*, 2002, **70** (8): 4485–4493
- [17] Hourcade D E, Mitchell L, Kuttner-Kondo L A, *et al.* Decay-accelerating factor (DAF), complement receptor 1 (CR1), and factor H dissociate the complement AP C3 convertase (C3bBb) *via* sites on the type A domain of Bb. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(2): 1107–1112
- [18] Lambris J D, Lao Z, Oglesby T J, *et al.* Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. *The Journal of Immunology*, 1996, **156**(12): 4821–4832
- [19] Rawal N, Rajagopalan R, Salvi V P. Stringent regulation of complement lectin pathway C3/C5 convertase by C4b-binding protein (C4BP). *Molecular Immunology*, 2009, **46**(15): 2902–2910
- [20] Baudino L, Sardini A, Ruseva M M, *et al.* C3 opsonization regulates endocytic handling of apoptotic cells resulting in enhanced T-cell responses to cargo-derived antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **111**(4): 1503–1508
- [21] Clarke E V, Weist B M, Walsh C M, *et al.* Complement protein C1q bound to apoptotic cells suppresses human macrophage and dendritic cell-mediated Th17 and Th1 T cell subset proliferation. *Journal of Leukocyte Biology*, 2015, **97**(1): 147–160
- [22] Nauta A J, Castellano G, Xu W, *et al.* Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 2004, **173**(5): 3044–3050
- [23] Lachmann P J. The amplification loop of the complement pathways. *Advances in Immunology*, 2009, **104**: 115–149
- [24] Harboe M, Mollnes T E. The alternative complement pathway revisited. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2008, **12**(4): 1074–1084
- [25] Ricklin D, Lambris J D. Complement-targeted therapeutics. *Nature Biotechnology*, 2007, **25**(11): 1265–1275
- [26] Barlow P N, Steinkasserer A, Norman D, *et al.* Solution structure of a pair of complement modules by nuclear magnetic resonance. *Journal of Molecular Biology*, 1993, **232**(1): 268–284
- [27] Perkins S J, Haris P I, Sim R B, *et al.* A study of the structure of human complement component factor H by Fourier transform infrared spectroscopy and secondary structure averaging methods. *Biochemistry*, 1988, **27**(11): 4004–4012
- [28] Zipfel P F, Jokiranta T S, Hellwage J, *et al.* The factor H protein family. *Immunopharmacology*, 1999, **42**(1): 53–60
- [29] Wu J, Wu Y-Q, Ricklin D, *et al.* Structure of complement fragment C3b – factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nature Immunology*, 2009, **10**(7): 728–733
- [30] Jokiranta T S, Hellwage J, Koistinen V, *et al.* Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(36): 27657–27662
- [31] Zipfel P F, Skerka C, Hellwage J, *et al.* Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochemical Society Transactions*, 2002, **30**(6): 971–978
- [32] Ferreira V P, Herbert A P, Hocking H G, *et al.* Critical role of the C-terminal domains of factor H in regulating complement activation at cell surfaces. *The Journal of Immunology*, 2006, **177**(9): 6308–6316
- [33] Mihlan M, Stippa S, Józsi M, *et al.* Monomeric CRP contributes to complement control in fluid phase and on cellular surfaces and increases phagocytosis by recruiting factor H. *Cell Death & Differentiation*, 2009, **16**(12): 1630–1640
- [34] Blackmore T K, Hellwage J, Sadlon T A, *et al.* Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *The Journal of Immunology*, 1998, **160**(7): 3342–3348
- [35] Hellwage J, Sabine K, Zipfel P F. The human complement regulatory factor-H-like protein 1, which represents a truncated form of factor H, displays cell-attachment activity. *Biochemical Journal*, 1997, **326**(2): 321–327
- [36] Díaz-Guillén M A, Rodríguez De Córdoba S, Heine-Suñer D. A radiation hybrid map of complement factor H and factor H-related genes. *Immunogenetics*, 1999, **49**(6): 549–552
- [37] Skerka C, Horstmann R D, Zipfel P. Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**(18): 12015–12020
- [38] Fritsche L G, Lauer N, Hartmann A, *et al.* An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Human Molecular Genetics*, 2010, **19**(23): 4694–4704
- [39] Timmann C, Leippe M, Horstmann R D. Two major serum components antigenically related to complement factor H are different glycosylation forms of a single protein with no factor H-like complement regulatory functions. *The Journal of Immunology*, 1991, **146**(4): 1265–1270
- [40] Heinen S, Hartmann A, Lauer N, *et al.* Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood*, 2009, **114**(12): 2439–2447
- [41] Skerka C, Timmann C, Horstmann R D, *et al.* Two additional

- human serum proteins structurally related to complement factor H. Evidence for a family of factor H-related genes. *The Journal of Immunology*, 1992, **148**(10): 3313–3318
- [42] Eberhardt H U, Buhlmann D, Hortschansky P, *et al.* Human factor H-related protein 2 (CFHR2) regulates complement activation. *PLoS One*, 2013, **8**(11): e78617
- [43] De Jorge E G, Caesar J J, Malik T H, *et al.* Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, **110**(12): 4685–4690
- [44] Hellwage J, Skerka C, Zipfel P F. Biochemical and functional characterization of the factor-H-related protein 4 (FHR-4). *Immunopharmacology*, 1997, **38**(1): 149–157
- [45] Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, *et al.* Complement factor H related proteins (CFHRs). *Molecular Immunology*, 2013, **56**(3): 170–180
- [46] Wirthmueller U, Dewald B, Thelen M, *et al.* Properdin, a positive regulator of complement activation, is released from secondary granules of stimulated peripheral blood neutrophils. *The Journal of Immunology*, 1997, **158**(9): 4444–4451
- [47] Fearon D T, Austen K F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *The Journal of Experimental Medicine*, 1975, **142**(4): 856–863
- [48] Hourcade D E. The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(4): 2128–2132
- [49] Spitzer D, Mitchell L M, Atkinson J P, *et al.* Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for *de novo* convertase assembly. *The Journal of Immunology*, 2007, **179**(4): 2600–2608
- [50] Merae J L, Duthy T G, Griggs K M, *et al.* Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. *The Journal of Immunology*, 2005, **174**(10): 6250–6256
- [51] Chen Q, Manzke M, Hartmann A, *et al.* Complement factor H-Related 5-Hybrid proteins anchor properdin and activate complement at self-surfaces. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2015, ASN. 2015020212
- [52] Moremen K W, Tiemeyer M, Nairn A V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, **13**(7): 448–462
- [53] Stowell S R, Ju T, Cummings R D. Protein glycosylation in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2015, **10**: 473–510
- [54] Ohtsubo K, Marth J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, **126**(5): 855–867
- [55] Spiro R G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 2002, **12**(4): 43R–56R
- [56] Schwarz F, Aebi M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 2011, **21**(5): 576–582
- [57] Peter-Katalinic J. *Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins*. *Methods in Enzymology*, 2005, **40**: 139–171
- [58] Pinho S S, Reis C A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature reviews Cancer*, 2015, **15**(9): 540–555
- [59] Ihara Y, Inai Y, Ikezaki M, *et al.* C-mannosylation: modification on tryptophan in cellular proteins// Endo T, Seeberger P H, Hart G W, *et al.* *Glycoscience: Biology and Medicine*. Japan: Springer, 2015: 1091–1099
- [60] Christiansen M N, Chik J, Lee L, *et al.* Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*, 2014, **14**(4–5): 525–546
- [61] Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2007, **8**: 261–278
- [62] Hennet T. Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects*, 2012, **1820**(9): 1306–1317
- [63] Freeze H H, Aebi M. Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, **15**(5): 490–498
- [64] Becker D J, Lowe J B. Leukocyte adhesion deficiency type II . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1999, **1455**(2): 193–204
- [65] Tomita M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1999, **1455**(2): 269–286
- [66] Hirani S, Lambris J D, Müller-Eberhard H J. Structural analysis of the asparagine-linked oligosaccharides of human complement component C3. *Biochemical Journal*, 1986, **233**(2): 613–616
- [67] Torreira E, Tortajada A, Montes T, *et al.* 3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(3): 882–887
- [68] Hinshelwood J, Spencer D I, Edwards Y J, *et al.* Identification of the C3b binding site in a recombinant vWF-A domain of complement factor B by surface-enhanced laser desorption-ionisation affinity mass spectrometry and homology modelling: implications for the activity of factor B. *Journal of Molecular Biology*, 1999, **294**(2): 587–599
- [69] Hourcade D E, Mitchell L M, Oglesby T J. Mutations of the type A domain of complement factor B that promote high-affinity C3b-binding. *The Journal of Immunology*, 1999, **162**(5): 2906–2911
- [70] Fenaille F, Le Mignon M, Groseil C, *et al.* Site-specific N-glycan characterization of human complement factor H. *Glycobiology*, 2007, **17**(9): 932–944
- [71] Kazatchkine M D, Fearon D T, Austen K F. Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and β 1H for cell-bound C3b. *The Journal of Immunology*, 1979, **122**(1): 75–81
- [72] Meri S, Pangburn M K. Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation *via* a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(10): 3982–3986
- [73] Pangburn M K. Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement.

- Immunopharmacology, 2000, **49**(1): 149–157
- [74] Jouvin M H, Kazatchkine M D, Cahour A, *et al.* Lysine residues, but not carbohydrates, are required for the regulatory function of H on the amplification C3 convertase of complement. *The Journal of Immunology*, 1984, **133**(6): 3250–3254
- [75] Schmidt C Q, Slingsby F C, Richards A, *et al.* Production of biologically active complement factor H in therapeutically useful quantities. *Protein Expression and Purification*, 2011, **76** (2): 254–263
- [76] Davis A E, Harrison R A. Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry*, 1982, **21**(23): 5745–5749
- [77] Fujita T, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *The Journal of Experimental Medicine*, 1978, **148**(4): 1044–1051
- [78] Ritchie G E, Moffatt B E, Sim R B, *et al.* Glycosylation and the complement system. *Chemical Reviews*, 2002, **102**(2): 305–320
- [79] Discipio R G. Ultrastructures and interactions of complement factors H and I. *The Journal of Immunology*, 1992, **149** (8): 2592–2599
- [80] Ullman C, Chamberlain D, Ansari A, *et al.* Human complement factor I : its expression by insect cells and its biochemical and structural characterisation. *Molecular Immunology*, 1998, **35** (9): 503–512
- [81] Tsiftoglou S A, Arnold J N, Roversi P, *et al.* Human complement factor I glycosylation: Structural and functional characterisation of the N-linked oligosaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2006, **1764**(11): 1757–1766
- [82] Karp D, Atkinson J, Shreffler D. Genetic variation in glycosylation of the fourth component of murine complement. Association with hemolytic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, **257**(13): 7330–7335
- [83] Rudd P M, Morgan B P, Wormald M R, *et al.* The glycosylation of the complement regulatory protein, human erythrocyte CD59. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(11): 7229–7244
- [84] Liszewski M K, Leung M K, Atkinson J P. Membrane cofactor protein: importance of N-and O-glycosylation for complement regulatory function. *The Journal of Immunology*, 1998, **161** (7): 3711–3718

Complement and Glycosylation*

ZHAO Fei^{1,3)**}, DANG Liu-Yi²⁾, ZHAO Xuan^{3,4)}, LI Ke^{3)**}

¹⁾ Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Jena 07745, Germany;

²⁾ Department of Molecular Biotechnology, Ghent University, Ghent 9000, Belgium;

³⁾ The Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China;

⁴⁾ Shangluo Central Hospital, Department of Clinical Laboratory, Shangluo 726000, China)

Abstract Complement system is an essential part of the innate immunity which serves as a bridge between innate and adaptive immunity. The complement system comprises of over 30 different proteins, most of which are glycoproteins. The recent researches have shown that complement system plays important roles in defense against the evading microbes and maintaining the cellular hemostasis. However, the complement system requires firm controls. Either insufficient activation or over-activation of complement would cause diseases. In this review, we summarize the recent advances in understanding the activation, regulation and the function of complement system and for the first time review the complement system by its glycosylation: we summarize the glycan structures of the complement proteins and analyze the glycosylation impact on the function of the proteins.

Key words complement, glycosylation, glycoprotein, regulation, factor H

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0320

* This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Shaanxi Province(2016YFJZ0020) and The National Natural Science Foundation of China(81470548).

**Corresponding author.

Tel: 86-29-87678329

Zhao Fei. E-mail: feizhao821@outlook.com

Li Ke. E-mail: ke.li@mail.xjtu.edu.cn

Received: August 1, 2017 Accepted: September 30, 2017