

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE LA DEFICIENCIA DEL FACTOR I
EN DOS FAMILIAS ESPAÑOLAS

TESIS DOCTORAL

ISABEL MARÍA PONCE CASTRO

MADRID, 2007

Departamento de Bioquímica
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE LA DEFICIENCIA DEL FACTOR I
EN DOS FAMILIAS ESPAÑOLAS

Memoria que para optar al grado de Doctor presenta

Isabel María Ponce Castro
Licenciada en Ciencias Biológicas

Directora: Dra. Margarita López Trascasa
Químico Adjunto de la Unidad de Inmunología
del Hospital La Paz

Tutora: Dra. Belén Peral Fuentes
Científico titular del CSIC
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Alberto Sols
(CSIC-UAM)

Unidad de Inmunología
Hospital Universitario La Paz
Madrid, 2007

No sé qué podré parecerle yo al mundo, pero tengo para mí que no he sido sino un muchacho que juega a la orilla del mar, que se distrae de cuando en cuando al encontrar un guijarro más liso o una concha más bella que las habituales, mientras el gran océano de la verdad se extendía ante mí aún por descubrir.

ISAAC NEWTON

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecerle a la Dra. Margarita López Trascasa la dirección de este trabajo y la oportunidad de formar parte de su equipo. Quería agradecerle la confianza y cariño que siempre ha puesto en mí y su gran capacidad de trabajo que ha sido muy edificadora y estimulante.

También quería agradecerle al Dr. Gumersindo Fontán la excelente forma de dirigir este servicio y las orientaciones que nos brinda a los residentes para nuestra mejor formación en la especialidad.

A los Drs. Antonio Ferreira, Rita Álvarez, Dora Pascual, M^a Cruz García Rodríguez y Pilar Sánchez-Corral, por haberse mostrado siempre tan accesibles y haberme dedicado su tiempo a las explicaciones teóricas y prácticas que he requerido. Destacar en este punto a Antonio y Pilar por su esfuerzo final en la revisión de esta memoria.

A Carolina por haberme ayudado e iniciado en este trabajo.

A mis amigos residentes y becarios, Charo, Eduardo, Olga, Álvaro, Eva, Prado, Cynthia, Alberto y Rocío, por su paciencia y cariño, os llevo a todos en mi pensamiento.

A un gran equipo de técnicos cuya ayuda ha sido inestimable en este proyecto. Muy especialmente a Sofía, Gracia, M^a Angeles y Flora que han estado serviciales a lo que he necesitado y me han mostrado su apoyo y cariño.

A los Drs. y becarios de la Unidad de Investigación, muchas gracias por vuestras orientaciones y amistad.

A los Drs. Alfredo Toraño y Mercedes Domínguez del Instituto de Salud Carlos III, por ofrecerme su laboratorio y su ayuda.

A los Drs. Juan Valcarcel del ICREA y Centro de Regulación Genómica de Barcelona y Xavier Roca en Cold Spring Harbor NY por sus orientaciones en el estudio molecular.

Al Dr. Matthew Pickering de la Facultad de Medicina -Imperial Collage por ofrecerme sus muestras de control.

Al Dr. Manuel J. Gómez del Centro de Astrobiología INTA-CSIC por su colaboración en la realización de la página web del Factor I y sus orientaciones en el tema de los modelos estructurales.

A los Drs. Juan Ayala del Centro de Biología Molecular-CSIC, Manuel Reina de la Facultad de Biología-UCB y Enrique Montiel del Instituto de investigaciones biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM por sus orientaciones en microscopía de fluorescencia.

A los médicos que han llevado los aspectos clínicos de los pacientes que hemos estudiado, especialmente quería agradecer al Dr. del Palacio del Hospital Doce de Octubre y al Dr. Arpa del Hospital La Paz, su interés y colaboración.

A mis pacientes, por su paciencia, gracias a ellos este trabajo está aquí.

A mis amigas, iiii que son muchas !!!!, por vuestra ayuda con los temas informáticos, por vuestra ayuda desinteresada de múltiples formas, gracias por vuestra amistad.

A mis hermanos y cuñado que siempre habéis aguantado con paciencia mis sermones, me habéis estimulado y ayudado en la finalización de este trabajo.

A mis padres por los incontables "cables" que a lo largo de mi vida me han echado y están echándome. Gracias a vuestro ejemplo de trabajo y sacrificio esta tesis ha salido adelante.

RESUMEN

La deficiencia del Factor I es una inmunodeficiencia primaria muy poco frecuente, en la que sólo hay 38 casos descritos y se hereda de forma autosómica recesiva. Los individuos con este déficit presentan fundamentalmente infecciones piógenas por bacterias encapsuladas, aunque también pueden tener patología por depósito de complejos inmunes o no presentar síntomas. La deficiencia del Factor I está causada por mutaciones en el gen del Factor I que dan lugar a un déficit antigénico en plasma. El defecto molecular se ha caracterizado sólo en cuatro familias.

El Factor I, es una serina proteasa del sistema de complemento constituida por dos cadenas, la cadena pesada y la cadena ligera. En la cadena ligera se encuentra el módulo serina proteasa. El Factor I se encuentra activo en el plasma, y su función es, regular la activación de la vía clásica y la vía alternativa mediante la proteólisis de C4b y C3b respectivamente.

Hemos realizado la caracterización del defecto inmunoquímico en el suero y el defecto molecular a partir del ARN de fibroblastos de piel, en dos familias españolas. Estas familias tenían patología infecciosa y una disminución grave de C3.

Las técnicas empleadas en el estudio fueron ELISA, Western Blot, Cultivo de fibroblastos, RT-PCR, PCR en ADN genómico y secuenciación. Los estudios de RT-PCR mostraron que, la Familia 1 presentaba el cambio, c.739T>G. En la Familia 2 se observó un ARNm que carecía del exón 5, además de la variación de secuencia c.804G>A en el exón 6, que no da lugar a cambio de aminoácido. Mediante amplificación del ADN genómico se confirmó la mutación encontrada en la Familia 1. En la Familia 2, se encontró la mutación c.772G>A en la última base del exón 5 que forma parte de la secuencia donadora del *splicing*, y se confirmó la variación encontrada en el exón 6. Además se observó, una delección de una timina en el intrón 7 a 108 pb del exón 7 que no afecta al correcto procesamiento del ARN mensajero.

Las dos mutaciones causantes de la deficiencia del Factor I en el plasma, se localizaron en el exón 5 que codifica para el módulo LDLr1. La mutación encontrada en la Familia 1, Cys247Gly, no se había descrito, y afectaría a la formación de un enlace disulfuro del módulo. La mutación que provoca la delección del exón 5, en la Familia 2, se había descrito anteriormente en una familia inglesa. Esta ausencia del módulo LDLr1

provocaría una anómala reorganización de los módulos de la cadena pesada y esto posiblemente afectaría a la actividad proteolítica.

SUMMARY

Deficiency of Factor I is a rare primary immunodeficiency disease, only 38 individuals with this deficiency have been reported. The inheritance is autosomic recessive. Patients typically present pyogenic infections, particularly with encapsulated bacteria and immunocomplexes diseases or no symptoms. Mutations in gene of Factor I originate a reduced levels of protein in plasma. The molecular defect has been characterised in four families.

Factor I is a serine proteinase of the complement system which has two chains, the heavy chain and the light chain. Serine protease module is in the light chain. The protein is secreted in its active form and controls the activation of the classic and alternative pathway. It cleaves C4b and C3b respectively.

We have determined the immunologic defect in sera and the molecular defect in skin fibroblast RNA of two Spanish families, who presented recurrent infections and a severe reduction of C3 levels. ELISA, Western Blot, fibroblasts culture, RT-PCR, genomic PCR and sequencing were used in this study.

RT-PCR studies have shown a missense mutation, c.739T>G, in Family 1. An exon 5 skipping and the variation sequence c.804G>A in exon 6 were observed in mRNA in Family 2. Mutation in Family 1 was confirmed by genomic PCR studies. A point mutation c.772G>A located in the last base of exon 5 was found in 5' splice site in the Family 2. In addition, the variation sequence of exon 6 was confirmed. Deletion of intron 7 thymine at 108 bp of exon 7 was also found in Family 2, not preventing alterations in mRNA processing.

To conclude, mutations causing Factor I deficiency in plasma were found in exon 5 which codifies LDLr 1 module protein. Cys247Gly mutation in Family 1 has not been described before and that would prevent the absence of a disulphide bridge in this module. c.772G>A mutation in the Family 2 has already been described in a English family. This mutation would produce an altered rearrangement of the heavy chain of Factor I and possibly affecting the proteolytic activity.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN	1
1. INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS.....	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Deficiencias de complemento.....	2
1.2.1. El sistema de complemento	2
1.2.2. Deficiencia en reguladores de la amplificación.....	5
2. LA DEFICIENCIA DE FACTOR I	7
2.1. Características generales.....	7
2.2. Manifestaciones generales	7
2.3. Deficiencia parcial de Factor I y Síndrome hemolítico urémico atípico	8
2.4. Diagnóstico de laboratorio de la Deficiencia de Factor I	8
2.5. Terapias y vacunaciones en la deficiencia de Factor I	9
3. EL FACTOR I	9
3.1. Características generales.....	9
3.2. Organización y estructura del Factor I	11
3.3. El gen del Factor I	13
3.4. Base molecular de la deficiencia de Factor I.....	15
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
4. DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LAS DOS FAMILIAS Y TRATAMIENTOS REALIZADOS	18
5. ESTUDIO DE PROTEÍNAS DEL COMPLEMENTO, INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES Y COMPLEJOS C3b-FACTOR H DEL SUERO.	20
5.1. Métodos de análisis de las proteínas de complemento	20
5.1.1. Nefelometría e Inmunodifusión radial.....	20
5.1.2. Ensayos Hemolíticos	20
5.1.3. ELISA	20
5.1.4. Western Blot	22
5.2. Métodos de análisis de los complejos del suero	22
5.2.1. ELISA comercial	22
5.2.2. Inmunoadsorción y Western Blot	22

5.2.3.	Western Blot y ELISA en la detección de los complejos C3b-Factor H	25
6.	ESTUDIO GENÉTICO DEL FACTOR I	25
6.1.	Numeración y nomenclatura de mutaciones	25
6.2.	Extracción de ADN	26
6.3.	Preparación de fibroblastos y extracción de ARN	26
6.4.	Generación y amplificación del ADNc de Factor I y secuenciación de los fragmentos obtenidos	27
6.5.	Amplificación y secuenciación de los exones y regiones intrónicas del Factor I a partir de ADN genómico	30
6.6.	Análisis mediante un programa informático de la estructura del módulo LDLr1 del Factor I	32
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN SUERO	34
7.1.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS NIVELES DE COMPLEMENTO ANALIZADOS EN LAS DOS FAMILIAS ESTUDIADAS	34
7.1.1.	Deficiencias en C3 y susceptibilidad a infección	37
7.1.2.	Deficiencia de los componentes terminales	38
7.1.3.	Implicaciones hormonales en la patogenia de la enfermedad en la paciente III de la Familia 1	39
7.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS INMUNOCOMPLEJOS Y COMPLEJOS C3b-FACTOR H ESTUDIADOS	40
7.2.1.	Descripción de los resultados obtenidos en el suero de la propositus de la Familia 1	40
7.2.2.	Ánisis de los componentes de los ICC en el suero de la paciente y su implicación en la clínica	43
7.2.3.	Detección de los complejos C3b-Factor H sueros de las dos familias	44
7.2.4.	Procesamiento y eliminación de los Inmunocomplejos por el Complemento	45
7.2.5.	Papel patogénico de los inmunocomplejos en las deficiencias de C3 primaria y secundarias (Deficiencias de Factor H y Factor I) y patología renal	47
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS MOLECULARES REALIZADOS	49

8.1.	Descripción de los resultados obtenidos en la Familia 1.....	49
8.2.	Descripción de los resultados obtenidos en la Familia 2.....	51
8.3.	Relevancia de la mutación c.772G>A en el proceso de <i>splicing</i>	53
8.4.	Efecto de las mutaciones encontradas en la estructura del módulo LDLr 1 y en la función del Factor I.....	56
8.5.	Efecto de las mutaciones encontradas en la síntesis y secreción del Factor I	60
	CONCLUSIONES	65
	BIBLIOGRAFÍA	66
	ANEXOS	76

ABREVIATURAS

ABTS: 2, 2'azino-di-(3 etilbenzotialina sulfato)

Ac: Anticuerpo

AcNa: Acetato sódico

ADNc: ADN complementario

Ag: Antígeno

ARNm: ARN mensajero

BCIP: 5-Br-4-Cl-3-indolilfosfato

BSA: Albúmina sérica bovina

C1-Inh: Inhibidor de C1

C1q: Subcomponente q del complejo C1

C1r: Subcomponente r del complejo C1

C1s: Subcomponente s del complejo C1

C3: Tercer componente del sistema de complemento

C4: Cuarto componente del sistema de complemento

DAB: Diaminobencidina

dNTP: Desoxinucleótido 5'-trifostato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo sobre inmunoabsorbente con enzima unido

ERAD: Degradación asociada al Retículo Endoplásmico

FH: Factor H

FI: Factor I

GN: Glomerulonefritis

IC: Inmunocomplejo

Igs(G): Inmunoglobulinas (de la clase G)

IUIS: Unión Internacional de Sociedades de Inmunología

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LES: Lupus eritematoso sistémico

MASP-1 (2): Serín proteasa 1 (2) asociada a la lectina de unión a manosa

MBL: Lectina de unión a manosas

MCP: Proteína cofactora de membrana

NBT: 4-Nitro azul de tetrazolio

OMIM: Bases de datos de herencia mendeliana humana

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Banco de datos de proteínas

PVDF: Polivinilideno difluorado

RE: Retículo Endoplásmico

r.p.m.: Revoluciones por minuto

RT: Retrotranscripción

SDS: Dodecilsulfato sódico

SHUa: Síndrome Hemolítico Urémico atípico

Splicing: Ajuste, eliminación de intrones y unión de exones.

SP: Serina proteasa

TAE: Tris, ácido acético y EDTA

Tris: Tris (Hidroximetil) Aminometano

Δ5: deleción del exón 5

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

1.1. Generalidades

El sistema inmune está constituido por un conjunto de proteínas y células que colaboran entre sí para defender al organismo de agentes infecciosos y otras agresiones. Cualquier fallo que se produce en este sistema altamente interrelacionado originará una respuesta defectuosa, dando lugar a clínica infecciosa o no infecciosa. A medida que se han ido conociendo los componentes y funcionamiento del sistema inmune se han ido asociando a nuevos cuadros en los que las manifestaciones clínicas son muy variadas. Al grupo heterogéneo de enfermedades causadas por defectos del sistema inmune se les denomina inmunodeficiencias.

Cuando la alteración está originada por un defecto genético (en algún componente del sistema inmune o en cualquier proteína que indirectamente afecte al sistema inmunológico), se le denomina inmunodeficiencia primaria.

La actual clasificación de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) considera los grupos de inmunodeficiencias primarias resumidos en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación general de las inmunodeficiencias primarias (IUIS 2005)

Inmunodeficiencias combinadas
Otros síndromes de inmunodeficiencia bien definida
Deficiencias predominantemente de anticuerpos
Enfermedades de disregulación inmune
Alteraciones autoinflamatorias
Defectos en número o función del sistema fagocitario
Defectos en la inmunidad innata
Deficiencias de complemento
Fuente de la tabla (Notarangelo <i>et al.</i> , 2005)

1.2. Deficiencias de complemento

El sistema de complemento que es el pilar de la inmunidad innata, participa no sólo en inflamación sino también actúa modulando la respuesta inmune adaptativa ó específica. Estos efectos los lleva a cabo mediante interacciones entre componentes del complemento o a través de fragmentos derivados de la activación, y proteínas reguladoras y receptores de complemento, sobre las células diana (Morgan *et al.*, 2005). La participación del complemento en la regulación de la inmunidad adaptativa se pone de manifiesto en estudios experimentales en los que una reducción de C3 circulante provoca una alteración en la respuesta de anticuerpos (Pepys, 1974) Fenómenos similares se han observado en personas con déficits de C3 primarios o secundarios (Reis *et al.*, 2006).

1.2.1. El sistema de complemento

El complemento es un sistema de más de 30 proteínas, que funcionan, como enzimas o como proteínas de unión, en plasma y en la superficie de las células, como receptores específicos de los fragmentos producidos durante la activación, o como reguladores, que van a distinguir las células del huésped frente a las extrañas durante el transcurso de una activación del complemento (Walport, 2001a;Walport, 2001b).

Se conocen 3 vías de activación de complemento, que convergen en la rotura proteolítica de C3, la vía clásica, vía alternativa y la vía de las lectinas (**Figura 1**)

Como parte de la inmunidad innata, el sistema de complemento es una importante arma efectora en la defensa del huésped, en la regulación de la inmunidad adquirida y en el aclaramiento de inmunocomplejos y otros materiales potencialmente peligrosos.

Debido a la capacidad del sistema de complemento de destruir y facilitar la eliminación de agentes extraños, debe estar estrechamente regulado y así evitar daño al propio organismo.

El sistema de complemento está regulado en tres pasos clave: iniciación, amplificación (formación de convertasa de C3 y de C5) y ataque de membrana. Las moléculas reguladoras que llevan a cabo esta regulación incluyen proteínas del plasma, C1 inhibidor, C4bp y Factor I, en la vía clásica, Factor H y Factor I en la vía alternativa y proteínas asociadas a membrana, MCP (CD46), DAF (CD55), CD59 y los receptores de complemento CR1 (CD38) y CR2 (CD21).

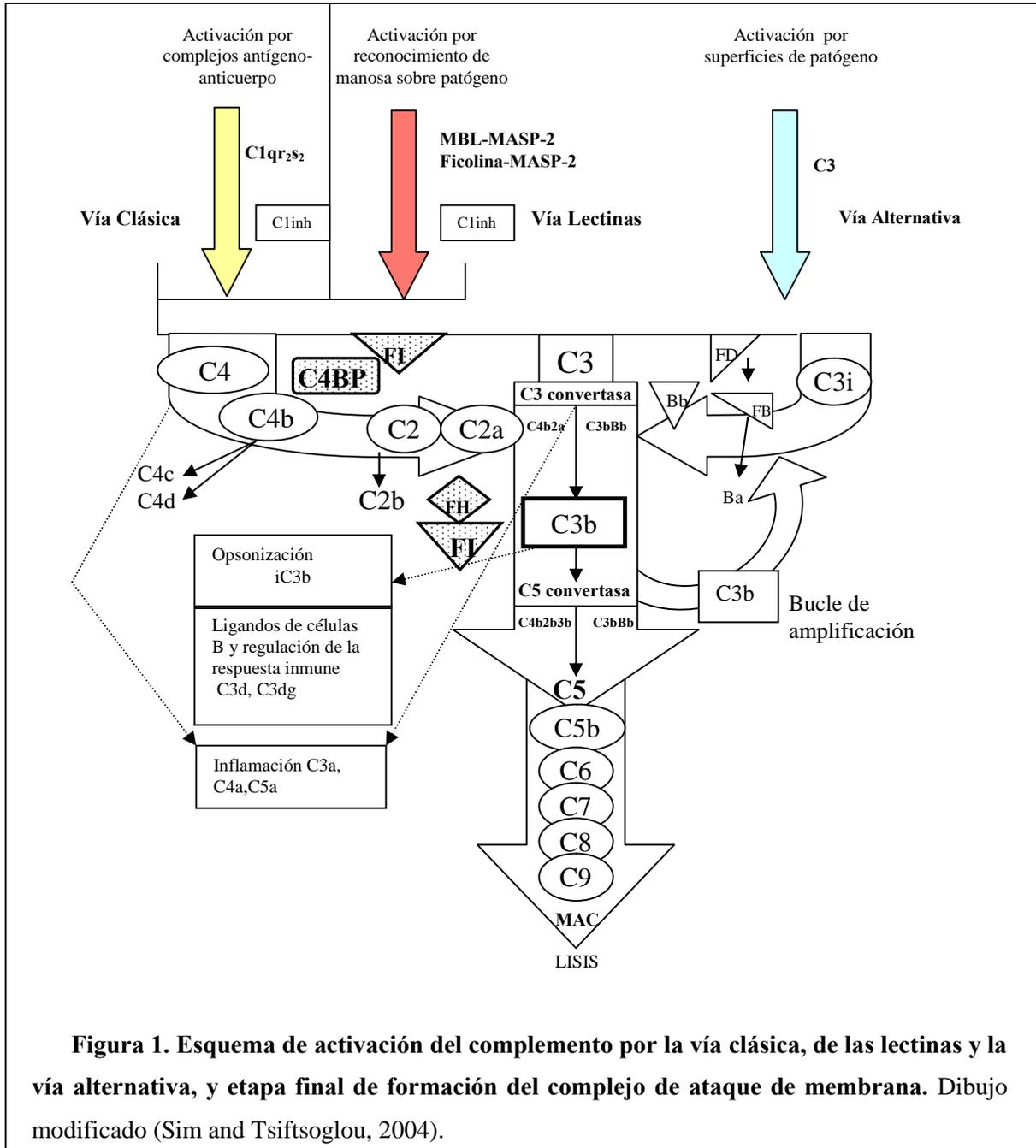


Figura 1. Esquema de activación del complemento por la vía clásica, de las lectinas y la vía alternativa, y etapa final de formación del complejo de ataque de membrana. Dibujo modificado (Sim and Tsiftoglou, 2004).

Se han descrito defectos en casi todas las proteínas del complemento tanto reguladoras como efectoras, y las patologías que llevan asociadas estas deficiencias, nos aportan información muy valiosa de las funciones que desempeñan.

Tabla 2. Deficiencias de complemento y asociaciones clínicas

DÉFICIT*	VÍA DE ACTIVACIÓN	HERENCIA	PRINCIPALES ASOCIACIONES CLÍNICAS
C1q, C1r, C1s, C4	C	AR	Síndrome lupus-like, enfermedad reumatoide, infecciones
inhibidor de C1	C	AD	Angioedema hereditario
C2	C	AR	Síndrome lupus-like, vasculitis, polimiositis, infecciones piógenas
MBP	L	AR	Infecciones piógenas
MASP2	L	AR	LES, infecciones piógenas
C3	Común a A, C, L	AR	Infecciones recurrentes piógenas, glomerulonefritis membranoproliferativa
Properdina	A	X	Infecciones por <i>Neisseria</i>
Factor D	A	AR	Infecciones por <i>Neisseria</i>
Factor B	A	AD	SHUa
Factor H	Regulador de A	AR AD	GN membranoproliferativa SHUa
Factor I	Regulador de A y C	AR AD	Infecciones piógenas SHUa
MCP	Regulador de A y C	AR y AD	SHUa
DAF y CD59	Inhibidores de A y MAC	Mutación somática en cr. X	Hemoglobinuria paroxística nocturna
C5, C6, C7, C8, C9	MAC	AR	Infecciones por <i>Neisseria</i>

* Déficit antigénico o de función; Vía de activación: C, clásica; A, alternativa; L, lectinas; Herencia: AR, autosómica recesiva; AD, autosómica dominante; X, ligada al cromosoma; SHUa, Síndrome hemolítico urémico atípico; GN, glomerulonefritis.

En la tabla 2, se muestran las diferentes asociaciones patológicas según la vía de activación afectada. En estas inmunodeficiencias la clínica dominante puede no ser infecciosa. Así los defectos de los componentes iniciales de la vía clásica (C1 a C2) dan lugar primordialmente, a lupus eritematoso sistémico (LES), por lo general con anticuerpos anti DNA-negativos, pero Ro₊. Aparecen también enfermedades causadas por complejos inmunes, y en el caso de la deficiencia de C2, pueden darse infecciones repetidas por *Neisseria*. El aumento de incidencia de LES y de enfermedades por complejos inmunes podría deberse a una mayor dificultad para su aclaramiento.

La deficiencia de C3, así como la de ciertos componentes de la vía alternativa, dan lugar a infecciones piógenas repetidas probablemente debidas a la falta de generación del C3b necesario para la opsonización y fagocitosis de estas bacterias.

Las deficiencias del complejo de ataque de membrana pueden producir fundamentalmente, infecciones repetidas por *Neisseria*, excepto en la de C9, que raramente causa patología. La incidencia aumentada de estas infecciones pone de manifiesto la importancia que la unión del complejo de ataque a las membranas de estas bacterias tiene para su destrucción (Fontán Casariego, 2006).

1.2.2. Deficiencia en reguladores de la amplificación

La vía alternativa se inicia con la hidrólisis espontánea en plasma de C3, a niveles bajos.

Se une a moléculas aceptoras no-específicas en plasma o en superficie, en las que se pueden formar convertasas y crear un bucle de retroalimentación. Así el control de la vía alternativa está destinado a prevenir un inapropiado ensamblaje de convertasas en fase fluida o en tejido propio.

Las proteínas que controlan negativamente las convertasas de C3 y C5 son; Factor H y Factor I en plasma, y MCP (Proteína cofactora de membrana), DAF (Factor acelerador del decaimiento), CR1 (Receptor del complemento tipo 1) y CR2 (Receptor del complemento tipo 2) en la membrana de las células hospedadoras (Figura 2)

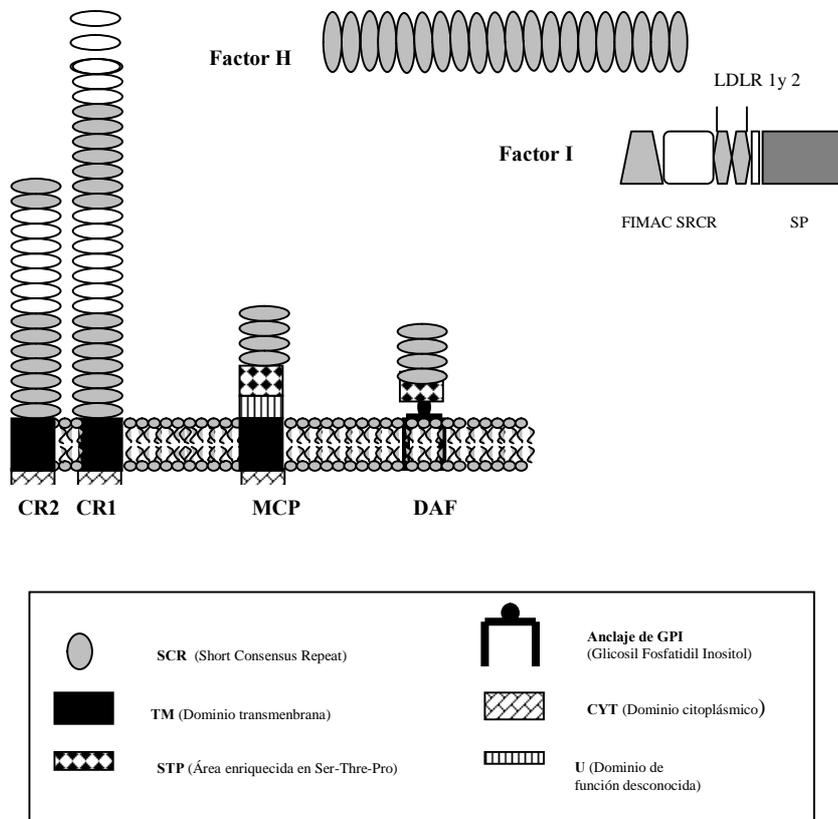


Figura 2 Representación de las moléculas reguladoras de las convertasas en fase fluida y unidas a membrana. FIMAC, complejo de ataque a membrana del Factor I; SRCR, receptor scavenger; LDLr 1 y 2, receptor de LDL; SP, serín proteasa.

Las proteínas reguladoras solubles Factor H y Factor I desempeñan un papel central en el control de la activación del complemento, tanto en plasma como en superficies propias.

La deficiencia total de estas proteínas provoca una amplificación incontrolada de la fragmentación de C3 y esto conlleva una disminución importante de los componentes de la vía alternativa y de los componentes terminales (Kirschfink and Binder, 1998).

La deficiencia de Factor H se ha descrito tanto en el hombre como en animales y está causada por mutaciones que dan lugar a un truncamiento de la proteína o una sustitución de aminoácidos que alteran su secreción en la circulación sanguínea (Ault *et al.*, 1997; Hegasy *et al.*, 2003; Sánchez-Corral *et al.*, 2000). En el cerdo, la deficiencia de Factor H da lugar a una glomerulonefritis, similar a la glomerulonefritis

membranoproliferativa tipo II humana, que origina fallo renal (Hogasen *et al.*, 1995). De forma similar, el ratón generado por inhibición génica selectiva “Knockout” de Factor H desarrolla espontáneamente una glomerulonefritis que se parece a la humana (Pickering *et al.*, 2002). Aunque no están claros, los procesos moleculares precisos que originan la glomerulonefritis membranoproliferativa en estos animales deficientes en Factor H, se demuestra que la incontrolada activación de C3 en plasma, debido a la ausencia de Factor H, es esencial para el desarrollo de la glomerulonefritis (Pickering *et al.*, 2002).

2. LA DEFICIENCIA DE FACTOR I

2.1. Características generales

La deficiencia de Factor I o deficiencia del inactivador de C3 (CFI, OMIM 217030) forma parte de las inmunodeficiencias primarias (Notarangelo *et al.*, 2005)

Es un déficit muy poco frecuente, en el que hay descritos 38 casos de 26 familias diferentes y tiene un patrón de herencia autosómica recesiva (Amadei *et al.*, 2001; Baracho *et al.*, 2003; Genel *et al.*, 2005; González-Rubio *et al.*, 2001; Kirschfink and Binder, 1998; Leitao *et al.*, 1997; Morley *et al.*, 1998; Naked *et al.*, 2000; Vyse *et al.*, 1996; Vyse *et al.*, 1994b).

El primer caso fue descrito en 1972 (Alper *et al.*, 1972). El paciente mostraba una susceptibilidad elevada a infecciones, hipercatabolismo de C3 y no tenía Factor I detectable en el suero. Algunos de sus familiares presentaban la mitad de los niveles normales de este factor.

2.2. Manifestaciones generales

Los pacientes con deficiencia en Factor I presentan típicamente infecciones piógenas, particularmente por bacterias encapsuladas; *Neisseria meningitidis* y/o *Streptococcus pneumoniae*. Las manifestaciones clínicas más frecuentes que padecen son; infecciones de vías respiratorias altas, sinusitis, bronquitis, neumonías, meningitis, otitis media y artritis.

Los heterocigotos están sanos e incluso hay homocigotos asintomáticos o que permanecen largos períodos de tiempo sin síntomas.

Debido a la ausencia de este factor, se produce un hipercatabolismo de C3 en el suero. Las funciones de opsonización, fagocitosis, y eliminación de inmunocomplejos, están alteradas en los deficientes de Factor I y estas alteraciones pueden ocasionarles enfermedades por depósito de complejos inmunes (Kirschfink and Binder, 1998).

2.3. Deficiencia parcial de Factor I y Síndrome hemolítico urémico atípico

El Síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) se caracteriza por ser un tipo de fallo renal con trombocitopenia y anemia hemolítica no relacionada con la toxina Shiga de *E. coli*, que provoca la forma típica.

Mutaciones en heterocigosis, en el gen de Factor I y en otros genes de proteínas reguladoras como Factor H y MCP se han asociado con el desarrollo de SHUa. (Saunders *et al.*, 2007) Estas mutaciones no son causa directa de este síndrome sino que son factores de predisposición a enfermedad, ya que hay familiares con estas mutaciones y no tienen manifestaciones clínicas. Este tipo de patología no se ha encontrado en los familiares heterocigotos de los deficientes totales en Factor I. Los mecanismos por los cuales estas mutaciones provocan alteraciones en la proteína y enfermedad, no están claros, pero se ha sugerido que estas mutaciones originan una regulación pobre de la vía alternativa en el riñón, frente a un daño que se produzca en el endotelio (Noris and Remuzzi, 2005)

Recientemente se ha creado una base de datos con las mutaciones encontradas en pacientes con SHUa que permitirá un mayor conocimiento de la implicación de estas mutaciones y su relación con los mecanismos de la enfermedad (Saunders *et al.*, 2007)

2.4. Diagnóstico de laboratorio de la Deficiencia de Factor I

La sospecha de la deficiencia de Factor I se puede establecer a partir de una disminución grave de C3 en el suero. Otros componentes como Factor B, Factor H y Properdina, también se observarían disminuidos.

La disminución de estos componentes de la vía alternativa nos indican un exceso de activación de la vía alternativa y por lo tanto el déficit de C3 es secundario al defecto de un regulador de esta vía.

Los niveles de los componentes de la vía clásica como el C4 no estarían afectados, aunque puede observarse disminución de la capacidad hemolítica CH50. Esta disminución es a consecuencia de la disminución de C3.

2.5. Terapias y vacunaciones en la deficiencia de Factor I

El principal tratamiento empleado para los pacientes con deficiencias heredadas de Factor I, Factor H y C3 sería el aporte del componente que falta y en su defecto el tratamiento con plasma. Este tratamiento se ha utilizado en las deficiencias de Factor I (Alper *et al.*, 1970; Barret and Boyle, 1984; Rasmussen *et al.*, 1988; Wahn *et al.*, 1980). Sin embargo, la vida media del Factor I es baja y además puede haber potenciales inconvenientes. Estos inconvenientes, fundamentalmente pueden ser, riesgo de infecciones virales, generación de una respuesta aloinmune frente a los componentes del suero y exacerbación de la enfermedad con la reconstitución del sistema de complemento.

Como profilaxis en los pacientes, es recomendable para evitar infecciones es la inmunización frente a patógenos para los que son particularmente susceptibles como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b y *Neisseria meningitidis* tipo A y C. (Kirschfink and Binder, 1998)

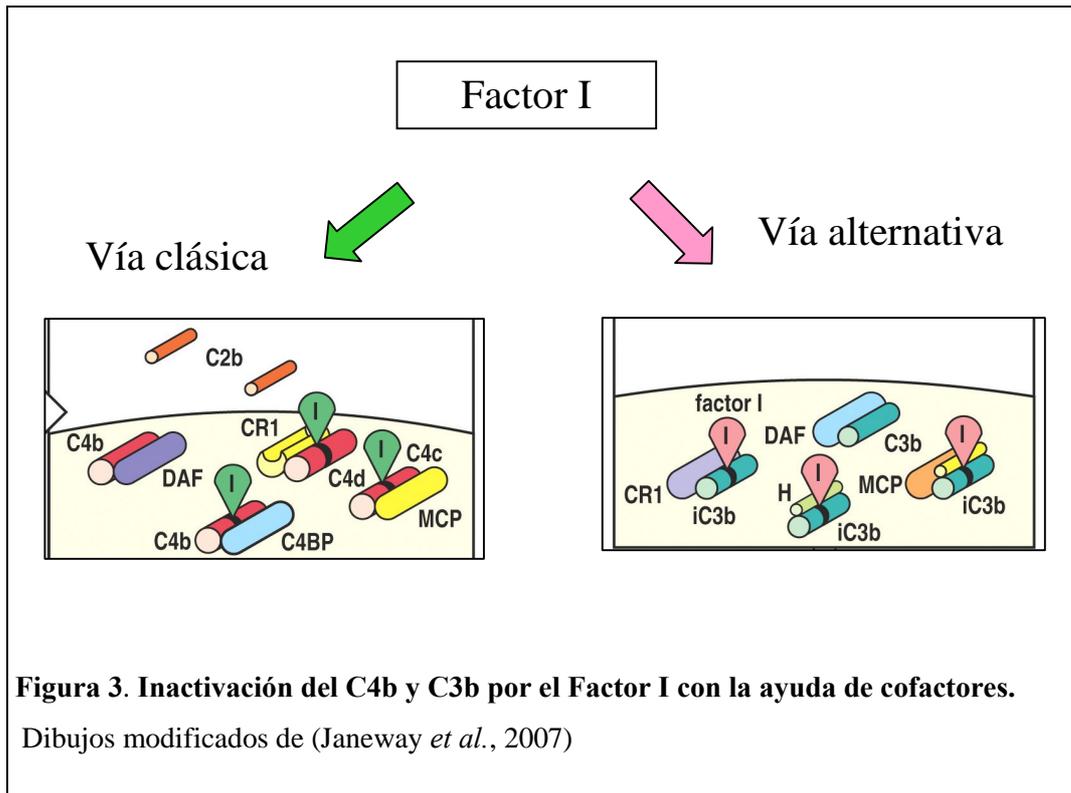
3. EL FACTOR I

3.1. Características generales

El Factor I es una serín proteasa del plasma (Davis and Harrison, 1982; Hsiung *et al.*, 1982), que circula a una concentración entre 25-35 $\mu\text{g/ml}$ de forma activa y no requiere activación proteolítica (Sim and Tsiftoglou, 2004).

La actividad de esta enzima fue descrita independientemente por dos autores (Lachmann and Müller-Eberhard, 1968; Tamura and Nelson, 1967).

La enzima actúa sobre la cadena α' de C4b, y α' de C3b sólo cuando se acompleja a las proteínas cofactoras C4bp, Factor H, CR1 soluble y de membrana, MCP y CR2. De esta manera impide la activación espontánea del complemento por la vía alternativa y clásica y previene así la generación de las convertasas de C3 y de C5.



El Factor I se sintetiza como una única cadena precursora de 583 aminoácidos. El péptido señal de 18 aminoácidos (Goldberger *et al.*, 1987), y cuatro aminoácidos básicos, se eliminan durante los pasos iniciales de la maduración intracelular. Después de este proceso se secreta un heterodímero de 561 aminoácidos en el que dos cadenas van a estar unidas por un puente disulfuro (Pangburn *et al.*, 1977).

Por lo menos dos variantes alélicas de Factor I existen, pero en muchas poblaciones sólo se encuentra una (Kölbe *et al.*, 1986; Nishimukai and Tamaki, 1986).

El Factor I es una proteína muy glicosilada en residuos de Asn. Recientemente se han caracterizado los seis sitios de glicosilación.

Las dos cadenas presentan igual composición de glicanos muy sializados (Tsiftoglou *et al.*, 2006) y la masa molecular aparente del Factor I estaría entre 80-90 kDa.

El hígado es el principal productor de este factor, otras células productoras son los fibroblastos y las células endoteliales y no lo expresan los leucocitos de sangre periférica (Schlaf *et al.*, 2001).

3.2. Organización y estructura del Factor I

La proteína madura de Factor I, que se encuentra en la sangre, está constituida por dos cadenas. La cadena pesada es de 50 kDa y tiene cuatro módulos. En el extremo amino terminal hay un motivo común a los componentes C6 y C7 de complemento, que se denomina FIMAC (Factor I/Membrane-Attack Complex proteins) seguido de un módulo homólogo a CD5, que es el módulo SRCR (Scavenger Receptor Cys-Rich). Y en el extremo carboxilo terminal hay dos módulos que son homólogos al receptor de lipoproteínas de baja densidad, LDLr 1 y LDLr 2. La cadena ligera es de 35 kDa y posee un único módulo con actividad serín proteasa (Vyse *et al.*, 1994a) (Figura 4).

Ciertos autores (Chamberlain *et al.*, 1998) sugieren un modelo de organización de estos módulos en el factor I, en el que FIMAC, SRCR y LDLr-1 podrían formar una organización compacta triangular estabilizada por un puente disulfuro entre la Cys en la posición 15 del N-t y la Cys en la posición 237 del módulo LDLr1 (Figura 4). Estos autores definieron dos entidades globulares, que constituirían una estructura bilobular en Factor I, el lóbulo de la cadena pesada y el lóbulo de la cadena ligera donde se encuentra el dominio serín proteasa (Chamberlain *et al.*, 1998).

La estructura tridimensional de cada uno de los módulos no está resuelta pero existe una aproximación a su estructura mediante modelado por homología a estructuras conocidas (Saunders *et al.*, 2007) Los modelos de cada uno de los módulos se pueden encontrar en la página www.fh-hus.org (Figura 4).

La cadena ligera tiene homología con otras serina proteasas. Así con el factor activador del plasminógeno presenta la mayor similitud, 41% de identidad de secuencia. Y entre las serina proteasas del complemento presenta la mayor identidad de aminoácidos con el Factor D.

Los aminoácidos que caracterizan el centro activo se denominan triada catalítica y son la His 362, Asp-411 y Ser-507. Además de estos, otros residuos se encuentran en esta región que definen la especificidad de proteólisis similar a la de la tripsina, en la que se escinden sólo las uniones arginil.

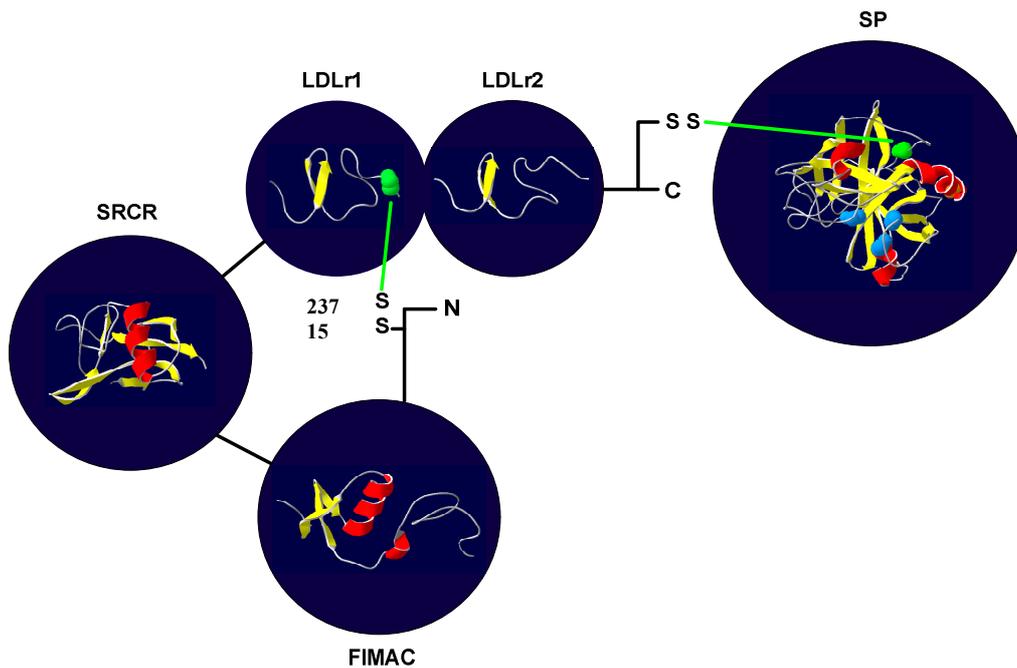


Figura 4. Modelo de la organización en dominios del Factor I según (Chamberlain *et al.*, 1998). Los módulos FIMAC, SRCR y LDLr 1 y 2 constituyen la cadena pesada, y el módulo SP forma parte de la cadena ligera. En color verde se indican las Cys implicadas en los puentes disulfuro intermodulares. En el módulo SP se indican en azul los aminoácidos que forman parte de la triada catalítica. Figuras realizadas con el programa Swiss PDB viewer y las estructuras de la página www.fh-hus.org (Saunders *et al.*, 2007) Se simbolizan en distinto color la estructura secundaria de los módulos, hélices alfa (rojo) y láminas beta (amarillo).

El Factor I fragmenta C3b y C4b sólo en presencia de cofactores. La cadena pesada se une al Factor H y se cree que el dominio serín proteasa interaccionaría con el sustrato C3b (Soames and Sim, 1997).

Aunque se han descrito una serie de sustratos sintéticos sobre los que puede actuar Factor I sin necesidad de cofactores (Tsiftoglou and Sim, 2004), la actividad proteolítica de Factor I, sobre C3b sin Factor H, es casi nula, incluso el dominio serina proteasa aislado, tiene actividad catalítica sobre C3b en ausencia de Factor H, pero tiene una actividad lenta y poco específica (Tsiftoglou *et al.*, 2005). Estos autores confirman la importancia de la interacción de la cadena pesada y el cofactor en la unión al sustrato, y en la orientación del dominio serina proteasa hacia los dos lugares de proteólisis del C3b en iC3b. La proteólisis de C3b de forma inespecífica la realizan varias proteasas,

sin embargo la generación de iC3b a partir de C3b sólo la realiza Factor I y no se han descrito otras proteasas que lo generen (Tsiftoglou *et al.*, 2005).

3.3. El gen del Factor I

La proteína Factor I está codificada por el gen *CFI* (NCBI GeneID:3426; UniProt/Swiss-Prot P05156), que se encuentra en el cromosoma 4 (Goldberger *et al.*, 1987) en la región q25 (Shiang *et al.*, 1987; Shiang *et al.*, 1989).

La estructura genómica fue descrita en 1994, pero no se describieron todas las secuencias intrónicas (Vyse *et al.*, 1994a). La secuencia completa del gen se puede consultar en las páginas www.ncbi.nlm.nih.gov y en www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000205403 y está contenida en el contig RP11-602N24 versión AC126283.3 gi:22091403.

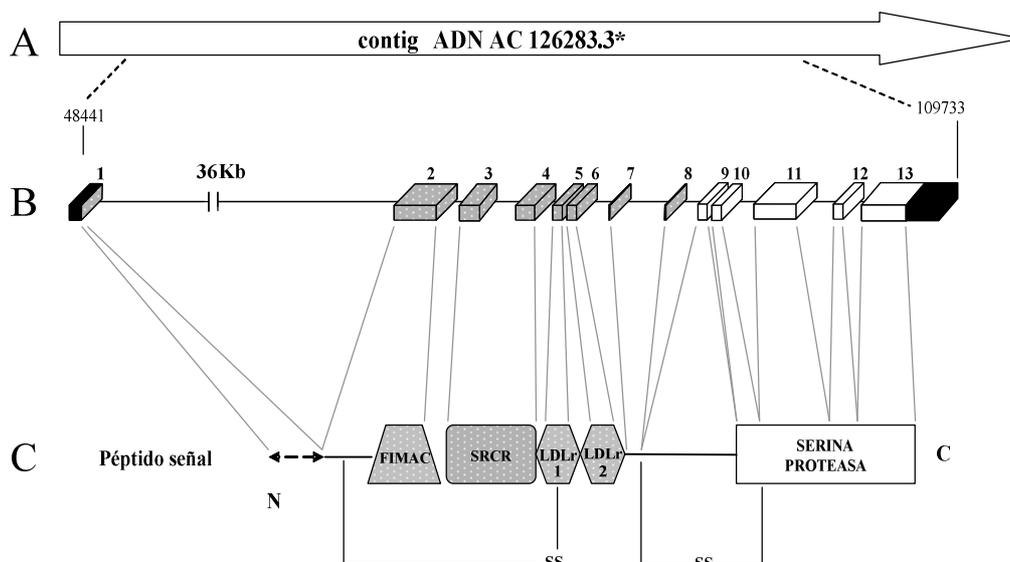


Figura 5 Estructura del gen del Factor I y su correspondencia en módulos. **A**, El Contig de ADN genómico AC126283.3* que contiene la secuencia completa del gen está en sentido (-) en las bases de datos. Las posiciones del gen que se especifican tienen la orientación en sentido (+); **B**, Secuencia génica del Factor I. En negro se indican las secuencias no traducidas y en gris los exones que codifican para la cadena pesada del Factor I. En blanco se representan los exones que codifican para la cadena ligera; **C**, La organización en módulos del Factor I; FIMAC (Complejo de ataque de membrana del Factor I), SRCR (Receptor scavenger), LDLr 1-2 (receptor de LDL).

El gen del FI se expande a lo largo de 63 Kb y está organizado en 13 exones, donde los 8 primeros codifican para la cadena pesada y los 5 últimos del 9 al 13, codifican para el centro activo (Vyse *et al.*, 1994a).

Este gen posee un primer intrón grande de 36 Kb. El primer exón es de pequeño tamaño de 86 pb y da lugar a una secuencia de 29 pb no traducida, seguida de una secuencia de 54 pb que codifica el péptido señal y el primer codón de la cadena pesada.

El segundo exón codifica para el módulo que tiene homología estructural con un módulo de C6/C7. El tercer y cuarto exón codifican para el dominio SRCR, también conocido como CD5. Este ha sido identificado en un número de proteínas de otros mamíferos, como el receptor *scavenger* de macrófagos murino y en dos glicoproteínas de superficie de linfocitos que están involucradas en la transducción de señales. Aunque no se conoce la función de éste parece tener un papel en la interacción proteína – proteína.

El exón 5 codifica el módulo LDLr 1 y el exón 6 el módulo LDLr 2. Este módulo está presente también en los componentes terminales C6, C7, C8 α , C8 β y C9. Los dos exones 5 y 6 están muy cercanos, separados por un intrón de 142 pb, el intrón más pequeño del gen.

El exón 7 y 8 codifican para la región “linker” entre la cadena pesada y la ligera y los exones 9 al 13 codifican para el dominio serín proteasa.

La secuencia del ADNc fue descrita en 1987 (Catterall *et al.*, 1987;Goldberger *et al.*, 1987). La longitud del ARNm se estimó que tendría un tamaño de 2,4 Kb (Goldberger *et al.*, 1987)

Otros autores más tarde, identificaron tres sitios de inicio de la transcripción, uno principal y dos menos importantes a 152, 178 y 198 pb del inicio de la traducción respectivamente (Minta *et al.*, 1998).

El promotor del FI ha sido caracterizado (Minta *et al.*, 1998) y reside en una región entre -112 y +3, tiene una caja TATA débil. Su transcripción puede ser modulada por Sp1, AP2 y/o CTF-NF1. Debido a que la actividad transcripcional del gen FI se ve aumentada por PMA, IL-6 y TNF α , podría considerarse, el Factor I, un reactante de fase aguda.

3.4. Base molecular de la deficiencia de Factor I

La base molecular de la deficiencia total de Factor I, sólo se ha caracterizado en cuatro familias.

La primera familia estudiada procedía de Escocia. En ella había dos hermanos con el mismo defecto que tenían una alteración en el exón 11, c.1253A>T, en la región serín proteasa, y provoca el cambio de una His por una Leu. La segunda familia es del Norte de Inglaterra, y se estudió una hija afectada que presentaba dos mutaciones en distinto alelo. Un alelo tenía la misma mutación, que la familia anterior en el exón 11, y en el segundo alelo tenía una mutación en el sitio donador del *splicing* que provocaba la delección del exón 5 que codifica para el módulo LDLr1. Además en el exón 6 había una mutación que no daba lugar a cambio de aminoácido (Vyse *et al.*, 1996).

La tercera familia de procedencia Suizo-Germana presentaba una doble mutación en el mismo alelo, c.907G>A y c.913G>T, que afecta al exón 8 que codifica para la región “linker” de la cadena pesada, da lugar a un cambio de Glu a Lys y de un Glu a un codón stop respectivamente y en el otro alelo tenía una mutación en el exón 11 c.1420C>T que causa un stop prematuro en la serín proteasa (Morley *et al.*, 1998).

La cuarta familia es de origen brasileño. En ella hay dos hermanas, de padres consanguíneos que presentaban una inserción en el exón 11 c.1190_1191InsAT. Esta mutación provoca un cambio en el marco de lectura y un stop prematuro 13 pb más abajo del sitio mutado (Baracho *et al.*, 2003).

Los niveles de FI son indetectables en el suero de todos los individuos homocigotos, y hay algunos que están asintomáticos. Los padres y hermanos heterocigotos que tienen niveles intermedios de Factor I, no presentan clínica.

Recientemente se han descrito dos fenotipos en pacientes con SHUa que tienen mutaciones en heterocigosis en Factor I. El fenotipo I en el que hay disminución de los niveles de la proteína y el fenotipo II en el que los pacientes tienen niveles normales pero la proteína tiene una función alterada (Caprioli *et al.*, 2006; Esparza-Gordillo *et al.*, 2005; Frémeaux-Bacchi *et al.*, 2004; Kavanagh *et al.*, 2005) (Figura 6).

Hasta el momento no existe una correlación genotipo/fenotipo, porque la expresión clínica de enfermedad no se correlaciona con la mutación presente en el *CFI* ni con los niveles de Factor I. Y entre los familiares que comparten una misma mutación pueden presentar una expresión fenotípica diferente. Debe haber por tanto,

otros factores genéticos o ambientales, además de la deficiencia total o parcial en Factor I que intervenga en la predisposición de un individuo a desarrollar enfermedad.

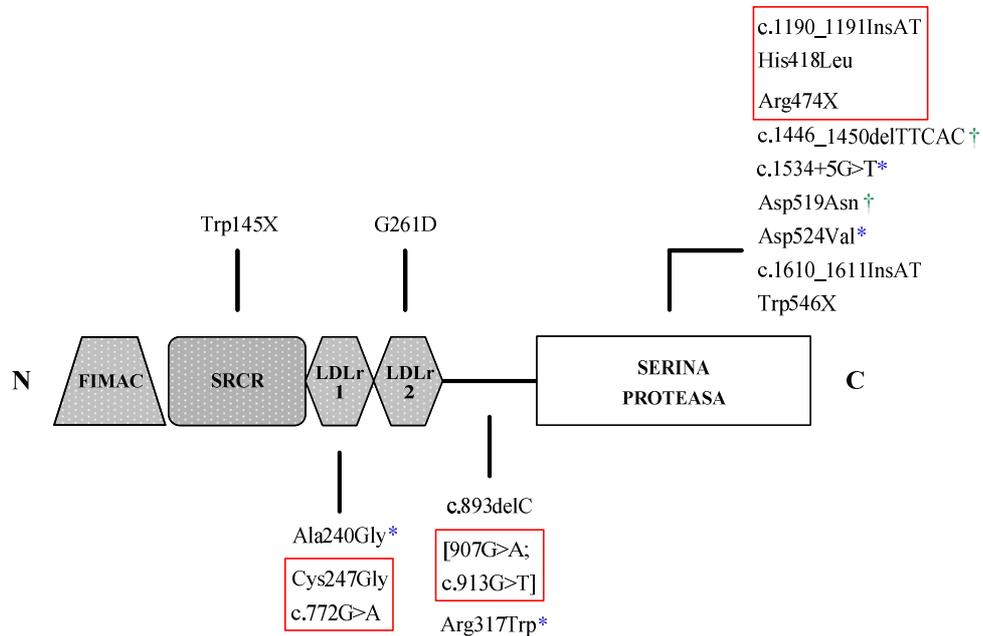


Figura 6. Distribución de las mutaciones asociadas a enfermedad dentro de los dominios de Factor I. Mutaciones en rojo están asociadas a deficiencia total de Factor I. El resto, se han encontrado en pacientes con SHUa: *, las mutaciones que producen un fenotipo II; +, Las mutaciones que no se han podido clasificar y el resto de las mutaciones producen un fenotipo I. Dibujo modificado de (Saunders *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo han sido:

1. Caracterizar mediante ensayos bioquímicos el defecto del sistema de complemento en dos familias españolas con niveles bajos de complemento.
2. Establecida la deficiencia en Factor I, analizar las alteraciones inmunoquímicas que origina en el suero de los pacientes.
3. Identificar la mutación patogénica en el gen *CFI* en las dos familias con Deficiencia de Factor I, mediante análisis molecular del ADNc en fibroblastos de piel.
4. Confirmar las mutaciones del ADNc en ADN genómico.
5. Analizar los mecanismos moleculares que han podido generar las mutaciones encontradas y determinar su efecto sobre el ARNm y sus implicaciones en la síntesis y secreción de la proteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

4. DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LAS DOS FAMILIAS Y TRATAMIENTOS REALIZADOS

Se inició el estudio en la Familia 1, en el año 2000. Esta familia está constituida por 5 individuos. Los padres están sanos y no refieren ser consanguíneos, habían tenido un hijo que falleció de meningis II2, tenían una hija III1 que presentaba meningitis de repetición asociadas a la menstruación y los otros dos hijos no tenían clínica al comienzo del estudio.

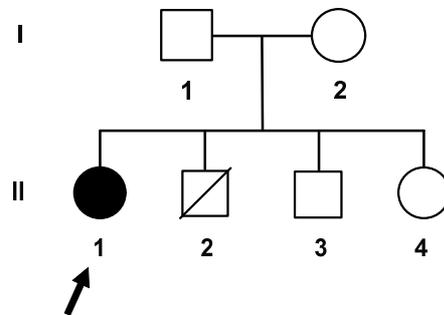


Figura 7. Árbol genealógico de la Familia 1. La propositus se señala con una flecha.

La clínica de la propositus (señalada con una flecha en la figura 7) se describió en Noviembre del 2001 (González-Rubio *et al.*, 2001). Brevemente se comentará la patología que presentó durante el estudio, la evolución de los síntomas y los tratamientos administrados.

El inicio de los síntomas en la propositus fue a los 16 años que sufrió una sepsis meningocócica coincidente con la menstruación.

A los 22 años sufrió otra meningitis asociada a la menstruación. No se encontró fístula meníngea ni agente infeccioso. Al observarse bajos niveles de C3 en suero fue remitida a la Unidad de Inmunología del Hospital La Paz.

Los episodios de meningitis coincidían con la menstruación y se la trató con una droga antiestrógeno (Triptorelina).

Después se le administraron infusiones de plasma fresco, para aportarle componentes de complemento, y no se observaron resultados satisfactorios.

En los LCR recogidos de cada episodio, no se detectaba microorganismo y se decidió administrar corticoides para prevenir nuevos cuadros.

Posteriormente, se detectó *Neisseria meningitidis tipo b* en el LCR del nuevo episodio y se le trató con Penicilina y Rifampicina.

Después se le administró gammaglobulina intravenosa y por último colchicina.

La propositus padeció 22 episodios de meningitis, y sólo en tres LCR se detectó microorganismo.

La hermana II4, estaba sana cuando se realizó el diagnóstico y también presentaba niveles bajos de C3. A los 18 años sufrió una meningitis meningocócica y después amigdalitis recurrentes. Recientemente ha sido amigdalectomizada.

La segunda familia estudiada, está constituida por 7 individuos. Los padres están sanos y refieren no ser consanguíneos.

El inicio de los síntomas en la propositus fue a los 17 años que sufrió una meningitis meningocócica. Después, a los 19 años tuvo una neumonía pneumocócica y se le hizo un estudio inmunológico que evidenció bajos niveles de C3.

Su hermano II5 presentó a los 9 años otitis supurativa y un año más tarde artritis séptica y el hermano II4 sólo padeció una meningitis linfocitaria a los 31 años.

Los tres hermanos presentaron unas lesiones hiperpigmentadas en las piernas, que se han ido resolviendo con el tiempo y en la actualidad no tienen clínica.

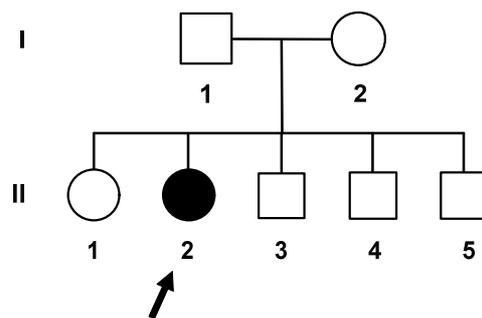


Figura 8. Árbol genealógico de la Familia 2. La propositus se señala con una flecha.

5. ESTUDIO DE PROTEÍNAS DEL COMPLEMENTO, INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES Y COMPLEJOS C3b-FACTOR H DEL SUERO.

Se recogieron muestras de sangre completa para preparar suero, plasma y ADN de todos los individuos de la Familia 1, y de la Familia 2. En todos los casos, dieron su consentimiento informado para el estudio.

Se alicuotaron, e inmediatamente se congelaron a -80 °C hasta su uso.

5.1. Métodos de análisis de las proteínas de complemento

Se cuantificaron los componentes más representativos de la vía clásica y de la vía alternativa.

5.1.1. Nefelometría e Inmunodifusión radial

Los niveles de C3, C4, se midieron por nefelometría Beckman (Fullerton, CA, EEUU) o Behring Analyzer II (Dade Behring, Marburg, Alemania), y los niveles de Factor B se midieron en el servicio de Inmunología del Hospital Gregorio Marañón por nefelometría (Beckman).

Los niveles de C1q se determinaron mediante inmunodifusión radial (Human Complement C1q Bindarid™ Radial Immunodiffusion Kit, The Binding Site Ltd., Birmingham, Gran Bretaña).

5.1.2. Ensayos Hemolíticos

La actividad funcional de la vía clásica CH50 y de la vía alternativa AP50 del complemento se midieron, con eritrocitos de carnero-hemolisina y eritrocitos de conejo, respectivamente, de acuerdo con procedimientos estándar (Phimister and Whaley, 1990).

La actividad de C7 y C8 fue también medida con ensayos hemolíticos como se describe en (Segurado *et al.*, 1992) y se utilizaron sueros de pacientes, en los que previamente se habían diagnosticado la deficiencia de C7 y C8.

5.1.3. ELISA

Se determinaron los niveles de properdina (P), Factor H (FH), Factor I (FI), y de C5 mediante ELISA sandwich (González-Rubio *et al.*, 2001).

Los pocillos fueron recubiertos con la fracción IgG de anticuerpos policlonales y monoclonal anti C5 como anticuerpos de captura, durante toda la noche a 4°C (Tabla 3).

Tabla 3 Anticuerpos empleados en el ELISA

	Anticuerpo de captura	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Properdina	IgG de cabra anti P (ATAB;Atlantic Antibodies, Scarborough,Me) 1µg/pocillo	Monoclonal anti P (Chemicon, Temecula, CA) diluido 1/2000 en PBS-Tween 0,1%	Policlonal de cabra Anti Igs de ratón marcado con peroxidasa (Biosource, Camarillo,CA) diluido 1/1000 en PBS-Tween 0,1%
Factor H	IgG de cabra anti FH (Quidel; Mountain View CA) 1µg/pocillo	Monoclonal anti FH (Quidel) diluido 1/8000 en PBS-Tween 0,1%	Policlonal de cabra Anti Igs de ratón marcado con peroxidasa (Biosource, Camarillo,CA) diluido 1/1000 en PBS-Tween 0,1%
Factor I	IgG de cabra anti FI (Quidel; Mountain View, CA) 2 µg/pocillo	Monoclonal anti FI (reconoce la cadena pesada)(Serotec, Oxford, England) diluido 1/20 en PBS-Tween 0,1%	Policlonal de cabra Anti Igs de ratón marcado con peroxidasa (Biosource, Camarillo,CA) diluido 1/1000 en PBS-Tween 0,1%
C5	Monoclonal anti C5 (Quidel) 40 ng/pocillo	Policlonal de cabra anti C5 (ATAB, Scarborough,ME, EEUU) diluido 1/1000 en PBS-Tween 0,1%	Policlonal de burro anti Igs de cabra marcado con peroxidasa (Chemicon, Temecula, CA) diluido 1/1000 en PBS-Tween 0,1%

Las muestras de suero se utilizaron a las diluciones adecuadas según cada proteína.

Las curvas patrón se realizaron con P, FI, FH purificados según el caso y como patrón de C5 se empleó un suero calibrado (Dade Behring, Marburg, Alemania) y el rango de normalidad se estableció midiendo sueros humanos normales. El sustrato que se utilizó fue una disolución de ABTS (Roche, Mannheim, Alemania) y 0,01% de H₂O₂.

5.1.4. Western Blot

Las proteínas de los sueros de las dos familias (1 μ l) de suero se separaron mediante SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras durante 1 hora a 20 mA en una cubeta Mighty Small II (Hoefer, San Francisco, CA, EEUU) con un tampón Tris 0.25 M, glicina 1.92 M, SDS 0.1% a pH 8.3. A continuación, se transfirió el gel a una membrana de PVDF (Millipore, Bedford, MA, EEUU) en una cubeta de electrotransferencia refrigerada a 4°C durante 1 hora a 100V. Y después se bloquearon las inespecificidades de la membrana con PBS y 5% de leche desnatada (LD) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó la membrana con el policlonal de cabra anti FI humano (Quidel) diluido 1/ 500 en PBS-Tween 0.1% y 2.5% LD (PBS-T-LD) durante 1 hora a temperatura ambiente.

El anticuerpo secundario que se empleó fue un monoclonal anti IgG de cabra marcado con fosfatasa alcalina (Sigma, St Louis, MO, USA) diluido 1/1000 en PBS-T-LD durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se reveló con el sustrato NBT/BCIP (Sigma).

5.2. Métodos de análisis de los complejos del suero

5.2.1. ELISA comercial

La determinación de Inmunocomplejos Circulantes (IC) se realizó mediante un ELISA comercial (SCIMEDX Corp, Denville, NJ). En los pocillos hay un monoclonal de captura anti C1q. El anticuerpo primario empleado es un monoclonal anti IgG marcado con peroxidasa. La curva patrón que emplea este sistema comercial son concentraciones conocidas de IgG agregada por calor. La concentración de ICC se mide como equivalentes de IgG humana agregada en μ g/ml. Los resultados positivos vienen indicados por la presencia de niveles iguales o superiores a 35 μ g/ml.

Se realizaron determinaciones en los sueros de las dos familias y varias determinaciones a lo largo del tiempo, en el suero de la propositus de la Familia 1.

5.2.2. Inmunoadsorción y Western Blot

El análisis, se abordó a partir del material retenido en las placas de ELISA comerciales para la detección de IC.

Se analizó el suero de la paciente III1, que tenía niveles altos de IC, en el período inicial en el que la paciente no estaba bajo ningún tratamiento.

Una alícuota de 1ml de suero humano normal y de la paciente se biotinilaron durante 2 horas a temperatura ambiente (Schuh *et al.*, 1992).

Se incubaron 50 µl de las muestras biotiniladas en los pocillos de las placas comerciales de ELISA para IC, durante 1 hora a 37 °C. Se lavaron los pocillos con solución de lavado y se añadió 150 µl de tampón de muestra 2x (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS, 0,02% de azul de bromofenol) a 37 °C, con el fin de eluir las proteínas pegadas.

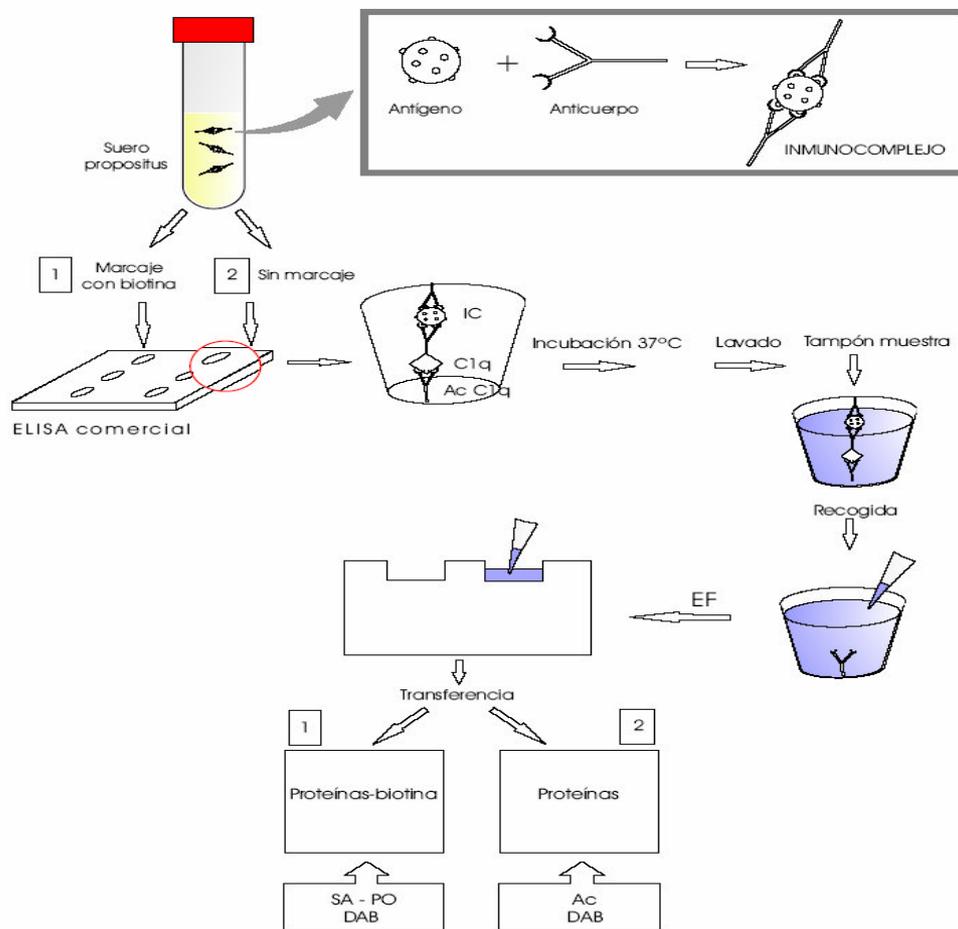


Figura 9. Esquema de la técnica de inmunoadsorción y western blot realizada con un suero control normal y con el suero de la propositus de la Familia 1. IC, inmunocomplejo; Ac, anticuerpo; Ac C1q, Anticuerpo anti C1q; EF, Electroforesis; SA-PO, estreptavidina–peroxidasa; DAB, sustrato Diaminobencidina.

El eluido se centrifugó y se cargó 20 µl en gel SDS-PAGE al 5%. Después se realizó la transferencia de las proteínas, a una membrana de nitrocelulosa 0.45 µm (Bio-Rad Headquarters Hercules,CA). La membrana se incubó con Estreptavidina-Peroxidasa (Sigma) durante 45 minutos en agitación a temperatura ambiente y finalmente se revelaron con el sustrato DAB (Sigma) (Figura 9)

Se realizó la misma operación de incubar el suero humano normal y el de la propositus en los pocillos de ELISA, pero sin biotinar (Figura 9). Se recogió lo retenido en el pocillo, con tampón de muestra, y se analizó mediante geles de SDS-PAGE al 5% y posterior transferencia a membrana Immobilon 0.45 µm (Millipore Bedford, MA, EEUU). Después se bloquearon las inespecificidades con Tris -5% LD durante 1 hora. Posteriormente las membranas se incubaron con anticuerpos específicos (Tabla 4) y se utilizó como sustrato el DAB (Sigma)

Tabla 4 Anticuerpos empleados en el western de sueros no biotinilados

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario y amplificador de la señal
Policlonal de conejo anti FH humano (rb 34 preparado por la Dra. Sánchez-Corral Unidad de Investigación H.U. La Paz) diluido 1/1000 en Tris-Tween 0,1%-2,5% LD.	Policlonal de cabra anti Igs de conejo marcado con biotina (Dako, Glostrup, Denmark) diluido 1/1000 en Tris-Tween 0,1%-2,5% LD y complejo avidina-peroxidasa biotinilada (Immunopure ^R Ultra Sensitive ABC Staining Kit, Pierce, Rockford,IL, EEUU).
Policlonal de conejo anti C3 humano (Dra. Sánchez-Corral) diluido 1/1000 en Tris-Tween 0,1%-2,5% LD.	Policlonal de cabra anti Igs de conejo marcado con biotina (Dako, Glostrup, Denmark) diluido 1/1000 en Tris-Tween 0,1%-2,5% LD y complejo avidina-peroxidasa biotinilada (Immunopure ^R Ultra Sensitive ABC Staining Kit, Pierce, Rockford,IL, EEUU).
Policlonal de cabra anti IgG humana marcado con peroxidasa (Nordic immunology, Tilburg, The Netherlands) diluido 1/1000 en Tris-Tween 0,1% - 2,5% LD.	_____

5.2.3. Western Blot y ELISA en la detección de los complejos C3b-Factor H

Las proteínas de los sueros de las dos familias (1µl) de suero se separaron mediante electroforesis, en SDS-PAGE al 5% y posterior transferencia a membrana. Después se bloqueó la membrana con Tris-Tween 0,1%-5% LD. El anticuerpo primario empleado fue la fracción IgG de conejo anti FH rb 34 diluido 1/750 en Tris-T 0,1%-2,5% LD que se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se incubó el anticuerpo secundario, un policlonal de cabra anti Igs de conejo marcado con biotina (Dako) diluido 1/1000 en Tris-T 0,1%-2,5% LD durante 50 minutos a temperatura ambiente. Por último, la membrana se incubó con el complejo avidina-peroxidasa biotinilada (Pierce) y el sustrato que se utilizó fue el DAB.

En el ELISA, para la detección de los complejos C3b-Factor H, se empleó como anticuerpo de captura un monoclonal anti C3 (SIM 27/A49, preparado por el Dr. Torano, Instituto de Salud Carlos III) 100 ng/pocillo.

El bloqueo de los pocillos se realizó con PBS-BSA 1% a 37° C durante 1 hora. Después se incubó el anticuerpo primario que fue una fracción IgG de conejo anti FH rb34 diluido 1/4000 en PBS-BSA 0,1%. Posteriormente el anticuerpo secundario empleado fue un policlonal de cabra anti Igs de conejo marcado con peroxidasa (Biosource) diluido 1/1000 en PBS-BSA 0,1%

En la curva patrón se empleó como anticuerpo de captura un monoclonal anti FH (Quidel) 150 ng/pocillo. En estos pocillos se incubó un suero normal cuyos niveles de Factor H eran conocidos. Los valores de los complejos C3b-Factor H se dan en equivalentes de FH (µg/ml)

El sustrato empleado fue una disolución de ABTS y 0,01% de H₂O₂.

6. ESTUDIO GENÉTICO DEL FACTOR I

6.1. Numeración y nomenclatura de mutaciones

La numeración de nucleótidos del ARNm según la secuencia publicada por (Catterall *et al.*, 1987) Gene Bank número de acceso Y00318, considera la primera base del exón 1 como la base número 1. En ese mismo año otro autor describe otra secuencia

de ARNm (Goldberger *et al.*, 1987) Gene Bank número de acceso J02770 que enumera la primera base, 15 bases más abajo que la secuencia anterior.

En esta tesis se va a utilizar la secuencia descrita por Catterall *et al.* 1987 en el que la primera base del exón es la base 1.

Más tarde se describieron unas secuencias de ADN genómico que corresponden a regiones 5' del gen, pero la secuencia completa no está descrita.

La secuencia en ADN genómico (Vyse *et al.*, 1994a) Gene Bank X78594 describen 430 pb más arriba del comienzo del exón 1 y la secuencia Gene Bank AF005095 (Minta *et al.*, 1998) corresponde a 1374 pb *aguas arriba* del exón 1.

La numeración de la secuencia de aminoácidos descrita, considera que el aminoácido número 1 es el primer aminoácido después del péptido señal (18 aa) (Catterall *et al.*, 1987;Goldberger *et al.*, 1987). Para la nomenclatura de las mutaciones, en esta tesis, se han seguido las recomendaciones de la Human Genome Variation Society en el que consideran el primer nucleótido el correspondiente a la Adenina del ATG de iniciación (Antonarakis and Nomenclature Working Group, 1998;den Dunnen and Antonarakis, 2000).

6.2. Extracción de ADN

A partir de 3ml de sangre con EDTA se obtuvo el ADN de las células blancas mediante el sistema comercial Puregene (Gentra Systems, Mineapolis, MN, EEUU).

6.3. Preparación de fibroblastos y extracción de ARN.

A los dos propositus y a los padres de las dos familias se les practicó una biopsia de piel, de 0,6 mm de diámetro en la cara interna del antebrazo, bajo consentimiento informado.

Se recogió la muestra de piel, en un tubo con 7 ml de medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Pasley, Gran Bretaña) con glutamina, 500 UI/ml de penicilina y 500µg/ml de estreptomina.

Las muestras se disgregaron en fragmentos más pequeños y se cultivaron con medio RPMI, glutamina, 20% de Suero de Ternera Fetal, 50 UI/ml de penicilina y 50µg/ml de estreptomina en placa de petri, p-20mm, a 37 °C y 5% de CO₂.

Los fibroblastos migran desde el fragmento original a la placa en 3-4 semanas y se adhieren al plástico. Se identifican por su morfología característica alargada y

fusiforme. Una vez que la placa está confluyente se realiza un pase a un frasco de cultivo T-25. Finalmente cuando el frasco está confluyente se realiza la extracción de ARN total. El reactivo comercial empleado fue Ultraspec RNA Isolation System (Biotecx Laboratorios, Houston, TX, EEUU).

Se determinó la concentración y pureza de los ARN extraídos mediante la medida de absorbancia a 260 y 280 nm.

6.4. Generación y amplificación del ADNc de Factor I y secuenciación de los fragmentos obtenidos.

Se diseñó una estrategia para la generación y amplificación del ADNc de FI mediante RT-PCR y posterior reamplificación mediante PCR anidada, que también fue empleada para la amplificación del ADNc de Factor H (Ault *et al.*, 1997)

Teniendo en cuenta las secuencias descritas (Catterall *et al.*, 1987;Minta *et al.*, 1998) se diseñaron unos cebadores RT1 y RT2 (TIB MOL BIOL, Berlín) que permitieran amplificar el ADNc de 1965 pb. (Figura 10) La secuencia de los cebadores se muestra en la Tabla 5.

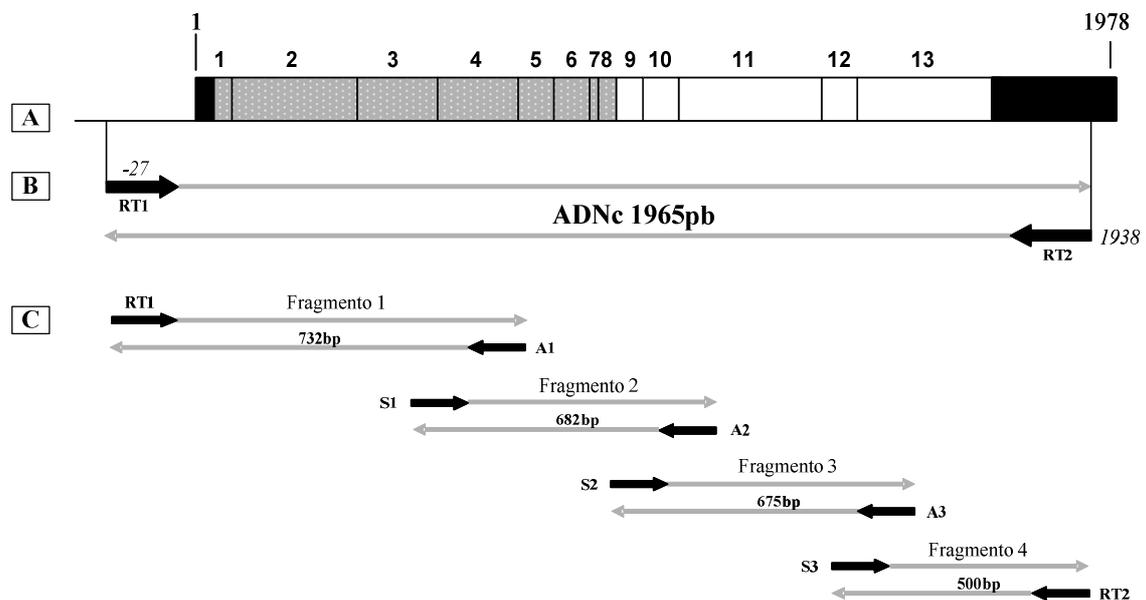


Figura 10 Estrategia realizada para la amplificación del ADNc de Factor I. A, se muestra el ARN mensajero de FI en el que las regiones no traducidas se representan en negro, en gris los exones que codifican para la cadena pesada, y en blanco los exones que codifican para la cadena ligera. Se considera la primera base del exón 1 como la base 1 (Catterall *et al.*, 1987); B, Generación del ADNc mediante RT-PCR; C, PCR anidada del ADNc en 4 fragmentos solapantes.

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50µl que contiene: 2µg de ARN total de fibroblastos, Tampón de reacción (0.2 mM dNTPs, 1,2 mM de MgSO₄), 0.05µM de cada uno de los cebadores RT1 y RT2, inhibidor de ARNasas (RNAsync, Ambion, Austin Texas USA), 2U de Taq polimerasa (Superscript One-Step RT-PCR System, Life Technologies, Inc Gaithersburg, MD USA).

Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9700 (Applied Biosystems). Primero se realizaron unos pasos previos a la reacción de RT-PCR, que consistieron en un calentamiento inicial a 70°C durante 10 minutos de todos los componentes, menos la enzima y el tampón, después a 4°C y se añade el tampón de reacción, y acto seguido se calienta a 48°C durante 2 minutos. Por último se pasa a 4°C y se añade la enzima. La reacción de RT-PCR comienza con un calentamiento a 25° C 10 minutos, síntesis del ADNc a 48° C durante 60 minutos y extensión a 25° C 10 minutos. Una vez terminada la síntesis del ADNc, la mezcla fue sometida 35 ciclos para la amplificación del ADNc naciente. Estos ciclos consistían en una desnaturalización a 94° C 1 minuto, alineamiento a 53° C 1 minuto y extensión a 68° C 2 minutos. La extensión final fue a 68° C durante 7 minutos.

Además del ARN de los pacientes, se extrajo ARN de fibroblastos control en las mismas condiciones y como control interno de reacción se emplearon los cebadores del gen constitutivo GADPH 12.5 uM, 30 ng de ARN control y 1U de Inhibidor de ARNasa. (Ambion).

El ADNc amplificado de 1965 pb fue utilizado como material de partida para la reamplificación en cuatro fragmentos solapantes mediante PCR anidada (Figura 10 y Tabla 5)

La reacción de la PCR anidada se realizó en un volumen final de 50 µl con: 2 µl del material amplificado en la RT-PCR, tampón de la Taq polimerasa (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis IN, USA), 10 mM dNTPs ,0.25 µ M de cada cebador y 1.25 U de Taq polimerasa. La reacción se llevó a cabo en 35 ciclos, previa desnaturalización inicial a 95 °C 2 minutos. Posteriormente 94° C 30 segundos, 54 °C 15 segundos, 72 °C 1 minuto. La extensión final se realizó a 72 °C durante 10 minutos.

Tabla 5. Cebadores empleados en la RT-PCR y PCR anidada

Fragmento	Cebadores directos 5'-3'	Cebadores inversos 5'-3'	Tamaño (pb)
ADNc total	RT1 - 27 ATACCTGGAGTGGAAAAGAGTTCTCAGCAG	RT2 ATTCCAATATGGCATAAACTCTGTGGAGACC-1938	1965
1	RT1 - 27 ATACCTGGAGTGGAAAAGAGTTCTCAGCAG	A1 AGTCATCCATTGGAGAATCTGCTTTCTGTG- 705	732
2	S1 501 GGGTTTCAACAAGGTGCTGATACTC	A2 TGGCTCTGAGACAATGTGCAGCAG-1182	682
3	S2 956-- TGACATGGATGCAGAAAAGAAGACGG	A3 ATCCATACAGACTAAGGGGCCTCC-1628	673
4	S3 1439-TGGCTGGGGACGAGAAAAAGATAACGAAAG	RT2 ATTCCAATATGGCATAAACTCTGTGGAGACC-1938	500
2	S1N * 539-GTTGTCTGATCTCTATAAATTCC	A2N* CCTTAAATATAACCACCGACAACC-1152	

Los cebadores S1N y A2N * son cebadores internos a S1 y A2 y sólo se emplearon para secuenciar.

Los cuatro fragmentos obtenidos mediante PCR anidada se separaron en un gel de agarosa, de bajo punto de fusión Nusieve (FMC BioProducts, Rockland, ME, EEUU) al 2% con tampón TAE 1X.

Después, los fragmentos se purificaron con el sistema de extracción de fragmentos de ADN a partir de geles, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Se comprobó la correcta purificación, en un gel de agarosa al 1% (Pronadisa, Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid), y se estimó la cantidad obtenida.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl que contenía: 4µl del reactivo de secuenciación (ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que contiene los dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente y la polimerasa, 5 pmoles del cebador directo o inverso, 30-90 ng de cada uno de los fragmentos purificados y 0,5µl de DMSO. Los cebadores empleados en la secuenciación de los cuatro fragmentos, fueron los mismos que se utilizaron en la amplificación. Para el fragmento 2, además se utilizaron otra pareja de cebadores más internos que se muestran en la Tabla 5.

La mezcla de reacción se somete a una desnaturalización inicial a 94° C 3 minutos, y después 25 ciclos de desnaturalización a 96° C 10 segundos, alineamiento a 50° C 5 segundos y extensión a 60° C 4 minutos.

Posteriormente, los productos de la reacción de secuenciación se precipitan en frío en una mezcla de etanol al 60% y AcNa 70 mM pH 5,2. El precipitado se recoge centrifugando 20 minutos a 14000 r.p.m. a 4°C. Se lava con etanol al 70% frío. Se retira el sobrenadante y se deja secar 5 minutos en una estufa a 37° C. El precipitado seco se resuspende y se analiza en un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

6.5. Amplificación y secuenciación de los exones y regiones intrónicas del Factor I a partir de ADN genómico

La secuencia completa del gen de Factor I no está descrita. Para realizar el estudio en ADN genómico, se realizó una búsqueda mediante el programa BLAST de alineamiento www.ncbi.nlm.nih.gov que alinea la secuencia de ADNc de Factor I con todo el genoma y permite encontrar el clon que contiene esa secuencia.

Se encontraron dos clones que contienen la secuencia completa e incompleta respectivamente del gen, clon RP11-602N24 versión AC126283.3 gi:22091403 y clon 2087A2 versión AP002020 gi:9795241 y se diseñaron unos cebadores que hibridaran en las regiones intrónicas adyacentes a los exones.(Tabla 6)

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl en el que se incluyeron: 250 ng de ADN genómico, tampón de la Taq polimerasa (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 10 mM dNTPs , 25 picomoles de cada cebador y 1.25 U de Taq polimerasa (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis IN, USA)

La mezcla de reacción se somete a una desnaturalización inicial de 95° C 2 minutos y después 35 ciclos de desnaturalización 94° C 30 segundos, temperatura alineamiento según el cebador (Tabla 6) durante 15 segundos y extensión a 72 ° C durante 1 minuto. La extensión final fue a 72° C 10 minutos. Los fragmentos amplificados de los exones 3, 4, 5/6, 9/10, 11 y 13 se separaron en gel de agarosa de bajo punto de fusión, al 2% y se purificaron mediante el sistema de purificación en gel (Quiagen) comentado anteriormente en el apartado 6.4, y el resto de los exones se purificaron mediante el sistema comercial QIAquick PCR purification (Quiagen, Hilden, Alemania).

Tabla 6. Cebadores empleados en la PCR de ADN genómico

EXONES	MÓDULO	CEBADOR DIRECTO 5'-3'	CEBADOR INDIRECTO 5'-3'	TAMAÑO (pb)	Tª ALINEAMIENTO	GEL 2%
1	Péptido señal	1S 48166 -TCTTCCCTGGAATACAGAATTGA	1A TCAATTA AAAATTGTTTGCATAAAAGG- 48568	403	56	NO
2	FIMAC	2S 83486 - CTTGAAGCCACCAGACAACA	2A GGCAACCCCTGATTTGTTA- 84059	574	54	NO
3	CD5	3S 85527 - CCTCATAGGGTTGATGTGAGG	3A2 GAAAGGTTAGGTAATCAAAAAGC- 85983	457	56	SI
4	CD5	4S 88624 -CTTGCCCAAGCTGTA ACTCC	4A GCAATGTCTGAATGGCAAAA- 89121	498	54	SI
5/6	LDLr1/ LDLr2	5/6S 89757 -TCATGCCACCACTCCATAAA	5/6A AGTTCTGCAAATGCCCACTC- 90313	557	54	SI
7	Linker	7S 92488 -GCTAGACATCCTACAATTCAAGG	7A GAAAAGGCCTGTACGCCTAAAC- 92838	351	60	NO
8	Linker	8S 97794 -CATGCCTGGGGATTTTGT A	8A TCCAGTTTAAAAGCAATTCTCAA- 98183	390	50	NO
9/10	Serina proteasa	9/10S 100789 -AAAAAGGCTAATGGGTTCAAGA	9A TCACTTTCATTGTTTCGGGA- 101277	489	56	SI
11	Serina proteasa	11S 103830 -TTCTGGGGAAATGAAAAAGG	11A GCCATGGCTGGATGTTTACT- 104359	530	50	SI
12	Serina proteasa	12S 107768 -TCCCAATGGTTTAAGTTATGAGA	12A CTGATGTGGTGGGAGGAGAT- 108031	264	52	NO
13	Serina proteasa	13S 109278 -GCAGCCTGAAAAATGGAAG	13A AAA ACTTGTATGCTTCACCAAAA- 109758	481	56	SI

La posición de los cebadores es según la secuencia del clon RP11602N en sentido directo.

Después se comprobó la correcta purificación de los productos amplificados, se estimó la cantidad obtenida y se secuenciaron los productos de PCR según se ha comentado en el apartado 6.4

6.6. Análisis mediante un programa informático de la estructura del módulo LDLr1 del Factor I

El análisis visual de la estructura del módulo LDLr 1 normal y mutado se realizó mediante un programa Swiss PDB viewer/DeepView <http://ca.expasy.org/spdbv/>.

El archivo que contiene la estructura a analizar se puede encontrar en la página del banco de datos de proteínas PDB o a través del código identificador del archivo. La estructura del módulo LDLr 1 se encuentra en la página www.fh-hus.org y es un modelado del módulo.

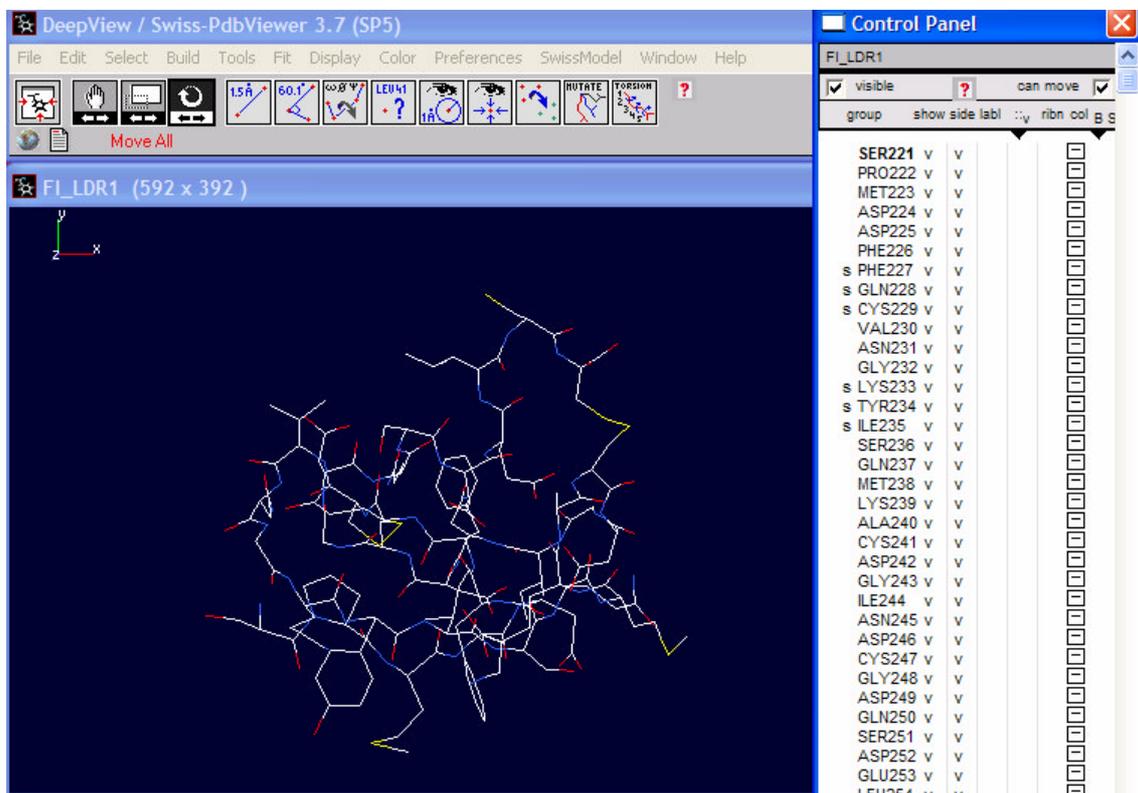


Figura 11. Pantalla del programa Swiss PDB viewer en el que se muestra la estructura del módulo LDLr1 por defecto. A la derecha se muestra la ventana Panel control que contiene todos los residuos del módulo. Desde esta ventana se pueden seleccionar los aminoácidos y se pueden generar diferentes representaciones del módulo.

Una vez que se ha ejecutado el programa, se abre el archivo con las coordenadas de la estructura. Se representa la estructura de la proteína por defecto, que es con líneas. En la barra principal de herramientas se selecciona la opción Panel de control que

permite disponer de toda la información de los residuos (Figura 11) Junto a la lista de los aminoácidos se sitúan seis columnas que se pueden activar o desactivar. De esta forma se puede cambiar la imagen utilizando diferentes representaciones y colores.

La sustitución de un aminoácido por el de la mutación se realiza con el icono mutar debajo de la barra de herramientas. Se selecciona el residuo a mutar en la pantalla principal y se especifica el aminoácido mutante.

Este programa tiene varias opciones que permiten no sólo mostrar la proteína en distintas representaciones, sino analizar varias estructuras al mismo tiempo, cambiar aminoácidos (mutar) y calcular distancias de enlace. Además tiene una conexión directa con el servidor de modelado por homología Swiss Model con el que se generan y analizan modelos de proteínas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN SUERO.

7.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS NIVELES DE COMPLEMENTO ANALIZADOS EN LAS DOS FAMILIAS ESTUDIADAS.

El análisis de la actividad hemolítica de la vía clásica, CH50, en los sueros (Tabla 7) pone de manifiesto la alteración en la activación de la vía clásica en los enfermos de las dos familias, la cual es indetectable, en la propositus e hija II3 de la familia 1. Sin embargo los niveles de C4 y C1q, componentes de la vía clásica, son normales lo que indica que la disminución de la actividad en la vía clásica se deba a una alteración en la activación de la vía alternativa.

Tabla 7. Actividad de la vía clásica en la familia 1 y 2

		CH50 U/ml (200-400)	C1q µg/ml (100-300)	C4 mg/dl (14-47)
Familia 1	I1	476	152	18
	I2	333	176	20
	II1	0	140	14
	II2	303	116	14
	II3	0	116	20
Familia 2	I1	384	184	21
	I2	>400	190	21
	II1	400	138	15
	II2	140	120	24
	II3	344	164	13
	II4	136	110	21
	II5	142	130	20

CH50 es la capacidad hemolítica del complemento por la vía clásica. Los valores que aparecen sombreados en gris indican valores disminuidos o nulos.

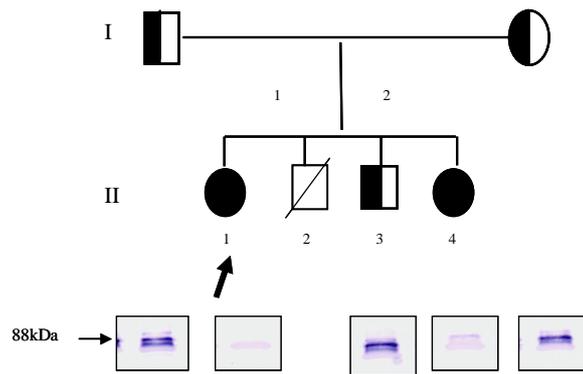
La actividad hemolítica de la vía alternativa, AP50, es nula en los enfermos de las dos familias (Tabla 8) y confirma el defecto en la vía alternativa. Los componentes de esta vía están disminuidos, C3, Factor H, Properdina, Factor B, y el Factor I no se detecta. Estos déficits de los componentes de la vía alternativa, se observan en la deficiencias de factor I, debido a la ausencia de este factor regulador, y la actividad CH50 está disminuida, a consecuencia de la disminución de C3 (Kirschfink and Binder, 1998)

Tabla 8. Actividad de la vía alternativa y de la vía terminal en las familias 1 y 2.

		AP 50 % SHN	C3 mg/dl (77-201)	FI % SHN	FB mg/dl (17-60)	FH µg/ml (200-600)	Properdina % SHN	C5 µg/ml (43-115)	C7 %SHN	C8 %SHN
Familia 1	I1	69	97	62	45	316	100	67.5	100	83
	I2	44	101	46	30	134	95	120	69	77
	II1	0	24	Nd	Nd	52	31	27.5	60	56
	II3	68	67	52	20	373	59	79	100	67
	II4	0	22	3	Nd	65	39	35	60	24
Familia 2	I1	100	108	87	40	300	86	176	•	•
	I2	83	87	62	18	420	100	177	•	•
	II1	100	103	59	37	400	86	156	•	•
	II2	0	17	Nd	Nd	100	44	55	58	100
	II3	88	101	31	49	600	94	166	•	•
	II4	0	25	Nd	Nd	80	52	88	22	96
	II5	0	17	Nd	Nd	60	36	59	48	96

AP50 es la capacidad hemolítica por la vía alternativa; Nd, No detectable; •, Determinación no realizada; Los valores normales de Factor I, H, Properdina, C7 y C8 se determinaron en relación a un conjunto de 30 sueros humanos normales. Los valores que aparecen sombreados en gris indican valores disminuidos.

Los niveles de Factor I, no se detectan en plasma, en ninguno de los enfermos. En la paciente II4 de la Familia 1, se encontraron trazas de Factor I (Figura 12) y en el momento del diagnóstico no presentaba ninguna patología. Ciertos autores, describieron un caso con niveles similares de Factor I, 2,6% de proteína circulante. Esta paciente a partir de los 4 años comenzaba a presentar infecciones pulmonares y sinusitis recurrente. La clínica respiratoria que presentaba pudiera estar favorecida por la deficiencia de Ig A que además tenía asociada (Tottori *et al.*, 1992).



FAMILIA 1



FAMILIA 2

Figura 12 Detección del Factor I en los sueros de la Familia 1 y 2 mediante Western Blot. En los árboles genealógicos los cuadrados y círculos con la mitad de sombreado indican niveles disminuidos de Factor I y los cuadrados y círculos sombreados totalmente indica proteína no detectable en el suero.

La edad media de aparición de la primera infección piógena en la deficiencia de Factor I es de 17 meses, en la deficiencia de Factor H es de 14 meses y en la deficiencia de C3 es de 8 meses (Vyse *et al.*, 1994b).

La frecuencia de infección, en los casos de deficiencia de Factor I, disminuye con la edad. Una posible explicación de este fenómeno es que la memoria inmunológica del sistema inmune adaptativo se amplía con la edad, por lo que el papel del sistema inmune innato llega a ser menos importante.

La expresión de la enfermedad en la deficiencia de Factor I es muy variable, hay pacientes que comienzan con clínica desde la infancia y continúan hasta la edad adulta y hay casos que se manifiestan en la edad adulta o están asintomáticos.

No se conocen los mecanismos implicados en la variabilidad de expresión de la enfermedad, pero creemos que no se pueden atribuir a variaciones en los niveles de complemento, sino a otros factores genéticos y ambientales.

Al igual que en la deficiencia de FI en la deficiencia de FH, hay una amplificación incontrolada en la fragmentación de C3, lo que conlleva un consumo y disminución de los niveles de C3 en suero. La deficiencia total de estas proteínas reguladoras da lugar a unas características clínicas de enfermedad similares a la deficiencia total de C3 con infecciones recurrentes piógenas, vasculitis, y en el caso de la deficiencia de FH se asocia a glomerulonefritis (Kirschfink and Binder, 1998).

La eficacia del complemento como opsonina se pone de manifiesto porque los individuos con deficiencia primaria o secundaria de C3 presentan infecciones recurrentes piógenas.

7.1.1. Deficiencias en C3 y susceptibilidad a infección

Los pacientes con deficiencia de C3 heredada, primaria o secundaria, exhiben un profundo defecto en múltiples funciones que contribuyen a su incrementada susceptibilidad a infección. Los defectos principales son un desequilibrio en la opsonofagocitosis, en la actividad bactericida del suero y en la respuesta inmune (Singer *et al.*, 1994).

Los productos derivados de C3b como resultado de la acción del Factor I, iC3b y C3dg, participan en las funciones fagocíticas e inmunorreguladoras respectivamente. iC3b puede unirse a CR3 (CD11b/CD18) que está involucrado en fagocitosis y C3dg y CR2 junto a otras proteínas de membrana del linfocito B intervienen en la transducción de la activación (Fearon, 1993; van Noesel *et al.*, 1993).

La contribución de estos defectos en la susceptibilidad a infección se ha confirmado en animales deficientes en C3 (Singer *et al.*, 1994) como en ratones *knockout* de C3 (Fischer *et al.*, 1996; Wessels *et al.*, 1995) los cuales demuestran alteraciones en las respuestas a Ag proteicos como no proteicos. Los niveles de IgM en la respuesta primaria están reducidos y en la respuesta secundaria el cambio de IgM a IgG no se genera.

7.1.2. Deficiencia de los componentes terminales

En estas deficiencias, el aumento en la incidencia de infecciones por *Neisseria* es debido presumiblemente a la disminución de la eficiencia de la vía lítica terminal. La deficiencia aislada de componentes terminales aumenta la susceptibilidad a infección por *Neisseria*, lo que da idea de la importancia del complejo de ataque de membrana en la eliminación de estos organismos (Ross and Densen, 1984)

De los 5 pacientes deficientes en Factor I, 4 han tenido infecciones con *Neisseria*.

La paciente que tuvo más clínica fue la propositus de la Familia 1, que tuvo 22 meningitis en dos años. Pero sólo se detectó el meningococo en tres LCR y en el resto de los LCR no se ha encontrado patógeno.

En los homocigotos de la familia 1, los componentes terminales, C5, C7 y C8 están disminuidos, en contraste con esto, los homocigotos de la Familia 2 sólo presentan valores disminuidos de C7. Esta disminución de los componentes terminales se debe a la regulación defectuosa de la convertasa de C3 que originaría un aumento en la formación de la convertasa de C5 y posterior consumo de componentes terminales en el suero.

La infección por *Neisseria meningitidis* se ha descrito con mayor frecuencia en la deficiencia de Factor I que en las deficiencias de Factor H y de C3 (Reis *et al.*, 2006; Vyse *et al.*, 1994b).

Existen una serie de variables que caracterizan a la enfermedad meningocócica en pacientes con disminución de los componentes en la vía terminal con respecto a los individuos sanos y estas son:

- **Riesgo de infección:** 5-10.000 veces mayor. La ausencia de actividad bactericida parece ser directamente responsable de esta susceptibilidad aunque es posible que el inóculo requerido para causar infección sea menor en los deficientes que en personas sanas. Una posible explicación al hecho de que no todos los individuos con déficit de terminales lleguen a infectarse con el meningococo, podría deberse a la presencia de un tipo de receptor en los neutrófilos que lleve a cabo una eficaz fagocitosis y muerte del meningococo, esto se ha encontrado en individuos con déficit de terminales y que no se han infectado (Fijen *et al.*, 1993; Fijen *et al.*, 1995).

- Infección con el mismo serogrupo en menos de un mes: La deficiencia de complemento puede contribuir a una supervivencia intracelular del meningococo.
- La deficiencia de complemento aporta una protección frente a consecuencias letales de la enfermedad: Algunas observaciones clínicas sugieren que la enfermedad meningocócica puede ser más leve en personas deficientes en complemento (Platonov and Belovorodov, 1991) aunque esto no está universalmente aceptado. Hay una íntima correlación entre la activación del complemento y la mortalidad en pacientes con enfermedad meningocócica y esto es en parte dependiente del ensamblaje del complejo de ataque de membrana (MAC). Pacientes con deficiencia en terminales al ser incapaces de ensamblar el MAC están expuestos a más bajos niveles de endotoxina para una carga microbiana dada. Está bien documentado el incremento de liberación de endotoxina de las bacterias Gram negativas seguida de la inserción del MAC in vitro, y hay una correlación directa entre la concentración de endotoxina circulante y el resultado en la enfermedad meningocócica (Brandtzaeg *et al.*, 1989a; Brandtzaeg *et al.*, 1989b).

7.1.3. Implicaciones hormonales en la patogenia de la enfermedad en la paciente III de la Familia 1.

La causa de la periodicidad de las meningitis que padeció esta paciente es desconocida.

El tratamiento con Triptorelina (anti estrógeno) que interrumpió las menstruaciones durante tres meses no impidió la aparición de los cuadros de meningitis. Sin embargo, pensamos que algún factor desconocido o mecanismo relacionado con la regulación hormonal pudiera estar influyendo en la aparición de los episodios.

Algunos autores han mostrado que varios componentes del sistema de complemento se producen en el endometrio de manera dependiente de hormonas y podrían realizar un papel en la función normal reproductora (Hasty *et al.*, 1994). (Nowicki *et al.*, 2000) comentan que hay una mayor susceptibilidad a infección por *N. gonorrhoeae* durante el ciclo menstrual. Además sugieren que cambios cíclicos similares podrían estar involucrados en la patogénesis de otras enfermedades infecciosas en la mujer.

Se sabe que en el angioedema hereditario por deficiencia de C1 inhibidor, hay factores hormonales que pueden regular los episodios, la menstruación puede ser un desencadenante y el embarazo puede mejorar o empeorar el curso de la enfermedad. Además se utilizan andrógenos como el danazol para tratar los angioedemas (Agostoni and Cicardi, 1972; Frank *et al.*, 1976)

7.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS INMUNOCOMPLEJOS Y COMPLEJOS C3b-FACTOR H ESTUDIADOS

7.2.1. Descripción de los resultados obtenidos en el suero de la propositus de la Familia 1

El estudio de los inmunocomplejos presentes en el suero de la propositus mostró que los niveles han oscilado a lo largo de los tratamientos (Tabla 9) que recibió pero siempre se han observado unos niveles elevados. Sólo en dos ocasiones en las que recibió Gammaglobulina intravenosa se negativizaron.

También se han detectado inmunocomplejos en el suero de la hermana de la propositus, pero no se han observado en los deficientes de FI de la Familia 2.

Aunque los cuadros de meningitis se resolvieron favorablemente y en la actualidad no presenta ninguna patología, los niveles de IC en la propositus siguen elevados.

En la bibliografía hay un caso descrito con sintomatología parecida a la propositus. Se trata de una mujer con deficiencia en Factor I, que padeció recurrentes Meningitis asépticas benignas o Meningitis de Mollaret, en el que la causa de los episodios no se conoce y también presentaba IC (Bonnin *et al.*, 1993).

Tabla 9. Determinaciones de los niveles de inmunocomplejos (IC) e IgG en el suero de la propositus de la Familia 1 desde el año 2000-2004

FECHA	07/01/2000	01/02/2000	10/02/2000	17/02/2000	21/02/2000	25/02/2000	29/02/2000	03/03/2000	08/03/2000	10/03/2000	03/04/2000	11/04/2000	05/05/2000	09/05/2000	13/05/2000	17/05/2000	20/05/2000	24/05/2000	26/05/2000	02/06/2000	05/06/2000	08/06/2000	12/06/2000	16/06/2000	20/06/2000	23/06/2000	26/06/2000
Nº MUESTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		26
IC (µg/ml)	138	*	90	116	155	135	126	126	100	120	*	159	125	144	153	149	134	98	140	108	80	100	127	123	*	*	73
IgG (mg/dl)	1190	*	*	1160	1050	1130	1040	965	928	952	*	1130	1120	1370	1410	1240	973	*	*	1410	1380	1300	1400	1450	1240	*	1300
INFORMACIÓN ADICIONAL	M		M						M		T	M	1ºIP				2ºIP		3ºIP			4ºIP		M	5ºIP	CO	
FECHA	30/06/2000	03/07/2000	07/07/2000	10/07/2000	11/07/2000	21/07/2000	24/07/2000	31/07/2000	04/08/2000	07/08/2000	11/08/2000	14/08/2000	18/08/2000	21/08/2000	23/08/2000	25/08/2000	28/08/2000	04/09/2000	06/09/2000	08/09/2000	11/09/2000	13/09/2000	14/09/2000	18/09/2000	22/09/2000	25/09/2000	29/09/2000
Nº MUESTRA	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39		40	41	42	43	44	45		46	47	48	49	50	
IC (µg/ml)	77	84	107	98	*	140	135	114	102	100	95	82	59	48	*	63	78	71	59	57	65	*	64	63	90	83	68
IgG (mg/dl)	1220	1210	1130	1070	*	989	896	965	873	779	882	753	820	828	*	789	819	924	*	864	833	*	735	857	885	937	872
INFORMACIÓN ADICIONAL					M				M		R				MI							M					
FECHA	01/10/2000	12/10/2000	18/10/2000	23/10/2000	27/10/2000	03/11/2000	09/11/2000	16/11/2000	21/11/2000	23/11/2000	29/11/2000	26/12/2000	17/01/2001	29/01/2001	09/02/2001	19/02/2001	21/02/2001	05/03/2001	16/03/2001	28/03/2001	10/04/2001	23/04/2001	04/05/2001	16/05/2001	28/05/2001	04/06/2001	
Nº MUESTRA				51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72		
IC (µg/ml)	*	*	*	83	95	70	62	59	50	43	31	47	73	67	40	0	39	0	46	54	95	102	108	95	90	*	
IgG (mg/dl)	*	*	*	3750	3140	3060	3860	*	5020	4050	3410	2530	2880	2530	2230	2710	2590	2460	2770	2300	2600	2010	2710	2300	2920	*	
INFORMACIÓN ADICIONAL	M	G	M	G	G	G	G		RHS		M/G	M/G	G		G	G		G	G	G	G	M/G	G		G/C	M	
FECHA	08/06/2001	21/06/2001	29/06/2001	03/07/2001	16/07/2001	24/07/2001	14/08/2001	21/08/2001	30/08/2001	12/09/2001	24/10/2001	03/04/2002	30/10/2002	13/11/2002	12/12/2002	21/01/2003	24/02/2003	24/03/2003	24/04/2003	27/05/2003	01/07/2003	11/09/2003	17/10/2003	17/11/2003	17/12/2003	22/10/2004	
Nº MUESTRA	73	74	75	76	77		78		79			80		81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	
IC (µg/ml)	90		96	93	95		105	*	100	*	*	130	*	78	150	65	100	135	105	73	220	200	83	95	90	93	
IgG (mg/dl)	2710	2190	2880	2420	2110		1900	*	1460	*	*	1040	*	1150	1000	1010	1070	1000	949	938	928	929	1050	1390	910	726	
INFORMACIÓN ADICIONAL						M		M		M	ML		M														

* Determinación no realizada

M Meningitis M Meningitis meningocócica

MI: Meningitis leve

RHS: Riesgo de hiperviscosidad

Niveles normales:

IC: <35 µg/ml

IgG: 520-1740 mg/dl

TRATAMIENTOS

1º) T Triptorelina (antiestrógeno)

2º) IP Infusión plasma fresco

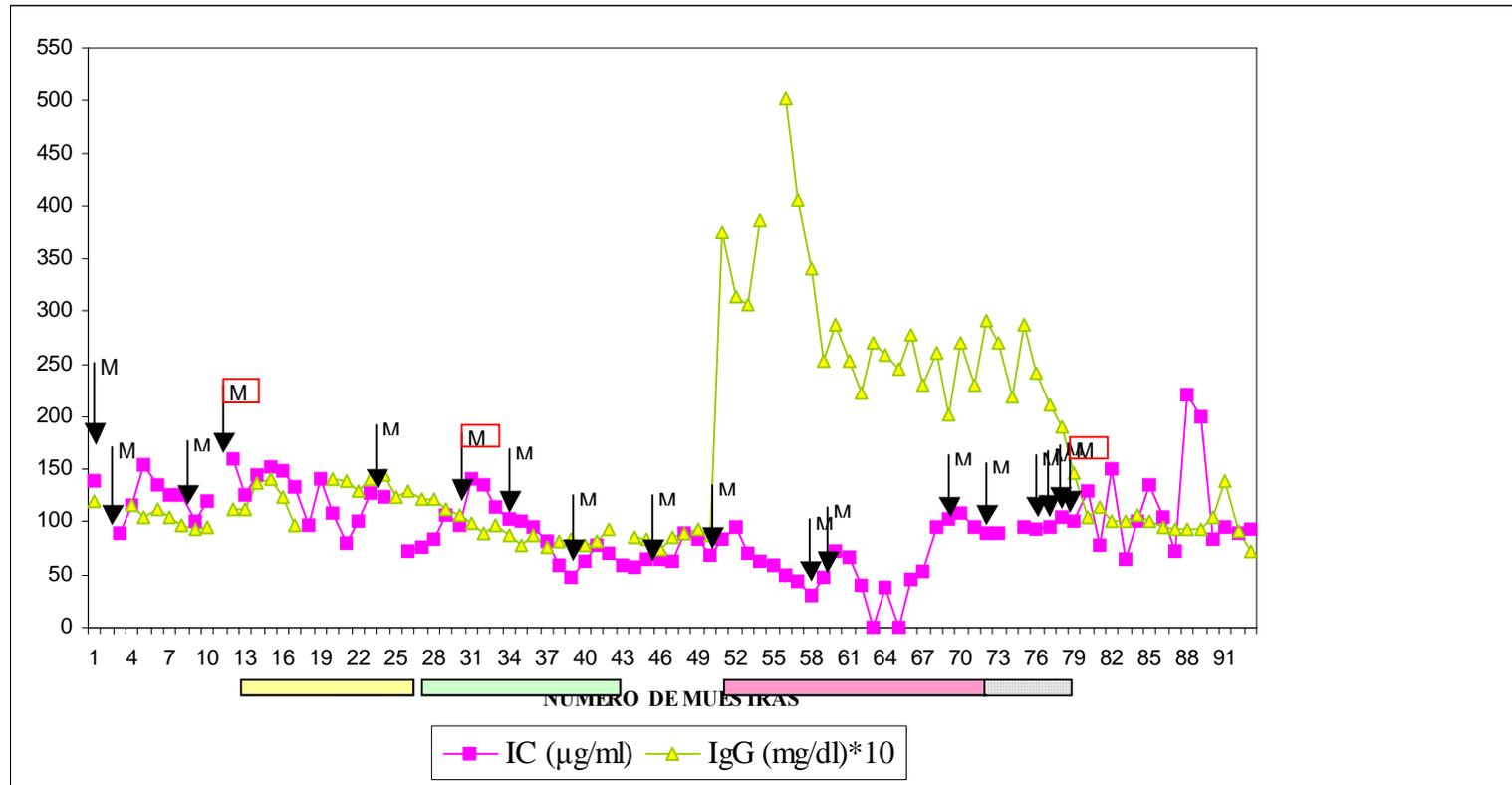
3º) CO Corticoides (antiinflamatorio)

4º) R Rifampicina (antibiótico)

5º) G Gamma globulina i.v. (preparado purificado del plasma)

6º) C Colchicina

Figura.12. Representación gráfica de las determinaciones de IC e IgG realizadas en el suero de la propositus de la Familia 1 desde el año 2000-2004.



M, meningitis; M, meningitis meningocócica; Las flechas indican los episodios de meningitis; período con infusión de plasma  período con corticoide  período con Gamma globulina intavenosa  período con colchicina 

7.2.2. **Análisis de los componentes de los ICC en el suero de la paciente y su implicación en la clínica**

Los IC que unen C1q e IgG no se detectan normalmente en el suero de los individuos sanos, pero a menudo se encuentran en el suero de pacientes con enfermedades autoinmunes como en la artritis reumatoide (AR) y lupus eritematoso sistémico (LES) (Nydegger *et al.*, 1974). Los inmunocomplejos son particularmente detectables en los pacientes de AR y LES cuando la enfermedad está activa.

Ningún procedimiento único parece detectar todos los tipos de IC, pero aquellos procedimientos que detentan IC con componentes del complemento activados, como C1q y C3d, parecen detectar los acontecimientos clínicamente relevantes.

La paciente presentaba unos IC que no disminuían los valores séricos de los componentes de la vía clásica como son C4 y C1q, y esto no es lo común en los pacientes con AR y LES que tienen IC.

La presencia de estos ICC y en niveles altos, en la paciente III con más patología, nos lleva a pensar que estén implicados en la patogenia de la enfermedad.

Los pacientes que tienen IC en la deficiencia en Factor I presentan clínica de poliarteritis, glomerulonefritis y enfermedad del suero (Rasmussen *et al.*, 1988; Sadallah *et al.*, 1999; Solal-Celigny *et al.*, 1982). En estos casos, los IC tampoco provocan activación de la vía clásica, pues los niveles de C1q y C4 son normales.

La presencia de inmunocomplejos en estos pacientes estaría justificada por la recurrencia de las infecciones que padecen, debido a su deficiencia de complemento. Además es conocida la incapacidad que presentan en la generación de iC3b, junto a niveles reducidos de CR1 (Jepsen *et al.*, 1989; Porteu *et al.*, 1986; Rasmussen *et al.*, 1989), favorecen la persistencia de los IC en el suero y se ve disminuida su eliminación.

Se trató de analizar los componentes de estos IC mediante la incubación del suero en las placas de ELISA que se empleaban para la detección de IC, y posterior elución de lo retenido con tampón que tiene SDS.

El material capturado en el pocillo, se analizó mediante western blot e incubación de la membrana con estreptavidina-peroxidasa y con anticuerpos. Se detectó la presencia de Ig G y C1q (Figura 13) y no se observó señal para C3 ni para Factor H (figura no mostrada).

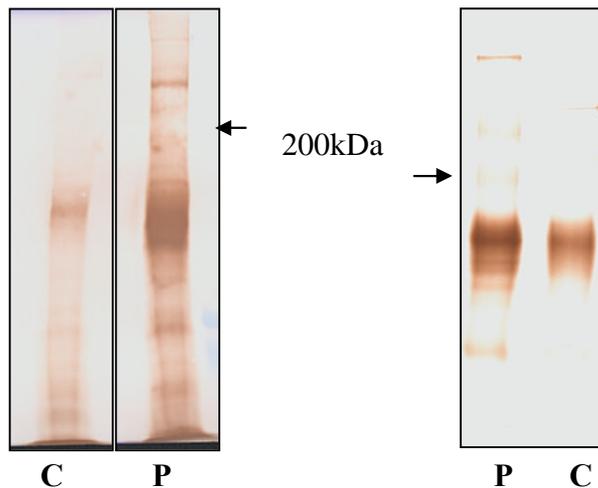


Figura 13. Análisis de los inmunocomplejos presentes en el suero de la propositus de la Familia 1. Izquierda. membrana con las proteínas biotiniladas capturadas **Derecha.** Membrana con las proteínas capturadas sin biotina, incubada con anti IgG peroxidasa; P, propositus de la Familia 1; C, suero humano normal.

7.2.3. Detección de los complejos C3b-Factor H sueros de las dos familias

La presencia de complejos C3b-Factor H, había sido descrita con anterioridad en el suero de los deficientes en Factor I (Naked *et al.*, 2000;Wahn *et al.*, 1981). La formación de estos complejos se debe a que el Factor H necesita del Factor I para liberarse de C3b. Esta unión podría actuar como un mecanismo por el cual se inactivarían los efectos del C3b en fase fluida que está en exceso.

Se diseñó un ELISA para la cuantificación de estos complejos C3-Factor H y se analizaron los sueros de las dos familias y 30 sueros control. Sólo se observaron los complejos en los homocigotos de las dos familias.

Mediante Western Blot y con policlonal anti Factor H rb34, se analizaron los sueros de los homocigotos. Se observaron complejos que tienen un tamaño mayor de 200 KDa que unen Factor H (Figura 14) y C3 (figura no mostrada).

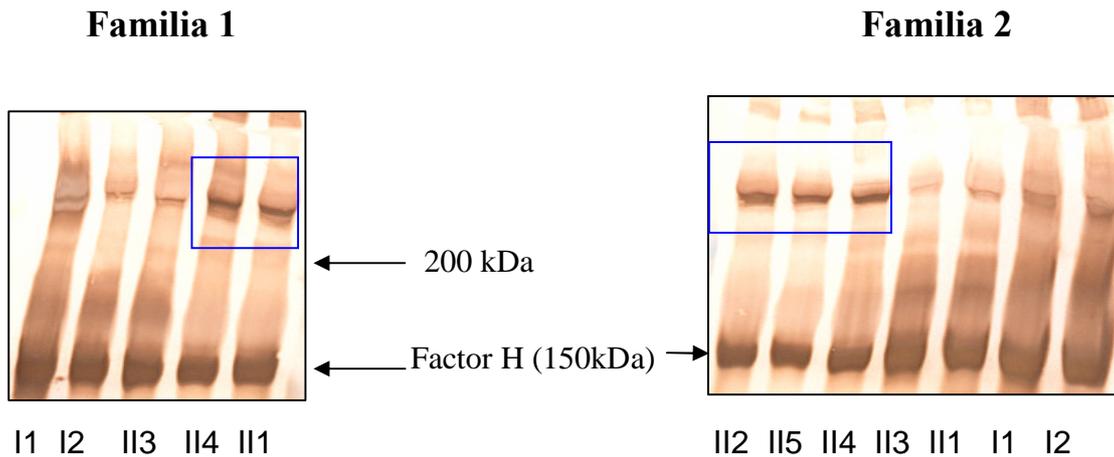


Figura 14. Análisis de complejos que unen Factor H en los sueros de la Familia 1 y 2. Los recuadros azules indican la posición de los complejos y corresponden a los sueros de los pacientes con deficiencia en FI.

En el caso de la paciente II1 se han cuantificado varios sueros a lo largo de los sucesivos tratamientos y se han observado oscilaciones en los niveles de los complejos C3b-Factor H.

La presencia de estos complejos también se han detectado en otros enfermos con hiperactivación de la vía alternativa solamente y cuyos niveles de Factor I en suero son normales, tres de ellos tienen un C3Nef que es un autoanticuerpo estabilizador de la convertasa de C3 otro paciente presenta una mutación en Factor B que le confiere una resistencia a la inactivación por los reguladores de la vía alternativa (Goicoechea de Jorge *et al.*, 2007).

7.2.4. Procesamiento y eliminación de los Inmunocomplejos por el Complemento.

La formación de los Inmunocomplejos (ICs) debido a la interacción de sustancias extrañas con anticuerpos específicos, es un proceso fisiológico que constituye una parte esencial de los mecanismos de defensa normales del hombre. Esta reacción está seguida generalmente de una o más reacciones secundarias, todas ellas hacen que el organismo neutralice y elimine microorganismos y moléculas no propias, que han penetrado las variadas barreras del cuerpo, después de la unión del anticuerpo, en forma de IC.

Hay una enorme variabilidad en la composición de los ICs, además del antígeno y anticuerpo puede haber C3 y C4 covalentemente unidos o C1q no covalentemente unido.

El complemento juega un papel crítico en varios estadios del procesamiento de los ICs. La incorporación de proteínas dentro de estos complejos modifica la estructura de la red. Covalentemente se incorporan productos de C3 y C4. Estos actúan como ligandos de receptores de las células que transportan los IC por el cuerpo y después de ligando de receptores de las células que capturan y eliminan los IC.

Los eritrocitos poseen el receptor CR1 para C3b/C4b al que se unen los complejos inmunes que han fijado complemento. A continuación, los eritrocitos transportan los complejos hasta el hígado, en donde se eliminan por los macrófagos hísticos. Los complejos pueden liberarse del eritrocito en la circulación, por la acción del Factor I. Estos complejos que contienen C3dg son eliminados por células fagocíticas portadoras de receptores para la Fc de la IgG o C3d (Schifferli *et al.*, 1986)

Los complejos inmunes pueden permanecer durante períodos prolongados en la circulación, y esto ocurre en dos situaciones:

1. Cuando el antígeno persiste porque no es eliminado efectivamente con la formación de inmunocomplejos, bien porque el antígeno sea un autoantígeno, bien porque haya una infección persistente donde la respuesta inmune no es efectiva en controlar la infección.
2. Cuando los mecanismos de aclaramiento fisiológicos están sobrepasados por la formación de grandes cantidades de inmunocomplejos o existen deficiencias en algunos de los componentes implicados en el aclaramiento, como ocurre en algunas deficiencias de complemento.

El tamaño de un complejo es importante para regular su eliminación; en general los complejos grandes se eliminan rápidamente por el hígado en unos pocos minutos, ya que presentan un entramado de regiones Fc de la IgG lo cual induce mayor avidéz en su unión a los receptores Fc de las células del sistema reticulo-endotelial y fijan mejor C1q, mientras que los de menor tamaño circulan durante periodos más prolongados. Los factores que intervienen en el tamaño de los complejos afectan probablemente a su eliminación. Se ha sugerido que un defecto genético que diera lugar a una mayor producción de anticuerpo de baja afinidad podría conducir a la formación de complejos

de menor tamaño y, por consiguiente, a la enfermedad de complejos inmune. Es probable que muchos de estos efectos relacionados con el tamaño del complejo se asocien a la capacidad de éste de fijar complemento (Schifferli and Taylor, 1989).

La mera presencia de IC no suele ser perjudicial por sí misma, los problemas comienzan, en cambio, cuando se depositan en los tejidos.

7.2.5. Papel patogénico de los inmunocomplejos en las deficiencias de C3 primaria y secundarias (Deficiencias de Factor H y Factor I) y patología renal

El principal desencadenante para el depósito de los ICs en los tejidos es, probablemente un **aumento de la permeabilidad vascular**. Este aumento puede iniciarse por una gama de mecanismos cuya importancia varía en las diversas enfermedades y en las distintas especies.

El complemento, a través de la generación de anafilotoxinas, los mastocitos, los basófilos y las plaquetas deben considerarse contribuyentes potenciales de la liberación de aminas vasoactivas, como la histamina y la serotonina.

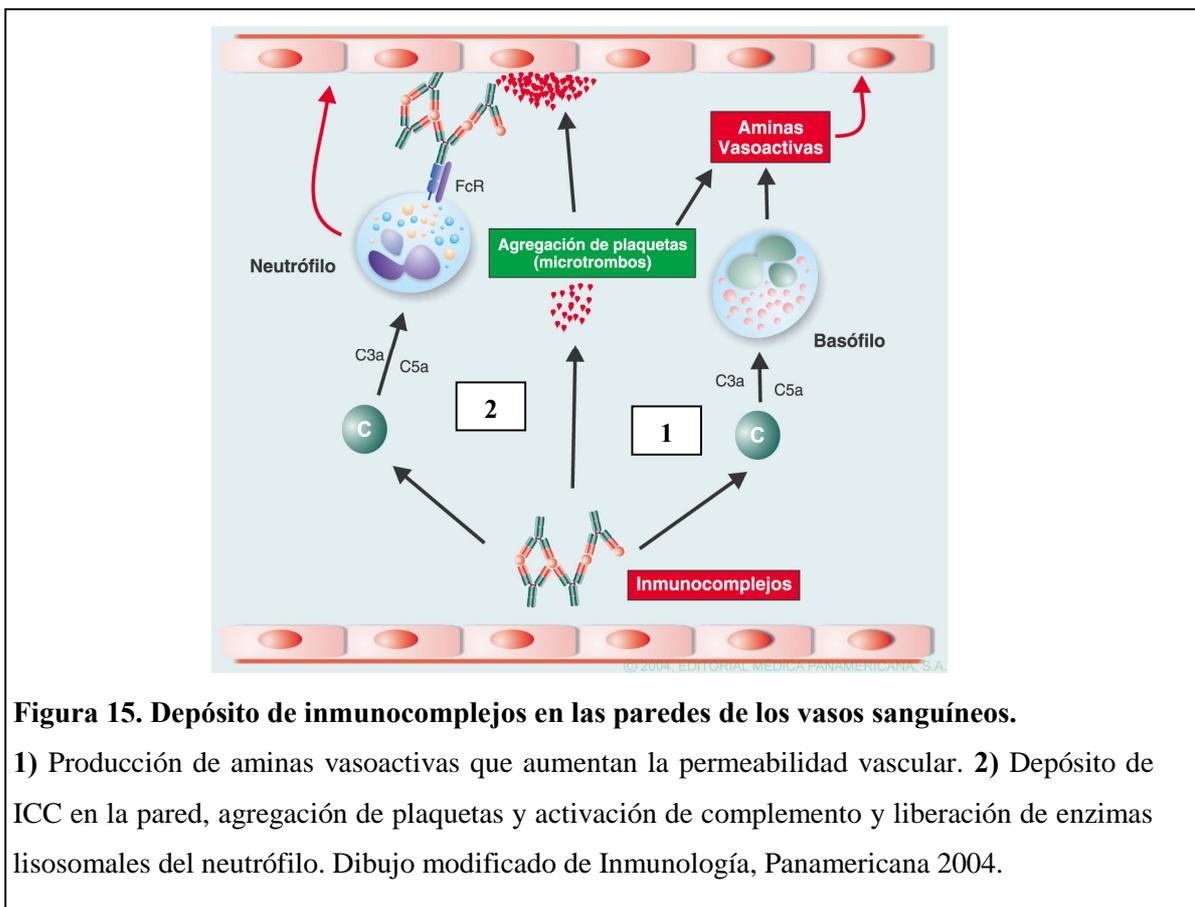


Figura 15. Depósito de inmunocomplejos en las paredes de los vasos sanguíneos.

1) Producción de aminas vasoactivas que aumentan la permeabilidad vascular. 2) Depósito de ICC en la pared, agregación de plaquetas y activación de complemento y liberación de enzimas lisosomales del neutrófilo. Dibujo modificado de Inmunología, Panamericana 2004.

Hay **factores hemodinámicos** que también afectan al depósito de los ICC. Es más probable el depósito de los ICs en donde la presión sanguínea sea más elevada y existan fenómenos de turbulencia. En los capilares glomerulares la presión es aproximadamente cuatro veces más alta que en la mayoría de los demás capilares.

Diferentes tipos de Glomerulonefritis (GN) se han descrito con activación incontrolada de la vía alternativa.

La incidencia de enfermedad renal en la deficiencia de FI era menor comparada con la incidencia en las deficiencias de C3 y de FH (Reis *et al.*, 2006)

En la deficiencia de Factor I sólo hay 4 casos de enfermedad por ICC se han descrito, dos de ellos desarrollaron glomerulonefritis (GN) (Amadei *et al.*, 2001; Sadallah *et al.*, 1999).

Ciertos autores sugieren, que varios factores han contribuido para que se diera GN en un paciente deficiente en Factor I a) la pérdida de función del complemento, b) excesiva carga de inmunocomplejos debido a las recurrentes infecciones y c) la pérdida de CR1, sobre los eritrocitos y podocitos, que está involucrado en la eliminación de los IC (Sadallah *et al.*, 1999). Aunque la deficiencia de C3 está asociada a enfermedad renal, los efectos de la ausencia de C3 no se conocen del todo. Las consecuencias de la esta deficiencia se ha visto que dependen de varios factores que incluyen un componente genético, y el tipo y la concentración de los ICC (Reis *et al.*, 2006). Existen modelos animales de ratones deficientes en C3 en los que existe una protección de la infiltración de los neutrófilos y de la proteinuria (Sheerin *et al.*, 1997). Otros modelos de ratón desarrollan daño renal aunque el depósito de inmunocomplejos no era superior comparado con los controles (Quigg *et al.*, 1998).

La paciente de la Familia 1, además de tener unos niveles altos de ICC, presenta una disminución de CR1 sobre sus eritrocitos (Miot *et al.*, 2002). Sería conveniente realizar un seguimiento de los niveles de IC en esta paciente y en su hermana por el riesgo que tienen de padecer a largo plazo, un daño renal.

Examinar los genes de Factor H y MCP en familiares heterocigotos de los deficientes en Factor I, es de interés para investigar si presentan algún polimorfismo que les predisponga a SHUa (Caprioli *et al.*, 2006; Esparza-Gordillo *et al.*, 2005; Nilsson *et al.*, 2007).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS MOLECULARES REALIZADOS.

8.1. Descripción de los resultados obtenidos en la Familia 1

El ADNc obtenido de los fibroblastos de la propositus y de los padres de la Familia 1, se amplificaron en 4 fragmentos solapantes. Los fragmentos obtenidos tenían un tamaño similar a los fragmentos de un control sano.

Estos fragmentos se secuenciaron y se encontró una sustitución de una timina por una guanina c.739T>G en el exón 5 del fragmento 2 (Ver Figura10). Este cambio se encontraba en homocigosis en la hija III1 y en heterocigosis en los padres.

Mediante secuenciación del exón 5 y 6, a partir de ADN genómico en todos los miembros de la familia, se confirmó la mutación en el exón 5, en la paciente y en los padres, y además, se encontró en homocigosis en su hermana II3 y en heterocigosis en su hermano II2 (Figura 16)

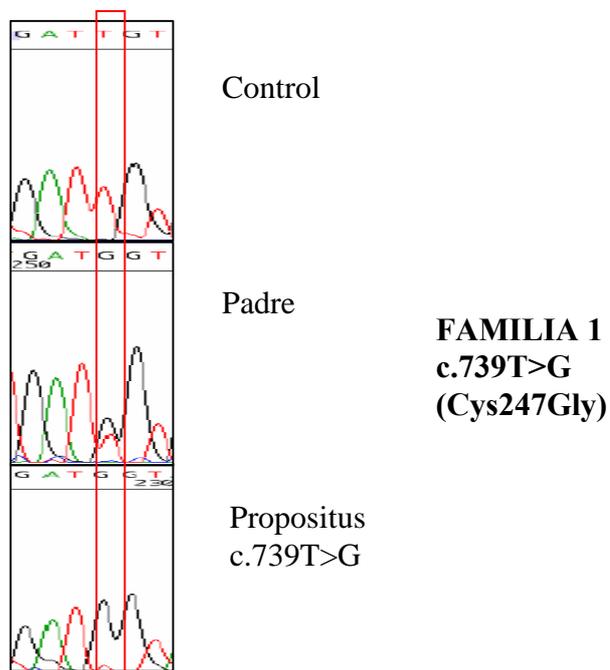


Figura 16. Secuencias del exón 5 realizadas a partir de ADN genómico en la Familia 1.

Esta transversión T>G, no se ha encontrado en ninguno de los 50 controles sanos analizados.

Esta mutación, produce un cambio de una cisteína por una glicocola, en el módulo LDLr 1 del Factor I, y hasta ahora, no se había descrito en la bibliografía.

El mecanismo por el que se produciría la sustitución de la timina por guanina en la primera base del codón podría explicarse mediante los procesos de mala inserción o de mal-alineamiento durante la replicación del ADN (Cooper and Krawczak, 1993).

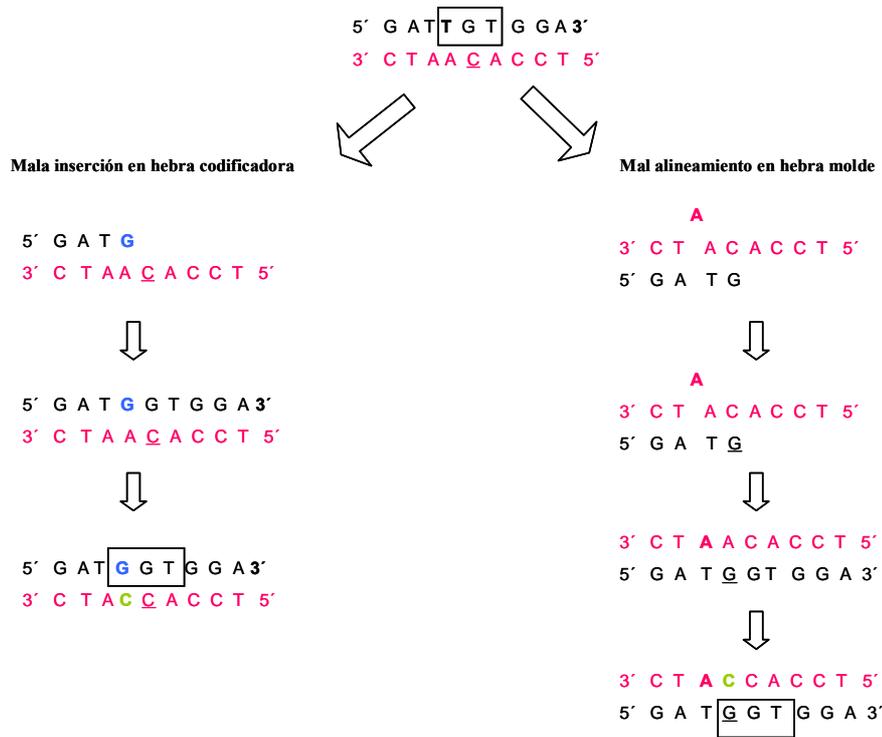


Figura 17. Proceso de mutagénesis en la mutación c.739T>G de la Familia 1 que provoca el cambio del codón TGT a GGT.

El proceso de mala inserción, puede ocurrir por un desequilibrio local en los desoxinucleótidos trifosfato de tal manera que la ADN polimerasa tienda a la mala-incorporación del exceso de un dinucleótido. Elevados niveles del próximo nucleótido correcto se asocia con una probabilidad mayor de extensión del nucleótido incorrecto y una probabilidad reducida de que se corrija debido a que la polimerización se ve favorecida. La posible consecuencia de una mala-inserción inicial de una base puede dar lugar a que la base incorrecta pueda ser permanentemente incorporada. Se repara la base correcta en la otra cadena y el resultado es la sustitución del par de bases.

El otro proceso de mutagénesis se produce mediante un proceso de mal-alineamiento inicial debido a la presencia de idénticas bases en la serie. Después, al volver a

alinearse ocurre un mal apareamiento. La posterior reparación, consolidaría la sustitución del par de bases.

8.2. Descripción de los resultados obtenidos en la Familia 2

El ADNc en la propositus y en sus padres se amplificó en cuatro fragmentos solapantes, y se observaron diferencias de tamaño, en el fragmento 2, en relación al control (Figura 18).

En los padres se apreciaban dos bandas, una banda correspondía con el tamaño esperado y la otra era de menor tamaño en relación al control sano. La banda de menor tamaño era la única que se observaba en la hija II2.

Tras purificación de este fragmento de menor tamaño y secuenciación, se observó que carecía del exón 5, y en el exón 6 había una sustitución c.804G>A que no da lugar a cambio de aminoácido. El cambio c.804G>A se ha encontrado en 20 controles sanos en heterocigosis y en un control en homocigosis, por lo que podría ser un polimorfismo.

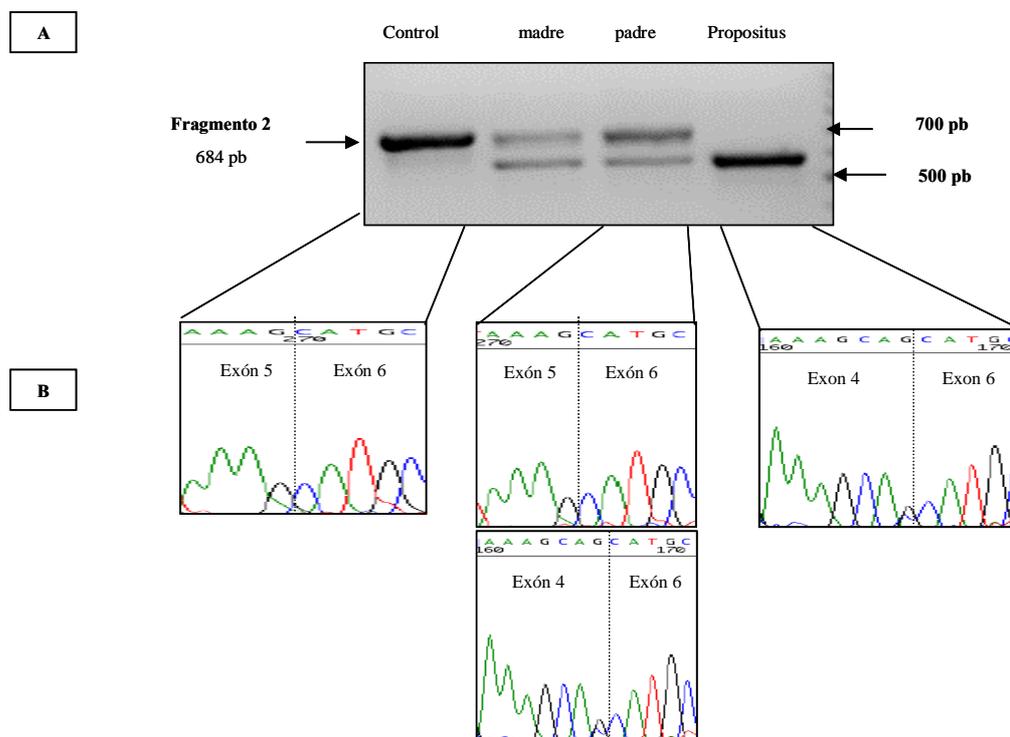


Figura 18. Amplificación y secuenciación del fragmento 2 de la PCR anidada en la Familia 2. A. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. B. Secuenciación del fragmento 2. Sólo se muestra en las secuencias la unión exón 5/exón 6 y exón 4/exón 6.

Se secuenció el exón 5 y 6, de todos los miembros de la familia, a partir de ADN genómico. En la propositus y en sus hermanos II4 y II5 se observaron dos cambios en homocigosis, c.772G>A, en la última base del exón 5, y c.804G>A en el exón 6. Estos cambios se encontraban en heterocigosis en los padres y en los hermanos II1 y II3. Se secuenciaron todos los exones y unas 100 pb aproximadamente de región intrónica y se encontró que la propositus y hermanos II4 y II5 carecían de una timina, en el intrón 7, que se encuentra a 108 pb del exón 7. Los padres y el resto de los hermanos presentan esta delección en heterocigosis.

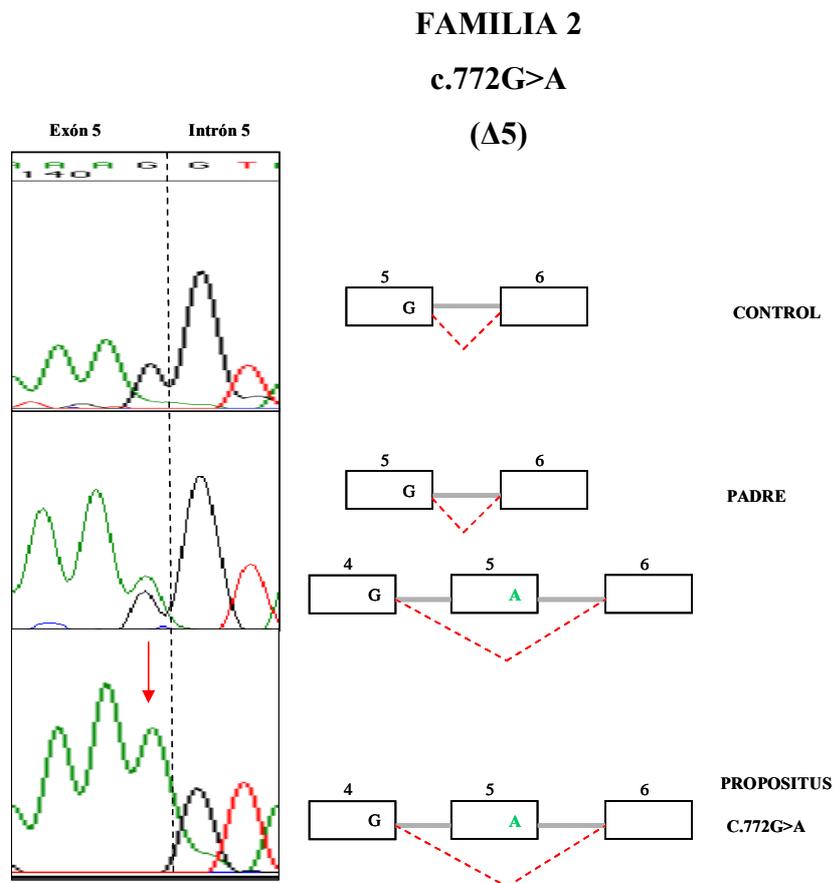


Figura 19 Secuencias del exón 5 en la Familia 2 y efectos que provoca la mutación c.772G>A

La alteración encontrada en el exón 5 no la hemos observado en 50 controles analizados. La última base del exón 5 forma parte de la secuencia de reconocimiento del sitio donador para el proceso de *splicing* o ajuste, de eliminación del intrón 5 y unión del exón 5 con el 6. La mutación en esta base, provoca un anómalo procesamiento de esta región y se pierde el exón 5 con su intrón.

Los padres no son consanguíneos, aunque son del mismo pueblo, al presentar tres cambios en el mismo alelo, apoya el hecho de que puedan tener un ancestro común.

La alteración encontrada en el exón 5 junto al polimorfismo en el exón 6 en la familia 2, se descubrió también en una familia del Norte de Inglaterra por Vyse et al. Hubiera sido interesante analizar el posible origen común de las mutaciones en la familia inglesa y española, pero no se pudo disponer de las muestras inglesas.

Es posible que la mutación surgiera en la población inglesa y se introdujera en España. Se conocen referencias históricas en las inmediaciones del pueblo toledano de donde esta familia es originaria, en las que se libraron enfrentamientos de tropas inglesas y españolas contra las francesas en la Batalla de Calatrava, durante la Guerra de la Independencia hecho histórico que podría haber favorecido la introducción de la mutación en esta zona (Jiménez de Gregorio, 1980).

8.3. Relevancia de la mutación c.772G>A en el proceso de *splicing*

La Familia 2 se ha encontrado que tiene la mutación c.772G>A que provoca la eliminación del exón 5 en el ARNm.

Los ARNm eucariotas tienen que sufrir una serie de modificaciones antes del proceso de traducción por el ribosoma. Entre estos procesos se encuentra la eliminación de intrones y unión de exones conocido como reacción de *splicing*. La eficiencia de esta reacción viene determinada por el reconocimiento de una variedad de motivos, localizadas en las uniones 5' y 3' exón-intrón conocidas como secuencia donadora y aceptora de *splicing*, respectivamente y el lugar de ramificación (15-35 pb más arriba del lugar 3').

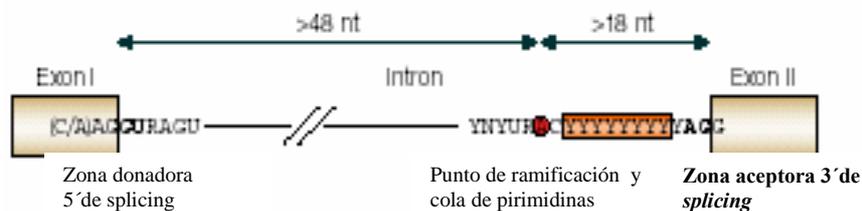


Figura 20 Secuencias consenso implicadas en la reacción de *splicing*. En rojo están marcadas el punto de ramificación y la cola de pirimidinas (Yn)

Se han descrito también una serie de secuencias génicas que están implicadas en el reconocimiento de los lugares de *splicing*, que favorecen el uso de las secuencias de *splicing* (ESE/ISE) o reprimen el uso de estos sitios(ESS/ISS) (Fu, 2004).

La reacción de *splicing* consta de dos reacciones de transesterificación que son catalizadas por el complejo de *splicing*, que es un complejo multiproteico llamado spliceosoma, formado por 5 ribonucleoproteínas pequeñas (sn RNPs) y otras proteínas asociadas encargadas de reconocer las secuencias de *splicing*.

Se ha estimado que el 10% de las mutaciones puntuales asociadas a enfermedades genéticas en humanos alteran las secuencias de *splicing* del ARNm (Krawczak *et al.*, 2007). Mutaciones en los sitios de *splicing* pueden resultar en defectos cuantitativos (disminución de los niveles del ARNm normal) o cualitativos, debidos a la pérdida de exones, *exon skipping*, o a la activación de sitios cripticos de *splicing*.

En el gen de Factor I se han descrito dos alteraciones que afectan al *splicing*, en la posición -1 de la secuencia donadora del *splicing*, del exón 5 (Vyse *et al.*, 1996), y en la posición +5 del intrón 12 (Caprioli *et al.*, 2006) pero en este último caso no se ha estudiado su defecto a nivel de ARNm.

La pérdida del exón 5 en el ARN mensajero de estos pacientes, se explicaría según el modelo del ensamblaje del complejo spliceosoma en el procesamiento del pre ARN mensajero. Una mutación en esta base conservada en la posición -1, impediría el ensamblaje del *spliceosoma* con la pérdida del complejo en los extremos 5' y 3' del exón, (Robberson *et al.*, 1990), lo cual conlleva una completa escisión del exón y su intrón adyacente.

En este ensamblaje del spliceosoma juega un papel importante la interacción de la ribonucleoproteína U1 con la secuencia donadora de *splicing*. Esta interacción se ve dificultada en las posición +5 de la secuencia donadora normal en la que tiene una A y difiere de la secuencia consenso. Se ha observado que la mayoría de los lugares 5' de *splicing* tienen una G al menos en la posición -1 o en +5 (Burge and Karlin, 1997; Carmel *et al.*, 2004).

La mutación en la familia 2 c.772G>A elimina la única G en la posición -1 provocaría una desestabilización añadida a la que ya había, de interacción de U1 con la secuencia donadora, se necesita al menos una guanina en -1 o en +5 para unirse a la C de U1 y formar tres puentes de hidrógeno.

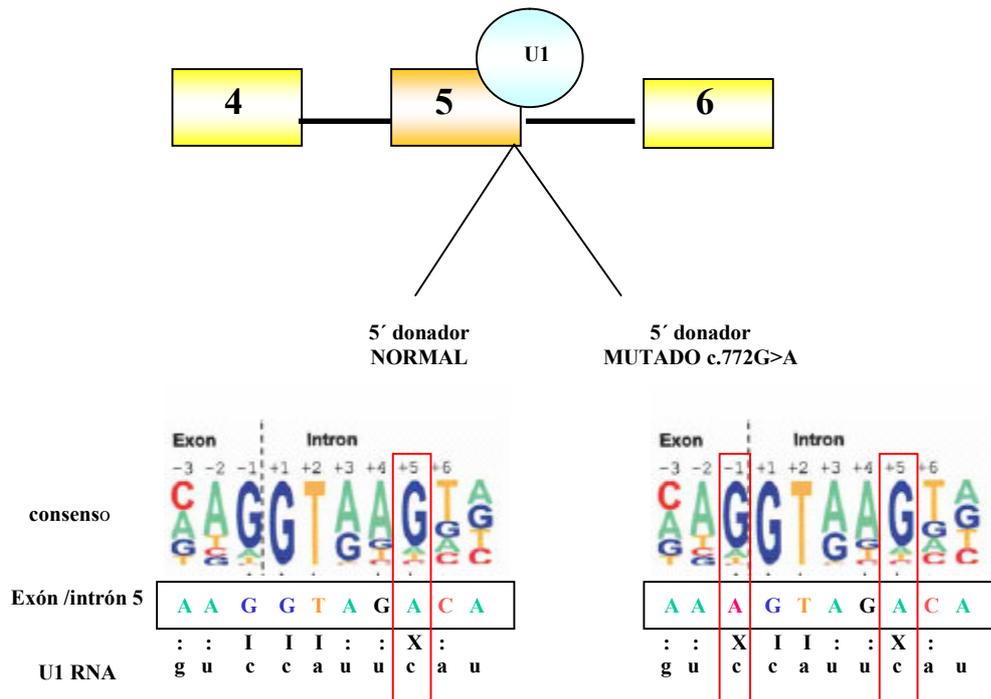


Figura 21. Interacción de la ribonucleoproteína U1 con el lugar donador 5' de *splicing* del exón 5 del gen de Factor I. I, :, indican apareamientos entre U1 y secuencia donadora. X, indica falta de apareamiento.

La eliminación del exón puede darse si en el exón no se encuentra definido el extremo 5' donador (Robberson *et al.*, 1990). El reconocimiento del lugar donador de *splicing* es un paso clave en el reconocimiento del exón (Krawczak *et al.*, 2007)

El hecho de que no haya un sitio crítico de *splicing* en las proximidades del sitio donador mutado junto a una distancia pequeña entre el exón 5 y 6, añadido a que la similitud de la secuencia donadora de *splicing* del exón 5 en relación a la secuencia consenso es baja, 69% (Shapiro and Senapathy, 1987) parece incierto el que pudiera haber un *splicing* residual (Vyse *et al.*, 1996).

Se realizó el análisis de los fragmentos alternativos mediante electroforesis del fragmento 2 en un gel de acrilamida y tinción con plata, y no se observaron en la paciente con la mutación en homocigosis, productos alternativos de un procesamiento normal en fibroblastos (datos no mostrados) También se ha amplificado con otra pareja de cebadores y no se han encontrado transcritos alternativos. Por tanto, es posible hipotetizar, que la mutación c.772G>A provoca una inestabilidad de U1 lo

suficientemente drástica para que el exón 5 sea eliminado no sólo en fibroblastos sino en otros tejidos.

8.4. Efecto de las mutaciones encontradas en la estructura del módulo LDLr 1 y en la función del Factor I

Las dos familias estudiadas, tienen mutaciones en el exón 5 que codifica para el módulo LDLr 1.

El módulo LDLr 1 se encuentra en la cadena pesada del Factor I. Los módulos FIMAC y SRCR también forman parte de la cadena pesada y se ha postulado que se disponen constituyendo una organización triangular estabilizada por un enlace disulfuro entre la Cys 15 del N-terminal y la Cys 237 del módulo LDLr1 (Ver enlace disulfuro en color verde de la Figura 22).

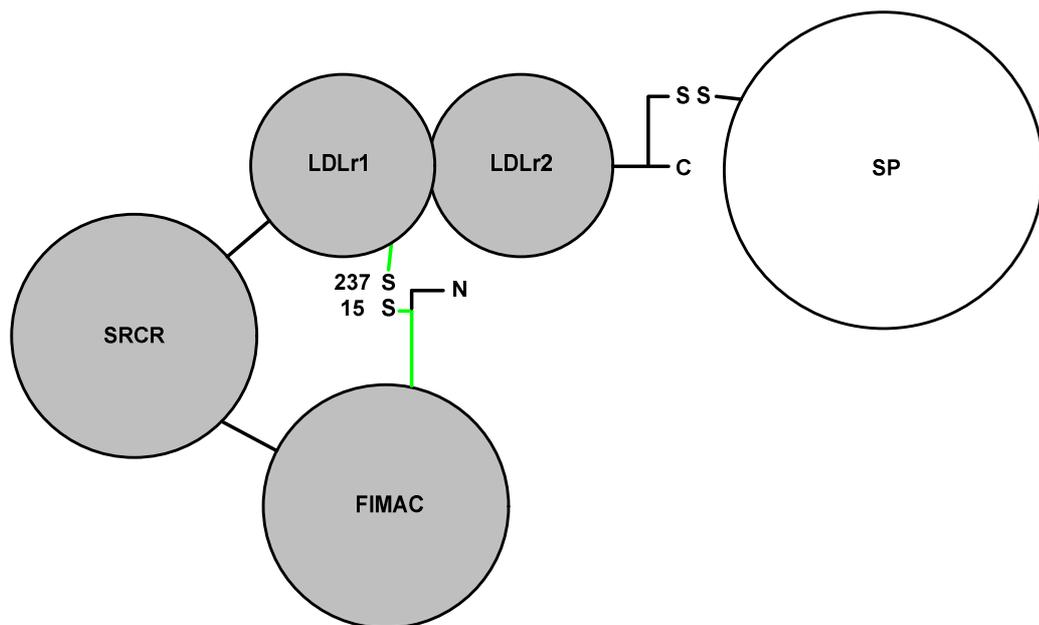


Figura 22. Modelo de la posible organización de los dominios del Factor I.

Esquema modificado de Chamberlain et al. No se muestran los residuos azucarados para una mejor visualización del esquema. En gris se han sombreado los módulos de la cadena pesada y en blanco está el único módulo SP de la cadena ligera. Los enlaces disulfuro intermodulares se establecerían entre la Cys 15 del N-t y la Cys 237 del módulo LDLr1 (en verde) y la Cys 309 de la región linker y la Cys 435 del módulo serín proteasa, SP.

Aunque la estructura del módulo LDLr 1 no está resuelta, se puede conocer mediante modelado por homología. Se ha generado un modelo del módulo LDLr 1 a partir de la estructura conocida de un módulo LDLRA (código PDB 1AJJ) (Fass *et al.*, 1997;Saunders *et al.*, 2007). En el plegamiento hipotético del módulo LDLr1 intervendrían dos enlaces disulfuro (Ver figura 24B) y en el módulo LDLRA se forman tres enlaces disulfuro (Ver figura 24.A).

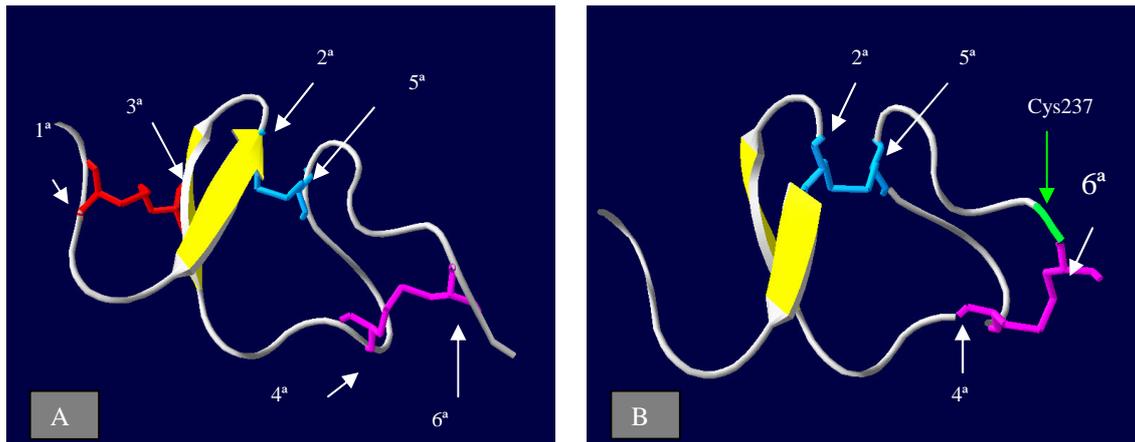


Figura 24. Estructura de un módulo LDLRA y. modelo de estructura del módulo LDLr1 del Factor I. Se indican con flechas las Cys que forman los enlaces disulfuro. El enlace disulfuro que se forma entre la Cys 1^a y 3^a es de color rojo, en azul es el que se da entre la Cys 2^a y 5^a y el enlace disulfuro morado es el que se da entre la Cys 4^a y 6^a; En verde se destaca la Cys 237; **A**, Estructura de un módulo LDLRA código 1AJJ; **B**, Modelo del módulo LDLr 1 del Factor I realizado por Saunders et al, www.fh-hus. Las imágenes se han visualizado con el programa Swiss PDB viewer y Adobe Photoshop 6.0

Los enlaces disulfuro en los módulos LDLRA confieren estabilidad a la región de unión al ligando del receptor de LDL. El receptor de LDL es el componente más importante de una familia de receptores de superficie que transportan macromoléculas al interior celular mediante endocitosis mediada por receptor. La capacidad que tiene el receptor para soportar el ambiente ácido del endosoma y volver intacto a la superficie le viene dada por la estructura de los módulos LDLRA (Brown *et al.*, 1997).

La reducción de estos enlaces disulfuro destruye su estructura y anula la unión al ligando (Goldstein *et al.*, 1985).

Los residuos ácidos conservados del módulo LDLRA que se encuentran entre la 4^a Cys y la 6^a Cys también juegan un papel importante en la interacción con los

ligandos. Estos residuos ácidos se unen a las regiones básicas de las apoproteínas B y E de las lipoproteínas de muy baja y baja densidad VLDL y LDL (Moestrup, 1994).

Al igual que en el receptor de LDL, la presencia de aminoácidos ácidos en los módulos LDLr1 y 2 del Factor I podrían intervenir en la interacción con residuos básicos. Así el módulo FIMAC contiene residuos básicos que podrían favorecer el acercamiento de este módulo hacia los módulos LDLr1 y 2.

Y esta organización favorece que los módulos SRCR, LDLr 1 y SP constituyan unas superficies expuestas que puedan interaccionar con los sustratos C3b y C4b y con los cofactores (Chamberlain *et al.* 1998)

Esta organización modular de la cadena pesada podría estar implicada en el reconocimiento de los cofactores necesarios para la orientación del sustrato en la generación de iC3b por el dominio serina proteasa. La acción de inhibidores de Factor I, como la suramina, apoya la implicación de la cadena pesada en la función del Factor I.

La suramina se une a proteínas que tienen dominios LDLRA (Vassiliou, 1997; Vassiliou *et al.*, 2001) y también a proteínas con dominio SP (Cadene *et al.*, 1997) Sin embargo, se ha observado que la suramina no inhibe el dominio serín proteasa del Factor I, por lo que se cree que podría deberse a la creación de un puente entre las dos cadenas de Factor I, posiblemente con una unión mayor a la cadena pesada (Tsiftoglou *et al.*, 2005).

Estos módulos homólogos a LDLRA también se han encontrado en otras proteínas del complemento que constituyen el complejo de ataque a membrana, C6, C7, C8 y C9. La función de este módulo en estas proteínas no se conoce bien.

Ciertos autores mostraron, que al aportar al componente C9 los ligandos del receptor de LDL, HDL y LDL, se inhibía la polimerización de C9 (Rosenfeld *et al.*, 1983). Esto podría implicar a este módulo en la regulación de la actividad MAC. Otros autores creen que en este módulo se pueden intercambiar algunos enlaces disulfuro entre los monómeros durante la polimerización del MAC (Würzner *et al.*, 1998).

Las proteínas con más de un dominio, se cree que se han originado mediante la fusión de los genes correspondientes a varias proteínas que existían previamente. La concentración de varios de esos dominios en una nueva proteína les confieren capacidades nuevas y posiblemente más complejas que las que tienen las proteínas sencillas (Gómez-Moreno Calera, 2003).

La propositus y su hermana de la Familia 1 presentan la mutación (Cys247Gly) que afecta a la 5ª Cys conservada que participa en la formación de un enlace disulfuro

con la Cys 2^a en el módulo LDLr1 (Figura 25). Además la mutación se encuentra en una zona de doblez o codo “bend” que cambiaría la geometría local de la cadena. La estructura del módulo mutado por tanto, sería diferente de la estructura nativa (Figura 25) (Saunders *et al.*, 2007) y podría ocasionar alteraciones en la organización triangular de la cadena pesada constituida por los módulos LDLr 1, FIMAC y SRCR (Chamberlain *et al.* 1998).

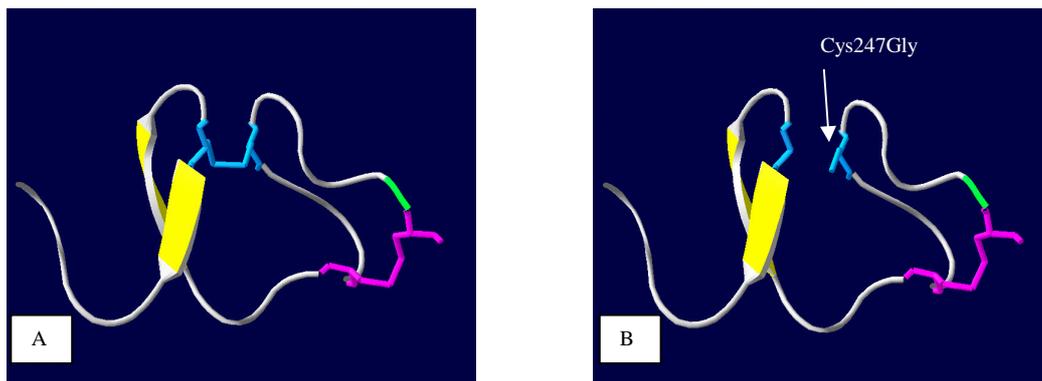


Figura 25. Modelo estructural del módulo LDLr1 del Factor I. A, Estructura del módulo normal; B, Estructura del módulo con la mutación (Cys247Gly); Modelado realizado por Saunders *et al.*, www.fh-hus; La estructura se ha visualizado con el programa Swiss PDB viewer y Adobe Photoshop 6.0

La familia 2 tiene la mutación c.772G>A que provoca la pérdida del módulo LDLr 1. Este módulo como se ha comentado anteriormente constituye junto con otros módulos la conformación triangular de la cadena pesada del Factor I mediante la formación de un enlace disulfuro entre la Cys 237 y la Cys 15 del N-t. Es posible que este enlace no pueda formarse debido a la pérdida del módulo y a consecuencia de esto, la función proteolítica del Factor I podría verse alterada.

8.5. Efecto de las mutaciones encontradas en la síntesis y secreción del Factor I

Las mutaciones que se han encontrado en las dos familias alterarían la estructura del módulo LDLr1 y podrían provocar un bloqueo en la secreción de la proteína que explicaría la ausencia de Factor I circulante en el suero de los pacientes estudiados.

Las mutaciones encontradas en el receptor de LDL, en pacientes con hipercolesterolemia familiar nos pueden aportar información para comprender los procesos intracelulares que producirían las mutaciones en el Factor I de la Familia 1.

Aunque hay una extensa descripción de los defectos moleculares en el gen del receptor de LDL, que causa la hipercolesterolemia familiar, pocos grupos científicos han estudiado el efecto de estas mutaciones a nivel de síntesis y secreción. Para facilitar el análisis mutacional del gen y llegar a establecer relaciones genotipo-fenotipo Varret y colaboradores, crearon una base de datos en el que incluyen 210 entradas (Varret *et al.*, 1997). Se recogen en esta base de datos, mutaciones puntuales, entre otras, que afectan a Cys de las repeticiones LDLRA. Los casos en los que se ha realizado estudio fenotípico se observa que el efecto de la sustitución de Cys por otros aminoácidos dan lugar a un defecto en el transporte intracelular de la proteína (Hobbs *et al.*, 1992).

Se ha observado, que receptores mutados de LDL que presentan alteraciones en regiones ricas en Cys o en regiones pobres en Cys, muestran igualmente defectos en el transporte intracelular lo que sugiere que las Cys por ellas mismas no bloquearían este transporte. Las mutaciones que provocan bloqueo depende de la región en la que se encuentren esta Cys, si están involucradas en una estructura determinada. Así, se espera que los dominios de la proteína que contengan aminoácidos hidrofílicos en la superficie de un bucle, tengan menos requerimientos de plegamiento que los aminoácidos que constituyen el bucle (Esser and Russell, 1988).

El Retículo Endoplásmico (RE) es el primer compartimento de la vía secretora responsable de la síntesis, modificación y canalización de las proteínas a sus lugares diana y hacia el espacio extracelular. Todas las proteínas secretadas entran en la vía secretora a través del RE. Allí las proteínas adoptan su conformación nativa y sufren una serie de modificaciones post-traduccionales que incluyen glicosilación en residuos de Asn y la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares. Las proteínas correctamente plegadas deben guiarse hasta el Golgi donde sufren las últimas modificaciones y se distribuyen en vesículas hasta su destino final dentro o fuera de la célula.

El plegamiento de una proteína multidominio, se cree que se lleva a cabo mediante el plegamiento individual de los dominios. Se ha sugerido que el propio proceso de traducción puede actuar como “chaperona” al permitir el plegamiento de dominios N-terminales antes que la aparición de las secuencias correspondientes a dominios más cerca del extremo C-terminal lo dificulte (Mateu and Neira, 2003).

Este procedimiento de plegamiento podría favorecer el plegamiento individual de cada módulo del Factor I. De tal forma que pudiera darse el plegamiento del módulo LDLr1 mutado, en el que quedarían 4 Cys que podrían constituir 2 enlaces disulfuro. Es posible que la Cys 2º que queda libre pudiera formar un enlace disulfuro con la Cys siguiente (Figura 23) aunque esto podría interrumpir la formación del enlace correcto de esta Cys con la Cys en la posición 15 (Ver enlace en verde en Figura 22).

Por tanto, la mutación Cys247Gly provocaría en el Factor I de los pacientes de la Familia 1 un plegamiento anómalo del módulo. Las proteínas plegadas de forma defectuosa deben ser eliminadas, pues son nocivas para la célula. Existe un sistema de “control de calidad” del plegamiento en el RE que mediante ciclos de desglicosilación-reglicosilación, en función de la estructura de la proteína, permiten que las proteínas prosigan su vía de secreción o se retengan en este compartimento. La acumulación de proteínas con plegamiento anómalo estimula una respuesta conocida como “Respuesta a proteínas desplegadas” (UPR unfolded protein response) (Figura 26).

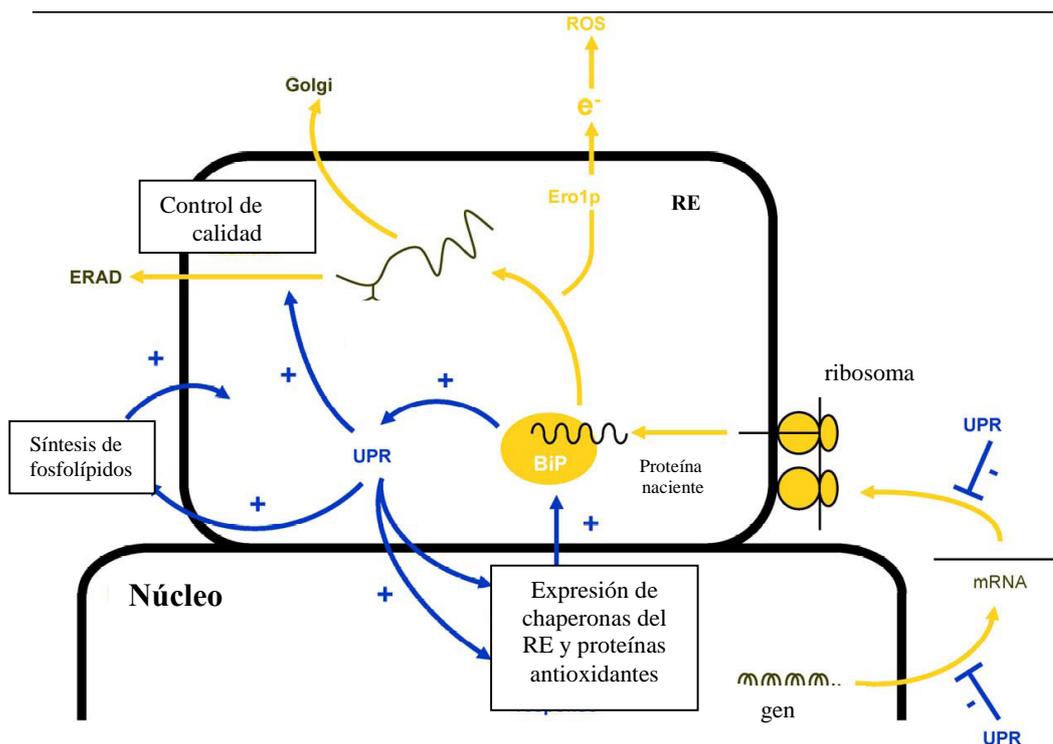


Figura 26 Flujo de proteínas a través del Retículo endoplásmico (RE) y principales actividades de la “Respuesta a proteínas desplegadas” (UPR). ROS, radicales de oxígeno; BiP, Chaperona del RE; Ero1p, foldasa oxidorreductasa; ERAD, degradación asociada al retículo. Dibujo modificado (Schröder and Kaufman, 2005)

La respuesta UPR incrementa la capacidad plegadora de la vía secretora y también la degradación asociada al RE conocida como ERAD que consiste en la selección y transporte de proteínas mal plegadas fuera del RE al citosol para su posterior degradación por el proteosoma (Schröder and Kaufman, 2005).

Debido a que el RE es el primer compartimento donde se dan las primeras modificaciones post-traduccionales, entre ellas la formación de enlaces disulfuro, es posible que la proteína mutada en la Familia 1 se encuentre retenida en este compartimento.

En la familia 2 se ha observado que la mutación encontrada c.772G>A provoca la pérdida del exón 5 pero no crea un cambio en el marco de lectura del ARNm, de forma que se sintetizaría un Factor I más corto sin 38 aminoácidos del módulo LDLr1. La síntesis del Factor I seguramente no se vería afectada, pero sí se afectaría la secreción del Factor I mutante. La mutación en la Familia 2 podría originar una reorganización anómala de la cadena pesada o incluso que no se diera tal reorganización. Esta alteración en la conformación de la proteína podría ser reconocida por los mecanismos del “control de calidad” y bloquearían la salida de la proteína mutada del RE, aunque también cabe la posibilidad que se pudiera encontrar en otros compartimentos como se ha observado en la proteína inhibidor de C1.

En pacientes con Angioedema Hereditario (AEH) que presentan una delección que no afecta al marco de lectura, del exón 4 del inhibidor de C1, se ha encontrado la proteína mutada en el Golgi o en compartimentos muy próximos a éste (Verpy *et al.*, 1993).

Algunas proteínas mal plegadas o mal ensambladas escapan de los mecanismos de retención en el RE y se pueden encontrar retenidas en otros compartimentos. Aunque no se conocen las precisas características que reconocen la maquinaria de “control de calidad” en las proteínas anómalas y cómo median la distribución de estas proteínas hacia una vía u otra, se cree que las características conformacionales de cada proteína dictan la vía de eliminación que se va a llevar a cabo (Arvan *et al.*, 2002).

Como en el RE, el Golgi también selecciona proteínas para su posterior eliminación basándose en su conformación. Hay evidencias de varias vías post-RE para la eliminación de proteínas. Las proteínas con plegamiento no nativo pueden dirigirse desde el Golgi al RE para el proceso ERAD, pero la vía más frecuente a la que se dirigen estas proteínas es al sistema endosomal/lisosomal para su degradación (Arvan *et al.*, 2002) (Figura 27).

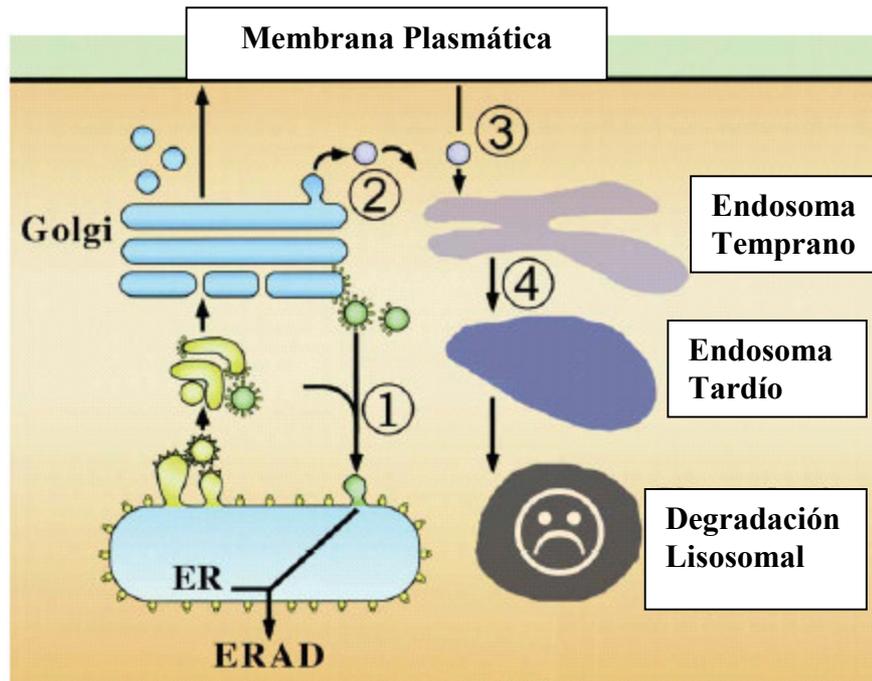


Figura 27 Compartimentos post-RE en el control de calidad de la vía secretora. Ruta 1. Las proteínas alteradas pueden desde el Golgi ser seleccionadas para su degradación y mediante transporte retrógrado ir al RE para su posterior degradación (ERAD). **Ruta 2.** Desde el Golgi se dirigen al sistema endosomal para su posterior degradación lisosomal. **Ruta 3.** Las proteínas se dirigen a la membrana plasmática y después al sistema endosomal/lisosomal. **Ruta 4.** Las proteínas recién sintetizadas utilizan los endosomas tardíos como intermediarios biosintéticos, pero antes de salir de este lugar puede iniciarse el “control de calidad” de estas proteínas. ER, Retículo endoplásmico; ERAD, degradación asociada al Retículo endoplásmico; Dibujo modificado (Arvan *et al.*, 2002).

En resumen, las mutaciones encontradas en el Factor I, en la Familia 1 y 2 bloquean su secreción y provocan la deficiencia de Factor I en el suero.

Aunque los niveles de Factor I en suero son indetectables en las dos familias, la clínica que presentan los afectados es muy distinta, incluso entre los hermanos de la misma familia. Ciertos autores sugieren que podrían darse en cada individuo, diferentes respuestas celulares de expresión de proteínas chaperonas, que dieran lugar a la retención de mayor o menor número de proteínas mal plegadas. Y estas mínimas variaciones en niveles de proteína pudieran favorecer el que unos individuos no presenten la misma gravedad de síntomas que otros (Kim and Arvan, 1998).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las dos familias españolas que hemos estudiado con niveles muy disminuidos de C3 y clínica infecciosa presentan una deficiencia total en el plasma del regulador del complemento, el Factor I.
2. Las meningitis de repetición que padeció la paciente de la Familia 1, asociadas a la menstruación estaban causadas por el meningococo en tres episodios. En el resto de los episodios la causa se desconoce. Otros factores, además de la deficiencia de complemento pudieron favorecer en esta paciente la patología.
3. Esta paciente presentaba unos niveles de inmunocomplejos elevados en el suero. Estos son de tipo IgG y unen C1q y pueden provocar, a largo plazo, una enfermedad renal en la paciente.
4. Los complejos C3b-Factor H en el suero, se han descrito en los individuos deficientes en Factor I. Los homocigotos de este estudio tienen estos complejos y también se han encontrado en otros pacientes con activación elevada de la vía alternativa.
5. Las mutaciones encontradas en el exón 5 son la causa del déficit en el suero del Factor I y son la causa de la patología que padecen.
6. Las mutaciones patogénicas encontradas en las dos familias, afectan al módulo LDLr1 del Factor I. La mutación encontrada en la familia 1, Cys247Gly, provocaría la ausencia de un enlace disulfuro implicado en el plegamiento del módulo. La mutación encontrada en la familia 2 c.772G>A generaría la ausencia del módulo LDLr1. Esta alteración impediría la reorganización del resto de los módulos de la cadena pesada en una conformación triangular.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Agostoni,A., Cicardi,M., 1972. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine* 71, 206-215.

Alper,CA., Abramson,N., Johnston,JB., Jandl,JH., Rosen,FS., 1970. Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement-mediated functions and of the third component of complement (C3). *New Engl J Med.* 282, 349-352.

Alper,CA., Rosen,FS., Lachmann,PJ., 1972. Inactivator of the third component of complement as an inhibitor in the properdin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69, 2910-2913.

Amadei,N., Baracho,GV., Nudelman,V., Bastos,W., Florido,M., Isaac,L., 2001. Inherited Complete Factor I Deficiency Associated with Systemic Lupus Erythematosus, Higher Susceptibility to Infection and Low Levels of Factor H. *Scand J Immunol.* 53, 615-621.

Antonarakis,SE., Nomenclature Working Group, 1998. Recommendations for Nomenclature System for Human Gene Mutations. *Hum Mutat.* 11, 1-3.

Arvan,P., Zhao,X., Ramos-Castaneda,J., Chang,A., 2002. Secretory pathway quality control operating in Golgi, Plasmalemmal, and Endosomal Systems. *Traffic.* 3, 771-780.

Ault,BH., Schmidt,BZ., Fowler,NL., Kashtan,CE., Ahmed,AE., Vogt,BA., Colten,HR., 1997. Human Factor H deficiency. *J Biol Chem.* 272, 25168-25175.

Baracho,GV., Nudelman,V., Isaac,L., 2003. Molecular characterization of homozygous hereditary factor I deficiency. *Clin Exp Immunol.* 131, 280-286.

Barret,DJ., Boyle,M., 1984. Restoration of complement function in vivo by plasma infusion in factor I (C3b inactivator) deficiency. *J Pediatr.* 104, 76-81.

Bonnin,AJ., Zeitz,HJ., Gewurz,A., 1993. Complement Factor I Deficiency with Recurrent Aseptic Meningitis. *Arch Intern Med.* 153, 1380-1383.

Brandtzaeg,P., Kierulf,P., Gaustad,P., Skulberg,A., Bruun,JN., Halvorsen,S., Sorensen,E., 1989a. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis.* 159, 195-204.

Brandtzaeg,P., Mollness,TE., Kierulf,P., 1989b. Complement activities and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis.* 160, 58-65.

Brown,MS., Herz,J., Goldstein,JL., 1997. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature*. 388, 629-630.

Burge,C., Karlin,S., 1997. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* 268, 78-94.

Cadene,M., Duranton,J., North,A., Si-Tahar,M., Chignard,M., Bieth,JG., 1997. Inhibition of neutrophil serine proteinases by suramin. *J Biol Chem*. 272, 9950-9955.

Caprioli,J., Noris,M., Brioschi,S., Pianetti,G., Castelletti,F., Bettinaglio,P., Mele,C., Bresin,E., Cassis,L., Gamba,S., Porrati,F., Bucchioni,S., Monteferrante,G., Fang,CJ., Liszewski,MK., Kavanagh,D., Atkinson,JP., Remuzzi,G., 2006. Genetics of HUS: The impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. 108, 1267-1279.

Carmel,I., Tal,S., Vig,I., Ast,G., 2004. Comparative analysis detects dependencies among the 5' splice-site positions. *RNA*. 10, 828-840.

Catterall,CF., Lyons,A., Sim,RB., Day,AJ., Harris,T., 1987. Characterization of the primary amino acid sequence of human complement control protein Factor I from an analysis of cDNA clones. *Biochem J*. 242, 849-856.

Chamberlain,D., Ullman,CG., Perkins,SJ., 1998. Possible Arrangement of the Five Domains in Human Complement Factor I As Determined by a Combination of X-ray and Neutron Scattering and Homology Modelling. *Biochemistry*. 37, 13918-13929.

Cooper,DN., Krawczak,M., 1993 An introduction to the structure, function and expression of human genes. *Human Gene Mutation*. BIOS scientific publishers limited, Oxford UK, pp. 19-48.

Davis,AE., Harrison,RA., 1982. Structural characterization of Factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry*. 21, 5745-5749.

den Dunnen,JT., Antonarakis,SE., 2000. Mutation Nomenclature Extensions and suggestions to describe complex mutations: A Discussion. *Hum Mutat*. 15, 7-12.

Esparza-Gordillo,J., Goicoechea,E., Buil,A., Berges,A., López-Trascasa,M., Sánchez-Corral,P., Rodríguez de Córdoba,S., 2005. Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32. *Hum Mol Genet*. 14, 703-712.

Esser,V., Russell,DW., 1988. Transport-deficient mutations in the Low Density Lipoprotein Receptor. *J Biol Chem*. 263, 13276-13281.

Fass,D., Blacklow,S., Kim,P., Berger,JM., 1997. Molecular basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module. *Nature*. 388, 691-693.

Fearon,DT., 1993. The CD19-CR2-TAPA-1 complex, CD45 and signaling by the antigen receptor of B lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 5, 341-348.

Fijen,C., Bredius,R., Kuijper,EJ., 1993. Polimorphism of IgG Fc receptors in meningococcal disease (letter). *Ann Intern Med* 119, 636.

Fijen,C., Bredius,R., Kuijper,EJ., Out,TA., de Haas,M., de Wit,T., Daha,MR., Dankert,J., van de Winkel,J., 1995 Complement deficiency and the role of Fcγ receptors, properdin and C3 in phagocytosis of meningococci. In: Fijen,C. (Ed.), *Meningococcal disease and complement deficiencies in the Netherlands*. University of Amsterdam, Amsterdam, pp. 157-175.

Fischer,MB., Ma,M., Goerg,S., 1996. Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J Immunol.* 157, 549-556.

Fontán Casariego,F., 2006. Inmunodeficiencias primarias. *Rev Esp Pediatr.* 62, 494-508.

Frank,MM., Gelfand,JA., Atkinson,JP., 1976. Hereditary angioedema: The clinical syndrome and its management. *Ann Intern Med.* 84, 580-593.

Frémeaux-Bacchi,V., Dragon-Durey,MA., Blouin,J., Vigneau,C., Kuypers,D., Boudailliez,B., Loirat,C., Rondeau,E., Fridman,WH., 2004. Complement Factor I: a susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet.* 41, on line mutation report e84-88.

Fu,XD., 2004. Towards a splicing code. *Cell* 119, 736-738.

Genel,F., Sjöholm,AG., Skattum,L., Truedsson,L., 2005. Complement Factor I deficiency associated with recurrent infections, vasculitis and immune complex glomerulonephritis. *Scand J Infect Dis.* 37, 615-618.

Goicoechea de Jorge,E., Harris,CL., Esparza-Gordillo,J., Carreras,L., Arranz,EA., Garrido,CA., López-Trascasa,M., Sánchez-Corral,P., Morgan,BP., Rodríguez de Córdoba,S., 2007. Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 240-245.

Goldberger,G., Bruns,G., Rits,M., Edge,MD., Kwiatkowski,DJ., 1987. Human complement Factor I: Analysis of cDNA-derived Primary Structure and Assignment of its gene to chromosome 4. *J Biol Chem.* 262, 10065-10071.

Goldstein,JL., Brown,MS., Anderson,RG., Russell,DW., Schneider,WJ., 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol.* 1, 1-39.

- Gómez-Moreno Calera,C., 2003 Clasificación estructural de las proteínas. In: Gómez-Moreno Calera,C., Sancho Sanz,J. (Eds.), Estructura de proteínas. Ariel, Barcelona, pp. 63-87.
- González-Rubio,C., Ferreira-Cerdán,A., Ponce,IM., Arpa,J., Fontán,G., López-Trascasa,M., 2001. Complement Factor I deficiency associated with recurrent meningitis coinciding with menstruation. *Arch Neurol.* 58, 1923-1928.
- Hasty,LA., Lambris,JD., Lessey,BA., Pruksananonda,K., Lyttle,CR., 1994. Hormonal regulation of complement components and receptors throughout the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 170, 168-175.
- Hegasy,GA., Willhoeft,U., Majno,SA., Seeberger,H., Zipfel,PF., Hellwage,J., 2003. Pig complement regulator factor H: molecular cloning and functional characterization. *Immunogenetics.* 55, 462-471.
- Hobbs,HH., Brown,MS., Goldstein,JL., 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1992, 445-466.
- Hogasen,K., Jansen,JH., Mollness,TE., Hovdenes,J., Harboe,M., 1995. Hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II is caused by factor H deficiency. *J Clin Invest.* 95, 1054-1061.
- Hsiung,LM., Barclay,AN., Gagnon,J., Brandon,MR., Porter,RR., 1982. The C3b inactivator is a serine proteinase. *Mol Immunol* 19, 1376 (abstract).
- Janeway,C.Jr., Travers,P., Walport,M., Shlomchik,MJ., 2007 *Immunobiology: The immune system in health and disease*, 6 Edition. Garland science, London.
- Jepsen,HH., Teisner,B., Rasmussen,JM., Svehag,SE., 1989. Reduced erythrocyte CR1 (CD35) receptor function and complement opsonization in Factor I deficient patients is restored by plasma infusion. *Scand J Immunol* 29, 247-255.
- Jiménez de Gregorio,F., 1980 Toledo y su provincia en la guerra de 1808. Instituto Provincial de Investigación y Estudios toledanos, Toledo.
- Kavanagh,D., Kemp,EJ., Mayland,E., Winney,RJ., Duffield,JS., Warwick,G., Richards,A., Ward,R., Goodship,JA., Goodship,T., 2005. Mutations in complement Factor I predispose to development of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 16, 2150-2155.
- Kim,P., Arvan,P., 1998. Endocrinopathies in the Family of endoplasmic reticulum (ER) Storage Diseases: Disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocr Rev.* 19, 173-202.

Kirschfink,M., Binder,R., 1998 Deficiencies in the Alternative Pathway: Factors I and H. In: Rother,K., Till,GO., Hänsch,G. (Eds.), *The Complement System*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 420-424.

Kölbe,K., Diepgen,T., Rukavina,V., Wahn,V., Kalden,JR., 1986. Microheterogeneity and polymorphism of Factor I of the human complement system. *Immunobiology* 173, 462-463.

Krawczak,M., Thomas,NS., Hundrieser,B., Mort,M., Wittig,M., Hampe,J., Cooper,DN., 2007. Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: Nature, distribution and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat* 28, 150-158.

Lachmann,PJ., Müller-Eberhard,HJ., 1968. The demonstration in human serum of "conglutininogen-activating factor" and its effect on the third component of complement. *J Immunol* 100, 691-698.

Leitao,M., Vilela,M., Rutz,R., Grumach,AS., Condino-Neto,A., Kirschfink,M., 1997. Complement Factor I deficiency in a family with recurrent infections. *Immunopharmacology* 38, 207-213.

Mateu,MG., Neira,JL., 2003 Plegamiento de las proteínas y enfermedades relacionadas. In: Gómez-Moreno Calera,C., Sancho Sanz,J. (Eds.), *Estructura de proteínas*. Ariel, Barcelona, pp. 201-230.

Minta,JO., Fung,M., Turner,S., Eren,R., Zemach,L., Rits,M., Goldberger,G., 1998. Cloning and characterization of the promoter for the human complement factor I (C3b/C4b inactivator) gene. *Gene* 208, 17-24.

Miot,S., Marfurt,J., Lach-Trifilieff,E., González-Rubio,C., López-Trascasa,M., Sadallah,S., Schifferli,JA., 2002. The mechanism of loss of CR1 during maturation of erythrocytes is different between Factor I deficient patients and healthy donors. *Blood Cell Mol Dis.* 29, 200-212.

Moestrup,SK., 1994. The alpha 2-macroglobulin receptor and epithelial glycoprotein-330: two giant receptors mediating endocytosis of multiple ligands. *Biochim Biophys Acta.* 1197, 197-213.

Morgan,BP., Marchbank,KJ., Longhi,MP., Harris,CL., Gallimore,AM., 2005. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol Lett.* 97, 171-179.

Morley,BJ., Bartók,I., Späth,PJ., Vyse,TJ., Schneider,PM., Walport,MJ., 1998. Molecular basis of hereditary factor I deficiency. *Mol Immunol.* 35, 344 abstract.

Naked,GM., Florido,M., Ferreira de Paula,P., Vinet,AM., Inostroza,JS., Isaac,L., 2000. Deficiency of Human complement Factor I associated with lowered Factor H. *Clin Immunol.* 96, 162-167.

Nilsson,SC., Karpman,D., Vaziri-Sani,F., Kristoffersson,AC., Salomon ,R., Provot,F., Frémaux-Bacchi,V., Trouw,LA., Blom,AM., 2007. A mutation in Factor I that is associated with atypical Hemolytic Uremic Syndrome does not affect the function of Factor I in complement regulation. *Mol Immunol* 44, 1835-1844.

Nishimukai,H., Tamaki,Y., 1986. I (C3b/C4b inactivator) typing by agarose gel isoelectric focusing and immunoblotting technique. *Hum Hered* 36, 195-197.

Noris,M., Remuzzi,G., 2005. Hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 16, 1035-1050.

Notarangelo,L., Casanova,JL., Conley,ME., Chapel,H., Fischer,A., Puck,J., Roifman,C., Seger,R., Geha,RS., 2005. Primary immunodeficiency diseases: An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest, 2005. *J Allergy Clin Immun.* 117, 883-894.

Nowicki,S., Tassell,AH., Nowicki,B., 2000. Susceptibility to gonococcal infection during the menstrual cycle. *JAMA* 8, 1291-1292.

Nydegger,UE., Lambert,PH., Gerber,H., Miescher,PA., 1974. Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. *J Clin Invest* 54, 297-309.

Pangburn,MK., Schreiber,RD., Müller-Eberhard,HJ., 1977. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein B1H for the cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med.* 146, 257-270.

Pepys,MB., 1974. Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra venom factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. *J Exp Med* 140, 126-145.

Phimister,GM., Whaley,K., 1990 Measurement of complement. In: In: Gooi,HC., Chapel,H. (Eds.), *Clinical Immunology: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, England, pp. 81-109.

Pickering,MC., Cook,HT., Warren,J., Bygrave,AE., Moss,J., Walport,MJ., Botto,M., 2002. Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nat Genet.* 31, 424-428.

Platonov,AE., Belovorodov,VB., 1991. Late complement component deficiency (LCCD) in the URSS: the situation in 1991. *Compl Inflamm* 8, 211 (abstract).

Porteu,F., Fisher,A., Descamps-Latscha,B., Halbwachs Mecarelli,L., 1986. Defective complement receptors (CR1 and CR3) on erythrocytes and leukocytes of Factor I (C3b-inactivator) deficient patients. *Clin Exp Immunol* 66, 471.

Quigg,RJ., Lim,A., Haas,M., Alexander,JJ., He,C., Carroll,MC., 1998. Immune complex glomerulonephritis in C4-and C3-deficient mice. *Kidney Int.* 53, 320-330.

Rasmussen,JM., Jepsen,HH., Teisner,B., Holmskov,NU., Rasmussen,GG., Svehag,SE., 1989. Quantification by ELISA by erythrocyte-bound C3 fragments expressing C3d and/or C3c epitopes in patients with factor I deficiency and with autoimmune diseases. *Vox Sang* 56, 262-269.

Rasmussen,JM., Teisner,B., Jepsen,HH., Svehag,S.-E., Knudsen,F., Kirstein,H., Buhl,M., 1988. Three cases of Factor I deficiency: The effect of treatment with plasma. *Clin Exp Immunol* 74, 131-136.

Reis,ES., Falcao,DA., Isaac,L., 2006. Clinical aspects and molecular basis of primary deficiencies of complement component C3 and its regulatory proteins Factor I and Factor H. *Scand J Immunol* 63, 155-168.

Robberson,BL., Cote,GJ., Berget,SM., 1990. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol.* 10, 84-94.

Rosenfeld,SI., Packman,CH., Leddy,JP., 1983. Inhibition of the lytic action of cell-bound terminal complement components by human high density lipoproteins and apoproteins. *J Clin Invest* 71, 795-808.

Ross,SC., Densen,P., 1984. Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of Neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine (Baltimore)* 63, 243-273.

Sadallah,S., Gudat,F., Laissue,JA., Späth,PJ., Schifferli,JA., 1999. Glomerulonephritis in a patient with complement Factor I deficiency. *Am J Kidney Dis.* 33, 1153-1157.

Sánchez-Corral,P., Bellavia,D., Amico,L., Brai,M., Rodríguez de Córdoba,S., 2000. Molecular basis for factor H and FHL-1 deficiency in an Italian family. *Immunogenetics* 51, 366-399.

Saunders,RE., Abarrategui-Garrido,C., Frémaux-Bacchi,V., Goicoechea de Jorge,E., Goodship,T., López-Trascasa,M., Noris,M., Ponce,IM., Remuzzi,G., Rodríguez de Córdoba,S., Sánchez-Corral,P., Skerka,C., Zipfel,PF., Perkins,SJ., 2007. The interactive Factor H-atypical Hemolytic Uremic Syndrome mutation database and website: Update and integration of Membrane Cofactor Protein and Factor I mutations with structural models. *Hum Mutat* 28, 222-234.

Schifferli,JA., Ng,YC., Peters,DK., 1986. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *The New England Journal of Medicine* 315, 488-495.

Schifferli,JA., Taylor,RP., 1989. Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes. *Kidney International* 35, 993-1003.

Schlaf,G., Demberg,T., Beisel,N., Schieferdecker,HL., Götze,O., 2001. Expression and regulation of complement Factor H and Factor I in rat and human cells: some critical notes. *Mol Immunol* 38, 231-239.

Schröder,M., Kaufman,RJ., 2005. ER stress and unfolded protein response. *Mutat. Res.* 569, 29-63.

Schuh,R., Kremmer,E., Ego,E., Wasiliu,M., Thierfelder,S., 1992. Determination of monoclonal antibody specificity by immunoadsorption and Western blotting. *Journal of Immunological Methods* 152, 59-67.

Segurado,OG., Arnáiz-Villena,A., Iglesias-Casarrubios,P., 1992. Combined total deficiency of C7 and C4B with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 87, 410-414.

Shapiro,MB., Senapathy,P., 1987. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: Sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.* 15, 7155-7174.

Sheerin,NS., Springall,T., Carrol,MC., Hartley,B., Sacks,SH., 1997. Protection against anti-glomerular basement membrane (GBM)-mediated nephritis in C3- and C4-deficient mice. *Clin Exp Immunol* 110, 403-409.

Shiang,R., Divelbiss,JE., Patil,S., Overhauser,J., Wasmuth,JJ., Buetow,KH., 1987. A physical map for the long arm of chromosome 4 using D4S35, D4S1, MTP2P1, ALB, ABP, AFP, GC, INP10, ADH3, EGF, IL2, FGG, FGB and MNS, IF, FGFb. *Cytogenet. Cell Genet.* 46, 691 (Abstract).

Shiang,R., Murray,JC., Buetow,KH., Wasmuth,JJ., Olney,AH., Sanger,WG., Goldberger,G., 1989. Mapping of the human complement Factor I gene to 4q25. *Genomics* 4, 82-86.

Sim,RB., Tsiftoglou,SA., 2004. Proteases of the complement system. *Biochemical Society Transactions* 32, 21-27.

Singer,L., Colten,HR., Wetsel,RA., 1994. Complement C3 deficiency: human, animal, and experimental models. *Pathobiology* 62, 14-28.

Soames,CJ., Sim,RB., 1997. Interactions between human complement components factor H, factor I and C3b. *Biochem J* 326, 553-561.

Solal-Celigny,P., Laviolette,M., Hebert,H., Atkins,PC., Sirois,M., Gertrudelehner-Netsch,G., Delâge,JM., 1982. C3b inactivator deficiency with immune complex manifestations. *Clin Exp Immunol* 47, 197-205.

Tamura,N., Nelson,R., 1967. Three naturally-occurring inhibitors of components of complements in guinea pig and rabbit serum. *J Immunol* 99, 582-589.

Tottori,DH., Hilman,B., Daul,CB., 1992. Concomitant Factor I and IgA deficiencies. *Ann of Allergy* 68, 115. (abstract).

Tsiftoglou,SA., Arnold,JN., Roversi,P., Crispin,MD., Radcliffe,C., Lea,SM., Dwek,RA., Rudd,PM., Sim,RB., 2006. Human complement factor I glycosylation: Structural and functional characterisation of the N-linked oligosaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764, 1757-1766.

Tsiftoglou,SA., Sim,RB., 2004. Human of complement Factor I does not require cofactors for cleavage of synthetic substrates. *J Immunol* 173, 367-375.

Tsiftoglou,SA., Willis,AC., Li,P., Chen,X., Mitchell,DA., Rao,Z., Sim,RB., 2005. The Catalytically Active Serine Protease Domain of Human Complement Factor I. *Biochemistry* 44, 6239-6249.

van Noesel,C., Lankester,AC., van Lier,R., 1993. Dual antigen recognition by B cells. *Immunol Today* 14, 8-11.

Varret,M., Rabès,JP., Collod-Bérout,G., Junien,C., Boileau,C., Bérout,C., 1997. Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res.* 25, 172-180.

Vassiliou,G., 1997. Pharmacological concentrations of suramin inhibit the binding of alpha2-macroglobulin to its cell-surface receptor. *Eur J Biochem* 250, 320-325.

Vassiliou,G., Benoist,F., Lau,P., Kavaslar,GN., McPherson,R., 2001. The low-density lipoprotein receptor-related protein contributes to selective uptake of high-density lipoprotein cholesteryl esters by SW872 liposarcoma cells and primary human adipocytes. *J Biol Chem* 276, 48823-48830.

Verpy,E., Couture-Tosi,E., Tosi,M., 1993. C1 inhibitor mutations which affect intracellular transport and secretion in type I hereditary angioedema. *Behring Inst Mitt* 93, 120-124.

Vyse,TJ., Bates,GP., Walport,MJ., Morley,BJ., 1994a. The organization of the human complement factor I gene (IF): A member of the serine protease gene family. *Genomics.* 24, 90-98.

Vyse,TJ., Morley,BJ., Bartók,I., Theodoridis,EL., Davies,KA., Webster,A., 1996. The molecular basis of hereditary complement Factor I deficiency. *J Clin Invest* 97, 925-933.

Vyse,TJ., Späth,PJ., Davies,KA., Morley,BJ., Philippe,P., Athanassiou,P., Giles,CM., Walport,MJ., 1994b. Hereditary complement Factor I deficiency. *QJM.* 87, 385-401.

Wahn,V., Göbel,U., Rauterberg,EW., Rother,U., Laurell,AB., 1980. Long-term treatment for a patient with C3b inactivator deficiency. *Allergol Immunopathol* 8, 422-428.

Wahn,V., Rother,U., Rauterberg,EW., Day,NK., Laurell,AB., 1981. C3b Inactivator Deficiency: Association with an Alpha-Migrating Factor H. *J of Clin Immunol* 1, 228-233.

Walport,MJ., 2001a. Complement: first of two parts. *New Engl J Med*. 344, 1058-1066.

Walport,MJ., 2001b. Complement: second of two parts. *New Engl J Med*. 344, 1140-1144.

Wessels,MR., Butko,P., Ma,M., Warren,HB., Lage,AL., Carroll,MC., 1995. Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role of complement in both innate and acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11490-11494.

Würzner,R., Witzel-Schlömp,K., Tokunaga,K., Fernie,BA., Hobart,MJ., Orren,A., 1998. Reference typing report for complement components C6,C7 and C9, including mutations leading to deficiencies. *Exp Clin Immunogenetics* 15, 268-285.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A:

González-Rubio,C., Ferreira-Cerdán,A., Ponce,IM., Arpa,J., Fontán,G., López-Trascasa,M., 2001. Complement Factor I deficiency associated with recurrent meningitis coinciding with menstruation. Arch Neurol. 58, 1923-1928.

En este artículo se describen los datos clínicos y tratamientos así como los datos de laboratorio que se han obtenidos en la propositus de la Familia 1. Estos datos se comentan en esta tesis.

Anexo B:

Saunders,RE., Abarrategui-Garrido,C., Frémaux-Bacchi,V., Goicoechea de Jorge,E., Goodship,THJ., López-Trascasa,M., Noris,M., Ponce Castro,IM., Remuzzi,G., Rodríguez de Córdoba,S., Sánchez-Corral,P., Skerka,C., Zipfel,PF., Perkins,SJ., 2007. The interactive Factor H-atypical hemolytic uremic syndrome mutation database and website: Update and integration of membrane cofactor protein and factor I mutations with structural models. Hum Mutat. 28, 222-234.

En este artículo se muestra la creación de una base de datos que recoge las mutaciones que se han encontrado en pacientes con Síndrome Urémico Hemolítico, y que afectan a las proteínas reguladoras Factor H, MCP y Factor I. Además, también se describen otras mutaciones en Factor I que causan deficiencia total, entre las que se encuentran las mutaciones que hemos encontrado en nuestras dos familias españolas.

Anexo C*:

Ponce,IM., Caballero,T., Reche,M., Piteiro,AB., López-Serrano,MC., Fontán,G., López-Trascasa,M., 2002. Polyclonal autoantibodies against C1 inhibitor in a case of acquired angioedema. Ann Allerg Asthma Im. 88, 632-637.

En este artículo se describen las características de los autoanticuerpos producidos frente al inhibidor de C1 en un paciente con angioedema adquirido.

* Esta publicación no tiene relación con el tema de esta tesis, pero se realizó durante el período de la misma.