

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO:  
BASES MOLECULARES Y MODELOS ANIMALES**

TESIS DOCTORAL

**ELENA GOICOECHEA DE JORGE**

Madrid, 2007

## **ABSTRACT**

Hemolytic uremic syndrome (HUS) is a major cause of acute renal failure in children. HUS is a microvasculature disorder clinically defined by thrombocytopenia, microangiopathic hemolytic anemia and acute renal failure. In “typical” HUS, the etiologic agent is frequently an infection of the *Escherichia Coli* strain O157:H7, which secretes a potent toxin that inhibits protein synthesis and damages endothelial cells in the microvasculature. Most of these HUS patients evolve satisfactorily, and complete recovery of the renal function is achieved in 2-3 weeks. A poorer prognosis is found in 5-10% of patients with HUS. This “atypical” form of HUS (aHUS) shows no particular relationship with infection, but is frequently associated with immunosuppressive drugs, cancer therapies, oral contraceptives, pregnancy or postpartum. Genetic studies during the last years have shown linkage of aHUS to the regulators of the complement activation (RCA) gene cluster in chromosome 1q32 and identified patients with mutations in the genes for factor H (*CFH*) and membrane cofactor protein (*MCP*). Moreover, mutations in factor I (*IF*), a complement regulator which is localized on chromosome 4, and common polymorphic variants within *CFH* and *MCP* genes have been identified to be associated with aHUS.

In this thesis, the molecular basis of aHUS has been investigated. During the first part of the study, we wanted to investigate the genetic factors associated with aHUS in the Spanish aHUS registry. Mutational screening of complement regulatory genes revealed 16% of aHUS patients carrying mutations in *CFH*, 12% in *MCP* and 5% in *IF* gene. Apart from mutations in complement regulators, we analyzed the contribution of common polymorphic variants in association studies and we proposed the possible biological implication.

Despite these advances in our understanding of the molecular basis of aHUS, no genetic defect has yet been found in two-thirds of aHUS patients, suggesting the existence of additional genetic factors that predispose to aHUS. Thus, a second part of the thesis has been focused in the search of novel candidate genes. In this context, we have identified aHUS patients with gain-of-function mutation in factor B, an activator of the alternative complement pathway. This finding reinforces the idea that complement activation, due to either a defective regulation of the activation or an abnormally increased activity of the alternative pathway enzymes, may be impaired in aHUS patients.

Taking advantage of our knowledge and experience in the genetic factors contributing in the development of aHUS, we generated the first animal model of the

disease. This transgenic mouse let us the possibility to establish *in vivo* the genotype-phenotype correlation of factor H and to study the contribution of the complement system in the development of aHUS. We could confirm the hypothesis that to generate aHUS is necessary the combination of effective plasma C3 regulation and defective regulation on renal endothelium.

## **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico.
aHUS	<i>Atypical hemolytic uremic syndrome.</i>
ARN	Ácido ribonucleico.
BSA	<i>Bovine serum albumin.</i>
CR1	<i>Complement receptor 1.</i>
C4BP	<i>C4b-binding protein.</i>
DAF	<i>Decay accelerating factor.</i>
dNTPs	Deoxinucleotidotrifosfato.
EDTA	<i>Ethylendiamine-tetracetic acid.</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunoadsorbent assay.</i>
h.	Horas.
<i>HF1</i>	Gen codificante de factor H.
HUS	<i>Hemolytic uremic syndrome.</i>
<i>IF</i>	Gen codificante de factor I.
Kb	Kilobases.
MAC	<i>Membrane attack complex.</i>
MCP	<i>Membrane cofactor protein.</i>
min.	Minuto.
Oligo	Oligonucleótido o cebador de PCR.
pb	Pares de bases.
PBS	Tampón fosfato salino.
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction.</i>
PEG	Polietilenglicol.
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro.
RCA	<i>Regulators of complement activation.</i>
RPS	Resonancia de plasmón de superficies.
ARNm	ARN mensajero.
rpm.	Revoluciones por minuto.
SCR	<i>Short consensus repeat.</i>

SDS	Dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida en presencia de SDS.
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism.</i>
TAE	Tampón tris-acetato-EDTA.
t.amb.	Temperatura ambiente.
UTR	<i>Untranslated region.</i>
V	Voltio.



## **ÍNDICE**



## ÍNDICE

### INTRODUCCIÓN.

<b>1. EL SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.....</b>	<b>2</b>
2.1. Vías de activación.....	3
2.2. Fase lítica.....	4
2.3. Control del sistema del complemento.....	7
2.4. Regulación de la convertasa de C3 por las proteínas del RCA.....	9
2.4.1. Aceleración de la disociación de la convertasa de C3.....	9
2.4.2. Proteólisis de C3b por factor I.....	9
2.5. Factor H .....	11
2.6. Proteína cofactor de membrana o MCP .....	12
2.7. Factor I .....	13
2.8. Factor B .....	13
<b>3. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS DE PREDISPOSICIÓN AL aHUS .....</b>	<b>14</b>
<b>4. DESREGULACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN EL aHUS.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	
1. Cultivos celulares .....	19
1.1. Líneas celulares .....	19

1.2. Transfecciones transitorias .....	19
1.3. Transfecciones estables .....	19
1.4. Ensayo de la luciferasa .....	20
1.5. Ensayo de la $\beta$ -galactosidasa .....	20
1.6. Ensayo de unión a células HUVEC .....	21
2. Purificación de proteínas .....	21
2.1. Purificación de factor H de ratón .....	21
2.2. Purificación de C3 de ratón .....	22
2.3. Purificación de la proteína FH $\Delta$ 16-20 a partir del plasma-EDTA de los ratones transgénicos .....	23
2.4. Purificación de factor B humano .....	23
3. Generación de C3b de ratón .....	23
4. Ensayos de ELISA .....	24
4.1. Protocolo general .....	24
4.2. Cuantificación de factor H de ratón .....	24
4.3. Cuantificación de C3 de ratón .....	25
4.4. Cuantificación de Factor B humano .....	25
4.5. Cuantificación de factor H humano .....	25
5. Electroforesis en geles de acrilamida y ensayos de Western Blot .....	26
6. Ensayo de la actividad cofactora de factor H en fase fluida .....	27
7. Análisis por resonancia en plasmón de superficies de la formación y disociación de la convertasa de C3 .....	27
8. Anticuerpos .....	28
9. Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica .....	28
10. Extracción de ADN genómico a partir de colas de ratones .....	29
11. Amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de los productos .....	30
12. Análisis de SNPs mediante discriminación alélica .....	36
13. Plásmidos .....	36
13.1. Construcción pCI-Neo-cDNA factor H ratón.....	37
13.2. Construcción pCI-Neo-cDNA factor B humano.....	37

13.3. Construcciones en el vector pXP2 de los promotores de FH, MCP y DAF.....	37
14. Pacientes de síndrome hemolítico urémico atípico .....	37
15. Mutagénesis dirigida .....	40
16. Ratones transgénicos.....	41
16.1. Construcción de la proteína mutante FH $\Delta$ 16-20 y su producción en células eucariotas.....	41
16.2. Desarrollo de la construcción para la transgénesis .....	42
16.3. Genotipado de los ratones transgénicos .....	43
16.4. Detección de FH $\Delta$ 16-20 en plasma .....	43
16.5. Estudios Histológicos .....	44
16.6. Valoración de la función renal y de los parámetros hematológicos.....	44
17. Recursos Bioinformáticos.....	45

## RESULTADOS

1. Factores genéticos asociados al aHUS.....	46
1.1. Mutaciones en genes reguladores del complemento.....	46
1.2. Variantes polimórficas del RCA asociados al aHUS.....	50
1.2.1. Análisis de polimorfismos en el gen <i>CFH</i> y en el gen <i>MCP</i> .....	50
1.2.2. Organización de haplotipos de las variantes polimórficas del gen <i>CFH</i> .....	51
1.2.3. Caracterización de la actividad transcripcional de la región promotora del gen <i>CFH</i> y del gen <i>MCP</i> en células HEK293.....	55
2. Factor B: un nuevo gen de susceptibilidad al aHUS.....	58

2.1. Identificación de un subgrupo de pacientes aHUS con evidencia de activación por la vía alternativa.....	58
2.2. Identificación de mutaciones en factor B en pacientes con activación de la vía alternativa.....	60
2.3. Situación de las mutaciones F286L y K323E en factor B.....	62
2.4. Caracterización funcional de las mutaciones F286L y K323E.....	63
2.5. La penetrancia de la enfermedad en portadores de mutaciones de factor B está modulada por otros alelos de riesgo del complemento.....	68
<b>3. Construcción de un modelo animal del aHUS.....</b>	<b>72</b>
3.1. Generación de los ratones transgénicos: CFH <sup>-/-</sup> . FHΔ16-20 y CFH <sup>+/-</sup> . FHΔ16-20.....	73
3.2. Caracterización <i>in vitro</i> de la proteína FHΔ16-20.....	74
3.2.1 La proteína FHΔ16-20 mantiene su actividad reguladora intacta <i>in vitro</i> .....	74
3.2.2 La proteína FHΔ16-20 tiene una capacidad de unión a heparina menor que la proteína de factor H silvestre.....	75
3.2.3 La proteína FHΔ16-20 tiene una capacidad de unión a células HUVEC menor que la proteína de factor H silvestre .....	76
3.3. Análisis del fenotipo del ratón Cfh <sup>-/-</sup> . FHΔ16-20.....	77
3.3.1. Niveles plasmáticos de FHΔ16-20.....	77
3.3.2. La proteína FHΔ16-20 es capaz de regular <i>in vivo</i> la activación del complemento en fase fluida.....	78
3.3.3. La histología renal en los ratones Cfh <sup>-/-</sup> . FHΔ16-20 demuestra la presencia de microangiopatía trombótica.....	80
3.3.4. La proteína FHΔ16-20 no es capaz de regular <i>in vivo</i> la activación del sistema del complemento sobre el endotelio renal.....	80
3.3.5. Análisis de parámetros asociados al síndrome hemolítico urémico.....	82

3.3.6. Análisis de ratones $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20 con baja expresión de factor H.....	83
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
1. Factores de predisposición al síndrome hemolítico urémico (HUS)...	85
2. Modelo animal del síndrome hemolítico urémico .....	92
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>98</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO</b>	





# **INTRODUCCIÓN**



## **1. EL SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO (HUS).**

El síndrome hemolítico urémico (HUS; MIM 235400) es una enfermedad de la microvasculatura definida clínicamente por anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia, que afecta preferentemente a los riñones y se manifiesta con hematuria, oligoanuria y fracaso renal.

La forma más frecuente de HUS se asocia preferentemente con infecciones de la cepa de E.Coli O157:H7 y es una de las causas principales de fracaso renal agudo en niños (Brandt et al., 1994; Tarr et al., 2005). Esta bacteria se transmite por vía oral y se une al epitelio de la mucosa intestinal, donde invade las células, se replica y finalmente las destruye provocando diarrea hemorrágica. Por otra parte, la cepa O157:H7 secreta verocitotoxinas (toxinas sigma) que entran en la circulación sistémica, interaccionan con receptores globotriaosilceramida (Gb3) de las células endoteliales e inhiben la síntesis proteica en el endotelio vascular. Las células endoteliales de los glomérulos de los riñones son la primera diana de las verocitotoxinas, por ser particularmente ricas en los receptores del tipo Gb3. Este fenómeno origina un estado protrombótico que parece estar implicado en el desarrollo de la trombosis microangiopática y el HUS (revisado en (Moxley, 2004; Richards et al., 2002).

La gran mayoría de los pacientes con esta presentación típica de la enfermedad tienen una evolución favorable, recuperando la función renal en su totalidad al cabo de las dos o tres semanas y sin secuelas permanentes. Tan solo una pequeña proporción de individuos con HUS típico, presentan una mala evolución y progresan a una enfermedad renal crónica llegando incluso a la muerte.

En contraste con estos casos típicos, existe un grupo de pacientes con HUS no asociado a diarrea (5-10% del total), con un pronóstico más grave y una elevada mortalidad. Esta forma "atípica" del HUS (aHUS) engloba a un grupo muy heterogéneo de pacientes con una etiología variada, y suele afectar a personas adultas, o bien, a niños muy pequeños. Entre los supervivientes de este grupo, la mitad tienen recurrencias incluso después de una recuperación completa tras el primer episodio y la mayoría progresa a insuficiencia renal terminal (Remuzzi and Ruggenti, 1998).

En general, el aHUS no muestra una relación particular con infecciones. Sin embargo, tiende a asociarse con tratamientos inmunosupresores o anticancerígenos, con el uso de anticonceptivos orales, con el embarazo o con el periodo posparto (Kniaz et al., 1992; Moake and Byrnes, 1996; Sutor et al., 1999). El hecho de encontrar casos

familiares de aHUS, con patrones de herencia autosómica tanto dominante como recesiva, sugirió la posibilidad de que existieran factores genéticos de predisposición a la enfermedad.

Durante muchos años se ha implicado al sistema del complemento con la fisiopatología del HUS. Las primeras evidencias surgieron en el año 1975, con la descripción de casos de aHUS que presentaban niveles reducidos de C3 plasmático, que es el componente principal del complemento (Kaplan et al., 1975). Posteriormente, esta idea se vió reforzada cuando se identificaron pacientes de aHUS con deficiencia en la proteína plasmática reguladora del complemento factor H (Thompson and Winterborn, 1981). Estas observaciones, junto con los depósitos de C3 en los glomérulos y arteriolas, y el incremento en los niveles plasmáticos de los productos de activación del complemento (C3a y C5a) característicos de estos pacientes, sugerían una activación descontrolada del complemento y una regulación defectuosa del mismo.

Sin embargo, ha sido recientemente cuando se ha demostrado una asociación genética entre la enfermedad y el sistema de complemento. Como se comentará más adelante, un 30-40% de los pacientes con aHUS presentan mutaciones en los genes que codifican para las proteínas reguladoras del complemento factor H (Caprioli et al., 2001; Caprioli et al., 2003; Manuelian et al., 2003; Perez-Caballero et al., 2001; Richards et al., 2001; Warwicker et al., 1998), MCP (Richards et al., 2003) y factor I (Fremaux-Bacchi et al., 2004; Kavanagh et al., 2005). El descubrimiento de esta asociación, ha permitido profundizar en el conocimiento de las bases moleculares del aHUS.

## **2. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.**

El sistema del complemento es el principal componente de la inmunidad innata y es también un importante mecanismo impulsor de la inmunidad adquirida. Aunque originalmente se propuso este sistema como un mero "complemento" a la inmunidad mediada por anticuerpos, hoy se sabe que este sistema está implicado en multitud de procesos (revisado en (Law and Reid, 1995):

- Defensa frente a infecciones:
  - Opsonofagocitosis
  - Reclutamiento y activación de fagocitos en el lugar de la infección.

- Lisis del patógeno.
- Participación en la respuesta inmune adquirida:
  - Incremento en la respuesta inmune mediada por anticuerpo.
  - Participación en el establecimiento de la memoria inmunológica.
- Eliminación de inmunocomplejos y de células apoptóticas.

El sistema del complemento está constituido por más de 30 proteínas que están presentes en el plasma y en las superficies celulares. La activación del sistema del complemento se pone en marcha a través de tres posibles vías: la vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa (figura 1) (Walport, 2001a, b). Estas vías de activación difieren en el tipo de molécula activadora y en las proteínas implicadas, pero comparten un mecanismo común basado en la activación secuencial de zimógenos de serin proteasas. Se produce así una reacción en “cascada” donde la señal se amplifica en cada paso de fragmentación, dado que cada proteasa es capaz de romper varias moléculas de su sustrato.

Tras esta primera fase de activación, tiene lugar una fase lítica, durante la cual los componentes del complemento se ensamblan para dar lugar a la estructura del poro lítico, denominado complejo de ataque a la membrana (MAC), el cual puede causar la lisis celular. Durante la fase lítica, los componentes del complemento se unen de una forma ordenada debido a la formación de nuevos puntos de unión, en lugar de ser activados por fragmentación de zimógenos (**figura 1**).

## **2.1. Vías de activación.**

Vía Clásica: Como su nombre indica, la vía clásica es la primera vía que se descubrió. La molécula activadora es un complejo antígeno-anticuerpo y las proteínas implicadas son: el complejo multimolecular C1 (una molécula de C1q y dos de C1r y C1s) (Arlaud et al., 2002a; Arlaud et al., 2002b), C4 y C2. La unión de los dominios globulares de C1q con la porción Fc de las inmunoglobulinas, especialmente IgG e IgM, inician una serie de cambios conformacionales y enzimáticos dentro del complejo. Estos cambios van a permitir la activación de C1s, que hidrolizará a C4 y C2 desembocando en la formación del complejo C4b2b o convertasa de C3 sobre la superficie activadora. Este complejo corta a C3 originando C3a y C3b. La unión del fragmento C3b en la convertasa de C3

origina el complejo C4b2b3b o convertasa de C5. Este complejo genera moléculas de C5b que participa en la fase lítica del sistema del complemento.

Vía de las lectinas: En esta vía las moléculas activadoras son residuos de manosa presentes en la superficie de algunos microorganismos (Fujita et al., 2004). La iniciación ocurre por un complejo homólogo a C1 que contiene proteínas de unión a manosa (MBL), MASP-1 y MASP-2, y que desemboca en la formación de convertasas de C3 y C5 idénticas a las de la vía clásica.

Vía alternativa: Esta vía también es independiente de los complejos antígeno-anticuerpo y proporciona la primera línea de defensa de la inmunidad innata. La vía alternativa está activándose constantemente como consecuencia de un proceso espontáneo, en el cual la molécula de C3 sufre un cambio conformacional que expone un enlace tioéster interno y es capaz de interactuar con una molécula de H<sub>2</sub>O dando lugar a C3-H<sub>2</sub>O (Muller-Eberhard, 1988).

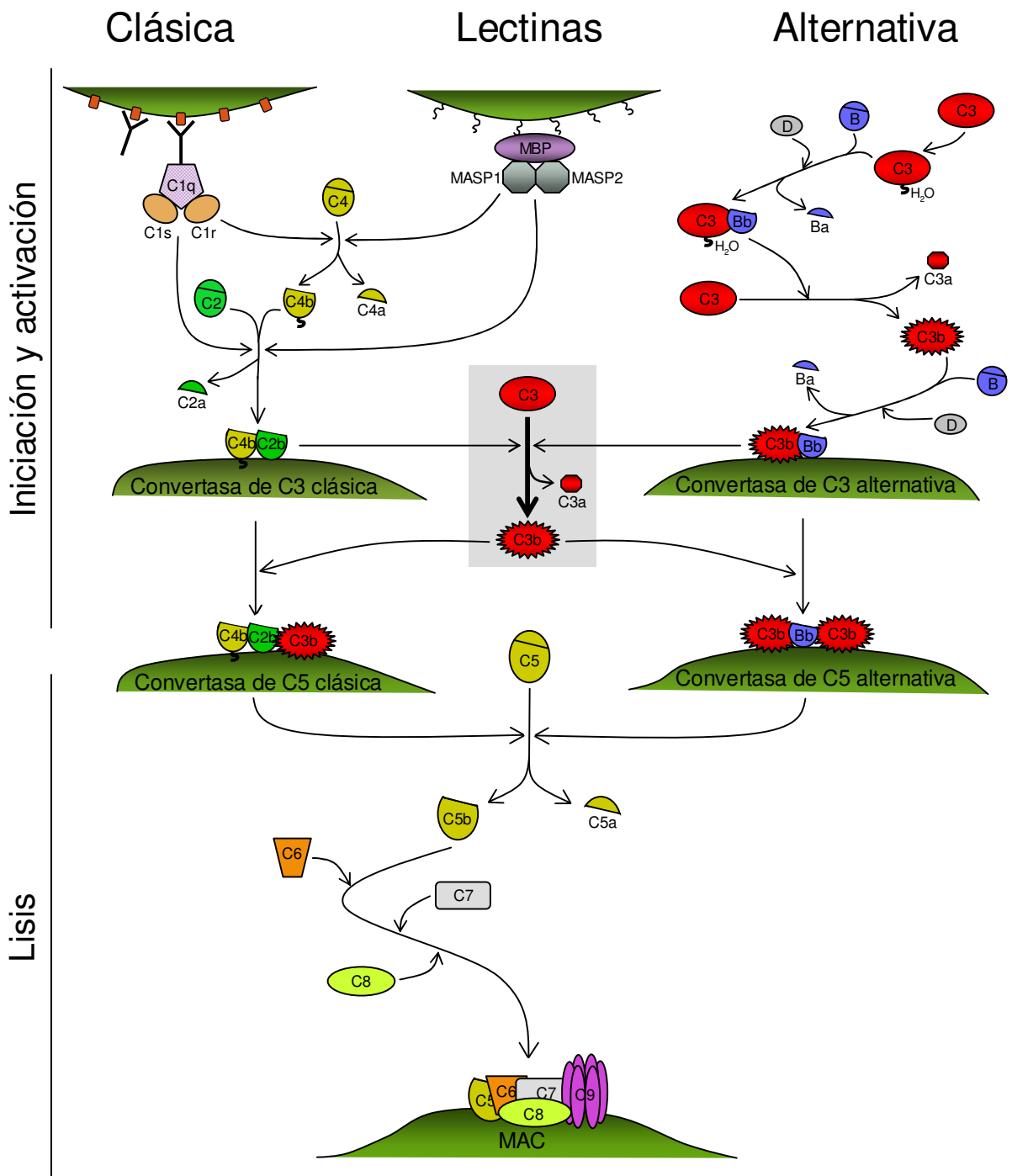
C3-H<sub>2</sub>O es estructuralmente similar a C3b y posee un sitio de unión a factor B (fB). Cuando se une fB, el factor D (fD) le produce un corte proteolítico generando los fragmentos Ba y Bb. El fragmento Ba se libera al medio mientras que el fragmento Bb permanece unido a C3-H<sub>2</sub>O proporcionando el elemento serin proteasa al complejo y constituyendo así la convertasa de C3, que es capaz de unir y proteolizar la molécula de C3 en los fragmentos C3a y C3b. Cabe destacar que la convertasa de C3 de la vía alternativa genera y contiene C3b, originando una amplificación de carácter explosivo que debe ser cuidadosamente controlada.

El C3b resultante podrá unirse covalentemente a las superficies celulares donde podrá tener lugar de nuevo el proceso de unión de fB y su activación dando como resultado la convertasa de C3 de la vía alternativa, C3bBb. La estabilidad de esta convertasa se incrementa cuando se une properdina al complejo. La unión de una segunda molécula de C3b a la convertasa de C3 genera la convertasa de C5 de la vía alternativa, C3bBb3b.

## **2.2. Fase lítica.**

Las tres vías de activación del complemento convergen en la formación de la convertasa de C5, siendo la rotura de C5 por estas convertasas la que inicia la ruta lítica

o terminal (Muller-Eberhard, 1986). En este primer paso se libera la potente anafilotoxina C5a y el fragmento C5b, que se une a la convertasa de C3 unida a la superficie celular. Durante la formación del MAC no tienen lugar cortes proteolíticos, sino que los distintos componentes del complemento se van uniendo de forma secuencial. Después de la unión de C5b a la convertasa de C3 se une C6, C7, C8 y C9. La proteína C9 polimeriza formando un poro en la membrana constituyendo así el complejo de ataque a la membrana maduro que, una vez formado, puede producir la lisis celular (Tschopp et al., 1982).



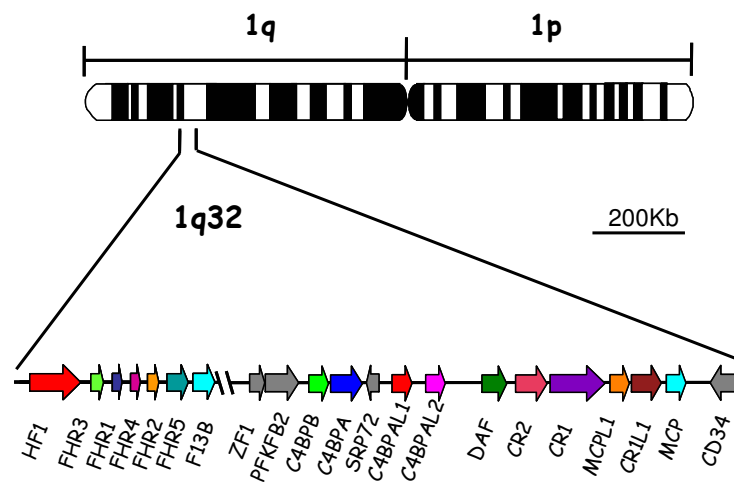
**Figura 1. Representación esquemática de las vías de activación y lisis del sistema del complemento.** El recuadro gris señala la formación de C3b, que es el paso crítico en la activación del complemento. MAC, complejo de ataque a la membrana.



### 2.3. Control del sistema del complemento.

Un sistema efector tan poderoso como el complemento requiere una regulación bien precisa ya que, de lo contrario, su activación podría resultar peligrosa para el propio organismo. Dicha regulación está encaminada a garantizar la efectividad de la activación del complemento contra agentes extraños y, a la vez, proteger a las células del huésped del daño accidental que tal activación podría causarles. Por otro lado, permite el mantenimiento de la homeostasis del sistema, de tal forma que tras una activación se evite el consumo total de sus componentes.

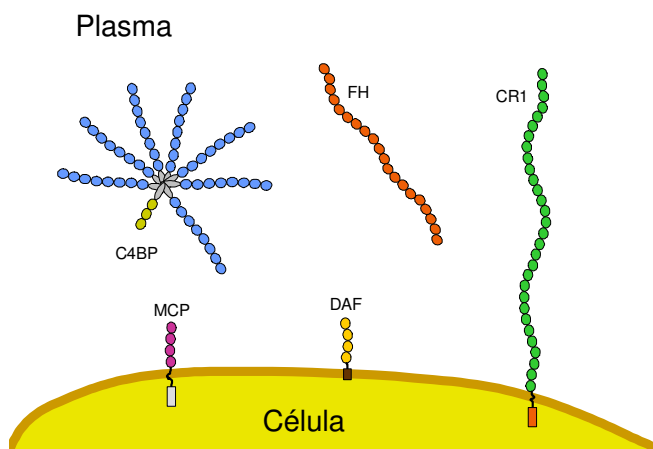
Para conseguir una regulación precisa del complemento, existen numerosas proteínas inhibidoras distribuidas entre el plasma y las superficies celulares, y que actúan a distintos niveles dentro de dicho sistema. Por ejemplo, el C1 inhibidor inhibe la vía clásica y la vía de las lectinas, disociando C1s y C1r de C1q, o MASP1/2 de MBL, respectivamente. Las proteínas CD59, clusterina y vitronectina inhiben el MAC. Las anafilatoxinas C3a, C4a y C5a se controlan rápidamente en plasma por las carboxipeptidasas N y R, que eliminan la arginina del extremo C-terminal de estos fragmentos.



**Figura 2. Estructura genómica del agrupamiento génico RCA en 1q32.** La línea horizontal representa la región genómica del agrupamiento génico RCA. Los genes se indican como flechas coloreadas o grises según estén o no implicados en la regulación del complemento, respectivamente.

El punto de máximo control a lo largo de todo el sistema del complemento se ejerce sobre la convertasa de C3. En este proceso de regulación intervienen numerosas proteínas, cuyos genes están estrechamente ligados dentro del agrupamiento génico denominado “Regulators of Complement Activation” (RCA), localizado en el cromosoma humano 1q32 (Rodríguez de Cordoba et al., 1999; Rodríguez de Cordoba et al., 1985; Weis et al., 1987) (**figura 2**). Las proteínas del RCA están compuestas predominantemente por un número variable de SCRs (*Short Consensus Repeat*), que puede oscilar entre 4 y 30. Se denomina SCR o CCP (*Control Complement Protein*) a un dominio globular característico, compuesto por 60 aminoácidos aproximadamente (Barlow et al., 1992; Barlow et al., 1993).

Del conjunto de proteínas del RCA reguladoras de las convertasas, algunas son proteínas de membrana (CR1, DAF, MCP) que inhiben la activación del complemento sobre las superficies celulares propias (**figura 3**). De esta manera el complemento se activa selectivamente sobre los patógenos, dado que estos no expresan estas moléculas en su superficie.



**Figura 3. Proteínas del RCA inhibitoras de las convertasa de C3.** Las esferas representan los dominios SCR. MCP es *membrane cofactor protein*, DAF es *decay accelerating factor*, CR1 es *complement receptor 1*, C4BP es *C4-binding protein*, FH es factor H.

Por otro lado, dentro del RCA hay proteínas plasmáticas (C4BP y factor H) cuya función consiste en inhibir la activación y el consumo de los componentes del complemento en la fase fluida (**figura 3**). Además, el factor H tiene la capacidad de interactuar selectivamente con las superficies celulares del huésped, protegiéndolas del daño que puede ocasionar la activación del complemento (Fearon, 1978).

A continuación se describirá en mayor detalle la regulación de la convertasa de C3 alternativa (C3bBb), ya que es un punto crítico del sistema del complemento donde se

va a definir el equilibrio entre activación e inhibición del mismo. Así, cualquier perturbación a este nivel podría generar una situación patológica que, como se verá más adelante, ocurre en el caso del síndrome hemolítico urémico.

#### **2.4. Regulación de la convertasa de C3 por las proteínas del RCA.**

La formación y la activación de la amplificación de la convertasa de C3 alternativa están estrechamente reguladas tanto en fase fluida como sobre las superficies celulares. La acción combinada de los reguladores será la que determine el progreso de la reacción de amplificación de la convertasa. Si los reguladores están presentes se evitará el loop de amplificación, y si no lo están, entonces la reacción de amplificación tendrá lugar sin restricciones.

Las proteínas del RCA inhiben las convertasas mediante dos mecanismos, o bien aceleran la disociación de la convertasa, o bien actúan como cofactores del factor I que proteolizará e inactivará la molécula de C3b.

##### **2.4.1. Aceleración de la disociación de la convertasa de C3.**

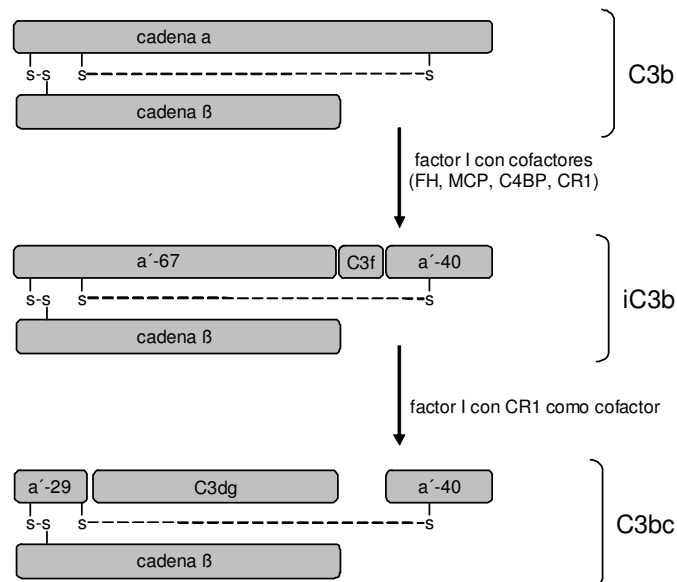
Las convertasas de C3 son de naturaleza inestable y una vez formadas tenderán a disociarse/decaer por si solas. Sin embargo, muchas de las proteínas del RCA pueden acelerar este proceso probablemente mediante la competición con factor B por el mismo sitio de unión sobre el C3b, evitando así la formación de la convertasa. Este mecanismo se deriva de la capacidad de ciertas proteínas del RCA para unir los mismos residuos en la molécula de C3b a los que se une el factor B (Lambris et al., 1996; Oran and Iseman, 1999). Además, parece que se requiere de la interacción de las proteínas del RCA con factor B para que tenga lugar la disociación de la convertasa, ya que existen distintas regiones en factor B que no se unen a C3b, y siguen siendo sensibles a la inhibición por las proteínas del RCA (Hourcade et al., 2002).

##### **2.4.2. Proteólisis de C3b/C4b por factor I.**

La proteólisis del C3b por factor I también inhibe la convertasa de C3. El factor I es una serin proteasa compuesta por una cadena ligera, que contiene el dominio serin proteasa, y una cadena pesada (Catterall et al., 1987). Una característica inusual del

factor I es que circula en su forma activa en el plasma. Sin embargo, el factor I no corta al C3b, del que es muy específico, a no ser que esté presente alguna proteína del RCA que actúe como cofactor. Curiosamente, el factor I no tiene ningún inhibidor natural, por lo que la presencia o ausencia de las proteínas del RCA parece ser el único mecanismo de regulación (Sim and Tsiftoglou, 2004).

No está del todo claro como las proteínas del RCA son capaces de cambiar la actividad del factor I. Sin embargo, parece ser que la unión previa de las proteínas del RCA al C3b es un requisito fundamental, ya que los mutantes del RCA sin capacidad para unirse, no tienen actividad cofactora. En base a esto se ha propuesto que las proteínas del RCA inducen un cambio conformacional en el C3b que permite su posterior proteólisis por el factor I (Blom et al., 2003).



**Figura 4. Proteólisis del C3b por factor I en presencia de cofactores.** El C3b está compuesto por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  unidas por un puente disulfuro. Los cortes proteolíticos que produce el factor I tienen lugar exclusivamente sobre la cadena  $\alpha$ .

Hay dos sitios de corte del factor I en la cadena  $\alpha$  del C3b (**figura 4**). La proteólisis en cualquiera de los sitios conduce a la inactivación del C3b (iC3b) y ya no será capaz de formar la convertasa de C3. Si la proteólisis tiene lugar en ambos sitios, se libera un fragmento pequeño (C3f), mientras que el resto de las partes del iC3b permanecen

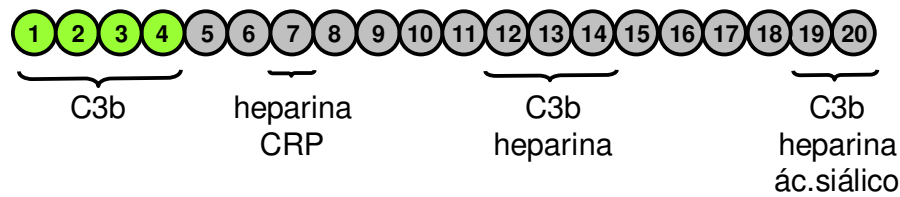
unidas por un enlace disulfuro (Davis et al., 1984; Ross et al., 1982). En caso de que CR1 fuera el cofactor, se produce un corte adicional que libera el fragmento C3dg.

A continuación se explica en más detalle las proteínas del RCA factor H y MCP, así como factor I y factor B, por su especial relevancia en el desarrollo de esta tesis.

## **2.5. Factor H.**

Factor H controla la activación del complemento por la vía alternativa en varios niveles: (1) actúa como cofactor de factor I en la inactivación proteolítica de C3b, (2) compite con factor B por la unión a C3b y (3) acelera la disociación de la convertasa de C3 de la vía alternativa (Pangburn et al., 1977; Weiler et al., 1976; Whaley and Ruddy, 1976). Es una glicoproteína plasmática de unos 150 kDa, compuesta por 20 dominios SCR (Ripoche et al., 1988), que se expresa principalmente en el hígado y alcanza concentraciones plasmáticas que varían entre 110-615 µg/ml dependiendo de los individuos (Esparza-Gordillo et al., 2004; Morris et al., 1982). Este regulador se ha caracterizado ampliamente y se han definido distintas regiones que participan en la interacción con C3b, heparina y polianiones (Fearon, 1978; Kazatchkine et al., 1979; Pangburn et al., 1983).

Como se puede observar en la **figura 5**, el factor H posee tres sitios en los que se puede unir C3b. El primero se sitúa en los SCR1-4, que es la región donde se localiza la capacidad cofactora de la molécula y que es fundamental para regular el complemento, tanto en fase fluida (plasma) como sobre las superficies celulares. El segundo sitio se localiza en el SCR7 y se piensa que participa de forma secundaria en la regulación del complemento sobre superficies. Por último, hay un tercer sitio de unión a C3b en el extremo C-terminal de la molécula (SCR19-20) que se considera esencial para regular el complemento sobre las superficies celulares. Además, se han definido tres regiones de interacción con heparina (SCR7, SCR13 y SCR19-20) y una región de interacción con polianiones en la parte C-terminal de la molécula (revisado en (Rodríguez de Cordoba et al., 2004)).



**Figura 5. Dominios funcionales en la molécula de FH.** Los 20 SCRs de la proteína se representan como esferas. Se indican tres sitios de unión con C3b, tres sitios de unión a heparina, el sitio de unión a ácido siálico en el extremo C-terminal de la molécula y el sitio de unión a CRP en el SCR7. En verde se indican los SCRs implicados en la actividad cofactora de factor H.

El gen que codifica para factor H se denomina *CFH* y está contenido en el agrupamiento génico RCA en 1q32 (**figura 2**). *CHF* abarca una región genómica de 95 Kb y está compuesto por 23 exones (Perez-Caballero et al., 2001). Este gen, por procesamiento alternativo de su transcrito, puede dar lugar a otra proteína denominada factor H-like 1 (FHL-1). Esta proteína plasmática está constituida por los 7 primeros SCRs de factor H y una cola hidrofóbica de 4 aminoácidos (SFTL), que no está presente en factor H, y que está codificada por un exón adicional (Zipfel and Skerka, 1994).

Aparte de estas dos moléculas, existen otras cinco proteínas relacionadas con factor H, denominadas “factor H-related” 1-5 (McRae et al., 2005; Zipfel and Skerka, 1994; Zipfel and Skerka, 1999). Estas proteínas tienen una alta homología de secuencia con factor H, incluso algunas de ellas son capaces de interaccionar con C3b y tienen actividad cofactora. Sin embargo, la función específica de estas proteínas relacionadas con factor H se desconoce (Díaz-Guillén et al., 1999; McRae et al., 2002; Zipfel et al., 1999; Zipfel and Skerka, 1994).

## **2.6. Proteína cofactor de membrana o MCP (*Membrane Cofactor Protein*).**

Como su nombre indica, MCP es una proteína de membrana que posee actividad cofactora para la inactivación proteolítica de C4b y C3b por el factor I (Seya and Atkinson, 1989). MCP tiene una estructura que consiste en 4 SCRs localizados en la porción extracelular, un dominio STP rico en serinas, treoninas y prolina, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica (Post et al., 1991).

MCP se expresa en la superficie de la mayoría de las células, a excepción de los eritrocitos, y es un importante mecanismo de defensa del organismo frente al daño producido por el complemento (Liszewski et al., 1991).

## **2.7. Factor I.**

Aunque factor I participa activamente en la regulación de la activación del complemento, es una proteína cuyo gen no se localiza en el agrupamiento génico RCA. El gen *IF* se encuentra situado en la región cromosómica 4q25 y codifica para una proteína perteneciente a la familia de las serin proteasas, que está implicada en la inactivación proteolítica de los productos de activación del complemento C4b y C3b (Catterall y col., 1997). La función de factor I depende de varios cofactores: el corte en C4b requiere de la proteína C4BP (C4-binding protein) y el corte de C3b en fase fluída depende del factor H. CR1 y MCP actúan de cofactores de factor I sobre las superficies celulares. De esta forma, el factor I impide la formación de la convertasa de C3 regulando el *loop* de amplificación de la vía alternativa.

## **2.8. Factor B.**

El factor B es una serin proteasa de elevada especificidad, cuyo gen (*BF*) se localiza en el cromosoma 6q24, junto con la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En su forma activa cataliza el paso central de amplificación de la activación del complemento. Cuando el factor B se une al C3b, o a su homólogo en fase fluida C3b-H<sub>2</sub>O, es susceptible de la proteólisis por el factor D, que libera el fragmento Ba y activa la serin proteasa del fragmento Bb, dando lugar a la convertasa de la vía alternativa C3bBb.

El factor B consta de 3 dominios SCR en su extremo N-terminal, conectados a un dominio del factor von Willebrand tipo A (vWfA) a través de un enlace de 45 aminoácidos, y un dominio serin proteasa (SP) en el extremo C-terminal, que aporta el centro catalítico. Los dominios vWfA y SP forman parte del fragmento Bb, mientras que los SCRs y el enlace constituyen el fragmento Ba. La unión del factor B al C3b depende de elementos en el fragmento Ba y del motivo de un sitio de adhesión dependiente del ión metal Mg<sup>2+</sup> (MIDAS) situado en el dominio vWfA del fragmento Bb.

Mediante experimentos de mutagénesis dirigida, se han identificado una serie de residuos en el dominio vWfA, que son críticos para la interacción entre factor B y C3b. En particular, la mutación D279G, que se localiza en las proximidades del sitio de unión de  $Mg^{2+}$  en el dominio vWfA, provoca una resistencia mayor a la disociación por las proteínas reguladoras factor H, DAF o CR1, y aumenta la afinidad por el C3b y la estabilidad de la convertasa C3bBb (Hourcade et al., 1999).

### **3. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS DE PREDISPOSICIÓN AL aHUS.**

Desde hace tiempo se planteó que el sistema del complemento podría estar vinculado con la patogénesis del HUS, pero ha sido recientemente cuando se ha establecido una asociación clara entre ambos. En el año 1998, un estudio realizado por Warwicker y *col.* demostró mediante análisis de ligamento que, en dos de los tres pedigrís analizados, el HUS segregaba con la región cromosómica 1q32, donde se localiza el agrupamiento génico RCA. Además, en una de estas familias se identificó una mutación en el gen *CFH* (Warwicker et al., 1998).

Desde entonces diversos estudios genéticos han identificado numerosas mutaciones, normalmente en heterocigosis, en el gen *CHF* en pacientes de aHUS (Caprioli et al., 2001; Perez-Caballero et al., 2001; Richards et al., 2001; Sánchez-Corral et al., 2002 ). Estas mutaciones raramente se asocian con hipocomplementemia o con niveles plasmáticos de factor H reducidos. Curiosamente, la mayor parte de estas mutaciones se localizan en el extremo C-terminal de la molécula (SCRs 16 al 20), un dominio que es crítico para controlar la activación del complemento sobre las superficies celulares (Manuelian et al., 2003; Pangburn, 2002). Experimentos *in vitro* muestran que dichas mutaciones afectan a la capacidad de factor H de interaccionar con C3b depositado sobre las superficies celulares y/o polianiones, disminuyendo la protección de las células ante la lisis del complemento (Sanchez-Corral et al., 2004). Además, dichas mutaciones no afectan a la actividad cofactora de factor H en la inactivación proteolítica de C3b por el factor I en plasma (Sánchez-Corral et al., 2002 ). Estos resultados estarían en consonancia con el hecho de que la mayor parte de los pacientes con aHUS, tienen niveles plasmáticos de C3 y de C4 dentro del rango normal de variación, indicando que se mantiene la homeostasis del sistema.

A lo largo del desarrollo de este trabajo de investigación, se han encontrado mutaciones en otros genes del complemento como *MCP* (Noris et al., 2003; Richards et



al., 2003) y *FI* (Fremeaux-Bacchi et al., 2004), que curiosamente, igual que factor H, también participan en la regulación de la vía alternativa. Como se ha comentado previamente, MCP es un regulador de membrana mientras que factor I es un regulador serin proteasa soluble. La mayor parte de las mutaciones en MCP y en factor I asociadas con el aHUS, dan lugar a una reducción de los niveles de expresión de la proteína, mientras que solo una pequeña proporción de las mutaciones no alteran los niveles de expresión pero afectan a la función de la molécula. En cualquier caso, las proteínas mutantes resultan en una menor protección de las superficies celulares frente a la activación del complemento.

En su conjunto, el análisis derivado de las mutaciones asociadas al aHUS sugiere que, para que se desarrolle la enfermedad, es necesaria la combinación de un sistema del complemento activo junto con un defecto específico en la regulación de la activación del complemento sobre las superficies celulares. Así, ante una situación que dispare la activación del complemento, no se podrá controlar el depósito y la amplificación del C3b en las superficies celulares de la microvasculatura, y provocará el daño y la destrucción del tejido.

Una característica muy común de las mutaciones en factor H, MCP o factor I asociadas al aHUS, es la penetrancia incompleta de la enfermedad en individuos portadores de dichas mutaciones. Por lo tanto, se puede decir que las mutaciones en los reguladores del complemento son necesarias, pero no suficientes, para que se desarrolle la patología. Este hecho sugiere la existencia de factores genéticos adicionales o ambientales de predisposición al aHUS que contribuyan al desarrollo de la enfermedad.

Recientemente, distintos grupos han descrito que SNPs de *CFH* y *MCP* relativamente frecuentes en población control están fuertemente asociados con el aHUS (Caprioli et al., 2003; Esparza-Gordillo et al., 2005; Fremeaux-Bacchi et al., 2005), por lo que aparte de las mutaciones en los genes *CFH*, *MCP* e *IF*, determinadas variantes polimórficas del RCA predisponen al desarrollo de la enfermedad. Resulta interesante además que, en determinadas familias con aHUS en los que hay mutaciones en alguno de los reguladores del complemento segregando con el fenotipo de la enfermedad, solo los individuos enfermos han heredado en un alelo la mutación y en el otro los polimorfismos de riesgo en *CHF* o *MCP*. Mientras que los familiares sanos pero que son portadores de la mutación, no han heredado los polimorfismos asociados a la enfermedad. Por lo tanto, la confluencia de varios factores de susceptibilidad determina

en gran medida la predisposición al aHUS y explica la penetrancia incompleta de la enfermedad en portadores de mutaciones en los genes reguladores del complemento.

#### **4. DESREGULACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN EL aHUS.**

Existen diferentes enfermedades asociadas con un defecto en el control de la vía alternativa del sistema del complemento. Tal es el caso del aHUS (Perez-Caballero et al., 2001; Richards et al., 2001; Warwicker et al., 1998), de la glomerulonefritis membranoproliferativa tipo I y II (MPGN1; MPGN2) (Dragon-Durey et al., 2004; Levy et al., 1986; López-Larrea et al., 1987) y, como se ha descrito recientemente, de la degeneración macular asociada a la edad (AMD) (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005). Curiosamente, hay una asociación entre el factor H y estas tres patologías, por lo se refuerza la idea de que la desregulación del sistema del complemento parece ser la causa de estas enfermedades, aunque se desconoce el mecanismo patológico que conduce a cada una de ellas.

A pesar de que inicialmente se asoció la deficiencia de factor H con el aHUS, hoy en día se sabe que esta es una situación minoritaria dentro del conjunto de pacientes con aHUS. De hecho, el déficit de factor H en el hombre y en el cerdo ocasiona normalmente MPGN2, que es una patología renal con características distintas al aHUS (Dragon-Durey et al., 2004; Høgåsen et al., 1995). De igual forma, el ratón knock-out de factor H desarrolla una glomerulonefritis parecida a la MPGN2 humana (Pickering et al., 2002). Aunque no se sabe mucho de los mecanismos moleculares que conducen a la MPGN2, los ratones deficientes de factor H han permitido demostrar que la activación descontrolada del C3 en el plasma, como consecuencia del déficit de factor H, es esencial para el desarrollo de la enfermedad.

Como se ha comentado anteriormente, las mutaciones asociadas al aHUS raramente resultan en hipocomplementemia o en niveles bajos de factor H en plasma. Por el contrario, provocan una alteración funcional de la molécula que afecta específicamente a la regulación del complemento sobre las superficies celulares, manteniendo intacta la capacidad reguladora en fase fluida.

El hecho de que la deficiencia completa de factor H ocasione MPGN2 y no HUS señala que, aunque ambas patologías implican a la misma molécula, cada enfermedad responde a una situación concreta diferente. En el caso de MPGN2, hay una desregulación masiva del complemento en fase fluida, reduciéndose el C3 plasmático

hasta niveles prácticamente indetectables. En el caso del aHUS, parece necesaria la existencia de un complemento activo en plasma en combinación con una falta de protección de las superficies celulares.

Está descrito que la inactivación del C3b depositado sobre las superficies celulares es más sensible a la disminución de la concentración de factor H y de factor I que la inactivación de C3b en fase fluida (Schreiber et al., 1978). En este contexto, las deficiencias parciales de factor H o de factor I, así como las mutaciones en el extremo C-terminal de factor H, afectarían en primer lugar a la regulación de la activación del complemento sobre las superficies celulares.

En resumen, las mutaciones asociadas al aHUS conducen, en última instancia, a una disminución de concentración “activa” de los reguladores del complemento, o bien por que afectan a los niveles de expresión de la proteína o bien porque alteran la función de la misma. Esta situación de insuficiencia de reguladores no podrá proporcionar una protección eficiente de las superficies celulares, en caso de que tenga lugar una activación del complemento.

**1. Análisis genético de proteínas reguladoras del complemento en el síndrome hemolítico urémico:**

- Cribado mutacional de los genes *CHF*, *IF* y *MCP*.
- Estudio de asociación con genes del RCA.

**2. Búsqueda de nuevos factores genéticos de predisposición al aHUS.**

**3. Desarrollo de un modelo animal del aHUS.**

- Caracterización de relaciones genotipo-fenotipo en el gen *CFH*.

## **1. Cultivos celulares**

### **1.1. Líneas celulares**

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: COS-7 (fibroblastos de riñón de mono verde africano), CHO (fibroblastos de ovario de hámster), HEK 293 (fibroblastos de riñón embrionario humano) y HUVEC (cordón umbilical humano).

Las líneas celulares COS-7 y HEK 293 se crecieron en medio DMEM (Gibco 41966-029) complementado con un 10 % de suero fetal bovino (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2mM L-glutamina (Gibco). La línea celular CHO se cultivó en medio Ham's F12 (Gibco; 21765-029) complementado de igual manera que el medio anterior. Las células HUVEC se crecieron en medio 199 (Gibco) suplementado con un 20% de suero fetal bovino, 10 µg/ml de heparina, 4 µg/ml de ECGFS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y fungizona (1:2000)

### **1.2. Transfecciones transitorias**

Las transfecciones se han realizado utilizando Lipofectina (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante, tal y como se describe brevemente a continuación.

24 horas antes de la transfección, se sembraron 500.000 células por cada placa de 35 mm de diámetro en 4 ml de medio completo. Antes de la transfección, 10 µg de ADN totales se incubaron durante media hora a temperatura ambiente con 24 µl de lipofectina y 156 µl de medio de cultivo sin suplementar. Mientras tanto, las células se lavaron un par de veces con 2 ml de PBS 1x y se les añadieron 2 ml de medio fresco a cada placa. Tras la incubación, se añadieron 800 µl de medio al complejo de ADN-lipofectina y se distribuyó el ml total a cada placa. 16 h más tarde, se substituyó el medio de la transfección por medio completo.

### **1.3. Transfecciones estables**

Las transfecciones estables se han llevado a cabo siguiendo el mismo protocolo utilizado en las transitorias. 24 horas después de la transfección se comenzó la selección con 0.5 mg/ml de G418 (Calbiochem). Se aislaron clones independientes

de cada construcción, se analizaron todos ellos, y se seleccionaron aquellos que producían cantidades mayores de proteína recombinante.

#### **1.4. Ensayo de luciferasa.**

Para realizar el ensayo de la luciferasa se empleó el kit de Promega “Luciferase Assay System” (E1500) y se siguieron las especificaciones del fabricante.

Se sembraron 50.000 células HEK 293 en placas de X mm de diámetro (placas de p24 de falcon) y se dejó estabilizar el cultivo al menos 16 horas antes de realizar la transfección. Tras 24-48 horas después de la transfección, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100µl del buffer de lisis dejándolo actuar durante 15 min a t. amb. y en agitación. Se recogieron los lisados en tubos eppendorf y se centrifugaron 5 min a 4°C a 15.000 rpm. Se prepararon otros tubos eppendorf con 50µl del sustrato de la luciferasa y, justo en el momento de medir la reacción, se les añadieron 20 µl del lisado, se mezcló y se midió la señal quimioluminiscente en un luminómetro TD-20/20 Turner Designs.

Este ensayo, junto con el que se describe a continuación, se realizó con 6 preparaciones diferentes de cada construcción que se quería valorar, cada una de ellas por triplicado, en un total de tres experimentos de luciferasa/β-galactosidasa independientes.

#### **1.5. Ensayo de la β-galactosidasa**

La detección de la actividad β-galactosidasa se llevó a cabo con el kit “Galacto-Light™” (Applied Biosystems; # BL100G) según las indicaciones del fabricante. En primer lugar, se preparó el tampón de la reacción diluyendo el sustrato “Galacton” 1:100 en el tampón disolvente y se dejó equilibrar a t. amb. Después, se incubó 50 µl del tampón de la reacción con 20 µl del lisado a valorar durante una hora. Este lisado procedió de la preparación que se ha descrito en el apartado anterior. Se añaden 100 µl del “acelerador”, se mezcla un poco y se mide rápidamente la señal quimioluminiscente en un luminómetro TD-20/20 Turner Designs.

#### **1.6. Ensayo de unión de factor H de ratón a células HUVEC.**

En este experimento se emplearon plasmas-EDTA de ratones silvestres, de ratones deficientes de FH y de ratones deficientes de factor H pero que expresaban la proteína mutante (FH $\Delta$ 16-20).

El día anterior a la realización del ensayo, se lavaron las células HUVEC con PBS 1x y se dejaron en medio de cultivo sin suero y con un 0.5% de BSA.

Al día siguiente, las células se lavaron dos veces con PBS 1x al 0.5% de BSA y se levantaron incubando 30 min a 37°C con PBS 1x 0.5% BSA y 0.01% de EDTA. Se recogieron en un falcon de 15 ml y se volvieron a lavar. Se centrifugaron a 1200 rpm 8 min y se resuspendieron en 3 ml de PBS 1x 0.5% BSA. Se contaron las células en una cámara New Bauer y se dispensaron unas  $1 \times 10^5$  células por punto del experimento. A continuación, las células se lavaron con PBS 0.5x, se centrifugaron 8 min a 1200 rpm y se retiró todo lo que se pudo del sobrenadante.

Las células se incubaron 1 h a 37 °C con 100  $\mu$ l de los plasmas-EDTA a valorar. Estos plasmas se dializaron previamente contra PBS 0.5x. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 0.5x y 0.5% BSA y se incubaron con 200  $\mu$ l de anticuerpo policlonal de conejo anti-FH de ratón diluido 1:250 durante 30 min a 4°C. Se lavó de nuevo con PBS 0.5x conteniendo 0.5 % de BSA y se añadió 200  $\mu$ l de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con alexa 488 a una dilución 1:1000. Se incubó 30 min a 4°C en oscuridad.

Finalmente, tras un lavado previo con PBS 0.5x, la señal de la alexa se determinó en un citómetro.

## **2. Purificación de proteínas.**

### **2.1. Purificación de factor H de ratón.**

Para purificar factor H de ratón se obtuvieron 100 ml de sangre-EDTA (10 mM) por punción cardíaca de numerosos ratones. La sangre-EDTA se centrifugó 15 min a 4°C y 3000 rpm para obtener el plasma-EDTA, al cual se le añadieron los inhibidores de proteasas PMSF (1mM) y  $\epsilon$ -aca (5mM). El primer paso en la purificación consistió en una precipitación con polietilenglicol (8000) al 7% (peso/volumen). Para ello se fue añadiendo poco a poco el PEG manteniendo el plasma en agitación y a 4°C, y se dejó en estas mismas condiciones O/N. El

precipitado que se obtuvo tras centrifugar a 4°C 15 min a 11000 rpm se resuspendió en PBS y se dializó frente a Tris-HCl 20 mM pH7.4, NaCl 50 mM. El siguiente paso en la purificación consistió en una cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa-Heparina (Heparin 6B Fast Flow, Amershan) previamente equilibrada con el mismo tampón en el que se dializó la muestra. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó exhaustivamente con el tampón de equilibrado, y las proteínas unidas a la columna se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl (75-250mM). Las fracciones recolectadas se analizaron por ELISA, se hizo un pool con aquellas que contenían factor H y se dializó frente a Tris-HCl 20 mM pH 8.6. La muestra se sometió entonces a una cromatografía de intercambio aniónico en una columna de DEAE-Sepharcel equilibrada en Tris-HCl 20 mM pH 8.6. Tras lavar la columna exhaustivamente con el tampón de equilibrado, las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl de 0-300mM. Las fracciones se analizaron de nuevo por ELISA, se hizo un pool con aquellas que contenían factor H, se dializó contra Tris-HCl 20 mM pH7.4, NaCl 50 mM y se pasó de nuevo por una columna de Sepharosa-Heparina con el fin de concentrar la muestra. En este caso el gradiente de NaCl fue de 75-300mM. Finalmente el pool de factor H se dializó frente a Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y se congeló a -80°C hasta el momento de su utilización.

## **2.2. Purificación de C3 de ratón.**

Para purificar C3 de ratón se siguieron los mismos primeros pasos de purificación del factor H de ratón que están descritos en el apartado anterior, una precipitación con PEG al 7% y una columna de Sepharose-Heparina. El C3 no se une a la columna y se recoge en el no retenido. Este se pone a dializar frente a Tris-HCl 20 mM pH 8.6 y se pasa por una columna de DEAE-Sepharcel equilibrada con el mismo tampón de diálisis. Se eluye el C3 aplicando un gradiente lineal de NaCl de 0-300 mM. Las fracciones eluidas se analizan por ELISA, se hace un pool con aquellas que contienen el C3, se pone a dializar frente a Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 50 mM y se pasa por una columna de intercambio aniónico (Mono-Q, Amersham Biosciences) equilibrada con el mismo tampón de diálisis. Tras lavados exhaustivos, las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl de 50-250 mM. Para identificar el C3 se analizaron las fracciones eluidas en gels de SDS-PAGE y se tiñeron con azul de coomassie.



### **2.3. Purificación de la proteína FH $\Delta$ 16-20 a partir del plasma-EDTA de los ratones transgénicos.**

Para poder caracterizar funcionalmente el FH $\Delta$ 16-20 de los ratones transgénicos, se purificó parcialmente la proteína a partir del plasma-EDTA de ratones Cfh $^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 (Knock-out para FH, pero transgénico) o de ratones Cfh $+/+$ . FH $\Delta$ 16-20 (heterocigoto para FH y transgénico). Para ello, 200  $\mu$ l de plasma-EDTA de dichos ratones se sometieron a una cromatografía de afinidad en una columna de sepharosa-heparina (HiTrap Heparina HP; GE Healthcare) previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH7.4, NaCl 50 mM. Tras lavados exhaustivos, las proteínas unidas a la columna se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl de 35 a 250 mM. Se determinó la presencia del FH en las fracciones recogidas por ELISA, obteniéndose dos picos de elución diferentes para el FH silvestre y el FH $\Delta$ 16-20, pudiendo así separar completamente ambas proteínas.

### **2.4. Purificación de factor B humano.**

La purificación de factor B a partir del plasma de pacientes o de individuos sanos, se llevó a cabo en un único paso cromatográfico utilizando una columna de sepharosa con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-factor B humano acoplado (JC1). Tras equilibrar la columna con Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, se pasaron entre 2 y 5 ml de plasma-EDTA. Se lavó la columna con el tampón de equilibrado, seguido de tampón acetato (0.1M, pH 4, NaCl 500 M) y tampón borato (0.1 M pH 8, NaCl 500 mM). Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con 1 ml de glicina 100 mM pH 2.5 seguido del tampón de equilibrado. Para equilibrar el pH de la glicina, se añadieron 20  $\mu$ l de Tris-HCl 2M pH 8 a cada fracción de 500  $\mu$ l eluida. Las fracciones con factor B se identificaron en geles de SDS-PAGE, se hizo un pool y se dializaron frente a Hepes 10 mM pH 7.4, NaCl 50 mM.

## **3. Generación de C3b de ratón**

El C3b es el resultado de un corte proteolítico en la cadena  $\alpha$  de C3 que da lugar a los fragmentos C3a y C3b. El C3 de ratón previamente purificado a partir de

plasma-EDTA (descrito en el apartado 3.2.2) se incuba con tripsina durante 2 min a 37°C. Posteriormente se inactiva la tripsina con soibitin y se carga una parte de la muestra en un gel SDS-PAGE al 8% para comprobar que la proteólisis ha funcionado correctamente.

#### **4. Ensayos de ELISA.**

##### **4.1. Protocolo general.**

En este ensayo se utilizan placas de 96 pocillos (COSTAR, Cambrigde MA) las cuales se tapizan con 100 µl de anticuerpo policlonal diluido en NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.5 durante toda la noche a 4°C. En todos los pasos sucesivos se utilizan siempre 100 µl por pocillo. La placa se lava una vez con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM y Tween-20 0.2%) y se satura durante 1 h a temperatura ambiente con BSA al 1% en tampón de lavado. A continuación, tras dos lavados consecutivos, se añaden las muestras a cuantificar debidamente diluidas en 1% BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Como referencia para la cuantificación, se incluyen junto con las muestras a valorar, diluciones seriadas de una muestra control de concentración conocida. Después de cuatro lavados se añade el anticuerpo primario diluido en presencia de BSA al 1% y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. Se lava la placa 4 veces, se añade el anticuerpo secundario diluido en presencia de BSA al 1% y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Tras 5 lavados, la placa se revela con una solución que contiene 4 pastillas/placa del sustrato OPD (DAKO A/S, Dinamarca) y 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, en 12 ml de Tris-Cl 50 mM pH7.6. Tras varios minutos de incubación la reacción se para con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M y se mide la absorbancia a 492 nm en un lector de placas de ELISA.

##### **4.2. Cuantificación de factor H de ratón.**

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el protocolo general con los anticuerpos mencionados a continuación.

Para sembrar la placa se utilizó una dilución 1:1500 de un anticuerpo policlonal de cabra anti-factor H de rata (cedido por el Dr. M. Daha, Holanda). Como

anticuerpo primario se empleó un anticuerpo policlonal de conejo anti-factor H de ratón (fracción  $\gamma$ -globulina) a una dilución 1:250. Como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (DAKO A/S, Dinamarca) a una dilución 1:1000.

#### **4.3. Cuantificación de C3 de ratón.**

Se siguió el mismo procedimiento señalado en el protocolo general con los anticuerpos descritos a continuación.

Para sembrar la placa se utilizó una dilución 1:1000 de un anticuerpo policlonal de cabra anti-C3 de ratón. Como anticuerpo primario se empleó un anticuerpo policlonal de conejo anti-C3 humano a una dilución 1:1000. Como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (DAKO A/S, Dinamarca) a una dilución 1:1000.

#### **4.4. Cuantificación de Factor B humano.**

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el protocolo general con los anticuerpos descritos a continuación.

Para sembrar la placa se utilizó una dilución 1:1000 de un anticuerpo policlonal de cabra anti-factor B humano (NSC). Como anticuerpo primario se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-factor B humano a una dilución 1:4000 (cedido por P. Morgan, Cardiff). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (DAKO A/S, Dinamarca) a una dilución 1:1000.

#### **4.5. Cuantificación de factor H humano.**

Se siguió el mismo procedimiento indicado en el protocolo general con los anticuerpos descritos a continuación.

Para sembrar la placa se utilizó una dilución 1:1000 del anticuerpo policlonal de conejo anti-factor H humano (34+35). Como anticuerpo primario se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-factor H humano (35H9) a una dilución 1:1000.

Como anticuerpo secundario se incubó un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (DAKO A/S, Dinamarca) a una dilución 1:1000.

## **5. Electroforesis en geles de acrilamida y ensayos de Western Blot**

Todos los geles de SDS-PAGE se han realizado siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli, UK, 1970). Las muestras se diluyen en tampón de carga (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS y 0.02% azul de bromofenol) y, si son necesarias condiciones de reducción, se añade 430 nM de  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras se calientan a 100°C durante 10 min y se corren en geles SDS-PAGE al 8% durante 1h. a 100 V.

Tras la electroforesis, los geles se equilibran durante 10 min en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8, glicina 192 mM y 20 % metanol) que se ha enfriado previamente a 4°C. Posteriormente, las proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Richmond, CA) utilizando una cubeta de transferencia (Trans-blot cell, Bio-Rad, Richmond, CA) en las siguientes condiciones:

tiempo = 1h.

voltaje inicial = 100 V.

amperaje limitado = 0.3 A.

temperatura = 4°C.

Una vez realizada la transferencia, la membrana se incuba con la solución de bloqueo (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, tween 20 0.05%, BSA al 3% y leche desnatada al 5%) durante 1h a t. amb. o durante toda la noche a 4°C. A continuación, la membrana se incuba con el anticuerpo primario diluido en la misma solución del tampón de bloqueo pero sin leche desnatada, durante 1 h. a t. amb. Tras 3 lavados de 5 min. con el tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM y tween 20 0.05 %), la membrana se incuba con el anticuerpo secundario ( anti-IgGs de ratón o de conejo marcados con HRP, DAKO) durante media hora a t. amb. Tras 4 lavados de 5 min., la membrana se revela con un reactivo quimioluminiscente (Supersignal West Pico, pierce, Rockford, IL) y se expone en una película fotográfica (Kodak, Francia).

## **6. Ensayo de la actividad cofactora de factor H en fase fluida.**

Este ensayo se ha empleado para valorar la actividad cofactora de la proteína mutante de ratón FH $\Delta$ 16-20 con respecto a la actividad cofactora de la proteína de FH silvestre. Para ello, se empleó FH de ratón silvestre o mutante parcialmente purificado, C3b de ratón y factor I humano. Se incubaron cantidades crecientes de factor H (10, 50, 250 ng) con 2  $\mu$ g de C3b y 0.4  $\mu$ g de factor I, durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se analizan las muestras por SDS-PAGE al 8% en condiciones de reducción. La proteólisis del C3b se observa por la disminución de su cadena  $\alpha$  y la aparición de los fragmentos proteolíticos  $\alpha$ 65,  $\alpha$ 45 y  $\alpha$ 43.

## **7. Análisis por resonancia en plasmón de superficies de la formación y disociación de la convertasa de C3.**

Estos experimentos fueron llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Paul Morgan en Cardiff.

Las interacciones entre el FB y el C3b se analizaron en un BIAcore 3000 (BIAcore, Uppsala, Sweden) a 25 °C. El C3b se depositó en la superficie de un chip de CM5 tal y como se describió previamente (Harris CL y col., 2005). Las proteínas de FB (37  $\mu$ g/ml del FB purificado del plasma de los pacientes; 10  $\mu$ g/ml de FB recombinante) fluyeron sobre la superficie de C3b a 20  $\mu$ l/min en HBS/Mg<sup>2+</sup> (10 mM Hepes pH 7.4, 50 mM NaCl y 1 mM Mg<sup>2+</sup>) en presencia o en ausencia de 2  $\mu$ g/ml de FD. Las interacciones se analizaron utilizando un software BIAcore BIAevaluation, y los datos de un blanco de referencia se sustrajeron para corregir los cambios en el índice de refracción de las distintas soluciones aplicadas.

Para analizar la disociación de la convertasa mediada por DAF, se cubrió la superficie del chip con el C3b y se hicieron fluir a su través, el FB (10  $\mu$ g/ml) y el FD (2  $\mu$ g/ml) para que se formara la enzima activa. Después, se hizo fluir DAF soluble (600 nM) a través de la superficie durante 60 segundos, y la disociación se monitorizó a tiempo real. Para analizar la disociación mediada por FH, la convertasa se formó con 20  $\mu$ g/ml de FB y 2  $\mu$ g/ml de FD. Tras la formación de la convertasa,

se inyectó tanto el tampón (disociación natural) como el FH (40 nM), y se monitorizó la disociación a tiempo real. Para retirar el fragmento Bb residual de la superficie, se inyectó DAF a 2 $\mu$ M. Puesto que el cambio total en masa en la superficie del chip tras la inyección de FH, es la combinación de la unión de FH y la disociación de Bb, el FH se inyectó a través de la superficie en ausencia de la convertasa para valorar el cambio en masa producido por la unión del FH solo.

## **8. Anticuerpos.**

- anti-FH ratón hecho en conejo.
- anti-FH rata hecho en cabra.
- anti-C3 ratón
- anti- C3 humano
- anti-FB humano NSC
- anti-FB humano monoclonal. (JC1)
- anticuerpos secundarios comerciales (DAKO):
  - anti-IgG ratón
  - anti-IgG conejo
  - anti-IgG de cabra

## **9. Extracción de ADN genómico humano a partir de sangre periférica.**

Se centrifuga la muestra de sangre-EDTA a 2500 rpm durante 10 min a t.amb. y se recoge la fase superior de plasma para su posterior análisis. Al resto de la preparación se le añade tampón de lisis de glóbulos rojos (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, NaCl 10 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM), se homogeniza suavemente y se centrifuga 10 min 2500 rpm t.amb. Se quita el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el pequeño precipitado blanco que contiene los linfocitos. Se repite el lavado y el centrifugado con el tampón de lisis de glóbulos rojos, hasta que el sobrenadante sea casi transparente.

Se resuspende el precipitado en tampón de lisis de células blancas (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 5 mM pH 8, NaCl 50 mM y SDS 0.2%) al cual se le han añadido previamente 200  $\mu$ g/ml de proteinasa K, y se incuba toda la noche a 40-42 °C.

Se añade un volumen de fenol pH 8 saturado en Tris-HCl y se agita hasta obtener una emulsión homogénea. Se centrifuga 5 min a 2500 rpm y se recupera la fase acuosa superior. Tras repetir la fenolización, se añade un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1 v/v) y se agita hasta conseguir una emulsión homogénea. Después, se centrifuga 5 min 2500 rpm y se recupera la fase superior. Se añade un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1 v/v), se agita, se centrifuga de nuevo y se recupera la fase superior.

El ADN se precipita con NaCl (concentración final 0.3M) y dos volúmenes de etanol absoluto. Se agita suavemente hasta que se forma una “malla” de ADN y se recoge con una pipeta pasteur de vidrio con la punta sellada al fuego.

Se lava el ADN en etanol al 70 %, se deja secar unos minutos y se resuspende en 0.5 ml de TE a 4°C toda la noche. Finalmente, se cuantifica midiendo la absorbancia a 260 nm.

#### **10. Extracción de ADN genómico a partir de colas de ratones.**

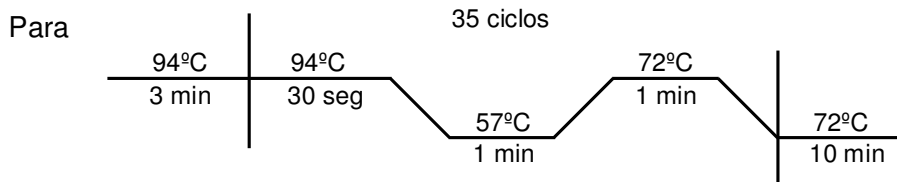
Se coloca una porción de cola de entre 0.5-1.5 cm en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se añaden 600 µl de tampón TNES (Tris-HCl 50 mM pH7.5, NaCl 0.4 M, EDTA 100 mM, 0.5% SDS) al que previamente se le han incorporado 350 µg de proteinasa K (17.5 µl de un stock a 20 µg/µl). Se incuba a 55°C, 200 rpm durante 1 h o hasta que se haya digerido todo el tejido (sólo permanece intacto el pelo). Se añaden 167 µl de NaCl saturado (~ 6 M), se agita con “vórtex” durante 15 seg y se centrifuga 30 min a 14000 rpm y t. amb. El sobrenadante se pasa a otro tubo eppendorf y se añade un volumen de etanol al 95% frío para precipitar el ADN. Se mezcla invirtiendo el tubo varias veces y se centrifuga 30 min a 14000 rpm y 4°C. Se lava el pellet con 100 µl de etanol al 70% frío. Tras retirar el etanol y dejar secar un poco el pellet, el ADN se resuspende en 100 µl de agua.

## 11. Amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de los productos.

Los exones de los genes *CFH*, *MCP*, *IF* y *FB*, se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico empleando el Kit CERTAMP (Biotools B&M Labs). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 12,5µl con los siguientes componentes:

<u>Componente</u>	<u>Volumen</u>
H <sub>2</sub> O estéril	6 µl
10x CERTAMP Buffer	1.25 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.5 µl
dNTPs 2 mM	1.25 µl
Oligos 5 µM	1 µl de cada uno
Enzima CERTAMP	0.5 µl
ADN 50ng/µl	1 µl

La amplificación de los genes *CFH*, *MCP* e *IF* se lleva a cabo en las mismas condiciones:



amplificar los exones de factor B se modifican las condiciones anteriores a 60°C de temperatura de hibridación y se incrementa el tiempo de elongación a 2 min 30 seg.

Los productos de PCR se separan mediante electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio (5µg/ml) en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ác. acético 20 mM, EDTA 2 mM pH8). El porcentaje de agarosa depende del tamaño del fragmento de PCR que se desea aislar (Sambrook et al., 1989). Antes de cargar las muestras se les añade 1/10 de su volumen de tampón de carga (Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol 0.2%, xilencianol 0.2 %, EDTA 40 mM pH8). Después de la electroforesis, se corta la banda de interés y se purifica el ADN de la agarosa utilizando un kit comercial (Qiagen Gel Extraction Kit, ref: 28704) siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los productos de PCR se purificaron



mediante tratamiento enzimático con fosfatasa alcalina y exonucleasa I (ExoSAP-IT<sup>®</sup>. USB), según las indicaciones del fabricante.

La secuenciación de los productos de interés se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática del Centro de Investigaciones Biológicas, en un secuenciador automático ABI PRISM-3700 o 3730 (Applied Biosystems), utilizando un kit de secuenciación con terminadores fluorescentes (dye-terminator cycle-sequencing kit. Applied Biosystems) y *Taq* FS DNA Polimerasa (Applied Biosystems). Los resultados se analizaron en el programa Chromas1.45.

En las tablas 1, 2, 3 y 4 se indican los oligonucleótidos empleados en la amplificación y la secuenciación de los genes *CFH*, *MCP*, *IF* y *BF*, respectivamente.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación y la secuenciación del gen *CFH*.

Región	Oligo forward	Secuencia 5' a 3'	Oligo reverse	Secuencia 5' a 3'	Tamaño (pb)
Prom.+ E1	FH101	TCTTTACCTTCTCAATATCCAGC	FH65	ACTCCTGTGAAAAGCATCATTAG	867
Exón 2	FH47	GTACATTTAAATAGACACTTTATGC	FH48	TACACCTAGTTTTCATAAATTTTAC	281
Exón 3	FH66	CCCCTCCTACATAAAATATATTCC	FH67	CCTATTTACTATCTTAATTATAAACC	171
Exón 4	FH68	TAAACACACATTATGTCAACGTTT	FH69	GAGACTTTAAGATATTTTAATGTAAG	206
Exón 5	FH70	TACATACACATATTTTTTACAATAAAC	FH71	GCTAAAATACTAAAACAGTAAGTG	294
Exón 6	FH72	CCTTTAATTTGCAATAAACATTTTGG	FH73	TATGTGATAAATTTATAAAGATCCAG	263
Exón 7	FH49	CGGATACTTATTTCTGCATTATCC	FH50	AAATTTCAGAATTAAGAAATGGGTC	264
Exón 8	FH74	GTTTATTACAGTAAAATTTCTTTATAC	FH75	CTTCGATCTTTGAAAGTTTATAC	300
Exón 9	FH51	TGAGCAAATTTATGTTTCTCATTTAC	FH52	TTAGAAAGACATGAACATGCTAGG	279
Exón 11	FH61	AAAATGTTATTGATCATATGCTTGTC	FH62	ACTTTTGTGTATCATCTGGATAATC	284
Exón 12	FH76	GTTTATTAGATGACATTAGAAATGAC	FH77	GGAAAACAGATTTATTTTCATTTTG	280
Exón 13	FH78	TTGGCAATGATTAATTATATATTCTC	FH79	TCAAAGTTCTAATTCTTATTTTCTCAGC	274
Exón 14	FH53	TATATTGTAAAACAGACAATTTAACC	FH54	ATACAAAATACAAAAGTTTTGACAAG	289
Exón 15	FH80	AAAACACATACATCATGTTTTTAC	FH81	GTTGTTACAATAAAAATATTAACTTTG	292
Exón 16	FH82	AGTTGGTTTGATTCCTATCATTTG	FH83	ACACACATACCTATTACTTTTTCC	277
Exón 17	FH84	ATATTTTTATTTTTATTTTTTATTATAAC	FH85	TATTAACCTCATTTGAAAGAATTATG	290
Exón 18	FH96	GAAAGTCTATGAGAATACAAGCC	<b>FH85</b>	TATTAACCTCATTTGAAAGAATTATG	476
Exón 19	FH55	GTATTTTATTTGTTTTTAACCCTTTG	FH56	ATGAATTCTACTATAAACAGAAATTG	277
Exón 20	FH86	TAAATTTATGAGTTAGTGAAACCTG	FH87	TGGTACCACTTACACTTTGAATG	272
Exón 21	FH88	TTTTAAAGATTTGCGGAACAAATAC	FH89	CCCACACATTATATAAATAAATTTTG	263
Exón 22	FH90	CTTGAAATATATTTGTAAGTGTATC	FH60	CCTGCTATACTCCCCAAAATG	307
Exón 23	FH91	TTGTATTTGATTTGCTCTCACAAAC	FH92	GTGAAATATCAGACTCATCACAGA	296
Exón 23	FH-E23-F2	CAATATCTTAATCAAAGCAGC	FH-E23-R2	ACAACCGTTAGTTTTCCAGGA	

**Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación y la secuenciación del gen *MCP*.

Región	Oligo <i>forward</i>	Secuencia 5' a 3'	Oligo <i>reverse</i>	Secuencia 5' a 3'	Tamaño (pb)
Promotor	MCP-Prom-1F	GGTGTGCTTAATAAATTAGATTCG	MCP-Prom-1R	CGCGGAAGACGCTGTTATTTTC	787
Exón 1	MCP-E1-F	CCGCCCTGGTGACTCGACGCACTT	MCP-E1-R	GTCCCCGCATTCCCCGCCACATAC	459
Exón 2	MCP-E2-F2	GATGTTACTTAAAACATGCAAG	MCP-E2-R	CCCCAAAATGTATGCAAATCTCT	444
Exón 3	MCP-E3-F	ATTGCCTGGGTGAATATGAATCTT	MCP-E3-R	TCTTGCCTATCTCCATAAAAACATC	418
Exón 4	MCP-E4-2F	AAAATTCCTTCATTATTATGTGTG	MCP-E4-R	CCGTCTCTTCAAAAATTACAAAAA	502
Exón 5*	MCP-E5-2F	TACATTTGCCTTTACCTCTTTTTTC	MCP-E5-R	ACACCTGCTTTGTTTATCTGTAGA	322
Exón 6	MCP-6 <sup>a</sup> -F	GTAAGAATGACAGCCAGCCAAGTT	MCP-6B-R	TGCCATTGTTGACTTACTTAGATA	786
Exón 7+8	MCP-E7_8F	GTTCTTAGCACGTTATGTAC	MCP-E7_8R	ATGGCTATACAAATGTCCTC	549
Exón 9	MCP-E9-F	ACACCCATCCTCACATTACTTTCA	MCP-E9-R	CTGGGGGAGGGATAGCATTAG	499
Exón 10	MCP-E10-F	CACAGAATGTTGTCACAGAAAATG	MCP-E10-R	GGATCCTATGTTTGGGCACCTC	379
Exón 11*	MCP-E11-F	AATTGCGATTCAAGATGAGATT	MCP-E11-R	AAAAGCACATTTGGGAAGC	446
Exón 12	MCP-E12-F	ATTATGGGGAGTTGGATTTAGAT	MCP-E12-R	TGTTTTTATGTTGCAGTGATGTTA	439
Exón 13	MCP-E13-F	GAACCTAATTCTCAGCTTTC	MCP-E13-R	CCTCTTTGATATTTACTGCC	331
Exón 14	MCP-E14-F	CAGGTTGGTGGCTCATTAC	MCP-E14-R	GTCCAATAAATCTAAGTG	419
Exón 14	MCP-E14-2F	TAATTTCAGAATCAGATGCATCC	MCP-E14-2R	TCAAACACCTACTTTTAGAGG	237

**Tabla 3.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación y la secuenciación del gen *IF*.

<b>Región</b>	<b>Oligo Forward</b>	<b>Secuencia 5' a 3'</b>	<b>Oligo reverse</b>	<b>Secuencia 5' a 3'</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
Exón 1	FI-E1-F	GGAAACAAGTTCCTATTGGTC	FI-E1-R	CTTGTCAGTTC AATGCCTCT	528
Exón 2	FI-E2-F	AACACCATCCTCATCTGTACT	FI-E2-R	TACTGGAAGACTTTTCACTGG	741
Exón 3	FI-E3-F	CTGCCGCTGACACATAATAAA	FI-E3-R	TCCAAGTGTTGGGTAAACATG	505
Exón 4	FI-E4-F	GTTTCTTACCTGCTACAGTAG	FI-E4-R	TATTATTGCCTATGTGACTGG	369
Exón 5 y 6	FI-E5-6-F	ATCTGATAAGGATGTCATGCC	FI-E5-6-R	CCATCTATGTTCCCCTTAAGAT	532
Exón 7	FI-E7-F	CAGCTAGACATCCTACAATTC	FI-E7-R	TGTT CAGGCTGGGTTATTACT	328
Exón 8	FI-E8-F	ACATGCCTTG GGGATTTTGTA	FI-E8-R	TAACCAGTGAGCCACCAATA	228
Exón 9 y 10	FI-E9-10-F	TACTAATGATTCCAGCCTGTC	FI-E9-10-R	GCTTTATCATCTGCCACAATC	594
Exón 11	FI-E11-F	CATGACAGCAAGCATT TACAA	FI-E11-R	TTATGCTTCTCTCTGAGTGCT	518
Exón 12	FI-E12-F	AAACACGCTAAGGAAGAGTTC	FI-E12-R	ATTAGAGGAAGAAACCTGAGC	429
Exón 13	FI-E13-F	TTGTTAAATGCCATGGAGGAG	FI-E13-R	GACAGG TACTATGCCAAACAT	748

**Tabla 4.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación y la secuenciación del gen *BF*.

**Oligonucleotidos para la amplificación del ADN por PCR.**

<b>Región</b>	<b>Oligo Forward</b>	<b>Secuencia 5' a 3'</b>	<b>Oligo reverse</b>	<b>Secuencia 5' a 3'</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
Exón 1-5	RT-FB-F1	CAAGCCAGGACACACCATC	RT-FB-R1	TCTTCCGCTTCTGTTGTTCC	1800
Exón 6-11	RT-FB-F2	TCATGTACGACACCCCTCAA	RT-FB-R2	AGCTCTCGTGTCCCTTTGAA	2500
Exón 12-18	RT-FB-F3	ATGAAAGCCAGTCTCTGA	R: RT-FB-R3	CCTGTCCAGCAGGAAACC	2000

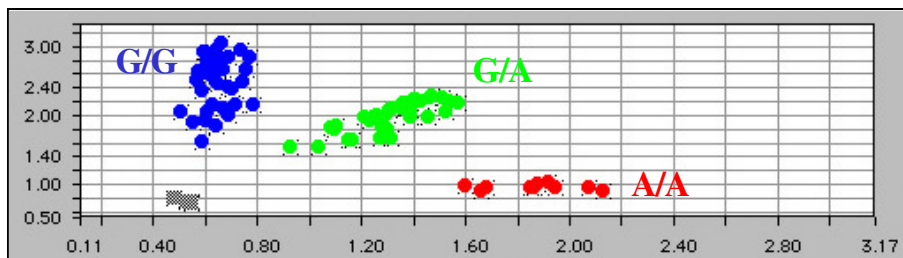
**Oligonucleotidos para la secuenciación.**

<b>Región</b>	<b>Oligo</b>	<b>Secuencia 5' a 3'</b>
Exón 1 y 2	RT-FB-F1	CAAGCCAGGACACACCATC
Exón 3	FB-IVS2-F1	GTTTCTCAGTGACATGGTCTCC
Exón 4y 5	RT-FB-R1	TCTTCCGCTTCTGTTGTTCC
Exón 6	RT-FB-F2	TCATGTACGACACCCCTCAA
Exón 7 y 8	FB-IVS8-R1	TATAGTGTTACAAGTGGACTTAAGG
Exón 9 y 10	FB-IVS8-F1	CTCAACTTGCTCACCCCTGC
Exón 11	RT-FB-R2	AGCTCTCGTGTCCCTTTGAA
Exón 12 y 13	RT-FB-F3	ATGAAAGCCAGTCTCTGA
Exón 14 y 15	FB-IVS13-F1	CAGACTATCAGGTGAGAGCGTC
Exón 16 y 17	FB-IVS17-R1	ACTAGCCACATGCATTGAGCT
Exón 18	FB-IVS17-F1	CTGATTCCTTTAGGTCAGCTAAG

## 12. Análisis de SNPs mediante discriminación alélica.

Esta técnica de genotipación de SNPs se basa en la amplificación de productos de PCR en presencia de dos sondas internas marcadas con distintos fluoróforos (VIC y FAM). Ambas sondas son complementarias a la región del SNP diana pero se diferencian en una base, de manera que una de las sondas es complementaria al alelo 1 del SNP y la otra es complementaria al alelo 2. Debido a la presencia de un *quencher*, estas sondas Taqman (Applied Biosystems) emiten fluorescencia exclusivamente como resultado de la amplificación del alelo al que son perfectamente complementarias. Esto ocurre porque la actividad exonucleasa de la polimerasa utilizada en la reacción de PCR rompe la sonda y permite la separación física del fluoróforo y el *quencher*. Por el contrario, si la sonda no hibrida perfectamente con el alelo que se está amplificando es desplazada por la polimerasa (en lugar de romperse) y no emite fluorescencia.

Las condiciones de amplificación son las recomendadas por el fabricante (10 ng de ADN genómico y la mezcla de reacción). Una vez finalizada la reacción, se mide la fluorescencia en un equipo de PCR cuantitativa (PE7700) y el genotipo viene definido por el tipo de fluorescencia emitido (fluorescencia VIC= homocigoto alelo 1; fluorescencia VIC+FAM= heterocigoto alelos 1 y 2; fluorescencia = FAM=homocigoto alelo 2.)



**Figura 10. Genotipación del SNP MCP IVS12+638G>A mediante discriminación alélica.** El eje "X" indica la intensidad de fluorescencia en VIC (alelo A) y el eje "Y" la fluorescencia en FAM (alelo G). Las nuestras analizadas quedan agrupadas según el tipo de fluorescencia que emiten, lo cual viene definido por su genotipo.

## 13. Plásmidos.

Como punto de partida se utilizaron los siguientes vectores: el plásmido comercial pCI-Neo (Promega) y los plásmidos pXP2 y pCAG (Miyazaki, 1989), que fueron amablemente cedidos por el Dr. Ángel Corbí y el Dr. Miguel Ángel Vidal del centro de Investigaciones Biológicas, respectivamente.

### 13.1. Construcción pCI-Neo-cDNA factor H ratón.

El ADNc del factor H de ratón se obtuvo previamente de las bases de datos de ESTs (BF237071). Está clonado en un vector pCMV-SPORT6 por su extremo 5' con Sall y por su extremo 3' con Not I.

### 13.2. Construcción pCI-Neo-cDNA factor B humano.

El ADNc del factor B humano se obtuvo previamente del clon de RZPD IRIAU969B085D6.

### 13.3. Construcciones en el vector pXP2 de los promotores de FH, MCP y DAF.

Con el fin de caracterizar funcionalmente algunos polimorfismos situados en la región promotora de los genes *CFH* y *MCP*, se han clonado las regiones promotoras implicadas en el plásmido pXP2. Este vector carece de promotor y contiene el gen que codifica para la luciferasa. El fragmento de promotor a estudiar se ha clonó corriente arriba del gen de la luciferasa.

## 14. Pacientes de síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS).

En el presente estudio se han incluido 98 pacientes no relacionados entre si y diagnosticados con aHUS, en base a las manifestaciones clínicas anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fallo renal agudo. Cabe destacar que, en estos individuos, la enfermedad no ha estado precedida de una infección de la cepa 0157 de *E.Coli*.

Paciente	Edad	C3 (mg/dl) [77-210]	C4 (mg/dl) [14-47]	Resumen Historial Clínico
HUS2	17	69	31,8	FRC. Trasplante renal. Hemodiálisis.
HUS3	51	59	26,3	Afectación neurológica. Recurrencia FRC. Hemodialisis.
HUS5	<1	107	10	3 episodios HUS. Afectación neurológica. Recurrencia
HUS9	<1	120	23,3	2 episodios HUS. Afectación neurológica. Recurrencia. FRC.
HUS11	1	167	52,9	Transplantado dos veces. Afectación neurológica. Recurrencia. FRC.
HUS12	<1	135	27,9	Un episodio HUS

HUS13	6	96	15,3	Transplantado. Hemodiálisis. FRC.
HUS14	17	110	16,8	FRC. 2 trasplantes. Hemodiálisis. HUS Asociado a ciclosporina.
HUS15	15	93	22,1	FRC. 2 trasplantes. Hemodiálisis. HUS asociado a ciclosporina
HUS17	nd	nd	nd	Un episodio HUS postparto
HUS19	1	54	19	HUS probablemente familiar
HUS20	49	99	21,4	HUS postransplante
HUS21	1	24	26,9	Posible origen infeccioso ( <i>Morganella Morganii</i> ). FRC.
HUS29	<1	72	35,6	Recurrencia. FRC.
HUS30	<1	130	46,9	FRC.
HUS36	<1	74	23,6	FRC. Transplantado. Hemodiálisis. Recurrencia
HUS37	<1	178	44,6	FRC. Diálisis peritoneal. Recurrencia
HUS38	<1	103	28,9	FRC. Diálisis peritoneal. Recurrencia
HUS39	<1	124	27,4	HUS familiar. Recurrencia
HUS41	nd	75	14	Nd
HUS46	49	168	23	HUS postransplante
HUS47	53	127	25,4	HUS postransplante. FRC.
HUS48	37	38	6,9	HUS postransplante
HUS49	nd	40	7,2	FRC.
HUS50	70	103	27	Un episodio HUS. FRC.
HUS51	22	112	32,1	HUS postransplante
HUS52	41	120	25,2	HUS postransplante. FRC.
HUS54	51	52	6,5	HUS postransplante. FRC.
HUS55	23	92	3,6	HUS familiar. Recurrencia. FRC.
HUS56	48	104	17,7	Un episodio HUS
HUS57	35	108	31,7	HUS posterior a cirugía conservadora de Mioma. No recidivante
HUS58	27	84	14,1	FRC. Trasplante renal sin recurrencia.
HUS59	36	87	13,5	FRC. Trasplante renal sin recurrencia.
HUS60	28	87	25,5	FRC. HUS asociado a anticonceptivos orales
HUS61	39	89	20,5	FRC. HUS asociado a anticonceptivos orales
HUS62	34	71	41,4	FRC. Espera trasplante renal..
HUS64	7	62	26,7	Un episodio HUS. FRC.
HUS65	25	15	31,9	Un episodio HUS
HUS66	35	154	33,2	Un episodio HUS. Diabetes mellitus tipo 2
HUS67	33	67	31,9	HUS tras anticonceptivos orales. FRC.
HUS68	58	nd	nd	Transplante renal. Recurrencia
HUS69	22	94	33,5	HUS familiar. FRC.
HUS70	43	77,3	11,4	HUS tras anticonceptivos orales. FRC.
HUS71	nd	63	47,5	Transplante renal. Recurrencia
HUS74	37	81	18	HUS de etiología desconocida. Un episodio HUS.
HUS79	46	111	20,4	HUS.
HUS80	32	74	27,0	HUS post-anginas. Recurrencia.
HUS81	22	65	24,7	HUS de etiología desconocida. Recuperación parcial de la función renal.
HUS82	49	105	29,7	HUS de origen desconocido. Recuperación total función renal.
HUS83	6	91	22,4	HUS pos-trasplante renal por MPGN II. FRC.
				HUS de origen desconocido. FRC. No recurrencia
				HUS de origen desconocido. FRC. No recurrencia
				HUS tras infección respiratoria. No recurrencia



HUS84	42	84	26.6	HUS familiar. Recuperación parcial de la función renal. Recurrencia.
HUS85	2	56	20.7	HUS familiar. Recuperación total función renal. Recurrencia.
HUS87	5	102	19.3	HUS de origen desconocido. Recuperación función renal. Recurrencia.
HUS88	53	76	6.49	HUS tras cuadro subgripal. Recuperación parcial de la función renal.
HUS89	nd	121	43.9	HUS de origen desconocido. Recuperación función renal. Recurrencia
HUS90	52	82	37.8	HUS familiar. No recurrencia. <b>Ahora trasplante renal</b>
HUS91	4	101	26.2	HUS de origen desconocido. Recuperación función renal. No recurrencia.
HUS92	36	104	10.3	HUS postparto. Recuperación parcial función renal.
HUS93	30	85	29.8	HUS familiar. Episodio tras donar riñón a su hermano gemelo un año antes.
HUS94	26	98.7	22.3	HUS de origen desconocido. Trasplante renal. No recurrencia.
HUS95	45	85	39.6	HUS origen desconocido. Recuperación parcial función renal. No recurrencia
HUS96	42	47	13.8	HUS de origen desconocido. Recuperación total función renal. Recurrencia.
HUS97	36	123	24.5	HUS de origen desconocido. No recurrencia. Trasplante renal
HUS98	40	102	15.1	HUS de origen desconocido. No recurrencia. Trasplantes renales. FRC.
HUS99	27	106	25.5	HUS postparto. Recuperación total función renal. No recurrencia.
HUS100	1.5	86	34.3	HUS de origen desconocido. FRT. Recurrencia.
HUS101	0.083	27	1.85	HUS tras infección urinaria. Recuperación total función renal. No recurrencia
HUS103	22	64	23	HUS postransplante. Recurrencia. FRT.
HUS104	55	126	41.6	HUS postransplante. Recuperación parcial función renal. No recurrencia.
HUS105	52	82	36.4	HUS postransplante. Recuperación parcial función renal. No recurrencia.
HUS106	48	119	38	HUS postransplante.
HUS107	35	91	13.2	HUS familiar. Posible asociación con anticonceptivos orales.
HUS108	4	73	22.1	HUS de origen desconocido. Recuperación parcial función renal. Recurrencia
HUS109	1	95	22.3	HUS origen desconocido. Recuperación total función renal. No recurrencia.
HUS110	23	71	9.55	HUS asociado a anticonceptivos orales. FRC. Recurrencia.
HUS111	57	122	34.7	HUS postransplante. Recuperación parcial función renal. No recurrencia.
HUS112	0.33	65	25.2	HUS familiar. Transtornos neurológicos.
HUS113	2	14	17.8	HUS tras infección por EBV. Recuperación parcial FR. No recurrencia.
HUS114	34	95	25.9	HUS origen desconocido. FRT. No recurrencia.
HUS117	7	173	60.7	HUS postransplante renal. Recuperación parcial FR. No recurrencia.

HUS118	2	178	27.2	HUS tras infección respiratoria. FRT. No recurrencia. Transplante renal.
HUS119	4	117	16.6	HUS tras infección respiratoria. No recurrencia. 2 trasplantes renales.
HUS125	25	81	24.3	HUS postransplante renal en dos ocasiones.
HUS126	19	113	28.6	HUS origen desconocido. Recuperación parcial función renal.
HUS127	46	59.5	23.7	HUS origen desconocido. Recuperación parcial función renal.
HUS128	56	30.5	6.02	HUS origen desconocido. Recuperación parcial función renal. No recurrencia
HUS129	56	138	24.4	HUS origen desconocido. Recuperación parcial función renal. No recurrencia
HUS130	6	124	19.2	HUS origen desconocido. Recuperación total función renal. Recurrencia
HUS131	2	129	25.9	HUS origen desconocido. FRT. Recurrencia. Transplante renal.
HUS132	3	115	15.2	HUS origen desconocido.
HUS135	4	105	13.4	
HUS137	64	68	27.9	HUS origen desconocido. FRT. No recurrencia.
HUS138	7	84	22.9	HUS de origen desconocido. Trastornos neurológicos. FRT. No recurrencia
HUS139	1.9	nd	nd	HUS de origen desconocido. Recuperación parcial función renal. Recurrencia
HUS 140				
HUS 141				
HUS142				
HUS143				
HUS144				
HUS145				

**Tabla 5. Individuos con aHUS incluidos en el estudio.** La edad se refiere a la edad de aparición del primer episodio de HUS. FRC= Fallo renal crónico. nd= no disponible. En rojo se indican los valores de C3 o C4 por debajo del rango de variación normal. Los niveles plasmáticos de C3 y C4 se determinaron por nefelometría en el Hospital Universitario de La Paz a cargo de la Dra. Margarita López-Trascasa.

## 15. Mutagénesis dirigida.

Para los experimentos de mutagénesis dirigida se empleó un kit comercial de Stratagene (“Quikchange™ Site-Directed Mutagenesis Kit”; # 108005) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Los oligos empleados para cada mutagénesis se describen en la tabla 6.

GEN	MUTACIÓN	OLIGO	SECUENCIA 5´ a 3´
-----	----------	-------	-------------------

FH de ratón	C937X	mFHStopSCR16F mFHStopSCR16R	TGTTGGACTTCCTTGAGGACCTCCACCTTC <sup>a</sup> GAAGGTGGAGGTCCTCAAGGAAGTCCAACA <sup>b</sup>
<i>BF</i>	D279G	FB-279G-F FB-279G-R	GGTGCTAGATGGATCAGGAAGCATTGGGGCCAGCAAC <sup>a</sup> GTTGCTGGCCCAATGCTTCCTGATCCATCTAGCACC <sup>b</sup>
<i>BF</i>	F286L	FB-286L-F FB-286L-R	CATTGGGGCCAGCAACTTGACAGGAGCCAAAAAG <sup>a</sup> CTTTTTGGCTCCTGTCAAGTTGCTGGCCCAATG <sup>b</sup>
<i>BF</i>	K323E	FB-323E-F FB-323E-R	GCTGTCTGCTTCAGACACTTCGACCCAAATTTTGG <sup>a</sup> CCAAAATTTGGGTGCAAGTGTCTGAAGCAGACAGC <sup>b</sup>

**Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en la mutagénesis dirigida.** <sup>a</sup> Oligonucleótidos “forward”. <sup>b</sup> Oligonucleótidos “reverse”. Los nucleótidos marcados en negrita corresponden a los cambios introducidos en la secuencia.

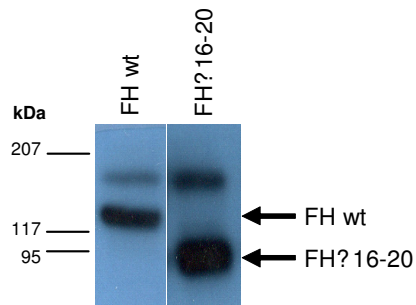
## 16. Ratones transgénicos

### 16.1. Construcción de la proteína mutante FH $\Delta$ 16-20 y su producción en células eucariotas.

La proteína FH $\Delta$ 16-20 se generó sustituyendo la Cys937 al inicio del SCR16 del factor H de ratón por un codón de terminación, mediante mutagénesis dirigida sobre el vector pCI-Neo donde previamente se clonó el ADNc de factor H de ratón. Esta construcción se secuenció en su totalidad para confirmar que tan sólo se introdujo el cambio deseado.

Para comprobar que la construcción era capaz de generar la proteína mutante correctamente, se analizó su expresión en cultivos celulares eucariotas. Para ello se transfectaron células COS7 con los plásmidos pCI-Neo con el ADNc de FH silvestre (como control) y la proteína mutante FH $\Delta$ 16-20, y se generaron transfectantes estables.

Puesto que el factor H es una proteína secretada, pudimos inmunoprecipitar las proteínas recombinantes de los medios de cultivos de las células transfectadas y las analizamos posteriormente mediante Western Blot. Como se puede observar en la figura 7, la proteína FH $\Delta$ 16-20 se produce correctamente y migra, como era de esperar, con un tamaño inferior al del factor H salvaje.



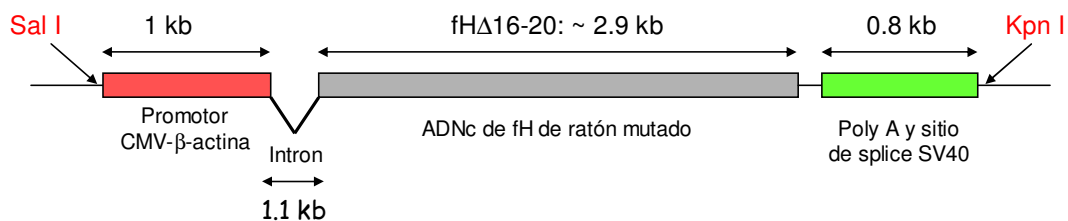
**Figura 7. Análisis por western blot de las proteínas recombinantes factor H wild type y FH $\Delta$ 16-20.** La banda de tamaño superior que aparece en ambos carriles corresponde a algo inespecífico e independiente de factor H.

### 16.2. Desarrollo de la construcción para la transgénesis.

Una vez que se confirmó en cultivos celulares que el ADNc con la mutación que da lugar a la proteína FH $\Delta$ 16-20 funciona correctamente, se generó la construcción para la transgénesis.

Se han probado distintas estrategias con el fin de expresar la proteína recombinante de factor H. En primer lugar se emplearon construcciones con promotores de expresión fundamentalmente hepática, como son el promotor endógeno del gen de factor H de ratón, el promotor del gen de C4BP humano y el promotor del gen de la PEPCK de rata. En todos estos casos, no se pudo detectar la expresión del transgén en los ratones transgénicos.

Finalmente se utilizó una construcción con un promotor de expresión fuerte y ubícuo, con el que se obtuvo la expresión del transgén deseada. La construcción empleada nos la cedió Miguel Ángel Vidal del Centro de Investigaciones Biológicas y es una versión modificada del vector descrito por Miyazaki, J., *et al* (Miyazaki, 1989). Esta construcción consta de un promotor híbrido compuesto por el promotor del gen de la  $\beta$ -actina de pollo y un enhancer del promotor de CMV, el primer intrón del gen de la  $\beta$ -actina de pollo y la señal de poliadenilación y un sitio de splicing del SV40 (**figura 8**). Sobre esta construcción se clonó el cDNA de factor H de ratón con la mutación Cys937X. El fragmento que se utilizó para la transgénesis se escindió del vector con las dianas Sal I y Kpn I y consta de 5,8 Kb.



**Figura 8. Construcción genética para la transgénesis.** Contiene un promotor híbrido de  $\beta$ -actina de pollo con un enhancer de CMV, el primer intrón de la  $\beta$ -actina de pollo que sirve para estabilizar la molécula, 2.9 Kb del ADNc de fH de ratón con la mutación correspondiente, y por último un poli A y un sitio de splicing del SV40 de conejo. El fragmento de AND lineal que se emplea para la transgénesis se genera mediante la digestión del plásmido pCMV con las enzimas Sal I y KpnI, que liberan un fragmento de 5,8 Kb.

### 16.3. Genotipado de los ratones transgénicos.

Para seleccionar aquellos ratones portadores del transgen, se llevó a cabo una PCR con oligos específicos del gen de factor H de ratón, capaces de amplificar el factor H únicamente a partir del ADNc del transgen. Para ello se emplearon dos parejas de oligos:

mFH-4F/mFH-6R: 5' GCAATTCAGGCTTCAAGATTG3' y 5'3'  
 mFH-8F/mFH-6R: 5'AAGCTG.....3' y 5'AGTGGCTAGC.....3'

La PCR se realizó sobre ADN genómico purificado por precipitación con NaCl y etanol (ver apartado 3.18 de mat. y mét.) a partir de las colas de los ratones. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C 3 min, 35 ciclos de 94°C 30 seg., 57°C 30 seg. 72°C 1 min. y, finalmente 72°C durante 10 min.

Como control de la calidad de las muestras se utilizaron los oligonucleótidos 5'AGTCAG..3' y 5'ACTGTGTGAT..3', específicos de GDP. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1%.

### 16.4. Detección de FH $\Delta$ 16-20 en plasma.

Aquellos ratones que resultaron positivos para el transgen por PCR, se analizaron posteriormente por western blot con el fin de caracterizar el nivel de expresión de la proteína FH $\Delta$ 16-20 en el plasma. Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.7, se corrió 1  $\mu$ l de plasma-EDTA de los ratones a analizar en condiciones de reducción en un gel SDS-PAGE.

Para revelar el western se empleó como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal de cabra anti-factor H de rata a una dilución 1:2000 y, como anticuerpo

secundario un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de cabra a una dilución 1:8000.

### **16.5. Estudios Histológicos.**

Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de la Dra. Marina Botto en el *Imperial College* de Londres.

Para microscopia óptica, los riñones se fijaron en la solución de "Bouin" y se embebieron en parafina. Las secciones se tiñeron con ácido Schiff periódico. Para los estudios de inmunofluorescencia, los riñones se congelaron inmediatamente. Se emplearon un anticuerpo de cabra anti-C3 de ratón (MP Biomedicals) y un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Sigma-Aldrich), ambos conjugados con FITC, sobre las secciones congeladas. El endotelio del ratón se tiñó usando un anticuerpo de rata anti-CD31 de ratón (regalo de B. Imhof, Ginebra, Suiza) seguido de la aplicación de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de rata con Texas red (Abcam). Para microscopia electrónica, las muestras se fijaron en un 2% de glutaraldehído, seguido de fijación en un 2% de tetróxido osmio acuoso y embebido en una resina Supr. Se tiñeron secciones ultrafinas con un 1% de acetato de uranilo acuoso y citrato de plomo Reynold.

### **16.6. Valoración de la función renal y de los parámetros hematológicos.**

Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de la Dra. Marina Botto en el *Imperial College* de Londres.

La urea del suero se midió con un método de UV empleando un kit comercial (R-Biopharm Rhone Ltd.) siguiendo las indicaciones del fabricante. El análisis de orina se llevó a cabo con Hema-Combistic (Bayer). Las plaquetas se cuantificaron de forma manual. Brevemente, la sangre se diluyó 1:20 en un 1% de oxalacetato amónico, y se mezcló la suspensión durante 15 minutos para que se lisaran los eritrocitos. Las muestras se transfirieron a un hemocitómetro y las plaquetas se contaron directamente. Las películas de sangre se prepararon manualmente usando la totalidad de la sangre-EDTA y se tiñó utilizando un rápido kit (Diff-Quik; Dade Behring).

## **17. Recursos bioinformáticos.**

El programa Insight II (BYOSYM software package; Molecular simulations, San Diego, CA) se empleó para modelar la estructura del dominio vWfA del factor B a partir de los archivos de PDB 1Q0P y 1RS0\_A. Además se empleó para situar las mutaciones F286L y K323E en la estructura.

## 1. FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS AL aHUS.

### 1.1. Mutaciones en genes reguladores del complemento.

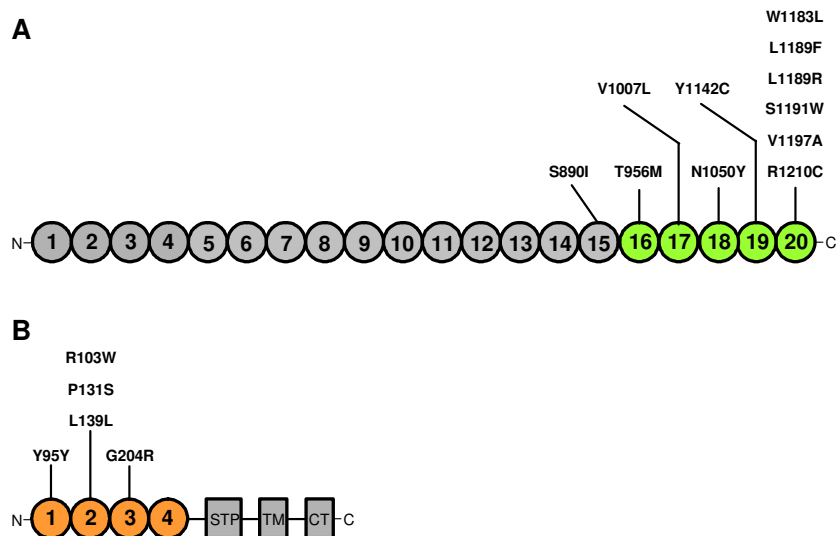
Como se comentó previamente en la introducción, el aHUS se asocia con mutaciones y polimorfismos en los genes reguladores del complemento *CHF*, *MCP* y *IF*. Por lo tanto, el primer abordaje para caracterizar nuestra población de individuos aHUS (98 pacientes) consistió en la búsqueda de mutaciones en dichos genes.

El rastreo mutacional se realizó amplificando por PCR cada uno de los exones de los genes *CHF*, *MCP* y *IF* a partir de ADN genómico, y analizando los productos obtenidos mediante secuenciación automática (apartado 11 de materiales y métodos). En la **tabla 7** se resumen todas las mutaciones encontradas hasta el momento, recogiendo en ella el trabajo desarrollado por distintos miembros del laboratorio así como de la Dra. Pilar Sánchez-Corral del Hospital Universitario La Paz.

En el gen *CHF*, se han identificado un total de 15 mutaciones diferentes en heterocigosis en 14 pacientes de aHUS, de las cuales 12 son mutaciones con cambio de sentido, 2 son delecciones y 1 es una inserción (ver **tabla 7**). En general, el nivel plasmático de factor H se mantiene dentro del rango normal de variación en todos los pacientes de aHUS, a excepción de los individuos portadores de las mutaciones del tipo inserción o delección, que tienen niveles bajos de factor H como consecuencia de la falta de expresión del alelo mutado.

Las mutaciones con cambio de sentido se agrupan en el extremo C-terminal de factor H (**figura 9**), una región que está implicada en la protección de las superficies celulares frente a la activación del complemento. Aunque la caracterización funcional de las mutaciones asociadas al aHUS no forman parte del estudio de esta tesis, algunas de estas mutaciones se han caracterizado y demuestran una disminución en la capacidad de factor H para unir C3b depositado sobre superficies (Sánchez-Corral et al., 2002 ) o resultan incapaces de proteger las superficies celulares frente a la activación del complemento en el ensayo hemolítico (Sanchez-Corral et al., 2004).





**Figura 9. Localización de las mutaciones con cambio de sentido en *CFH* y *MCP* encontradas en los pacientes de aHUS. A)** Estructura de factor H compuesta por 20 SCRs, donde hay un agrupamiento de las mutaciones aHUS en el extremo C-terminal de la molécula. En verde se indican los SCRs implicados en la interacción con C3b depositado sobre las superficies celulares y polianiones. **B)** Estructura de MCP compuesta por cuatro SCRs (naranja), un dominio rico en serina, treonina y prolina (STP), un dominio transmembrana (TM) y una extremo citoplasmático. Las mutaciones de cambio de sentido se localizan en los SCRs.

En el gen *MCP* se han identificado hasta 10 mutaciones diferentes en un total de 12 pacientes de aHUS (**tabla 7**). Todos los cambios se encontraron en heterocigosis, a excepción de la mutación c.905-925del, que se presentó en homocigosis en el paciente HUS89. Dentro de las mutaciones encontradas, 3 son con cambio de sentido, 2 son sinónimas, 3 son inserciones o deleciones que cambian el marco de lectura, y 2 mutaciones afectan a los sitios de *splice*. La mayor parte de las mutaciones en el gen *MCP* (64%) están asociadas con niveles bajos de proteína (las determinaciones cuantitativas de MCP fueron realizadas por citometría de flujo en PBLs por la Dra. Pilar Sánchez-Corral).

**A)**

PACIENTE	GEN	MUTACIÓN	CONSECUENCIA
HUS 2	CHF	p.W1183L	Función de FH alterada <sup>1</sup> .
HUS 11	CHF	p.L1189R	Función de FH alterada <sup>1</sup> .
HUS 12	CHF	p.T956M	Función de FH alterada <sup>1</sup> .
HUS 29	CHF	p.R1210C	Función de FH alterada <sup>1</sup> .
HUS 30	CHF	p.S1191W	Función de FH alterada <sup>1</sup> .
HUS 67	CHF	p.V1197A	Función de FH alterada <sup>1</sup> .
HUS 96	CHF	c.351delG	Alelo nulo. Niveles bajos de FH.
HUS 100	CHF	p.Y1142C	Función de FH alterada <sup>1</sup> .
HUS 127	CHF	c.89insA	Alelo nulo. Niveles bajos de FH.
HUS 142*	CHF	p.S890I/p.V1007L	Desconocida.
HUS 13	MCP	p.L139L	Desconocida. Ausente en población control.
HUS 38	MCP	p.K249NfsX5	Proteína truncada en SCR4. Posible alelo nulo.
HUS 64	MCP	c.286 + 1G>C	Alelo nulo. Afecta a secuencia consenso de <i>splice</i> . Niveles bajos de MCP en PBLs.
HUS 83	MCP	c.390 – 1G>C	Afecta a secuencia consenso de <i>splice</i> . No afecta <i>splice</i> por RT.
HUS 87	MCP	p.L139L	Desconocida.
HUS 89**	MCP	c.905-925del	Alelo nulo.
HUS 130	MCP	p.R59X	Alelo nulo. Niveles bajos de MCP en PBLs.
HUS 135	MCP	p.G204R	Desconocida. Niveles bajos de MCP en PBLs.
HUS 97	IF	p.C86Y	Desconocida. Niveles bajos de FI.
HUS 98	IF	p.K441R	Desconocida.

**B)**

PACIENTE	GEN	MUTACIÓN	CONSECUENCIA
HUS 3	CHF	p.V1197A	Función de FH alterada <sup>1</sup> .
	CHF	Δexon2	Función de FH alterada <sup>1</sup> .
HUS 36	CHF	p.N1050Y	Desconocida. Ausente en población control.
	MCP	p.L139L	Desconocida. Ausente en población control.
HUS 37	CHF	p.L1189F	Función de factor H alterada <sup>1</sup> .
	MCP	p.Y95Y	Desconocida. Ausente en población control.
HUS 68	MCP	p.P131S	Alelo nulo. Residuo conservado. Niveles bajos de MCP en PBLs.
	IF	c.1624insAT	Alelo nulo. Niveles bajos FI..
HUS 109	MCP	p.R103W	Desconocida.
		c.905-925del	Alelo nulo. Niveles bajos de MCP en PBLs.
	IF	p.N151S	Desconocida. Niveles bajos de FI.
HUS 124***	CHF	p.P1166L	Desconocida.
	IF	p.K441R	Desconocida.

**Tabla 7. Resumen de las mutaciones identificadas en los genes CHF, IF y MCP en los pacientes con aHUS. A)** Pacientes en los se ha identificado un único alelo mutado. **B)** Pacientes con más de una mutación sobre el mismo gen o en genes diferentes. <sup>1</sup> Ensayos *in*

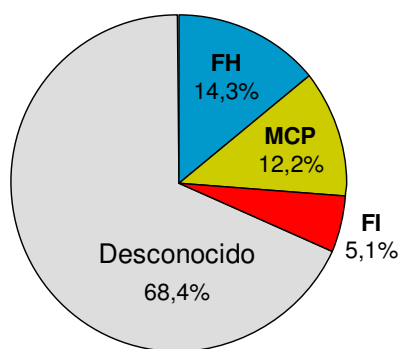
*vitro* demuestran que dichas mutaciones presentan una menor capacidad para proteger a las superficies celulares propias frente a la activación del complemento (Sánchez-Corral y col., 2002). \* Ambas mutaciones se encuentran en el mismo alelo. \*\* Mutación en homocigosis. \*\*\* Paciente con HUS precedido de diarrea.

Por otro lado, como se puede observar en la **figura 9**, las mutaciones que no se asocian con niveles bajos de proteína se localizan en los SCRs de la región N-terminal de MCP sugiriendo, como se ha descrito anteriormente, que esta región debe ser muy importante para la regulación del complemento (ref.).

El rastreo mutacional sobre el gen *IF* reveló cuatro mutaciones diferentes en heterocigosis en cinco pacientes de aHUS (**tabla 7**). De las cuatro mutaciones, hay una inserción de dos pares de bases que modifica el marco de lectura e introduce un codón stop prematuro (c.1624insAT), y hay 3 mutaciones con cambio de sentido. Todas estas mutaciones, a excepción de la mutación K441R, se asocian con niveles bajos de factor I plasmático. Por otro lado, la mutación K441R se localiza en el dominio serin proteasa de la molécula, por lo que se podría sugerir una alteración funcional de la molécula.

Resulta interesante además, el hecho de que en 6 pacientes de aHUS se han identificado más de una mutación en genes reguladores del complemento (**tabla7**). En el paciente HUS3, se identificaron dos mutaciones en el gen *CHF*, V1197A y  $\Delta$ exon2, cada una de ellas en un alelo diferente. En los individuos HUS36 y HUS37 se encontraron mutaciones en los genes *CHF* y *MCP*, mientras que en HUS68 y HUS109 se encontraron mutaciones en *MCP* e *IF*, destacando además que HUS109 tiene los dos alelos de *MCP* mutados. Y por último, HUS124 presenta una mutación en el gen *CFH* y otra en el gen *IF*.

En resumen, en nuestro registro de enfermos aHUS nos encontramos un 14,3% de los pacientes con mutaciones en *CHF*, un 12,2% con mutaciones en *MCP*, y un 5,1% con mutaciones en *IF* (**figura 10**).



**Figura 10. Porcentaje de pacientes de aHUS en los que se han identificado mutaciones en los genes *CFH*, *MCP* e *IF*.**

## **1.2. Variantes polimórficas del RCA asociados al aHUS.**

A parte de las mutaciones encontradas en los genes *CFH*, *MCP* e *IF*, se ha descrito una asociación entre determinadas variantes polimórficas comunes del RCA y el aHUS. En un primer estudio se describió una clara asociación de la enfermedad con los siguientes alelos del gen *CFH*: -332T en la región promotora, c.2016G en el exón 14 (SCR11) y c.2808T en el exon 19 (SCR16) (Caprioli et al., 2003). Posteriormente en nuestro laboratorio, se identificaron una serie de SNPs en el gen *MCP* asociados con el aHUS (-547G y -261G en la región promotora, IVS9 - 78A, IVS12 + 638A y c.2232C>T, este último situado en la región 3'UTR). Se observó además que estos alelos estaban en desequilibrio de ligamiento constituyendo un haplotipo de riesgo para la patología que se denominó *MCP<sub>ggaac</sub>* (Esparza-Gordillo et al., 2005).

### **1.2.1. Análisis de polimorfismos en el gen *CFH* y en el gen *MCP*.**

En este contexto, se analizaron las frecuencias de determinadas variantes polimórficas de los genes *CFH* y *MCP* en nuestro registro de pacientes aHUS (98 individuos) y en una población control (139 individuos), con el objetivo de establecer su posible asociación con la enfermedad. En el gen *CFH* se analizaron los polimorfismos -332C/T, c.184G/A (SCR1), c.1204T/C (SCR7), c.2016A/G (SCR11) y c.2808G/T (SCR16). Para analizar las variantes polimórficas del gen *MCP*, se seleccionaron los polimorfismos de la región promotora -547A/G y -261A/G, así como el polimorfismo de la región 3'UTR c.2232T/C. El genotipado de estos SNPs se realizó por discriminación alélica utilizando sondas Taqman (tal es el caso del

SNP -332C/T en el gen *CHF* y del SNP c.2232C>T en el gen *MCP*) o mediante amplificación de las regiones de interés por PCR y secuenciación de los productos por secuenciación automática (ver apartados 11 y 12 de materiales y métodos).

Se compararon las frecuencias alélicas de cada SNP entre la población aHUS y una población de individuos control. Como se puede observar en la tabla 8, hay una asociación estadísticamente significativa entre los alelos del gen *CHF* -332T, c.184G, c.2016G y c.2808T y la población aHUS, mientras que el polimorfismo c.1204T/C aparece con la misma frecuencia en ambas poblaciones. En el gen *MCP*, los alelos -547G, -261G y c.2232C están fuertemente asociados con la patología tal y como se había descrito anteriormente (Esparza-Gordillo et al., 2005) (**tabla 8**).

### **1.2.2. Organización de haplotipos de las variantes polimórficas del gen *CFH*.**

Las variantes polimórficas del gen *CFH* (-332C/T, c.184G/A, c.1204T/C, c.2016A/G y c.2808G/T) se organizaron en 6 haplotipos mayoritarios mediante la aplicación del programa SNPStats y se calcularon las frecuencias de cada uno de ellos en la población de pacientes aHUS y en la población control, así como los riesgos relativos y los valores de *p* de cada uno de ellos (**figura 11**).

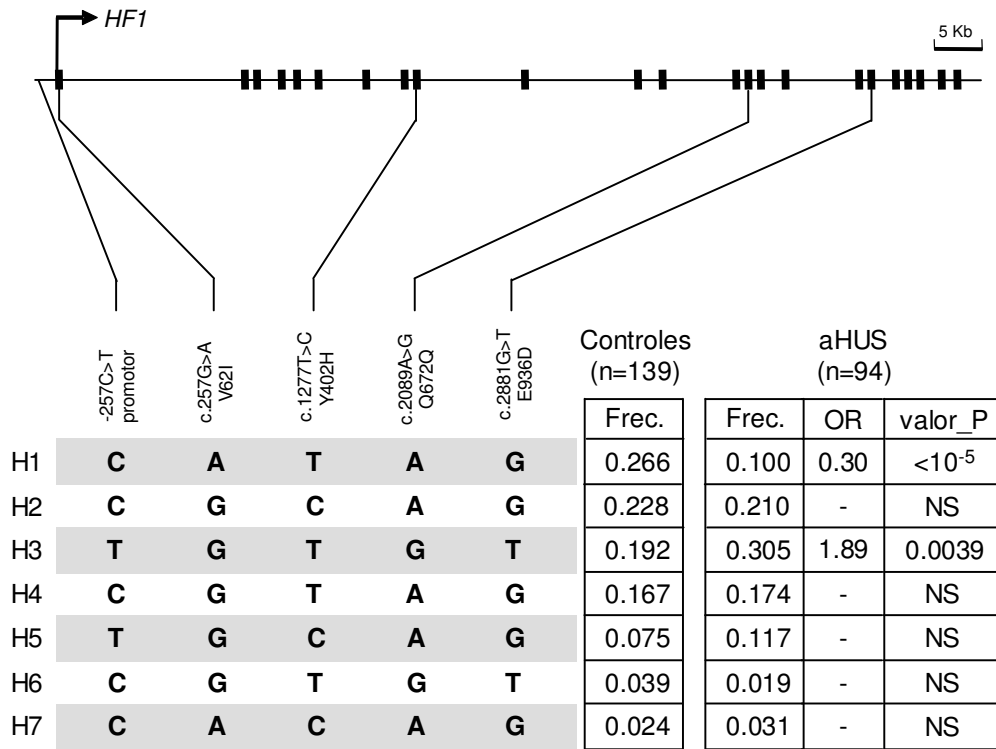
Al comparar las frecuencias en ambos grupos muestrales, se identificó un haplotipo de riesgo para la enfermedad con una diferencia en las frecuencias estadísticamente significativa. Este haplotipo, denominado H3, está compuesto por las variantes: -332T, c.184G, c.1204T, c.2016G y c.2808T, y pasa de tener una frecuencia de 0.192 en la población control a una frecuencia de 0.305 en la población aHUS (odds ratio=1.89; *p*=0.0039). Por otro lado, nos encontramos un haplotipo protector, denominado H1, que aparece con una frecuencia menor en la población aHUS con respecto a la población control (frec. Control=0.266; frec. aHUS=0.100; odds ratio=0.3; *p*=10<sup>-5</sup>).

Como se describió previamente en el trabajo de Esparza-Gordillo y col. (2005), las variantes polimórficas en el gen de *MCP* se distribuyen en dos haplotipos mayoritarios. Si consideramos la variante c.2232T del gen *MCP* como un SNP marcador del haplotipo de riesgo *MCPggaac*, podemos observar como este haplotipo está muy representado en la población aHUS con respecto a la población control (frec. Control=0.23; frec. aHUS=0.47; *p*=0.0014), tal y como se describió previamente.

En resumen, estos datos indican que variantes polimórficas en los genes *CHF* y *MCP* pueden tener una relación con la etiología de la enfermedad en nuestra serie muestral.

SNP (alelo1>alelo2)	NCBI id	Controles				Frec. Alelo		aHUS				Frec. Alelo.		Valor_p
		Genotipos				1	2	Genotipos				1	2	
		1/1	1/2	2/2	Suma			1/1	1/2	2/2	Sum			
<i>CFH -332C&gt;T</i>	Rs3753394	72	66	13	151	0.70	0.30	27	43	18	88	0.55	0.45	0.0016
<i>CFH c.184G&gt;A</i>	rs800292	70	61	7	138	0.73	0.27	71	17	3	91	0.87	0.13	0.00032
<i>CFH c.1204T&gt;C</i>	rs1061170	73	65	8	146	0.72	0.28	54	32	7	93	0.75	0.25	n.s.
<i>CFH c.2016A&gt;G</i>	rs3753396	92	55	5	152	0.79	0.21	43	36	14	93	0.66	0.34	0.0015
<i>CFH c.2808G&gt;T</i>	rs1065489	90	56	5	151	0.78	0.22	41	39	13	93	0.65	0.35	0.0017
<i>MCP -547A&gt;G</i>	rs2796267	37	27	3	67	0.75	0.25	26	42	18	86	0.55	0.45	0.0061
<i>MCP -261A&gt;G</i>	rs2796268	35	26	4	65	0.74	0.26	24	45	17	86	0.54	0.46	0.0065
<i>MCP c.2232T&gt;C</i>	rs7144	43	24	4	71	0.77	0.23	26	43	21	90	0.53	0.47	0.0014

**Tabla 8. Asociación entre SNPs del agrupamiento génico RCA y el aHUS.** La nomenclatura de los polimorfismos está referida al inicio de transcripción de cada gen, siendo la posición +1 la A del ATG. El valor\_p es el resultado de un *two-sided Fisher exact test* para la comparación de las frecuencias alélicas de cada SNP entre las poblaciones aHUS y control. n.s.=no significativo. Valor-p nominal=0.05; Valor\_p corregido por *Multiple testing*=0.003.



**Figura 11. Estructura y frecuencias de los haplotipos presentes en el gen *CHF*.** La línea horizontal representa la región cromosómica del gen, con los exones indicados como rectángulos verticales. Las líneas finas indican la posición de los polimorfismos y las barras grises horizontales representan los haplotipos mayoritarios. La frecuencia de cada haplotipo en la población control y en la población HUS se muestra en las tablas de la derecha. La nomenclatura de los polimorfismos se refiere al inicio de transcripción (+1), que se indica con una flecha.



### 1.2.3. Caracterización de la actividad transcripcional de la región promotora del gen *CHF* y del gen *MCP* en células HEK293.

Dado que el haplotipo de riesgo en el gen *CHF* (H3) contiene la variante – 332T y este es un polimorfismo que está situado en un elemento de respuesta a NFκB en la región promotora (Warwicker et al., 1997), planteamos la posibilidad de que este alelo pudiera influenciar la transcripción del gen. Del mismo modo, el haplotipo de riesgo *MCP*<sub>ggaac</sub> está compuesto, entre otros, por dos SNPs de la región promotora (-547G y -261G) de los cuales, el SNP – 261 está situado en un elemento potencial de unión a CBF-1/RBP-Jκ, que es un miembro de la vía de señalización de Notch y está implicado en múltiples aspectos del desarrollo vascular. Además, CBF-1/RBP-Jκ juega un papel en la regulación de CR2, otra proteína del RCA relacionada con MCP. Por lo tanto, quisimos estudiar la posibilidad de que estos polimorfismos estuvieran implicados en la actividad transcripcional de los genes *CHF* y *MCP*.

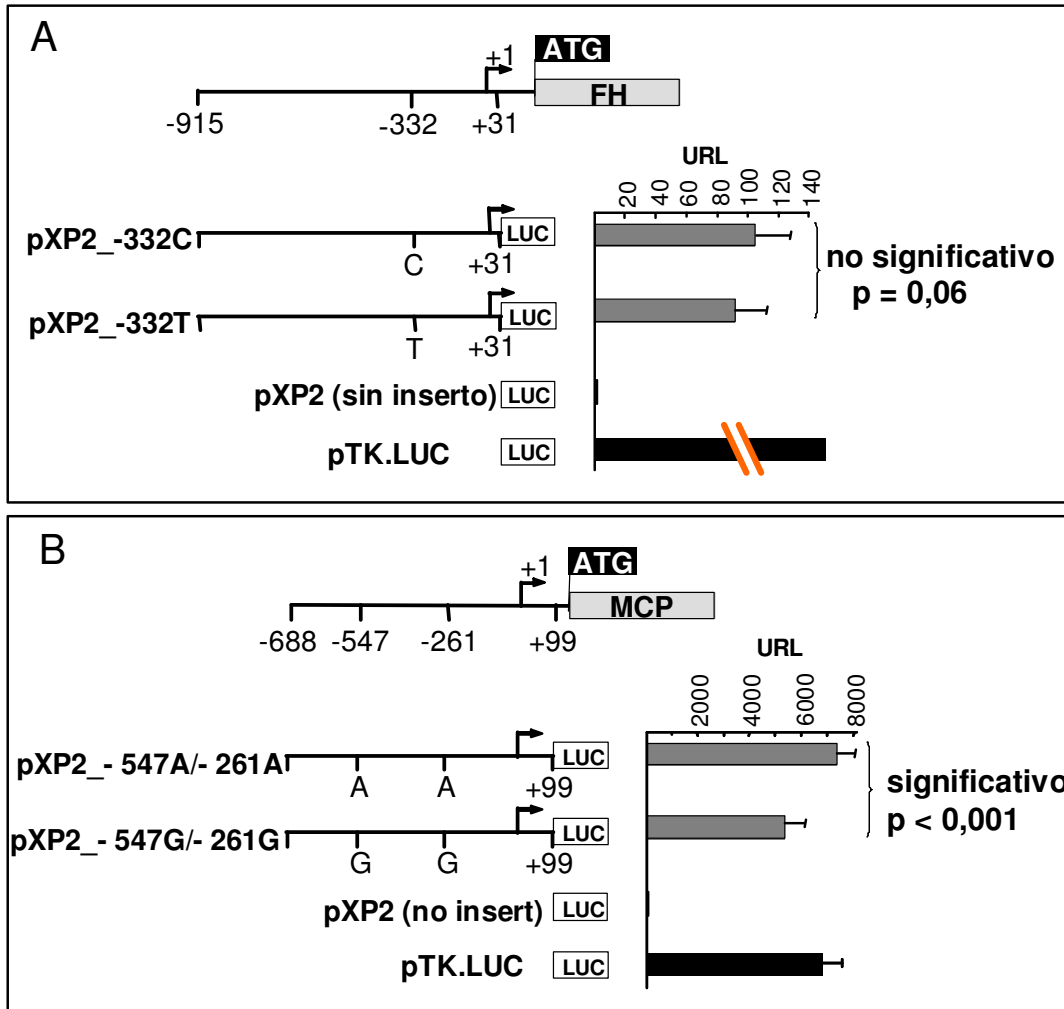
En primer lugar, se analizaron los niveles de factor H plasmático en función de los distintos genotipos del polimorfismo –332C/T de *CHF*. Los valores medios obtenidos para los genotipos C/C, C/T y T/T fueron  $322 \pm 87 \mu\text{g/ml}$ ,  $308 \pm 77 \mu\text{g/ml}$  y  $352 \pm 91 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Por lo tanto, parece que el polimorfismo -332C/T no afecta a los niveles de factor H plasmático. De forma similar, se analizaron los genotipos del SNP -261G>A en relación a los niveles de MCP detectados por citometría de flujo en PBLs. Los valores medios obtenidos fueron (preparar figura). Tampoco se detectó una asociación entre el genotipo y los niveles de proteína.

A pesar de que no parece que haya una disminución de los niveles de factor H y MCP en presencia de los alelos de riesgo – 332T y – 261G, respectivamente, quisimos estudiar la posibilidad de que estas variantes pudieran afectar a la expresión local de factor H y MCP en el epitelio del riñón. Así pues, se analizó la actividad transcripcional de las distintas variantes en las regiones promotoras de los genes *CHF* y *MCP* sobre las células HEK293.

Para estudiar el SNP – 332C/T, se amplificó por PCR un fragmento de xxxpb de la región promotora del gen *CHF* a partir de ADN genómico de individuos homocigotos C/C ó T/T. Este fragmento que contiene el polimorfismo -257C/T se clonó en el plásmido pXP2, corriente arriba del gen que codifica para la enzima luciferasa (ver materiales y métodos). De forma similar se clonaron xxxpb del promotor de *MCP*, conteniendo las variantes -547G/-261G o -547A/-261A, en el plásmido pXP2.

Estas construcciones se cotransfectaron junto con el plásmido que contiene la  $\beta$ -galactosidasa sobre las células HEK293. Como control positivo se transfectó un plásmido pXP2 que contiene la región promotora de la timidina kinasa del herpesvirus.

Tras la transfección las células se lisaron y, con los lisados, se realizaron ensayos de actividad luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa (ver mat. y mét.). En la **figura 12** se representan los valores relativos de la luciferasa de cada una de las construcciones. Como control de la transfección, se normalizaron los valores de la luciferasa en función de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. En las células HEK293 transfectadas con el promotor de factor H no se aprecia ninguna diferencia en la actividad transcripcional entre las dos variantes. Sin embargo, en las células transfectadas con el promotor de MCP se observa persistentemente una disminución de casi el 25% de la actividad transcripcional de la variante -547G/-261G con respecto a la variante -547A/-261A. Estos datos sugieren que tal vez el haplotipo *MCP*<sub>GGAAC</sub> conlleva una reducción de los niveles de expresión de MCP sobre las superficies celulares en el riñón, resultando así en un factor de riesgo para la patología.



**Figura 12. Efecto del polimorfismo -332C/T del gen *CFH* y de los polimorfismos -547A/G y -261A/G del gen *MCP*, sobre la actividad transcripcional de dichos genes en células HEK293. (A)** En la parte superior de la figura se muestra la región promotora del gen de factor H con la localización del polimorfismo -332C/T, el inicio de transcripción (+1) y el codón de iniciación ATG. La construcción pXP2\_-332C contiene el alelo -332C clonado corriente arriba del gen de la luciferasa en el plásmido pXP2. Del mismo modo, la construcción pXP2\_-332T contiene el alelo -332T. Como control negativo empleamos la construcción pXP2 que carece de inserto, y como control positivo utilizamos la construcción pTK.LUC que contiene el promotor de la timidita kinasa. **(B)** Se indica la región promotora del gen *MCP* con la localización de los polimorfismos -547A/G y -261A/G, el inicio de transcripción (+1) y el codón de iniciación ATG. La construcción pXP2\_-547A/-261A contiene los alelos -547A y -261A clonados corriente arriba del gen de la luciferasa en el plásmido pXP2. Los controles pXP2 y pTK.LUC son los mismos que los descritos en el apartado anterior.

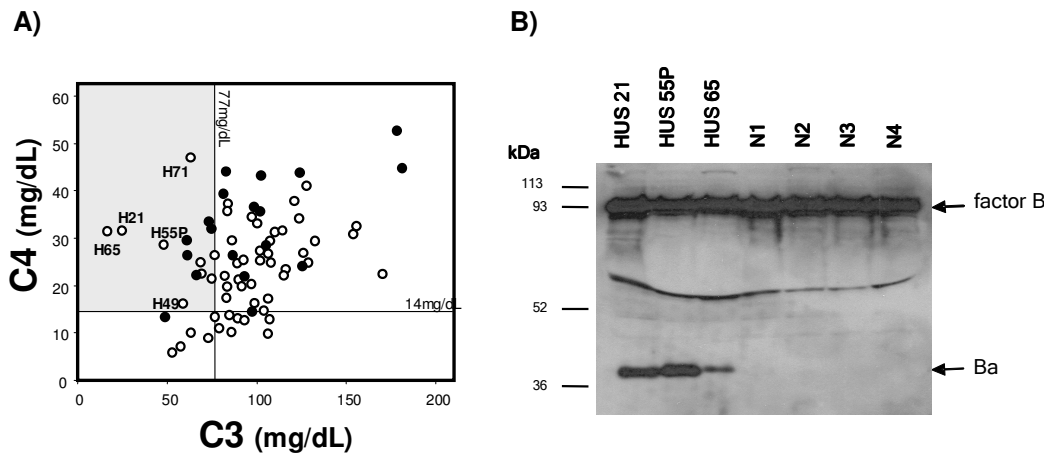
## **2. FACTOR B: UN NUEVO GEN DE SUSCEPTIBILIDAD AL aHUS.**

A pesar del enorme avance en el conocimiento de las bases moleculares del aHUS, las mutaciones y/o polimorfismos encontrados en los genes reguladores del complemento *CHF*, *MCP* e *IF*, tan solo explican el fallo genético en aproximadamente un 30% de los pacientes. Por lo tanto, aún queda un gran número de individuos en los que determinar la causa de la patología. Este hecho, unido a que la penetrancia incompleta de la enfermedad en individuos portadores de mutaciones es una característica muy común, sugiere que deben existir factores genéticos adicionales que confieran riesgo para la patología.

En este contexto, decidimos buscar nuevos genes de predisposición al aHUS. Dado que dicha patología surge como resultado de una falta de regulación del sistema de complemento, planteamos la hipótesis de que las variantes genéticas de las proteínas activadoras del complemento, que resulten en una activación exacerbada del mismo, también son factores de riesgo de aHUS. Como se verá más adelante, de las observaciones derivadas del estudio de nuestro registro de pacientes aHUS, planteamos al gen de factor B (*BF*) como un nuevo gen candidato para desarrollar la patología.

### **2.1. Identificación de un subgrupo de pacientes aHUS con evidencia de activación por la vía alternativa.**

Como se puede observar en la **figura 13A**, la mayor parte de los pacientes de aHUS presentan niveles normales de C3 y C4 indicando que, en general, los pacientes de aHUS no son hipocomplementémicos. Sin embargo, existen algunos individuos como HUS21, HUS49, HUS55P, HUS65 y HUS71, que no tienen mutaciones en ninguno de los genes reguladores del complemento y que presentan de forma persistente niveles bajos de C3 y niveles normales o incluso elevados de C4. Este hecho sugiere que en estos individuos está teniendo lugar una activación del complemento por la vía alternativa. Si analizamos el plasma de estos pacientes por Western Blot (**figura 13B**) podemos observar como aparece el fragmento Ba como resultado de la activación del complemento por la vía alternativa. Sin embargo, no hay evidencias de activación en el plasma de 4 individuos sanos (**figura 13B**).



**Figura 13. Niveles de C3 y C4 en el plasma de los pacientes aHUS. (A)** La línea vertical dentro de la gráfica señala el valor umbral de C3 en plasma (77mg/dl) por debajo del cual se consideran niveles bajos de C3. Del mismo modo, la línea horizontal indica el valor umbral de C4 en plasma (14mg/dl) por debajo del cual se consideran niveles bajos de C4. Cada circulito representa un paciente aHUS y aquellos que están en negro hacen referencia a los individuos con mutaciones en alguno de los genes del complemento. Como muestra el diagrama, la mayoría de los pacientes presentan niveles normales de C3 y de C4 en plasma. Se han señalado algunos de los pacientes que tienen niveles bajos de C3 y niveles normales de C4. **(B)** Análisis por western blot del factor B en el plasma de pacientes aHUS con niveles bajos de C3 y en individuos sanos (N1-4). En los plasmas de HUS21, HUS55P y HUS65, además de la banda de factor B se detecta el producto proteolítico Ba demostrando una activación de la vía alternativa del complemento.

Es interesante además, que el paciente HUS55P pertenece a un pedigrí español con múltiples afectos, en el que la enfermedad segrega con la región MHC en el cromosoma 6q24 (Carreras et al., 1981), región donde se localiza el gen de factor B (*BF*).

Por ello, se decidió realizar un cribado mutacional del gen *BF* en aquellos individuos que presentaban evidencia de la activación del sistema del complemento por la vía alternativa.

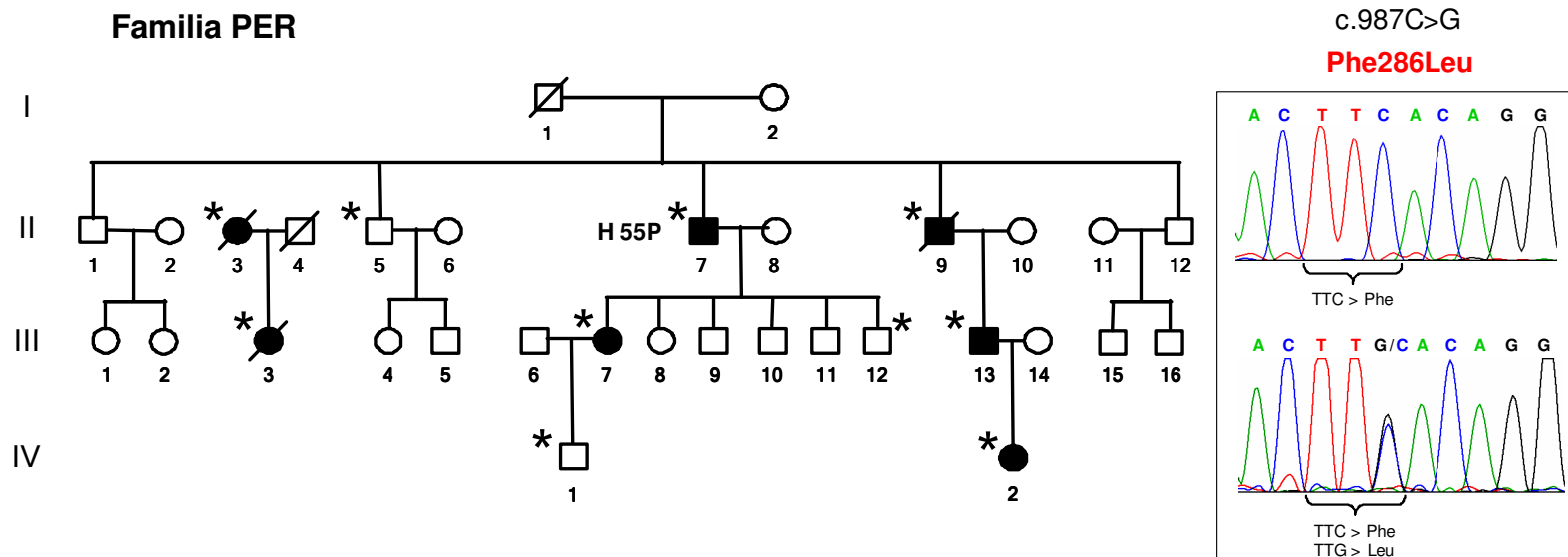
## 2.2. Identificación de mutaciones en factor B en pacientes con activación de la vía alternativa.

Se analizó el gen *BF* en los pacientes sin mutaciones en genes reguladores del complemento, con niveles bajos de C3 y niveles normales de C4 (ver **tabla 5** en materiales y métodos). Estos son: HUS19, HUS21, HUS41, HUS55P, HUS71, HUS80, HUS81, HUS85, HUS103, HUS113 y HUS137.

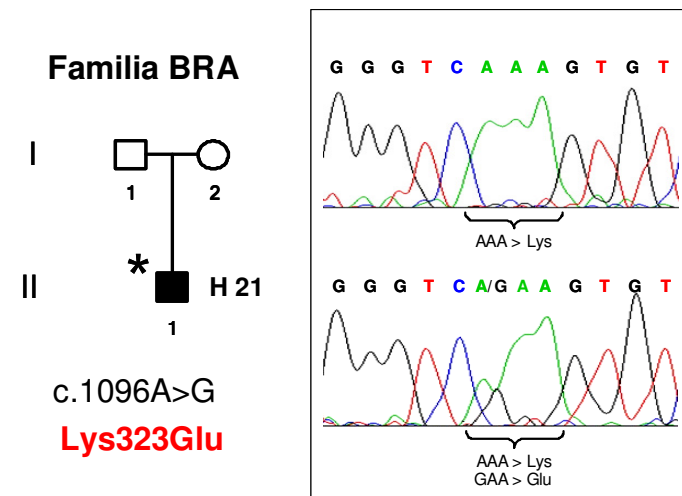
Se amplificaron por PCR todos los exones del gen *BF* a partir de ADN genómico y se secuenciaron los productos obtenidos. Dentro de este subgrupo de pacientes, los individuos HUS21 y HUS55P resultaron ser portadores de mutaciones missense en heterocigosis en el gen de factor B. HUS21 es portador de la mutación c.1096A>G (K323E) en el exón 7, que codifica para el dominio del factor von Willebrand tipo A (vWfA) de factor B. K323E es una mutación *de novo* que no está presente en los padres de HUS21 (**figura 14**). La integridad de la muestra en los padres de HUS21 (familia BRA) se confirmó genotipando varios marcadores en el RCA. La secuenciación genómica de *BF* en HUS55P detectó la mutación c.987C>G (F286L) en el exón 6, que codifica para el dominio vWfA. La mutación F286L segrega con niveles bajos de C3 que presentan diversos miembros del pedigrí (familia PER) y la heredan todos los individuos afectados de este pedigrí.

Se analizó además la presencia de las mutaciones F286L y K323E en población control. Para la detección del cambio c.987C>G (F286L) se desarrolló una sonda Taqman, mientras que el cambio c.1096A>G (K323E) se analizó mediante RFLP ya que se crea un sitio de restricción TaqI. Las mutaciones F286L y K323E no se encontraron en más de 100 individuos sanos analizados.

A)



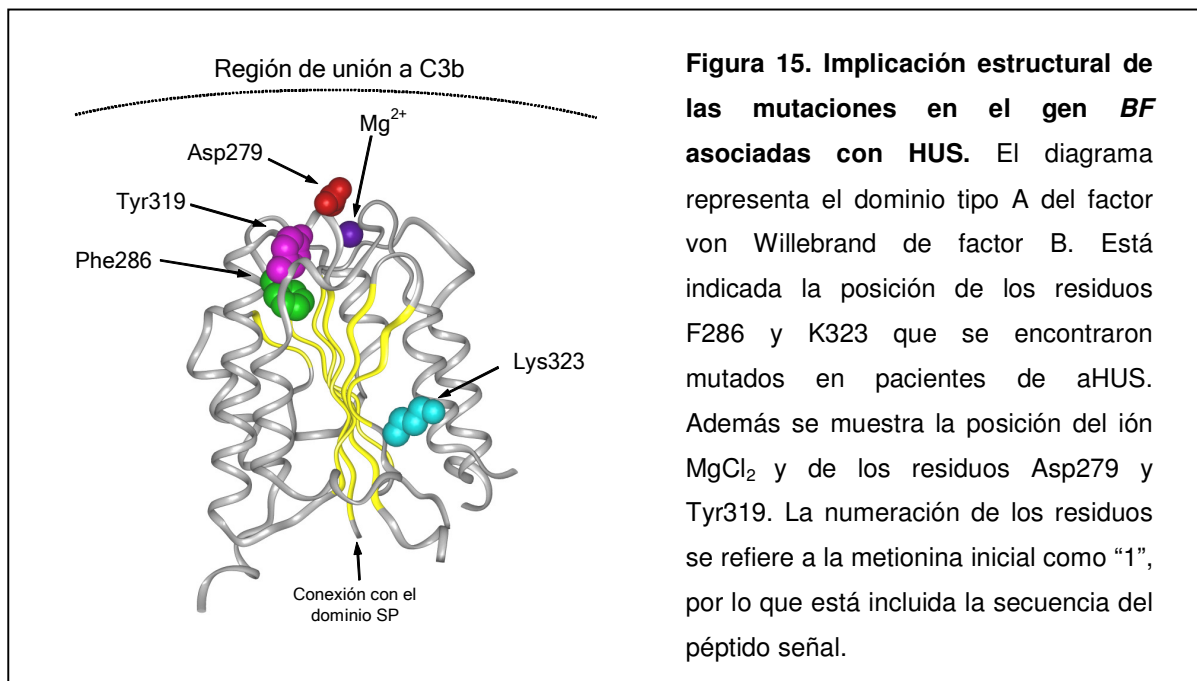
B)



**Figura 14. Mutaciones en el gen *BF* en dos pedigrís con aHUS.** Las casillas en negro representan los individuos con HUS. El asterisco señala a los portadores de las mutaciones. Las casillas cruzadas se refieren a individuos fallecidos. **A)** Pedigrí de la familia PER a la que pertenece HUS55P. En este familia se ha identificado la mutación c.987C>G que provoca un cambio F286L en heterocigosis. **B)** En el pedigrí de HUS21 (BRA) se ha identificado el cambio c.1096 en heterocigosis que provoca la sustitución de la lisina en posición 323 por glutámico.

### 2.3. Situación de las mutaciones F286L y K323E en factor B.

Como ya se ha comentado previamente en la introducción, el factor B proporciona el sitio catalítico de la convertasa C3bBb de la vía alternativa. Tras la interacción con C3b, factor B es cortado por factor D en dos fragmentos, Ba y Bb. El fragmento Ba se libera mientras que el fragmento Bb permanece unido a C3b formando así la convertasa de la vía alternativa, C3bBb. El fragmento Bb consiste fundamentalmente de dos dominios proteicos, el dominio vWfA y el dominio serin proteasa. La interacción del fragmento Bb con C3b tiene lugar a través del dominio vWfA y es dependiente de los iones  $Mg^{2+}$  o  $Ni^{2+}$ .



Con el fin de analizar las posibles implicaciones estructurales de las mutaciones F286L y K323E en factor B, se han localizado dichas mutaciones en la estructura de la molécula. Para ello, mediante el programa Insight II se ha modelado la estructura del dominio vWfA y se han situado los residuos F286 y K323 en la misma. Como se puede observar en la **figura 15**, el residuo F286 es adyacente al residuo Y319, que se encuentra expuesto en la región de interacción del dominio vWfA con el C3b. En este contexto, el cambio F286L podría afectar a la movilidad del residuo Y319 y modificar la



interacción entre el factor B y el C3b, alterando la estabilidad de la convertasa. La mutación K323E en cambio, afecta a un residuo interno próximo a las  $\alpha$ -hélices 4 y 5. Esta región podría estar implicada en la interacción con los reguladores del complemento DAF, CR1 y factor H (Hourcade et al., 2002).

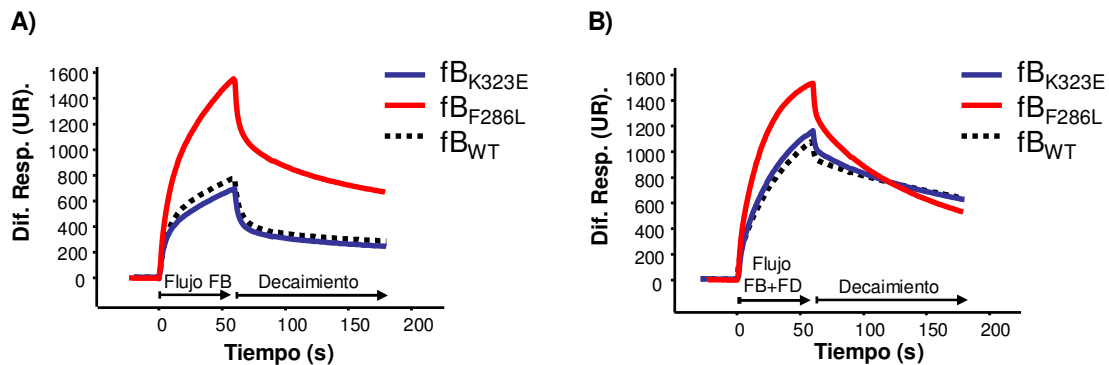
#### **2.4. Caracterización funcional de las mutaciones F286L y K323E.**

Con el fin de estudiar el efecto de las mutaciones F286L y K323E, se purificó el factor B a partir de plasma-EDTA tanto de individuos portadores de las mutaciones como de individuos sanos (ver apartado 2.4 de materiales y métodos). La caracterización funcional de las proteínas mutantes se llevó a cabo con la colaboración con los Drs. Claire Harris y Paul Morgan (*Department of Medical Biochemistry and Immunology, Cardiff University*). Se analizó la capacidad de formación y disociación de la convertasa de C3 en tiempo real, mediante la técnica de resonancia en plasmón de superficie (RPS).

En primer lugar, se sometió el factor B control o mutante sobre una superficie en la que previamente se había unido el C3b a través de su grupo tioester, tanto en ausencia como en presencia de factor D (2 $\mu$ g/ml) para valorar la formación de la proenzima (C3bB) o de la enzima activa (C3bBb), respectivamente.

El factor B purificado del paciente HUS55P y que es portador de la mutación F286L (fB<sub>F286L</sub>), dio lugar a un complejo C3bB de manera mucho más rápida y eficiente que el formado por el factor B control o el factor B purificado del paciente HUS21 y que lleva la mutación K323E (fB<sub>K323E</sub>) (**figura 16A**). En presencia de factor D (**figura 16B**), se observó un incremento similar en la formación del complejo C3bBb en el caso del factor B control y el fB<sub>K323E</sub>, mientras que para el fB<sub>F286L</sub> no se apreció ningún incremento en la formación de la convertasa con respecto a la situación anterior sin factor D. Sin embargo, se detectó una disociación mayor de la convertasa formada por el fB<sub>F286L</sub> con respecto a la disociación obtenida por la convertasa formada por el factor B control o fB<sub>K323E</sub>.

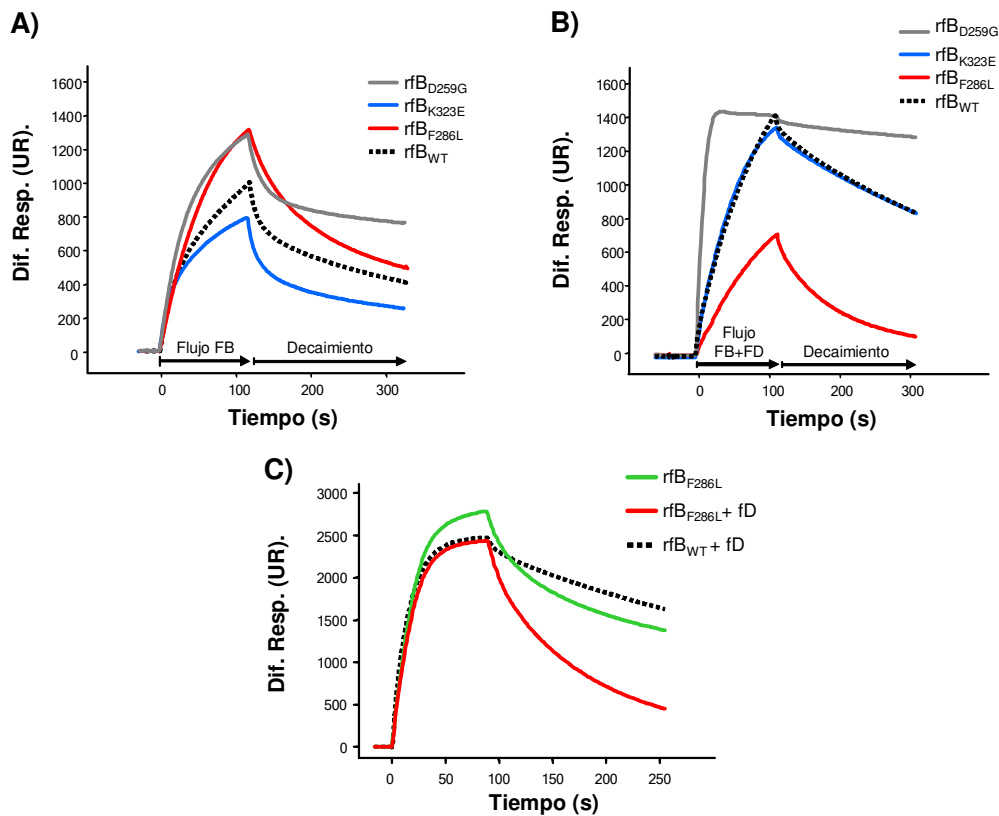
Puesto que las preparaciones de factor B purificados a partir del plasma de los pacientes HUS55P y HUS21, contienen una mezcla de factor B salvaje y mutante (debido a la presencia de las mutaciones en heterocigosis), decidimos repetir estos experimentos con proteínas recombinantes para asegurarnos de que las diferencias



**Figura 16. Análisis por RPS de los factores B purificados a partir de plasma. (A)** Formación de los complejos C3bB. El factor B control ( $fB_{WT}$ ) y el factor B purificado a partir del plasma del paciente HUS21 ( $fB_{K323E}$ ) forman unos niveles similares de proenzima, mientras que el factor B purificado del paciente HUS55P ( $fB_{F286L}$ ) forma el complejo C3bB de una forma más rápida y eficiente. **(B)** Formación de los complejos C3bBb. En presencia de factor D, el  $fB_{WT}$  y  $fB_{K323E}$  forman la convertasa de C3 en un nivel similar. El  $fB_{F286L}$  forma gran cantidad de complejo con C3b tanto en ausencia como en presencia de fD. Dif. Resp, diferencia de respuesta. UR, unidades relativas.

encontradas en la formación de los complejos son debidas al efecto de la mutaciones. Para ello, se produjeron proteínas recombinantes del factor B control y de los mutantes F286L y K323E. Además, se generó el mutante D279G como un control positivo, ya que está descrito que incrementa la estabilidad de la convertasa (Hourcade et al., 1999). Las proteínas recombinantes se produjeron en cultivos de células CHO y, posteriormente, se purificaron de los sobrenadantes de estos cultivos siguiendo el mismo protocolo descrito para la purificación del factor B a partir de plasma. Finalmente, se analizaron la formación de los complejos de proenzima y de enzima activa con estas proteínas recombinantes.

En ausencia de factor D, el complejo C3bB formado por el  $fB_{F286L}$  mostró un incremento similar al observado con la proteína nativa y a un nivel comparable al complejo formado por el control positivo  $fB_{D279G}$ , sugiriendo que la unión inicial entre C3b y el factor B portador de la mutación F286L es más eficiente (**figura 17A**). El factor B recombinante con la mutación K323E ( $fB_{K323E}$ ), forma un complejo comparable al formado por el factor B control ( $fB_{WT}$ ) comportándose como la proteína nativa (**figura 17A**).



**Figura 17. Análisis por RPS de los factores B recombinantes. A)** Formación de los complejos C3bB (en ausencia de factor D). rfB<sub>WT</sub> y rfB<sub>K323E</sub> forman niveles similares de proenzima, mientras que rfB<sub>F286L</sub> forma el complejo C3bB de forma más rápida y a un nivel mayor, comparable al obtenido por el mutante rfB<sub>D279G</sub>. **B)** Formación de C3bBb en presencia del factor D. A 10 µg/ml, el rfB<sub>WT</sub> y rfB<sub>K323E</sub> forman niveles similares de complejo C3bBb. El rfB<sub>F286L</sub> forma niveles más bajos de complejo con C3b en presencia de factor D, como consecuencia de una aceleración en la tasa de disociación del fragmento Bb. **C)** Formación de C3bBb. A 37 µg/ml, el rfB<sub>F286L</sub> forma altos niveles de proenzima, pero cuando se incubaba con factor D, los niveles de la enzima formada tanto por rfB<sub>WT</sub> y rfB<sub>F286L</sub> fueron comparables. Dif. Resp, diferencia de respuesta. UR, unidades relativas.

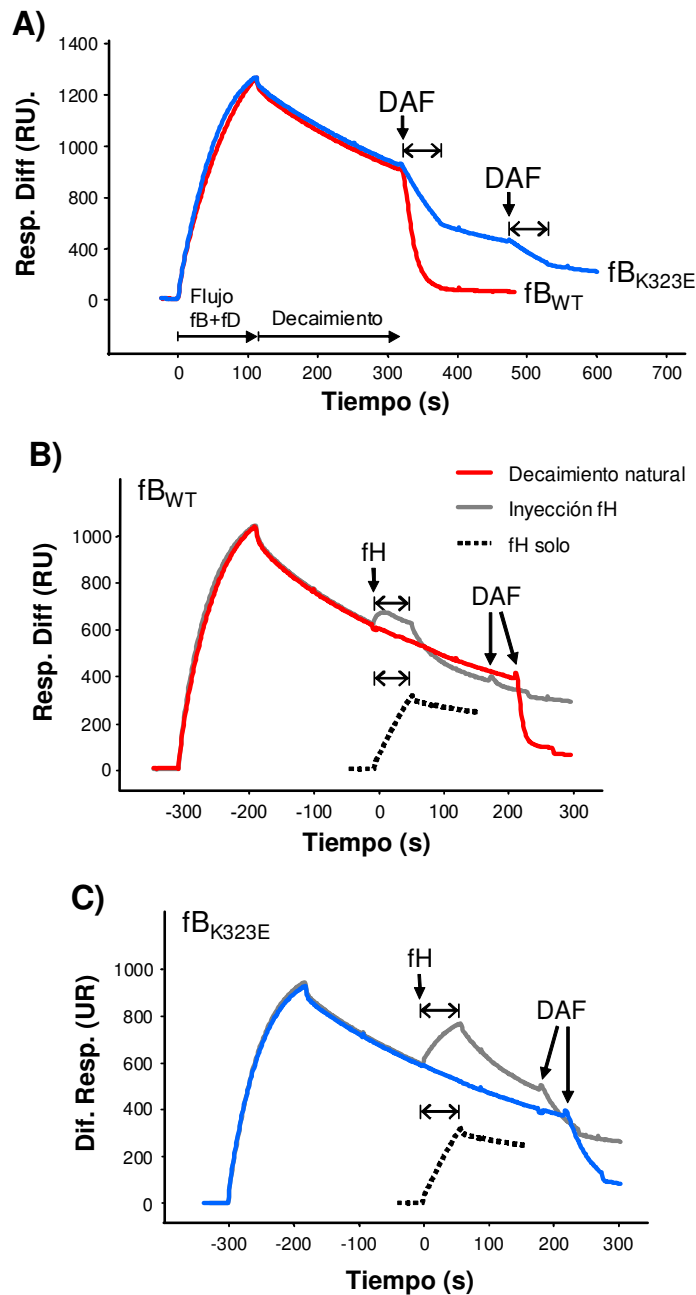
En presencia de factor D (**figura 17B**), rfB<sub>F286L</sub> forma menos cantidad de enzima activa cuando se realiza el experimento a baja concentración de factor B (10 µg/ml), como consecuencia de una elevada tasa de decaimiento de la enzima. Curiosamente, cuando se emplean concentraciones mayores de factor B (37µg/ml) (**figura 17C**), el nivel de enzima activa se asemeja a la formada por el factor B salvaje, aunque se sigue observando un mayor decaimiento de la convertasa con respecto a la proteína salvaje.

La formación y decaimiento de la convertasa para el mutante K323E, en presencia de factor D, es de nuevo comparable a la formada por el factor B control.

Hasta el momento, solo se ha detectado un comportamiento anómalo en el mutante  $fB_{F286L}$ , que podría explicar la ganancia de función de la proteína y su implicación con la patología. Sin embargo, el mutante  $fB_{K323E}$  se comportó de forma similar al factor B salvaje en cuanto a la formación de la proenzima y de la convertasa. Por ello, decidimos explorar otros aspectos de las convertasas con el fin de identificar un posible defecto de la proteína  $fB_{K323E}$ . Con este motivo, se analizó por RPS la capacidad de los reguladores del complemento DAF y factor H de disociar la enzima activa.

En primer lugar, se formó la convertasa de C3 pasando las proteínas recombinantes  $fB_{WT}$  y  $fB_{K323E}$  sobre la superficie de C3b en presencia de factor D. Tras dejar decaer la enzima de forma natural durante varios minutos, se pasó DAF soluble (600 nM) a través de la superficie. Como se puede observar en la **figura 18A**, el  $fB_{WT}$  se liberó rápidamente de la superficie, mientras que el complejo C3bBb formado por el  $fB_{K323E}$  fue mucho más resistente a la disociación incluso tras una segunda inyección de DAF soluble. De forma similar, la enzima fue más resistente a la disociación por factor H (**figura 18C**).

A diferencia de DAF, que se disocia rápidamente de la convertasa tras la disociación, la unión del factor H a C3b es estable. Por lo tanto, tras la inyección de factor H (40 mM) a la superficie con la convertasa, se produce un aumento en la cantidad de proteína total unida a la superficie, que es el resultado final del balance entre la unión del factor H y la liberación del fragmento Bb del complejo. Para visualizar el cambio debido a la unión del factor H exclusivamente, se inyectó factor H sobre una superficie de C3b sin factor B (**figura 18B y 18C**; línea punteada). Durante la inyección de factor H sobre la convertasa formada por el  $fB_{WT}$ , el balance entre la unión de factor H y la disociación del fragmento Bb resulta en un ligero aumento en la cantidad de proteína total unida (**figura 18B**). Para distinguir entre el factor H unido y el fragmento Bb residual, se añadió DAF soluble a la superficie. Dado que no se apreció ninguna disociación, se pudo concluir que el factor H disoció la convertasa en su totalidad. Por el contrario, cuando se añade DAF a una convertasa idéntica y que no ha sido disociada por factor H, se puede observar una disociación eficiente de la enzima (**figura 18B**).



**Figura 18. Análisis por RPS de la disociación mediada por DAF y factor H de la convertasa formada por  $fB_{K323E}$ .** A) Disociación por DAF. Una vez formada la convertasa en presencia de fD se deja decaer libremente el complejo durante unos minutos antes de añadir DAF soluble. El fragmento Bb de  $fB_{WT}$  se libera rápidamente por una aceleración del decaimiento del complejo C3bBb, mientras que el fragmento Bb de  $fB_{K323E}$  muestra una disociación menor y más lenta del complejo. Tras una segunda inyección de DAF soluble, todavía permanece parte de Bb del mutante unido al C3b. Dif. Resp, diferencia de respuesta. UR, unidades relativas.

Cuando el factor H se somete a una superficie con la convertasa del  $fB_{K323E}$  formada (**figura 18C**), se observa un gran aumento en la masa indicando que la disociación de la convertasa está impedida. La adición de DAF a esta convertasa provoca la disociación de la enzima, por lo que se confirma la presencia de Bb residual.

En resumen, estos ensayos funcionales demuestran cada uno de los mutantes de factor B provocan un aumento en la activación de la vía alternativa. La mutación F286L genera un factor B con una capacidad mayor para interaccionar con C3b, dando lugar a más enzima activa, mientras que la mutación K323E, genera una molécula más resistente a la disociación de la convertasa por los reguladores DAF y factor H. El descubrimiento de las mutaciones ganancia de función en el gen *BF* y su asociación con el aHUS pone de manifiesto la importancia de la convertasa de C3 de la vía alternativa en la patogénesis de la enfermedad.

## **2.5. La penetrancia de la enfermedad en portadores de mutaciones en factor B está modulada por otros alelos de riesgo del complemento.**

En el pedigrí PER, se han identificado 11 individuos portadores de la mutación F286L en el gen *BF*, pero tan solo 7 de ellos han desarrollado la enfermedad y el resto son lo suficientemente mayores para pensar que están fuera de riesgo. Para profundizar más en los factores que puedan estar modulando la manifestación de la enfermedad en esta familia, analizamos la presencia de los haplotipos de riesgo en el gen *CHF* (H3) y *MCP* (*MCPggaac*) en todos los miembros de la familia. Se analizaron 4 SNPs en el gen *CFH* (-331C/T, c.994C/A, c.2016A/G y c.2808G/T) y 5 SNPS en el gen *MCP* (-547A/G, -261A/G, IVS9-78G/A, IVS12+638G/A y c.2232T/C) y se construyeron los bloques haplotípicos (**Tabla 9**).

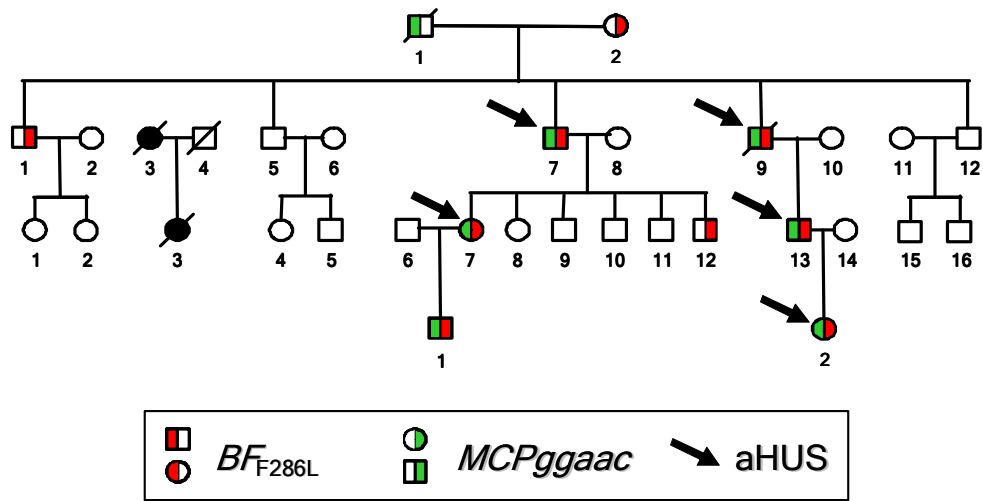
Como se puede observar en la **figura 19**, dentro del grupo de portadores de la mutación F286L, solo los individuos que desarrollaron la enfermedad son portadores además del haplotipo de riesgo *MCPggaac*, a excepción del individuo IV-I, que todavía es bastante joven y podría desarrollar la patología, indicando que en esta familia la combinación de la mutación en el gen *BF* con el haplotipo de riesgo *MCPggaac* son los responsables de determinar la penetrancia de la enfermedad. Curiosamente, en el individuo afecto de la familia BRA (II-1) también está presente el haplotipo *MCPggaac* además de la mutación K323E en *BF* (**Tabla 9**).

Estos datos apoyan la idea de que el fenotipo del HUS asociado a las mutaciones ganancia de función en *BF*, está modulado por variantes genéticas comunes en los reguladores del complemento, como el alelo *MCPggaac*, que se asocia con un incremento del riesgo a padecer la enfermedad.

		CFH -332C/T	CFH c.921C/A	CFH c.2016A/G	CFH c.2808G/T	MCP -547A/G	MCP -261A/G	MCP IVS9-78G/A	MCP IVS12+638G/A	MCP c.2232T/C	Status enfermedad (edad de inicio; edad actual)
PER (F286L)	I-2	T	C	A	G	A	A	G	G	T	Sano (88)
		T	C	A	G	A	A	G	G	T	
	II-5	T	C	A	G	A	A	G	G	T	Sano (60)
		C	A	A	G	A	A	G	G	T	
	II-7 (HUS55P)	T	C	A	G	A	A	G	G	T	Afecto (48a;59a)
		C	A	A	G	G	G	A	A	C	
	II-9 (HUS85P)	T	C	A	G	A	A	G	G	T	Afecto (35a;fallecido)
		C	A	A	G	G	G	A	A	C	
	III- 7(HUS55)	C	A	A	G	G	G	A	A	C	Afecto (23a;34a)
		T	C	G	T	G	G	A	A	C	
III-12	T	C	A	G	A	A	G	G	T	Sano (20)	
	T	C	G	T	A	A	G	G	T		
III-13 (HUS85)	C	C	A	G	A	A	G	G	C	Afecto (2a;29a)	
	C	A	A	G	G	G	A	A	C		
IV-1	T	C	G	T	A	A	G	G	T	Sano (15a)	
	C	C	A	G	G	G	A	A	C		
IV-2 (HUS112)	T	C	G	T	G	A	G	G	T	Afecto (4me;9me)	
	C	A	A	G	G	G	A	A	C		
BRA (K323E)	II-1 (HUS21)	T	C	G	T	A	A	G	G	T	Afecto (4me;6a)
		C	A	A	G	G	G	A	A	C	

Tabla 9. Haplotipos de *CFH* y *MCP* y status de la enfermedad en los portadores de las mutaciones en el gen *BF*. El sombreado gris señala el haplotipo de riesgo *MCP<sub>ggaac</sub>*-a, años. me, meses.





**Figura 19. Confluencia de factores genéticos de predisposición a HUS en individuos con la patología.** Las casillas en rojo señalan a los individuos con la mutación F286L en factor B. Las casillas en verde indican los miembros de la familia portadores del haplotipo de riesgo *MCP<sub>ggaac</sub>*. La flecha señala a los individuos con aHUS. Sólo los individuos portadores de la mutación en factor B y del haplotipo *MCP<sub>ggaac</sub>* desarrollan aHUS en esta familia.

### 3. CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO ANIMAL DE aHUS

A lo largo de los últimos años en el laboratorio, se ha avanzado de forma espectacular en el conocimiento de las bases moleculares del aHUS, proporcionando grandes contribuciones al campo. Gracias a la creación de un registro español de pacientes del aHUS, se ha podido disponer de muestras de pacientes que han permitido el estudio exhaustivo de la enfermedad desde un punto de vista genético y proteómico. Estos estudios han proporcionado al laboratorio el conocimiento, la experiencia y las herramientas necesarias para desarrollar el modelo animal del aHUS.

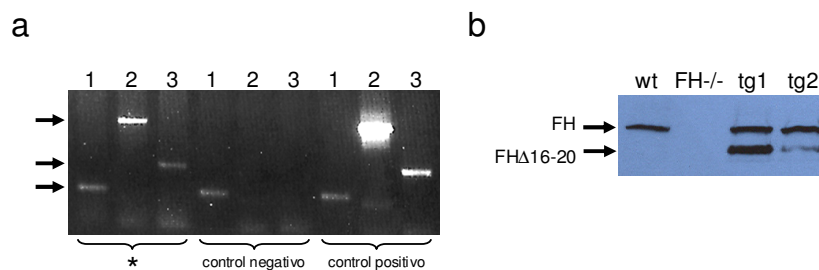
De los datos generados en nuestro laboratorio y en otros grupos, se sabe que en los pacientes del aHUS existe un defecto en la regulación de la activación de la vía alternativa del complemento sobre las superficies celulares. Este hecho, unido a que la mayor parte de los pacientes no son hipocomplementémicos, nos hizo plantear la hipótesis de que para que se desarrolle el aHUS, es necesaria es necesaria la combinación de una regulación intacta de C3 en fase fluida y una regulación deficiente de la activación de C3 sobre el endotelio renal.

Para conseguir este objetivo, planteamos desarrollar un ratón transgénico que exprese una proteína de factor H de ratón (FH $\Delta$ 16-20) a la que le faltan los últimos 5 dominios SCR, que es la región equivalente en el ratón a la mayor parte de las mutaciones asociadas al aHUS en el factor H humano. Estos animales se cruzan posteriormente con los ratones deficientes de factor H (Cfh<sup>-/-</sup>), para generar animales que expresen la proteína mutante sola (Cfh<sup>-/-</sup>. FH $\Delta$ 16-20) o en combinación con el factor H de ratón completo (Cfh<sup>+/-</sup>. FH $\Delta$ 16-20).

Este proyecto no hubiera podido tener lugar sin la colaboración de los Dres. Matthew Pickering y Marina Botto del *Imperial College* de Londres. En primer lugar porque son, entre otros, los autores del ratón deficiente de factor H (Pickering et al., 2002) que se ha empleado para el desarrollo del modelo animal de aHUS y, en segundo lugar, porque han aportado su experiencia para el análisis del fenotipo del ratón, siendo los responsables de la caracterización del aHUS a nivel renal (cortes histológicos, análisis por inmunofluorescencia, microscopia electrónica).

### 3.1. Generación de los ratones transgénicos: *Cfh*<sup>-/-</sup>. FH $\Delta$ 16-20 y *Cfh*<sup>+/-</sup>. FH $\Delta$ 16-20.

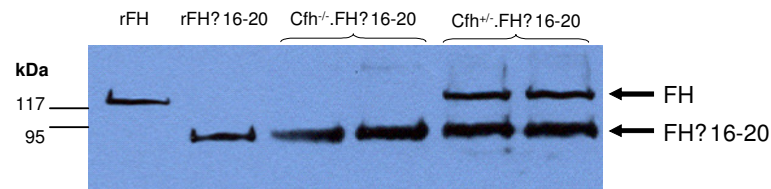
Los ratones transgénicos que expresan la proteína truncada de factor H, FH $\Delta$ 16-20, se han generado por el procedimiento clásico de microinyección nuclear de ADN lineal en oocitos de ratón fertilizados CBA x C57BL/6. La construcción utilizada se describe en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos (16.1). La progenie resultante se analizó por PCR para identificar aquellos ratones que integraron el transgen en su genoma (**figura 20a**) y, posteriormente, los individuos positivos para el transgen se analizaron por western blot para confirmar la presencia de la proteína mutante en el plasma.



**Figura 20. a) Genotipado por PCR de las primeras camadas de ratones obtenidas tras la microinyección.** Cada muestra se amplifica con tres parejas de primers diferentes: (1) específica de GTP, (2) y (3) son dos parejas de primers específicos del transgén. Las flechas señalan los correspondientes fragmentos amplificados. El asterisco muestra un animal que resultó positivo para el ADNc de factor H de ratón. **b) Ejemplo de análisis por western blot del factor H en el plasma de los ratones positivos para el transgen.** Ratón silvestre (wt), ratón knock-out de factor H (FH<sup>-/-</sup>), tg1 y tg2 son dos ejemplos de ratones transgénicos detectados por PCR. La flecha superior indica la banda correspondiente al factor H silvestre y la flecha inferior señala la posición de la proteína FH $\Delta$ 16-20, que puesto que carece de cinco SCRs, migra de acuerdo a un peso molecular menor.

Como se puede observar la **figura 20b**, se obtuvieron ratones con un nivel de expresión de la proteína mutante muy diferente. El ratón tg1 muestra un nivel de expresión de la proteína FH $\Delta$ 16-20 similar al factor H endógeno, mientras que el ratón tg2 presenta niveles de la proteína mutante muy por debajo del valor normal. Para la generación de líneas estables se seleccionaron tanto ratones transgénicos que presentaban un alto grado de expresión en plasma de la proteína FH $\Delta$ 16-20, así como ratones con baja expresión de la proteína mutante.

Posteriormente, mediante entrecruzamientos de los ratones transgénicos y los ratones deficientes de factor H ( $Cfh^{-/-}$ ), se obtuvieron ratones que expresan o bien la proteína FH $\Delta$ 16-20 exclusivamente ( $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20) o en combinación con el factor H salvaje ( $Cfh^{+/-}$ . FH $\Delta$ 16-20) (**figura 21**).



**Figura 21. Análisis por Western Blot del FH plasmático de los ratones transgénicos.** Como controles del factor H silvestre y de la proteína mutante FH $\Delta$ 16-20 se utilizaron las proteínas recombinantes, rFH y rFH $\Delta$ 16-20, respectivamente. Se muestran dos ejemplos de ratones  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 y dos ejemplos de ratones  $Cfh^{+/-}$ . FH $\Delta$ 16-20.

### 3.2. Caracterización *in vitro* de la proteína FH $\Delta$ 16-20:

Como se ha comentado anteriormente, la región C-terminal de factor H está implicada en la interacción de C3b depositado sobre superficies y polianiones, mientras que la actividad cofactora se localiza en el extremo N-terminal de la molécula.

Nuestro primer objetivo se ha centrado en el análisis, *in vitro*, de la capacidad cofactora de la proteína FH $\Delta$ 16-20 en fase fluída, así como de la capacidad de esta proteína para interactuar con heparina y células HUVEC.

Para poder llevar a cabo estos ensayos, se purificó parcialmente la proteína FH $\Delta$ 16-20 a partir de plasma-EDTA de los ratones transgénicos (ver apartado 2.3 de Materiales y Métodos).

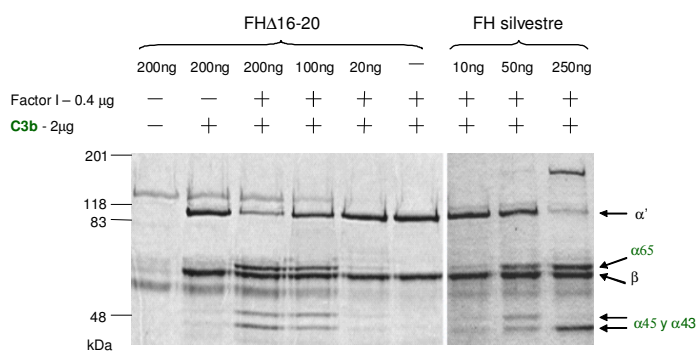
#### 3.2.1. La proteína FH $\Delta$ 16-20 mantiene su actividad reguladora intacta *in vitro*:

El factor H actúa como cofactor de factor I en la inactivación de C3b, reacción en la que se produce un corte proteolítico de la cadena  $\alpha'$  del C3b generando los fragmentos  $\alpha'65$ ,  $\alpha'45$  y  $\alpha'43$ . Con el fin de determinar la capacidad reguladora de la

proteína FH $\Delta$ 16-20 en fase fluida, se hizo un ensayo de actividad cofactora *in vitro* incubando la proteína mutante con factor I humano y C3b de ratón.

Como se puede observar en la **figura 22**, a medida que se incrementa la concentración de FH $\Delta$ 16-20, se observa una disminución de la intensidad de la banda de la cadena  $\alpha'$  de C3b y un incremento de los fragmentos  $\alpha'$ 65,  $\alpha'$ 45 y  $\alpha'$ 43.

Por lo tanto, la proteína FH $\Delta$ 16-20 mantiene intacta su actividad cofactora y es capaz de regular el complemento en fase fluida.



**Figura 22. Análisis de la actividad cofactora en fase fluida de la proteína FH $\Delta$ 1-16.**

Se incubaron cantidades crecientes de las proteínas FH silvestre y FH $\Delta$ 1-16 con C3b de ratón y factor I humano. Las flechas indican la posición de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  de C3b así como los productos de la proteólisis de la cadena  $\alpha'$  ( $\alpha$ 45,  $\alpha$ 43 y  $\alpha$ 65).

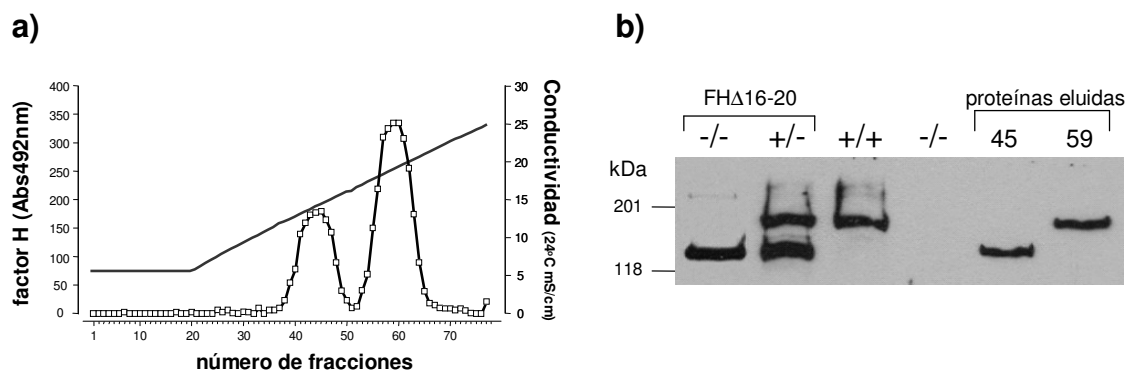
### 3.2.2. La proteína FH $\Delta$ 16-20 tiene una capacidad de unión a heparina menor que la proteína de factor H silvestre:

Está descrito que determinadas mutaciones aHUS localizadas en el extremo C-terminal de factor H provocan una disminución en la interacción de factor H con heparina (ref.). La molécula de factor H presenta tres regiones de unión a heparina, una en el SRC7, otra en los SCR12-13 y una tercera en el SCR20. La eliminación del extremo C-terminal en FH $\Delta$ 16-20 conlleva por lo tanto la pérdida de uno de los sitios de interacción con heparina por lo que la unión a este glicosaminoglicano se espera que sea menor.

Para estudiar la capacidad de interacción de FH $\Delta$ 16-20 respecto a la proteína silvestre, se sometió un suero de un ratón Cfh $+/-$ . FH $\Delta$ 16-20 a una columna de sepharosa-heparina (Hitrap). La elución de las proteínas unidas a la columna se llevó a cabo aplicando un gradiente lineal de NaCl de 35 a 200mM. Las fracciones eluidas se

analizaron por ELISA para determinar la presencia de factor H y se obtuvieron dos picos de elución claramente definidos (**figura 23a**).

Posteriormente se analizó una fracción de cada pico de elución por western blot y se pudo comprobar que la proteína FH $\Delta$ 16-20 eluía en el primer pico mientras que el factor H silvestre lo hacía en el segundo, poniendo de manifiesto que la proteína mutante interacciona de forma más débil con heparina que la proteína silvestre (**figura 23b**).



**Figura 23. Ensayo de unión a heparina. (a) Patrón de elución de factor H en una columna de Sepharose-Heparina del tipo HiTrap.** Se representan las fracciones eluidas de la columna en función de la absorbancia a 492 nm obtenida en un ensayo de ELISA para detectar el fH. **(b) Análisis por western blot de las fracciones eluidas.** Se analizaron las fracciones 45 y 59 como representación de cada pico de elución. Además se incluyeron como controles los plasmas correspondientes a ratones transgénicos que no expresan factor H silvestre (-/-), que si lo expresan en heterocigosis (+/-), un ratón silvestre (+/+), y un ratón knock-out de fH (-/-). La proteína FH $\Delta$ 16-20 aparece en el primer pico de elución de la columna.

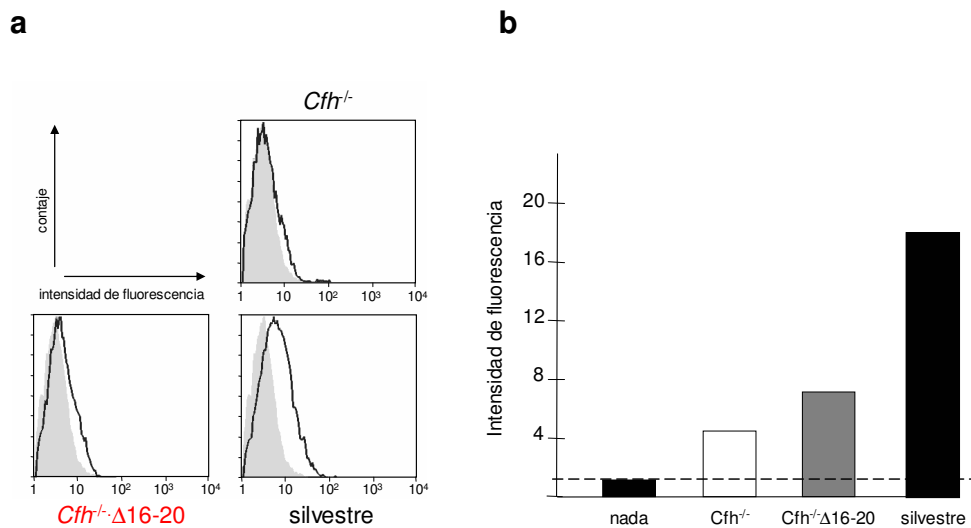
### 3.2.4 La proteína FH $\Delta$ 16-20 tiene una capacidad de unión a células HUVEC menor que la proteína de factor H silvestre:

Se ha descrito que algunas de las mutaciones aHUS localizadas en el extremo C-terminal de factor H provocan una disminución de la capacidad de factor H de interactuar con células endoteliales, lo que conllevaría a un defecto en la regulación de la activación del complemento sobre las superficies celulares.

Por lo tanto, quisimos evaluar la capacidad de interacción de la proteína FH $\Delta$ 16-20 con las células endoteliales HUVEC. Con este objetivo, las células se incubaron con

100µl de plasma-EDTA dializado frente a PBS 0.5X de distintos grupos de ratones (silvestre,  $Cfh^{-/-}$  y  $Cfh^{-/-}$ .FHΔ16-20). Posteriormente, el factor H unido se detectó usando un anticuerpo de conejo anti-FH de ratón y un anticuerpo de cabra anti-Igs de conejo conjugado con alexa 488. Se utilizó un anticuerpo de isotipo conjugado con alexa 488 como control.

Como se observa en la **figura 24**, la proteína FHΔ16-20 se une mucho menos que la proteína salvaje. Este resultado confirma que la proteína mutante se comporta de forma similar a las moléculas portadoras de mutaciones en el extremo C-terminal de factor H.



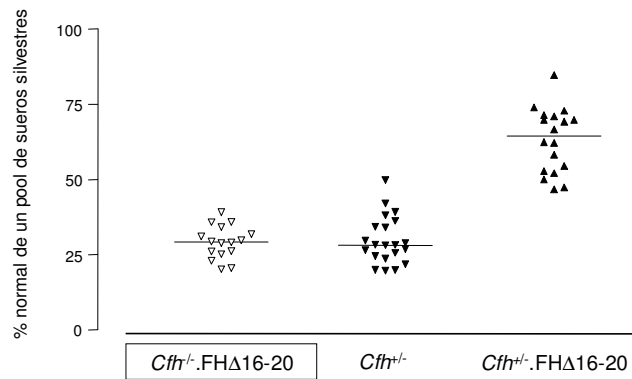
**Figura 24. Análisis por citometría de flujo de la unión de FH silvestre y FHΔ1-16 a células HUVEC.** El índice de fluorescencia se calculó multiplicando la intensidad media de fluorescencia por el porcentaje de células teñidas positivas para FH.

### 3.3 Análisis del fenotipo del ratón $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20.

#### 3.3.1. Niveles plasmáticos de FHΔ16-20.

Se analizó el nivel de expresión del transgén *in vivo*. La proteína FHΔ16-20 se detectó en el plasma de los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20 o  $Cfh^{+/-}$ . FHΔ16-20 mediante western blot (**figura 21**) y se cuantificó por ELISA (**figura 25**). Si se comparan los

niveles de expresión de factor H en los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20, donde se expresa exclusivamente la proteína FHΔ16-20, con los niveles de factor H en los ratones  $Cfh^{+/-}$ , se puede observar que el transgén se expresa en un nivel similar al factor H endógeno.



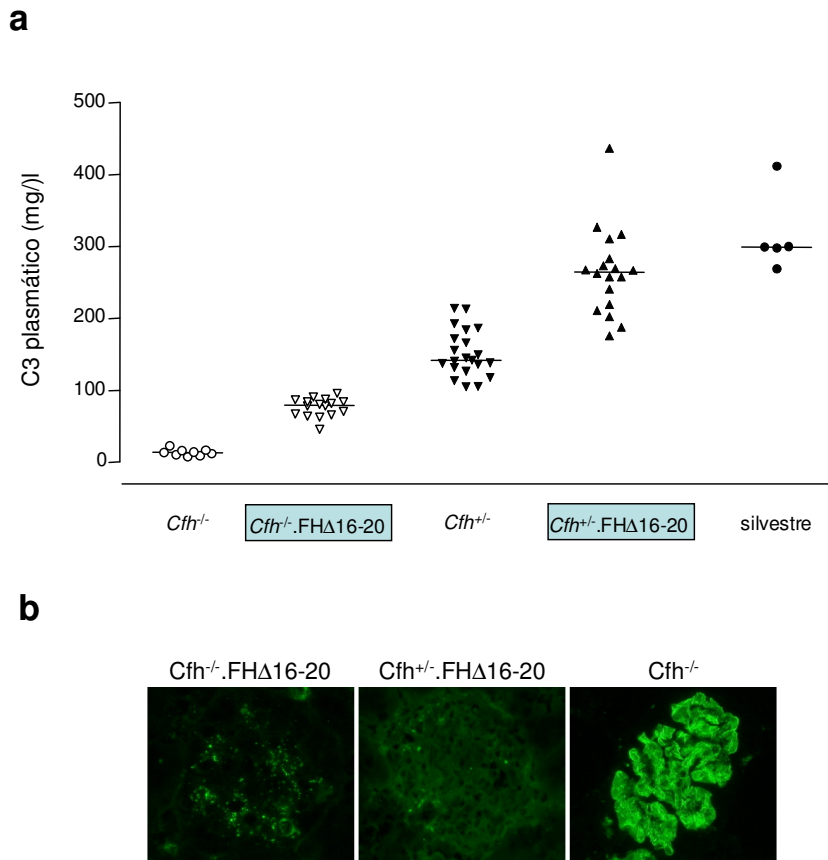
**Figura 25. Determinación de los niveles plasmáticos de factor H por ELISA.** Los niveles de factor H están referidos a la cuantificación de factor H obtenida para un pool de sueros de ratones silvestres.

### 3.3.2. La proteína FHΔ16-20 es capaz de regular *in vivo* la activación del complemento en fase fluida.

Una vez confirmada la expresión del transgen en el plasma de los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20, quisimos valorar la capacidad de esta proteína para regular la activación del complemento *in vivo*. Si tenemos en cuenta que los ratones  $Cfh^{-/-}$  presentan una deficiencia secundaria de C3 en plasma (Pickering et al., 2002), la medida de los niveles de C3 en el plasma de los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20 nos dará una idea de la capacidad de la proteína mutante en regular el complemento.

Se midieron los niveles plasmáticos de C3 en distintos grupos de ratones por ELISA (ver apartado 4.3 de Materiales y Métodos). Como se muestra en la **figura 26a**, los niveles de C3 en el ratón  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20 están aumentados con respecto a los niveles prácticamente indetectables de C3 del ratón  $Cfh^{-/-}$ . Del mismo modo, se aprecia un incremento en C3 en el ratón  $Cfh^{+/-}$ . FHΔ16-20 cuando se compara con el ratón  $Cfh^{+/-}$ . Estos datos indican que la proteína FHΔ16-20 es capaz de regular *in vivo* la activación de C3 en fase fluida restaurando los niveles del complemento.





**Figura 26. (a) Niveles plasmáticos de C3.** El nivel medio de C3 plasmático en los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 fue de 79.5mg/l (rango de 46.1-95.9, n=16), siendo significativamente superior al nivel obtenido en los ratones  $Cfh^{-/-}$  (media de 14.3mg/l, rango de 7.9-23.2, n=9,  $p < 0.05$ ). El nivel de C3 en los animales  $Cfh^{+/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 es superior al nivel obtenido en los ratones  $Cfh^{+/-}$  (nivel medio 264.6 versus 142mg/l respectivamente,  $p < 0.001$ ) y no se diferencia de los niveles observados en los ratones silvestres. Los recuadros azules señalan a los ratones con expresión de la proteína FH $\Delta$ 16-20 **(b) Tinción de C3 en los glomérulos de los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20,  $Cfh^{+/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 y  $Cfh^{-/-}$ .** La tinción de C3 en los ratones  $Cfh^{-/-}$  es muy intensa y tiene lugar a lo largo de la membrana basal glomerular, mientras que en los animales  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 y  $Cfh^{+/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 no es evidente. En los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 se observa un patrón de tinción de C3 granular en la zona mesengial, mientras que en los animales  $Cfh^{+/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 no se detecta tinción.

Además, se analizó la capacidad de FH $\Delta$ 16-20 de regular el complemento dentro del riñón. Para ello, se realizaron tinciones de C3 en los glomérulos de los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20,  $Cfh^{+/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 y  $Cfh^{-/-}$ , a la edad de tres semanas **(figura 26b)**. A

diferencia de la intensa tinción de C3 observada en el ratón  $Cfh^{-/-}$ , en el que hay un depósito de C3 a lo largo de la membrana basal glomerular, en el ratón  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20, nos encontramos un patrón de tinción de C3 de forma granular en la zona mesengial. Por lo tanto, FH $\Delta$ 16-20 también previene de una forma muy eficiente el cúmulo de C3 a lo largo de la membrana basal glomerular.

### **3.3.3. La histología renal en los ratones $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 demuestra la presencia de microangiopatía trombótica.**

La mayor parte de los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 terminaron presentando hematuria y anasarca o bien morían antes de las 12 semanas de edad. Con el fin de caracterizar el daño en los riñones de estos ratones, se realizó la histología renal a las ocho semanas de edad de estos animales. Además, como controles, se analizaron también los ratones  $Cfh^{+/+}$ . FH $\Delta$ 16-20. Como se puede observar en la **figura 27**, la presencia de microangiopatía trombótica y daño endotelial en los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 es evidente, mientras que en los ratones  $Cfh^{+/+}$ . FH $\Delta$ 16-20 no se encontró ningún tipo de anomalía histológica incluso a los 6 meses de edad.

Es de destacar que, en los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20, no se encontraron depósitos electrón-densos en la MBG, una de las características de MPGN2 que aparecen en los ratones  $Cfh^{-/-}$  a esa edad (Pickering et al., 2002).

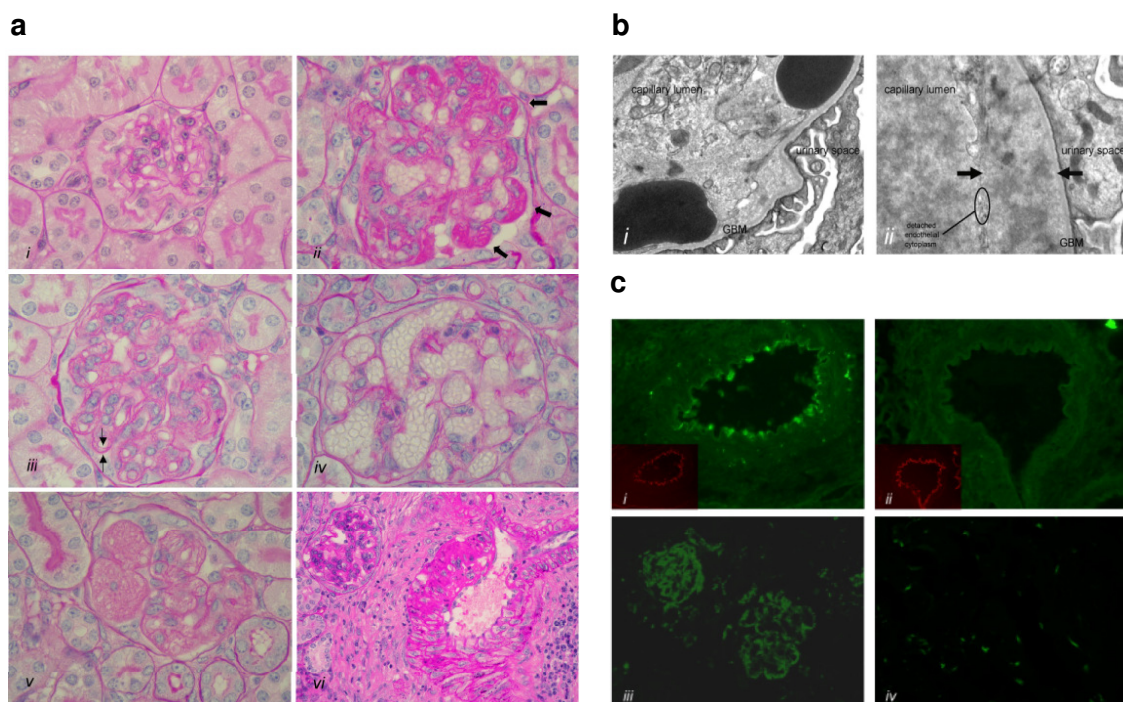
### **3.3.4. La proteína FH $\Delta$ 16-20 no es capaz de regular *in vivo* la activación del sistema del complemento sobre el endotelio renal.**

Como ya se comentó en la introducción, los datos de los pacientes de HUS parecen indicar que en estos individuos la regulación del complemento en el plasma es normal, mientras que la regulación de la activación del complemento sobre los endotelios resulta ineficiente. Los datos generados *in vitro* con la proteína FH $\Delta$ 16-20, indicaron que esta proteína mantiene la capacidad para regular el complemento en el plasma, mientras que presentó una capacidad disminuida para interactuar con heparina y con los endotelios, por lo que la protección de los mismos podría verse disminuida.

Para comprobar la capacidad reguladora de la proteína FH $\Delta$ 16-20 sobre el endotelio renal, se analizó por inmunofluorescencia la presencia de C3 en los riñones

de los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20 con hematuria. Como se puede observar en la **figura 27c**, se encontró C3 depositado a lo largo del endotelio y en el músculo liso de las arterias renales. Además, se encontró un depósito anormal en el tejido mesangial del glomérulo y en las paredes de los capilares. Por el contrario, en los ratones  $Cfh^{+/+}$ . FH $\Delta$ 16-20 no se encontró ningún depósito anormal de C3 en el tejido renal.

En conclusión, la proteína FH $\Delta$ 16-20 muestra una capacidad limitada para regular la activación del sistema del complemento sobre el endotelio renal, estando en consonancia con los experimentos desarrollados *in vitro*.



**Figura 27. Histología renal (a y b) y análisis por inmunofluorescencia (c) en los ratones  $Cfh^{-/-}$ .FH16-20. (a)** Se muestra un glomérulo normal de un ratón  $Cfh^{+/+}$ .FH $\Delta$ 16-20 de dos meses de edad (i), y las características de microangiopatía trombótica observadas por microscopía de luz en el glomérulo de un ratón  $Cfh^{-/-}$ .FH $\Delta$ 16-20 (ii) a (vi). Estas son: microtrombos glomerulares (ii, flechas), doble contorno de la pared de los capilares (iii, flechas), formación de microaneurismas en los capilares (iv), mesangiólisis (v) e inflamación en las arterias glomerulares (vi). **(b)** Cambios ultraestructurales característicos de la microangiopatía trombótica detectados por microscopía electrónica. Los eritrocitos se localizan bajo del endotelio dañado y entran en contacto directo con la membrana basal del glomérulo (i, aumento x20000). Descamación del endotelio y acumulación de un material fibrino-mucoide translúcido (ii, flechas, aumento x25000). **(c)** Tinción de C3 en el riñón. Presencia de C3 depositado a lo largo del

endotelio y en el músculo liso de las arterias renales en los ratones  $Cfh^{-/-}$ .FHΔ16-20 (i), pero no en los ratones  $Cfh^{+/-}$ .FHΔ16-20 (ii). Tinción de C3 en la zona mesangial y en las paredes de los capilares en los ratones  $Cfh^{-/-}$ .FHΔ16-20 con HUS (iii), a diferencia de la ausencia de tinción encontrada en los ratones  $Cfh^{+/-}$ .FHΔ16-20 (iv). Los recuadros con la tinción en rojo se refieren al marcaje del endotelio murino con anti-CD31 (PECAM).

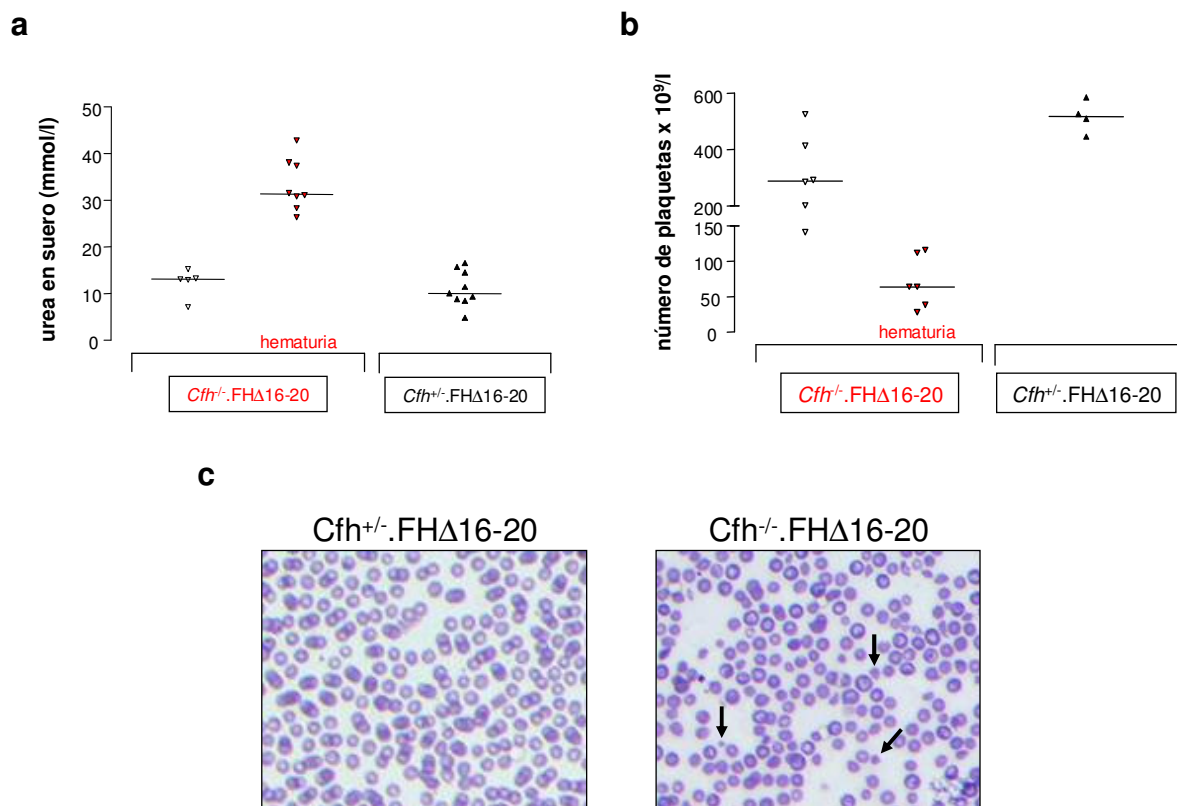
### 3.3.5. Análisis de parámetros asociados al síndrome hemolítico urémico.

El síndrome hemolítico urémico se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fallo renal agudo (ref.). Con el objetivo de profundizar un poco más en las características del HUS, se realizó un análisis de los siguientes parámetros en aquellos ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20 con hematuria: nivel de urea en sangre, presencia de hemólisis y número de plaquetas.

Los niveles de urea en sangre en los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20 fueron de 31.8 mmol/l de media (26.3-42.8 de rango, n=8), un valor significativamente elevado en comparación con los 10 mmol/l de media obtenido en los ratones  $Cfh^{+/-}$ . FHΔ16-20 (4.8-16.5 de rango, n=11, p=0.0061).

Como se puede observar en la **figura 28**, la fragmentación de los eritrocitos en sangre periférica fue evidente en todos los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20 con hematuria. Además, estos ratones presentaron niveles bajos de plaquetas en sangre ( $64 \times 10^9/l$  de media, 28-291 de rango, n=7) en comparación con los niveles normales obtenidos en los ratones  $Cfh^{+/-}$ . FHΔ16-20 ( $517 \times 10^9/l$  de media, 445-584 de rango, n=4, p=0.0061).

En su conjunto, podemos decir que los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20 presentan las características clínicas típicas del HUS.



**Figura 28. Características típicas de HUS en los ratones  $Cfh^{-/-}.FH\Delta 16-20$  con hematuria. (a)** Medida de los niveles de urea en suero. En los ratones  $Cfh^{-/-}.FH\Delta 16-20$  con hematuria se observa un incremento en los niveles séricos de urea, indicando una alteración en la función renal. **(b)** Medida del número de plaquetas. En los ratones  $Cfh^{-/-}.FH\Delta 16-20$  con hematuria se observa una gran reducción del número de plaquetas respecto a los ratones  $Cfh^{+/-}.FH\Delta 16-20$ , lo que se denomina trombocitopenia. **(c)** Frotis de sangre periférica. En los ratones  $Cfh^{-/-}.FH\Delta 16-20$  con hematuria hay evidencia de fragmentación de los eritrocitos (flechas), mientras que en los ratones  $Cfh^{+/-}.FH\Delta 16-20$  las células están intactas.

### 3.3.6. Análisis de ratones $Cfh^{-/-}.FH\Delta 16-20$ con baja expresión de factor H.

Como se comentó previamente en el apartado 3.1, se mantuvo una línea de ratones transgénicos que expresaban niveles muy bajos del transgén, entorno al 2% de la concentración normal en plasma. Estos ratones, a los que denominamos  $Cfh^{-/-}$ .

FH $\Delta$ 16-20*bajo*, permitieron estudiar la importancia que tienen los niveles de complemento activo en el desencadenamiento de la patología.

El nivel medio de C3 plasmático en los ratones Cfh<sup>-/-</sup>. FH $\Delta$ 16-20*bajo* fue 34.8 mg/l (20.7-50.1 de rango, n=6), un valor significativamente más bajo que los ratones Cfh<sup>-/-</sup>. FH $\Delta$ 16-20 (79.5 mg/l, p<0.001) pero algo superior a los animales Cfh<sup>-/-</sup> (14.3 mg/l, p<0.01).

A los 8 meses de edad de los ratones Cfh<sup>-/-</sup>. FH $\Delta$ 16-20*bajo*, se realizó la histología renal sobre 6 animales y ninguno de ellos presentaba evidencias de microangiopatía trombótica, tan sólo una leve expansión mesengial. Además, hasta el momento del sacrificio los ratones no desarrollaron hematuria, no presentaron fragmentación de los glóbulos rojos y los niveles de urea en sangre se mantuvieron dentro del rango normal (10.6 mmol/l, rango 8.9-11.5). En comparación con los animales Cfh<sup>-/-</sup> de la misma edad, los ratones Cfh<sup>-/-</sup>. FH $\Delta$ 16-20*bajo* presentaban una tinción menor de C3 en las paredes de los capilares y una reducción del número de los depósitos electrón-densos.

Con estas observaciones podemos concluir que los ratones Cfh<sup>-/-</sup>. FH $\Delta$ 16-20*bajo* no tienen niveles suficientes de la proteína FH $\Delta$ 16-20 para poder regular el complemento en fase fluida y por lo tanto no alcanzan los niveles mínimos de complemento activo para poder desarrollar HUS. Por otro lado resulta muy interesante que, por lo menos hasta los 8 meses de edad de los ratones, estos animales tampoco desarrollan MPGN2.

## 1. Factores de predisposición al síndrome hemolítico urémico (HUS).

En los últimos años se ha avanzado de forma espectacular en el conocimiento de las bases moleculares del aHUS. Fue en el año 1998 cuando se estableció, por vez primera, una asociación entre el aHUS y el sistema RCA, identificándose además mutaciones en el gen *CHF* segregando con la enfermedad (Warwicker et al., 1998). Desde entonces hasta hoy en día, se han identificado numerosas mutaciones asociadas al aHUS en diferentes reguladores del sistema del complemento, como factor H (Caprioli et al., 2001; Caprioli et al., 2003; Manuelian et al., 2003; Perez-Caballero et al., 2001; Richards et al., 2001; Warwicker et al., 1998), MCP (Richards et al., 2003) y factor I (Fremeaux-Bacchi et al., 2004; Kavanagh et al., 2005). Además, diversos estudios de asociación han puesto de manifiesto que determinadas variantes polimórficas comunes del sistema RCA, confieren riesgo para la patología (Caprioli et al., 2003; Esparza-Gordillo et al., 2005; Fremeaux-Bacchi et al., 2005).

En el presente trabajo, se han tratado de estudiar en profundidad las bases moleculares del aHUS mediante varios abordajes diferentes. En primer lugar, y gracias a la existencia del registro español de pacientes del aHUS, se estudiaron aquellos genes de los reguladores del complemento que previamente se asociaron con la patología. Para ello, se realizó un cribado mutacional de los genes *CHF*, *MCP* e *IF*. A continuación, se reanalizaron las variantes polimórficas del RCA asociadas con la patología y se trató de hallar la implicación biológica de las mismas. Además, se buscaron nuevos factores genéticos de riesgo fuera del sistema RCA. Y por último, se ha generado el primer modelo animal del síndrome hemolítico urémico.

De forma similar a lo que ocurre en otros registros de enfermos aHUS (Caprioli et al., 2006; Neumann et al., 2003), el rastreo mutacional de los genes *CHF*, *MCP* e *IF* sobre el registro español del aHUS, constituido por 98 pacientes, reveló que un total de 26 pacientes (26,5%) son portadores de mutaciones en dichos genes.

En el gen *CHF* se identificaron 15 mutaciones en heterocigosis, de las cuales hay 12 mutaciones con cambio de sentido, 2 deleciones y una inserción. Las mutaciones con cambio de sentido se asocian con niveles normales de factor H plasmático, mientras que las mutaciones del tipo inserción/delección dan lugar a un

cambio de la fase de lectura, que provoca el truncamiento de la proteína y la falta de expresión de la misma, dando lugar a niveles reducidos de factor H en el plasma de estos pacientes.

Por otro lado, es importante destacar que todas las mutaciones con cambio de sentido identificadas, se localizan en el extremo C-terminal de la molécula de factor H, que es una región con capacidad para interactuar con el C3b depositado sobre las superficies celulares y polianiones del tipo heparina o ácido siálico. Hoy en día se han descrito numerosos ensayos funcionales que demuestran que aquellas moléculas de factor H portadoras de mutaciones en dicha región, presentan una reducción en la capacidad de unión del factor H al C3b depositado sobre superficies, a heparina o bien a células endoteliales (Manuelian et al., 2003). Del mismo modo, la mayor parte de las mutaciones con cambio de sentido que hemos encontrado en el registro español del aHUS, están asociadas con defectos funcionales en la molécula que disminuyen su capacidad para regular la activación del complemento sobre las superficies celulares, manteniendo intacta su capacidad reguladora en fase fluida (Sanchez-Corral et al., 2004; Sánchez-Corral et al., 2002 ).

El rastreo mutacional del gen *MCP* identificó 10 mutaciones diferentes en 12 pacientes del aHUS, de las cuales 9 se hallaron en heterocigosis y una en homocigosis. En general, a diferencia de lo que ocurre con las mutaciones en *CFH*, las mutaciones en *MCP* (70%) van asociadas con una reducción en los niveles de proteína en la superficie celular. Curiosamente, la única mutación con cambio de sentido (R103W) que no se ha asociado con niveles bajos de proteína, se localiza en el SCR2 de MCP. Los SCRs1-4 de MCP están implicados en la actividad reguladora de la molécula (Liszewski et al., 1991), por lo que se tal vez la mutación R103W provoque un defecto funcional en la molécula que le impida regular la activación del complemento.

Por último, en el gen *IF* se identificaron 4 mutaciones en heterocigosis en 5 pacientes de aHUS. De forma similar a lo que ocurre en el caso de MCP, todas las mutaciones en factor I, a excepción de la mutación K441R, están asociadas con niveles bajos de la proteína.



Cabe destacar además, la presencia de más de una mutación en 6 pacientes de aHUS, las cuales pueden afectar a un mismo gen (HUS3) o pueden implicar a genes diferentes (HUS36, HUS37, HUS68, HUS109 y HUS124). Este hallazgo pone de manifiesto que el aHUS es una enfermedad compleja que puede requerir la convergencia de varios factores de susceptibilidad para su manifestación. Esta convergencia de factores, como se discutirá más adelante, explicaría en algunos casos la penetrancia incompleta de la enfermedad en determinados pedigríes.

En su conjunto, las mutaciones identificadas en los genes *CHF*, *MCP* e *IF* asociadas al aHUS, demuestran que existe heterogeneidad genética en aHUS y que dicha enfermedad se relaciona con la deficiencia funcional de las proteínas reguladoras del complemento que, en algunos casos, surge como consecuencia de una deficiencia de los niveles de proteína y en otros, por alteraciones funcionales de la misma. Algunas de estas mutaciones asociadas al aHUS se han caracterizado funcionalmente y han mostrado que alteran fundamentalmente la capacidad de proteger las superficies celulares frente a la activación del complemento, sin afectar, en cambio, la homeostasis del complemento en plasma (ref). Esta situación estaría en consonancia con el hecho de que, en general, los pacientes del aHUS presentan niveles normales de C3 y C4 en el plasma. Estos datos llevan por lo tanto a plantear que, para que se desarrolle aHUS, es necesaria la combinación de una regulación deficiente de la activación del complemento sobre las superficies celulares y un sistema del complemento activo en plasma.

A parte de las mutaciones encontradas en los genes *CFH*, *MCP* e *IF*, se han descrito variantes polimórficas comunes en los genes *CFH* y *MCP* asociadas con el aHUS (Caprioli et al., 2003; Esparza-Gordillo et al., 2005; Fremeaux-Bacchi et al., 2005).

El análisis de las distintas variantes en *CFH* y *MCP* en el registro español de pacientes del aHUS, identificó un haplotipo de riesgo y otro protector para el aHUS en *CFH* (*CFH-H3* y *CFH-H1*, respectivamente) y un haplotipo de riesgo en *MCP* (*MCP<sub>GGAAC</sub>*). Además, estos datos concuerdan con otros estudios de asociación similares, por lo que la contribución de estas variantes polimórficas al desarrollo de la enfermedad se mantiene en diferentes cohortes de pacientes (Caprioli et al., 2003; Esparza-Gordillo et al., 2005; Fremeaux-Bacchi et al., 2005).

Una vez establecida la asociación de las variantes polimórficas en los genes *CFH* y *MCP*, quisimos establecer la relación funcional de estos haplotipos con la patología. El haplotipo protector para el aHUS, *CFH-H1*, contiene la variante c.184A que codifica para isoleucina en la posición 62. Curiosamente, un abstract reciente asocia la variante Ile62 con un incremento de la actividad reguladora del factor H y una reducción en la activación de la vía alternativa del complemento (Kuttner-Kondo et al., 2007). Este resultado tal vez, podría justificar que el haplotipo *CFH-H1* se comporte como un haplotipo protector para el aHUS.

En el caso de los alelos de riesgo *CFH-H3* y *MCP<sub>GGAAC</sub>*, puesto que ambos haplotipos contienen polimorfismos situados en la región promotora del gen (-257T y -546G/-246G en *CFH* y *MCP*, respectivamente), planteamos la posibilidad de que estos alelos pudieran afectar a la expresión del gen a través de un efecto sobre la actividad transcripcional. Además, resultaba interesante el hecho de que la variante del promotor del gen *CFH*, -257T, está situada en un elemento de respuesta a NFkB (Warwicker et al., 1997), que es factor de transcripción que está implicado en la regulación de numerosos genes que se activan tras una respuesta inmune o inflamatoria (Akira and Kishimoto, 1997; Ghosh et al., 1998). En el caso de las variantes en el promotor de *MCP*, el alelo -261G es especialmente interesante porque rompe un sitio consenso de unión del factor de transcripción CBF-1/RBP-JK, que está implicado en desarrollo vascular y en la regulación transcripcional de CR2 e Interleuquina 6 (Makar et al., 2001; Vales and Friedl, 2002).

En primer lugar, estudiamos la posibilidad de que los haplotipos de riesgo de *CFH* (H3) y *MCP<sub>GGAAC</sub>* estuvieran relacionados con una disminución de los niveles de expresión de factor H y MCP. Sin embargo, no se observó ninguna asociación entre estos haplotipos y una reducción de los niveles de factor H plasmático o niveles bajos de MCP en la superficie de los PBLs.

A pesar de ello, no podíamos excluir la posibilidad de que las variantes -257T y -546G/-246G afectaran a los niveles de expresión local de factor H o MCP en el riñón, por lo que estudiamos la actividad transcripcional de las distintas variantes en experimentos de transfección transitoria sobre las células HEK293 (*Human Embryonic*

*Kidney*). Mientras que para el SNP -257C>T del promotor del gen *CFH* no se encontró ninguna diferencia significativa en la actividad transcripcional de las dos variantes, los alelos de *MCP* -547G y -261G, pertenecientes al haplotipo de riesgo *MCP*<sub>GGAAC</sub>, generan una disminución del 25% en los niveles de expresión de MCP en las células HEK293. Estos datos sugieren que, tal vez, las variantes -547G y -261G, podrían influenciar los niveles de expresión de MCP de forma local o en determinadas condiciones de inflamación o infección. Teniendo en cuenta que la mayor parte de las mutaciones en MCP se encuentran en heterocigosis y que dan lugar a una reducción del 50% de los niveles de MCP en las superficies, una reducción del 25% es una diferencia notable y podría justificar la asociación del haplotipo *MCP*<sub>GGAAC</sub> con el aHUS.

Por otro lado, existe una hipótesis adicional que permitiría explicar la asociación observada entre el haplotipo *MCP*<sub>GGAAC</sub> y la enfermedad. Existen evidencias de que el haplotipo *MCP*<sub>GGAAC</sub> se podría extender hacia el gen de C4BPB, incluyendo los genes de CR1, DAF y C4BPA. Esto resulta muy interesante teniendo en cuenta que, en un trabajo previo en el laboratorio, se mapearon en esa región del RCA los loci responsables de las variaciones cuantitativas de factor H, C4BP y CR1. En base a estos datos, resulta tentador pensar en el haplotipo *MCP*<sub>GGAAC</sub> como un haplotipo extendido a lo largo del RCA capaz de influenciar simultáneamente los niveles de expresión de determinadas proteínas reguladoras del complemento.

A pesar de los avances en el conocimiento de las bases moleculares del aHUS, sigue sin conocerse el defecto genético en más de dos tercios de los pacientes que, junto con la penetrancia incompleta de la enfermedad en los individuos portadores de mutaciones en los genes *CFH*, *MCP* e *IF*, sugiere la existencia de factores genéticos adicionales de predisposición al aHUS. Por ello, quisimos explorar la posibilidad de que otros factores genéticos estuvieran implicados en la patología. Si consideramos el complemento como un sistema que se encuentra en equilibrio entre activación y regulación, del mismo modo que las mutaciones asociadas al aHUS en los reguladores del complemento desplazarían la balanza hacia una mayor activación, las variantes genéticas en los activadores de este sistema, también podrían tener el mismo efecto, actuando así como un factor de predisposición al aHUS. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que las variantes genéticas en los activadores del complemento, que

resulten en una excesiva activación del mismo, son también factores de riesgo para el aHUS.

Nuestra población de pacientes del aHUS se ha caracterizado exhaustivamente desde el punto de vista de los perfiles del complemento y del análisis genético de los reguladores del complemento factor H, MCP, factor I y DAF. La mayor parte de los individuos en nuestra cohorte presenta niveles normales de C3 y C4 indicando que, en general, los pacientes aHUS no son hipocomplementémicos. De forma minoritaria, tenemos un subgrupo de pacientes sin mutaciones en los genes reguladores del complemento, con niveles bajos de C3 y niveles normales o incluso elevados de C4, indicando que hay una activación del complemento por la vía alternativa. Curiosamente, uno de estos pacientes, HUS55P, pertenece a una gran familia española en la que se describió que la enfermedad segregaba con la región MHC (*Major Complex Histocompatibility*) en el cromosoma 6q24, en la que se incluye el gen *BF*, que codifica para el factor B.

El factor B es una proteína activadora del complemento que se une a C3b para formar la convertasa de C3 de la vía alternativa. Este hecho situaba al factor B como un buen candidato para ser un factor de predisposición al aHUS. A pesar de la reciente publicación de un trabajo en el que se excluyen mutaciones en el gen *BF* en una cohorte de pacientes del aHUS (Kavanagh et al., 2006), las observaciones en nuestro grupo muestral nos llevaron a secuenciar el gen *BF* en aquellos individuos con una evidencia de activación de la vía alternativa del complemento. La secuenciación de *BF* en este subgrupo de pacientes, identificó dos individuos portadores de mutaciones con cambio de sentido en heterocigosis, F286L y K323E. Ambas mutaciones se localizan en el dominio tipo A del factor von Willebrand (vWfA) aunque en regiones diferentes. El cambio F286L se sitúa adyacente al residuo Y319, que se encuentra expuesto en la región de interacción del dominio vWfA con el C3b (Hourcade et al., 2002), por lo que podría verse afectada la interacción entre ambas proteínas. La mutación K323E, sin embargo, afecta a un residuo próximo a las  $\alpha$ -hélices 4 y 5 del vWfA que, curiosamente, definen una de las dos regiones de interacción con los reguladores del complemento DAF, CR1, y en menor medida factor H, descritas previamente (Hourcade et al., 2002).

La caracterización funcional de las proteínas  $FB_{F286L}$  y  $FB_{K323E}$  demuestra que ambas mutaciones son mutaciones ganancia de función, ya que provocan una mayor activación del sistema del complemento por la vía alternativa. Por un lado, la mutación F286L potencia la formación de la proenzima C3bB, que dará lugar a una mayor cantidad de enzima activa *in vivo*, mientras que la mutación K323E forma una enzima activa C3bBb que ofrece una mayor resistencia a su disociación por los reguladores DAF y factor H, causando también un incremento de enzima activa *in vivo*. Este efecto diferente entre ambos mutantes tiene sentido dada la distinta localización de los residuos afectados dentro del dominio vWfA. Además, en el contexto del aHUS, solo las mutaciones que provoquen una ganancia de función en el factor B tienen sentido ya que, al tratarse de una molécula activadora del complemento, desplazarán el equilibrio del sistema hacia una activación mayor del mismo.

Como se ha comentado previamente, la penetrancia incompleta del aHUS es una característica relativamente frecuente en individuos portadores de mutaciones asociadas al aHUS en los genes *CFH*, *MCP* e *IF*. Ya con anterioridad propusimos que, la confluencia de varios factores de susceptibilidad al aHUS en un mismo individuo, podría influenciar la predisposición al desarrollo de la enfermedad y que, en algunos casos, explicaría la penetrancia incompleta del aHUS en los portadores de mutaciones en los genes reguladores del complemento (ref.). En el caso de las mutaciones identificadas en el gen *BF*, el cambio F286L se identificó en numerosos miembros de una misma familia, pero no todos los individuos portadores desarrollaron el aHUS.

Por lo tanto, quisimos investigar la posibilidad de que otros factores de susceptibilidad pudieran estar influenciando la penetrancia del aHUS en aquellos individuos portadores de las mutaciones en el gen *BF*. Para ello, analizamos los bloques haplotípicos de los genes *CFH* y *MCP* que previamente describimos asociados al aHUS y, curiosamente, nos encontramos que todos los individuos portadores de la mutación F286L y que desarrollaron aHUS, presentaban además el haplotipo de riesgo  $MCP_{GGAAC}$ . Mientras que dentro del grupo de los portadores sanos, solo el individuo más joven y probablemente con posibilidad de desarrollar la patología en el futuro, era también portador del haplotipo  $MCP_{GGAAC}$ . Estos datos sugieren que, el fenotipo HUS asociado a las mutaciones ganancia de función en el gen *BF*, está modulado por

variantes comunes en los genes del complemento, como el haplotipo *MCP*<sub>GGAAC</sub>, que está asociado con un incremento del riesgo a desarrollar aHUS.

La eficacia del sistema del complemento como mecanismo de defensa innato contra las infecciones de los microbios, depende de un buen control que impida el consumo innecesario de sus componentes, y que restrinja su activación sobre la superficie de los microorganismos impidiendo el daño inespecífico sobre los tejidos propios. Los análisis genéticos y funcionales de las proteínas reguladoras del complemento factor H, MCP y factor I, muestran que este control estricto del complemento debe estar impedido en los pacientes del aHUS. La identificación de las mutaciones ganancia de función en el gen *BF* asociadas con el aHUS, refuerzan este planteamiento y pone de manifiesto que la desregulación del sistema de complemento podría también ser consecuencia de un incremento de la actividad de las enzimas de la vía alternativa. Este hallazgo situaría a otras proteínas del complemento en la misma vía que el factor B, como C3 y properdina, como genes potencialmente candidatos a la contribución de la susceptibilidad del aHUS.

El tipo de mutación identificada en los pacientes de aHUS tiene relevancia desde el punto de vista terapéutico. Por ejemplo, el trasplante renal está contraindicado en pacientes con mutaciones en *CFH*, porque la persistencia del defecto funcional en el plasma del paciente (molécula de factor H mutante), genera recidivas que desembocan en la pérdida del riñón transplantado. Sin embargo, el trasplante renal es aconsejable en pacientes con mutaciones en MCP ya que, al tratarse de una proteína de membrana, el defecto funcional desaparecería con el riñón extraído.

### **Modelo animal del síndrome hemolítico urémico.**

De los datos derivados de nuestro laboratorio y de otros grupos, se sabe que un defecto funcional de la molécula de factor H puede estar asociado con glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II (MPGN2), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) y más recientemente con degeneración macular asociada a la edad (AMD). La deficiencia completa de factor H en humanos, cerdos y ratones, resulta en una deficiencia secundaria de C3 severa que desemboca en el desarrollo de MPGN2. Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, las mutaciones en factor H que

predisponen al aHUS aparecen generalmente en heterocigosis y se asocian con niveles antigénicos normales de C3 y factor H. Curiosamente, estas mutaciones tienden a agruparse en el extremo C-terminal de la molécula sobre los SCR16 al 20, coincidiendo con una región de la molécula fundamental para regular la activación del complemento sobre las superficies celulares. Hay que destacar además, que las mutaciones aHUS no afectan a la capacidad reguladora de la activación del complemento en fase fluida, que requiere de los cinco primeros SCRs del N-terminal. Por ello, planteamos la hipótesis de que para desarrollar aHUS es necesaria la combinación de una regulación intacta de C3 en fase fluida y una regulación deficiente de la activación de C3 sobre el endotelio renal.

Con el objetivo de demostrar esta hipótesis y de desarrollar el primer modelo animal de aHUS, planteamos desarrollar un ratón que tenga un factor H plasmático con una alteración específica que le impida regular la activación del complemento sobre las superficies celulares, pero con capacidad para controlar la activación del complemento en fase fluida. Para conseguir este objetivo, se ha generado un ratón transgénico que expresa un factor H murino al que le faltan los últimos 5 SCRs: FH $\Delta$ 16-20. Posteriormente, este ratón se ha cruzado con el ratón knock-out de factor H (CFH $^{-/-}$ ) para generar ratones que expresen tanto la proteína mutante sola (CFH $^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20) o en combinación con el factor H murino completo (CFH $^{+/+}$ . FH $\Delta$ 16-20).

Las moléculas de factor H humanas y murinas presentan un alto grado de similitud en términos de función y localización. En ambas proteínas, la actividad reguladora del complemento se localiza en el extremo N-terminal, mientras que la capacidad de interacción con heparina, C3b y células endoteliales, está mediada por el extremo C-terminal de la molécula (Cheng et al., 2006). De hecho, los ensayos funcionales que se desarrollaron *in vitro* con la proteína FH $\Delta$ 16-20, demostraron que esta molécula mantiene la capacidad reguladora en fase fluida intacta, pero presenta una menor capacidad de unión a heparina y a las células HUVEC, con respecto al factor H silvestre. Estos experimentos pusieron de manifiesto que el FH $\Delta$ 16-20 se comporta de forma similar al factor H humano portador de mutaciones asociadas con el aHUS.

En los ratones Cfh $^{-/-}$ . FH $\Delta$ 16-20, el nivel de FH $\Delta$ 16-20 plasmático fue comparable al nivel de factor H plasmático presente en el ratón Cfh $^{+/+}$ , por lo que la expresión del trasgén alcanzó un nivel de proteína mutante en plasma equiparable a la

concentración fisiológica. Gracias a que en los ratones  $Cfh^{-/-}$  se produce una deficiencia secundaria de C3 (Pickering et al., 2002), pudimos valorar *in vivo* la capacidad reguladora de FHΔ16-20, midiendo los niveles de C3 plasmático en los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20. Este análisis reveló la presencia de niveles de C3 plasmático significativamente superiores en los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20 en comparación con los ratones  $Cfh^{-/-}$ , así como niveles superiores de C3 en los ratones  $Cfh^{+/-}$ . FHΔ16-20 en relación con los animales  $Cfh^{+/-}$ . Estos datos indican que la proteína FHΔ16-20 es capaz de regular la activación de C3 plasmático *in vivo*, evitando el consumo completo de C3.

Los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20 de 6 a 12 semanas de edad, desarrollaron el aHUS de forma espontánea. La histología renal mostró las características típicas de la microangiopatía trombótica, que incluye trombosis glomerular, apariencia de doble contorno de la pared de los capilares, formación de microaneurismas y mesangiolisis. Además, la microscopía electrónica reveló los cambios ultraestructurales que acompañan a la microangiopatía trombótica, como son la presencia de eritrocitos en contacto directo con la membrana basal glomerular, como consecuencia del desprendimiento de células del endotelio, y la presencia de material floculente en el espacio subendotelial. Es importante resaltar que no se detectaron depósitos electrón-densos en la membrana basal glomerular, una característica ultraestructural típica de MPGN2 que se encuentra presente en ratones  $Cfh^{-/-}$  de la misma edad.

El depósito de C3, en ausencia de IgG, fue evidente en el endotelio del riñón y en el músculo liso de las arterias, en las paredes de los capilares y en la zona mesengial del glomérulo. La microangiopatía trombótica en los ratones  $Cfh^{-/-}$ . FHΔ16-20, se asoció con fallo renal, fragmentación de eritrocitos y trombocitopenia, todas ellas características típicas del aHUS. Sin embargo, cabe destacar que los ratones  $Cfh^{+/-}$ . FHΔ16-20 no desarrollaron aHUS de forma espontánea y mostraron una histología renal normal.

Como se ha comentado previamente, hay distintas entidades patológicas como el aHUS, MPGN2 y AMD, que están relacionadas con mutaciones o polimorfismos en el gen *CFH*, sugiriendo que la desregulación de la vía alternativa del complemento es una característica común a todas ellas. Sin embargo, las variantes genéticas del *CFH* que están asociadas a una u otra enfermedad son diferentes, por lo que se sugiere que



existe una relación genotipo-fenotipo para el *CFH*. MPGN2 se caracteriza por el cúmulo de C3 y material electrón-denso a lo largo de la membrana basal del glomérulo, mientras que el aHUS se caracteriza por el daño del endotelio renal y microangiopatía trombótica, que resulta anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal. El factor H es una proteína con diferentes dominios funcionales, y dependiendo del tipo de alteración que presente dará lugar a una u otra patología. Así, la deficiencia completa de factor H está asociada con MPGN2, mientras que las mutaciones que están asociadas al aHUS se localizan en su mayoría en el extremo C-terminal de la molécula.

El desarrollo del modelo animal del aHUS ha puesto de manifiesto la existencia de la correlación genotipo-fenotipo para el gen *CFH*. El ratón deficiente de factor H (*CFH*<sup>-/-</sup>) desarrolla MPGN2 como consecuencia de una activación masiva del C3, resultando en niveles prácticamente indetectables de C3 plasmático. La introducción en los ratones *CFH*<sup>-/-</sup> de una molécula de factor H transgénica (FHΔ16-20), que mimetiza las mutaciones humanas asociadas al aHUS, restaura los niveles de C3 y del complemento en el plasma de estos animales deficientes de factor H. Como resultado, los ratones *Cfh*<sup>-/-</sup>. FHΔ16-20 cambian el fenotipo de la enfermedad, pasando de MPGN2 al aHUS. Estos datos indican la importancia de un complemento activo en el plasma para el desarrollo del aHUS.

El estudio de una segunda línea de animales transgénicos, caracterizados por presentar una baja expresión de la proteína mutante FHΔ16-20 (2% del valor de FH normal), nos ha permitido analizar la contribución de la regulación de C3 plasmático en el desarrollo de la patología. En este grupo de ratones, denominados *Cfh*<sup>-/-</sup>.FHΔ16-20**bajo**, los niveles medios de C3 plasmático fueron 34.38 mg/l, un valor significativamente inferior al nivel medio obtenido para los animales *Cfh*<sup>-/-</sup>.FHΔ16-20 (79.5mg/l), pero superior a los niveles medios de C3 presentes en los ratones *Cfh*<sup>-/-</sup> (14.3mg/l).

La histología renal de los ratones *Cfh*<sup>-/-</sup> . FHΔ16-20**bajo** a los ocho meses de edad, demostró tan solo una leve expansión mesangial sin evidencias de microangiopatía trombótica. Tampoco desarrollaron hematuria o fragmentación de los eritrocitos, y los niveles de urea en sangre se mantuvieron normales hasta el momento del sacrificio. Es decir, no presentaron las características clínicas típicas del aHUS.

Curiosamente, el fenotipo de los ratones  $Cfh^{-/-}$ . F $\Delta$ 16-20*bajo*, también se distinguió del fenotipo observado en los ratones  $Cfh^{-/-}$ . La tinción de C3 en las paredes de los capilares de los ratones  $Cfh^{-/-}$ . F $\Delta$ 16-20*bajo*, fue reducida en comparación con la tinción observada en los ratones  $Cfh^{-/-}$  de la misma edad. Además, los depósitos subendoteliales electrón-densos en la GBM, típicos de MPGN2, se presentaron de forma infrecuente.

Estas observaciones sugieren que los ratones  $Cfh^{-/-}$ . F $\Delta$ 16-20*bajo* no tienen niveles suficientes de la proteína F $\Delta$ 16-20 para poder regular el complemento en fase fluida y por lo tanto no alcanzan los niveles mínimos de complemento activo para poder desarrollar el aHUS. Por otro lado resulta muy interesante, que por lo menos hasta los 8 meses de edad de los ratones, estos animales tampoco desarrollan MPGN2. De los datos derivados de ambas líneas de ratones transgénicos, junto con la observación de que el aHUS no se desarrolla en los ratones  $Cfh^{-/-}$  que tienen una deficiencia secundaria de C3, se demuestra que la activación de C3 es el mecanismo efector clave en el aHUS.

Curiosamente, las mutaciones en genes del complemento que se encuentran en los pacientes con aHUS aparecen normalmente en heterocigosis y están frecuentemente asociadas con la penetrancia incompleta de la enfermedad. Esta situación concuerda con el hecho de que los ratones  $Cfh^{+/-}$ . F $\Delta$ 16-20 no desarrollan la enfermedad de forma espontánea, lo que sugiere que, al igual que en determinados pacientes, se requieren múltiples fallos genéticos para desarrollar la enfermedad. Además, existen una serie de factores ambientales tales como infecciones, fármacos inmunosupresores, anticonceptivos orales, embarazo, periodo postparto etc... que podrían desencadenar la enfermedad en aquellos individuos portadores de las mutaciones en heterocigosis. Del mismo modo, tal vez los ratones  $Cfh^{+/-}$ . F $\Delta$ 16-20 desarrollarán aHUS si tuvieran un daño adicional, ya sea otra alteración genética o un daño medioambiental. Tampoco se puede descartar la posibilidad de que haya diferencias entre especies a la hora de regular la activación de C3 en las superficies por factor H u otros reguladores de membrana, que contribuyen a la aparente resistencia de los ratones  $Cfh^{+/-}$ . F $\Delta$ 16-20 a desarrollar la enfermedad.

Al igual que ocurre en humanos que son portadores de mutaciones en el gen *CFH*, el fenotipo de los ratones *Cfh*<sup>-/-</sup>. FHΔ16-20 se restringe al riñón, sugiriendo que las características anatómicas o fisiológicas de este órgano hacen del endotelio de la vasculatura renal particularmente sensible al daño provocado por la activación del complemento.

Como se ha comentado previamente, el tratamiento de los pacientes con mutaciones en el gen *CFH* resulta difícil. Los datos derivados del estudio del ratón *Cfh*<sup>-/-</sup>. FHΔ16-20, definen un aspecto importante a tener en cuenta de cara a la terapia que se pretende utilizar. Los agentes empleados con intención de restablecer la regulación de C3 tienen que conseguirlo en las superficies celulares. De hecho, nuestras observaciones sugieren que, si se restaura la regulación de la activación del complemento en fase fluida exclusivamente, incrementando los niveles de C3 plasmático, y sigue perdurando un defecto para proteger las superficies celulares, entonces el resultado será nefasto.

En conclusión, el aHUS es una patología compleja que implica la desregulación de la vía alternativa del complemento. Parece que se desarrolla como consecuencia de una protección deficiente de las superficies celulares ante una activación del sistema del complemento, como consecuencia de un defecto funcional de las proteínas reguladoras del complemento. Múltiples defectos, implicando a las proteínas reguladoras del complemento plasmáticas o de membrana, así como a los activadores del complemento, parecen necesarios para provocar la desregulación y la protección deficiente de los tejidos propios. Los factores ambientales que activen el complemento son también muy importantes en el desarrollo del aHUS. Las infecciones, los anticonceptivos orales, los medicamentos inmunosupresivos, las terapias anticancerígenas, el embarazo o el periodo postparto, han sido importantes desencadenantes del aHUS en un número significativo de pacientes. Estos factores ambientales probablemente modulen la predisposición genética de cada individuo, de tal forma que aquellos individuos portadores de fuertes factores genéticos de predisposición al aHUS necesiten un desencadenante ambiental débil, mientras que los individuos sin una fuerte predisposición genética necesiten de un factor ambiental más fuerte para desarrollar la enfermedad. Es decir, que un factor ambiental fuerte debe compensar una baja predisposición genética.

## CONCLUSIONES

1. Mutaciones en factor H, MCP y factor I, así como determinadas variantes polimórficas comunes en los genes *CFH* (*CFH<sub>TGTGT</sub>*) y *MCP* (*MCP<sub>GGAAC</sub>*), son factores de riesgo en los pacientes del aHUS del registro español.
2. Las variantes polimórficas -547G y -261G que forman parte del haplotipo de riesgo *MCP<sub>GGAAC</sub>*, están asociadas con una reducción de la expresión de la proteína del 25 % en cultivos celulares.
3. La desregulación del sistema del complemento no solo puede deberse a defectos en las proteínas reguladoras del complemento, sino también, a defectos en las proteínas activadoras que resulten en una activación exacerbada del mismo.
4. Las mutaciones en el gen *BF* que conducen a una mayor activación del sistema del complemento son un factor de riesgo para desarrollar el aHUS.
5. Existe una correlación genotipo-fenotipo para el gen *CFH*. Distintas alteraciones en la molécula de factor H dará lugar a distintas patologías.
6. Para que se desarrolle el aHUS es necesaria la combinación de un defecto en la regulación de la activación del complemento sobre el endotelio renal, y un sistema del complemento activo en plasma.

## BIBLIOGRAFÍA

Akira, S., and Kishimoto, T. (1997). NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. *Advances in immunology* 65, 1-46.

Arlaud, G.J., Gaboriaud, C., Thielens, N.M., Budayova-Spano, M., Rossi, V., and Fontecilla-Camps, J.C. (2002a). Structural biology of the C1 complex of complement unveils the mechanisms of its activation and proteolytic activity. *Mol Immunol* 39, 383-394.

Arlaud, G.J., Gaboriaud, C., Thielens, N.M., and Rossi, V. (2002b). Structural biology of C1. *Biochem Soc Trans* 30, 1001-1006.

Barlow, P.N., Norman, D.G., Steinkasserer, A., Horne, T.J., Pearce, J., Driscoll, P.C., Sim, R.B., and Campbell, I.D. (1992). Solution structure of the fifth repeat of factor H: a second example of the complement control protein module. *Biochemistry* 31, 3626-3634.

Barlow, P.N., Steinkasserer, A., Norman, D.G., Kieffer, B., Wiles, A.P., Sim, R.B., and Campbell, I.D. (1993). Solution Structure of a Pair of Complement Modules by Nuclear Magnetic Resonance. *J Mol Biol* 232, 268-284.

Blom, A.M., Villoutreix, B.O., and Dahlback, B. (2003). Mutations in {alpha}-Chain of C4BP That Selectively Affect Its Factor I Cofactor Function. *J Biol Chem* 278, 43437-43442.

Brandt, J.R., Fouser, L.S., Watkins, S.L., Zelikovic, I., Tarr, P.I., Nazar-Stewart, V., and Avner, E.D. (1994). Escherichia coli O 157:H7-associated hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers. *J Pediatr* 125, 519-526.

Caprioli, J., Bettinaglio, P., Zipfel, P.F., Amadei, B., Daina, E., Gamba, S., Skerka, C., Marziliano, N., Remuzzi, G., and Noris, M. (2001). The Molecular Basis of Familial Hemolytic Uremic Syndrome: Mutation Analysis of Factor H Gene Reveals a Hot Spot in Short Consensus Repeat 20. *J Am Soc Nephrol* 12, 297-307.

Caprioli, J., Castelletti, F., Bucchioni, S., Bettinaglio, P., Bresin, E., Pianetti, G., Gamba, S., Brioschi, S., Daina, E., Remuzzi, G., *et al.* (2003). Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: the C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease. *Hum Mol Genet* 12, 3385-3395.

Caprioli, J., Noris, M., Brioschi, S., Pianetti, G., Castelletti, F., Bettinaglio, P., Mele, C., Bresin, E., Cassis, L., Gamba, S., *et al.* (2006). Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood* 108, 1267-1279.

Carreras, L., Romero, R., Requesens, C., Oliver, A.J., Carrera, M., Clavo, M., and Alsina, J. (1981). Familial hypocomplementemic hemolytic uremic syndrome with HLA-A3,B7 haplotype. *Jama* 245, 602-604.

Catterall, C.F., Lyons, A., Sim, R.B., Day, A.J., and Harris, T.J. (1987). Characterization of primary amino acid sequence of human complement control protein factor I from an analysis of cDNA clones. *Biochem J* 242, 849–856.

Cheng, Z.Z., Hellwage, J., Seeberger, H., Zipfel, P.F., Meri, S., and Jokiranta, T.S. (2006). Comparison of surface recognition and C3b binding properties of mouse and human complement factor H. *Mol Immunol* 43, 972-979.

Davis, A.E., 3rd, Harrison, R.A., and Lachmann, P.J. (1984). Physiologic inactivation of fluid phase C3b: isolation and structural analysis of C3c, C3d,g (alpha 2D), and C3g. *J Immunol* 132, 1960-1966.

Díaz-Guillén, M.A., Rodríguez de Córdoba, S., and Heine-Suñer, D. (1999). A radiation hybrid map of complement factor H and factor H-related genes. *Immunogenetics* 49, 549-552.

Dragon-Durey, M.-A., Fremeaux-Bacchi, V., Loirat, C., Blouin, J., Niaudet, P., Deschenes, G., Coppo, P., Herman Fridman, W., and Weiss, L. (2004). Heterozygous and Homozygous Factor H Deficiencies Associated with Hemolytic Uremic Syndrome or Membranoproliferative Glomerulonephritis: Report and Genetic Analysis of 16 Cases. *J Am Soc Nephrol* 15, 787-795.

Edwards, A.O., Ritter, R., Abel, K.J., Manning, A., Panhuysen, C., and Farrer, L.A. (2005). Complement Factor H Polymorphism and Age-Related Macular Degeneration. *Science* 308, 421-424.

Esparza-Gordillo, J., Goicoechea de Jorge, E., Buil, A., Carreras Berges, L., Lopez-Trascasa, M., Sanchez-Corral, P., and Rodriguez de Cordoba, 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.

Esparza-Gordillo, J., Soria, J.M., Buil, A., Almasy, L., Blangero, J., Fontcuberta, J., and Rodríguez de Córdoba, S. (2004). Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics* 56, 77-82.

Fearon, D.T. (1978). Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 1971-1975.

Fremeaux-Bacchi, V., Dragon-Durey, M.A., Blouin, J., Vigneau, C., Kuypers, D., Boudailliez, B., Loirat, C., Rondeau, E., and Fridman, W.H. (2004). Complement factor I: a susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet* 41, e84.

Fremeaux-Bacchi, V., Kemp, E.J., Goodship, J.A., Dragon-Durey, M.A., Strain, L., Loirat, C., Deng, H.W., and Goodship, T.H.J. (2005). The development of atypical haemolytic-uraemic syndrome is influenced by susceptibility factors in factor H and membrane cofactor protein: evidence from two independent cohorts. *J Med Genet* 42, 852-856.

Fujita, T., Matsushita, M., and Endo, Y. (2004). The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunological reviews* 198, 185-202.

Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* 16, 225-260.

Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L.V., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Hardisty, L.I., Hageman, J.L., Stockman, H.A., Borchardt, J.D., Gehrs, K.M., *et al.* (2005). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 7227-7232.

Haines, J.L., Hauser, M.A., Schmidt, S., Scott, W.K., Olson, L.M., Gallins, P., Spencer, K.L., Kwan, S.Y., Nouredine, M., Gilbert, J.R., *et al.* (2005). Complement Factor H Variant Increases the Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Science* 308, 419-421.

Høgåsen, K., Jansen, J.H., Mollnes, T.E., Hovdenes, J., and Harboe, M. (1995). Hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II is caused by factor H deficiency. *J Clin Invest* 95, 1054-1061.

Hourcade, D.E., Mitchell, L., Kuttner-Kondo, L.A., Atkinson, J.P., and Medof, M.E. (2002). Decay-accelerating Factor (DAF), Complement Receptor 1 (CR1), and Factor H Dissociate the Complement AP C3 Convertase (C3bBb) via Sites on the Type A Domain of Bb. *J Biol Chem* 277, 1107-1112.

Hourcade, D.E., Mitchell, L.M., and Oglesby, T.J. (1999). Mutations of the type A domain of complement factor B that promote high-affinity C3b-binding. *J Immunol* 162, 2906-2911.

Kaplan, B.S., Chesney, R.W., and Drummond, K.N. (1975). Hemolytic uremic syndrome in families. *N Engl J Med* 292, 1090-1093.

Kavanagh, D., Kemp, E.J., Mayland, E., Winney, R.J., Duffield, J.S., Warwick, G., Richards, A., Ward, R., Goodship, J.A., and Goodship, T.H. (2005). Mutations in complement factor I predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 16, 2150-2155.

Kavanagh, D., Kemp, E.J., Richards, A., Burgess, R.M., Mayland, E., Goodship, J.A., and Goodship, T.H. (2006). Does complement factor B have a role in the pathogenesis of atypical HUS? *Mol Immunol* 43, 856-859.

Kazatchkine, M.D., Fearon, D.T., and Austen, K.F. (1979). Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b. *J Immunol* 122, 75-81.

Klein, R.J., Zeiss, C., Chew, E.Y., Tsai, J.-Y., Sackler, R.S., Haynes, C., Henning, A.K., SanGiovanni, J.P., Mane, S.M., Mayne, S.T., *et al.* (2005). Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science* 308, 385-389.

Kniaz, D., Eisenberg, G.M., Elrad, H., Johnson, C.A., Valaitis, J., and Bregman, H. (1992). Postpartum hemolytic uremic syndrome associated with antiphospholipid antibodies. A case report and review of the literature. *Am J Nephrol* 12, 126-133.

- Kuttner-Kondo, L., Muqim, N., Crabb, J.W., Hollyfield, J.G., and Medof, M.E. (2007). Effects on factor H function of polymorphisms linked to age-related macular degeneration. *Mol Immunol* *44*, 201.
- Lambris, J.D., Lao, Z., Oglesby, T.J., Atkinson, J.P., Hack, C.E., and Becherer, J.D. (1996). Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. *J Immunol* *156*, 4821-4832.
- Law, S.K.A., and Reid, K.B.M. (1995). *Complement*, 2<sup>nd</sup> edn (Oxford, IRL Press).
- Levy, M., Halbwachs-Mecarelli, M.C., Guber, G., Kohout, A., Bensenouci, P., Niaudet, G., Hauptmann, G., and Lesavre, P. (1986). H deficiency in two brothers with atypical dense intramembraneous deposit disease. *Kidney Int* *30*, 949-956.
- Liszewski, M.K., Post, T.W., and Atkinson, J.P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annual review of immunology* *9*, 431-455.
- López-Larrea, C., Dieguez, M.A., Enguix, A., Dominguez, O., Marin, B., and Gomez, E. (1987). A familial deficiency of complement factor H. *Biochem Soc Trans* *15*, 648-649.
- Makar, K.W., Ulgiati, D., Hagman, J., and Holers, V.M. (2001). A site in the complement receptor 2 (CR2/CD21) silencer is necessary for lineage specific transcriptional regulation. *International immunology* *13*, 657-664.
- Manuelian, T., Hellwage, J., Meri, S., Caprioli, J., Noris, M., Heinen, S., Jozsi, M., Neumann, H.P., Remuzzi, G., and Zipfel, P.F. (2003). Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *J Clin Invest* *111*, 1181-1190.
- McRae, J.L., Duthy, T.G., Griggs, K.M., Ormsby, R.J., Cowan, P.J., Cromer, B.A., McKinstry, W.J., Parker, M.W., Murphy, B.F., and Gordon, D.L. (2005). Human Factor H-Related Protein 5 Has Cofactor Activity, Inhibits C3 Convertase Activity, Binds Heparin and C-Reactive Protein, and Associates with Lipoprotein. *J Immunol* *174*, 6250-6256.
- McRae, J.L., Murphy, B.E., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Crawford, J., and Cowan, P.J. (2002). Location and structure of the human FHR-5 gene. *Genetica* *114*, 157-161.
- Miyazaki, J., Takaki, S., Araki, K., Tashiro, F., Tominaga, A., Takatsu, K. and Yamura, K. (1989). Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* *79*, 269-277.
- Moake, J.L., and Byrnes, J.J. (1996). Thrombotic microangiopathies associated with drugs and bone marrow transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* *10*, 485-497.
- Morris, K.M., Aden, D.P., Knowles, B.B., and Colten, H.R. (1982). Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2. *J Clin Invest* *70*, 906-913.
- Moxley, R.A. (2004). *Escherichia coli* 0157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. *Anim Health Res Rev* *5*, 15-33.
- Muller-Eberhard, H.J. (1986). The membrane attack complex of complement. *Annual review of immunology* *4*, 503-528.



- Muller-Eberhard, H.J. (1988). Molecular organization and function of the complement system. *Annual review of biochemistry* 57, 321-347.
- Neumann, H.P.H., Salzman, M., Bohnert-Iwan, B., Mannuelian, T., Skerka, C., Lenk, D., Bender, B.U., Cybulla, M., Riegler, P., Konigsrainer, A., *et al.* (2003). Haemolytic uraemic syndrome and mutations of the factor H gene: a registry-based study of German speaking countries. *J Med Genet* 40, 676-681.
- Noris, M., Brioschi, S., Caprioli, J., Todeschini, M., Bresin, E., Porrati, F., Gamba, S., and Remuzzi, G. (2003). Familial haemolytic uraemic syndrome and an MCP mutation. *Lancet* 362, 1542-1547.
- Oran, A.E., and Iseman, D.E. (1999). Identification of Residues within the 727-767 Segment of Human Complement Component C3 Important for Its Interaction with Factor H and with Complement Receptor 1 (CR1, CD35). *J Biol Chem* 274, 5120-5130.
- Pangburn, M.K. (2002). Cutting Edge: Localization of the Host Recognition Functions of Complement Factor H at the Carboxyl-Terminal: Implications for Hemolytic Uremic Syndrome. *J Immunol* 169, 4702-4706.
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., and Muller-Eberhard, H.J. (1983). C3b deposition during activation of the alternative complement pathway and the effect of deposition on the activating surface. *J Immunol* 131, 1930-1935.
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., and Müller-Eberhard, H.J. (1977). Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med* 146, 257-270.
- Perez-Caballero, D., Gonzalez-Rubio, C., Gallardo, M.E., Vera, M., Lopez-Trascasa, M., Rodriguez de Cordoba, S., and Sanchez-Corral, P. (2001). Clustering of Missense Mutations in the C-Terminal Region of Factor H in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am J Hum Genet* 68, 478-484.
- Pickering, M.C., Cook, H.T., Warren, J., Bygrave, A.E., Moss, J., Walport, M.J., and Botto, M. (2002). Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nat Genet* 31, 424 - 428.
- Post, T.W., Liszewski, M.K., Adams, E.M., Tedja, I., Miller, E.A., and Atkinson, J.P. (1991). Membrane cofactor protein of the complement system: alternative splicing of serine/threonine/proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J Exp Med* 174, 93-102.
- Remuzzi, G., and Ruggenti, P. (1998). The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int Suppl* 66, S54-57.
- Richards, A., Buddles, M.R., Donne, R.L., Kaplan, B.S., Kirk, E., Venning, M.C., Tielemans, C.L., Goodship, J.A., and Goodship, T.H.J. (2001). Factor H Mutations in Hemolytic Uremic Syndrome Cluster in Exons 18-20, a Domain Important for Host Cell Recognition. *Am J Hum Genet* 68, 485-490.

Richards, A., Goodship, J.A., and Goodship, T.H. (2002). The genetics and pathogenesis of haemolytic uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11, 431-435.

Richards, A., Kemp, E.J., Liszewski, M.K., Goodship, J.A., Lampe, A.K., Decorte, R., Muslumanoglu, M.H., Kavukcu, S., Filler, G., Pirson, Y., *et al.* (2003). Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12966-12971.

Ripoche, J., Day, A.J., Harris, T.J., and Sim, R.B. (1988). The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem J* 249, 593-602.

Rodriguez de Cordoba, S., Diaz-Guillen, M.A., and Heine-Suñer, D. (1999). An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32. *Mol Immunol* 36, 803-808.

Rodriguez de Cordoba, S., Esparza-Gordillo, J., Goicoechea de Jorge, E., Lopez-Trascasa, M., and Sanchez-Corral, P. (2004). The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol* 41, 355-367.

Rodriguez de Cordoba, S., Lublin, D.M., Rubinstein, P., and Atkinson, J.P. (1985). Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked. *J Exp Med* 161, 1189-1195.

Ross, G.D., Lambris, J.D., Cain, J.A., and Newman, S.L. (1982). Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. *J Immunol* 129, 2051-2060.

Sambrook, J.E.F., Frisch, T., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning; a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edn (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sanchez-Corral, P., Gonzalez-Rubio, C., Rodriguez de Cordoba, S., and Lopez-Trascasa, M. (2004). Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol Immunol* 41, 81-84.

Sánchez-Corral, P., Pérez-Caballero, D., Huarte, O., Simckes, A.M., Goicoechea, E., López-Trascasa, M., and Rodríguez de Córdoba, S. (2002). Structural and Functional Characterization of Factor H Mutations Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am J Hum Genet* 71, 1285–1295.

Schreiber, R.D., Pangburn, M.K., Lesavre, P.H., and Müller-Eberhard, H.J. (1978). Initiation of the alternative pathway of complement: recognition of activators by bound C3b and assembly of the entire pathway from six isolated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 3948–3952.

Seya, T., and Atkinson, J.P. (1989). Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem J* 264(2): 581–588, 264(262): 581–588.

Sim, R.B., and Tsiftoglou, S.A. (2004). Proteases of the complement system. *Biochemical Society Transactions* 32, 21-27.

Sutor, G.C., Schmidt, R.E., and Albrecht, H. (1999). Thrombotic microangiopathies and HIV infection: report of two typical cases, features of HUS and TTP, and review of the literature. *Infection* 27, 12-15.

Tarr, P.I., Gordon, C.A., and Chandler, W.L. (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365, 1073-1086.

Thompson, R.A., and Winterborn, M.H. (1981). Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin. *Clin Exp Immunol* 46, 110-119.

Tschopp, J., Muller-Eberhard, H.J., and Podack, E.R. (1982). Formation of transmembrane tubules by spontaneous polymerization of the hydrophilic complement protein C9. *Nature* 298, 534-538.

Vales, L.D., and Friedl, E.M. (2002). Binding of C/EBP and RBP (CBF1) to overlapping sites regulates interleukin-6 gene expression. *The Journal of biological chemistry* 277, 42438-42446.

Walport, M.J. (2001a). Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344, 1058-1066.

Walport, M.J. (2001b). Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344, 1140-1144.

Warwicker, P., Goodship, T.H., and Goodship, J.A. (1997). Three new polymorphisms in the human complement factor H gene and promoter region. *Immunogenetics* 46, 437-438.

Warwicker, P., Goodship, T.H.J., Donne, R.L., Pirson, Y., Nicholls, A., Ward, R.M., Turnpenny, P., and Goodship, J.A. (1998). Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 53, 836-844.

Weiler, J.M., Daha, M.R., Austen, K.F., and Fearon, D.T. (1976). Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 3268-3272.

Weis, J.H., Morton, C.C., Bruns, G.A., Weis, J.J., Klickstein, L.B., Wong, W.W., and Fearon, D.T. (1987). A complement receptor locus: genes encoding C3b/C4b receptor and C3d/Epstein-Barr virus receptor map to 1q32. *J Immunol* 138, 312-315.

Whaley, K., and Ruddy, S. (1976). Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med* 144, 1147-1163.

Zipfel, P.F., Jokiranta, T.S., Hellwage, J., Koistinen, V., and Meri, S. (1999). The factor H protein family. *Immunopharmacology* 42, 53-60.

Zipfel, P.F., and Skerka, C. (1994). Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today* 15, 121-126.

Zipfel, P.F., and Skerka, C. (1999). FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today* 20, 135-140.

**ANEXO.**

Durante la realización de esta tesis doctoral se han conseguido las siguientes publicaciones:

**A) Relacionadas con los resultados presentados en esta memoria:**

1. Matthew C.Pickering, **Elena Goicoechea de Jorge**, Rubén Martínez-Barricarte, Sergio Recalde, Alfredo García-Layana, Kirsten L. Rose, Jill Moss, Mark J.Walport, Terence Cook, Santiago Rodríguez de Córdoba, and Marina Botto. (2007) Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains. *J Exp Med* **204**(6): 1249–1256.
2. **Elena Goicoechea de Jorge**, Claire L.Harris, Jorge Esparza-Gordillo, Luis Carreras, Elena Aller Arranz, Cynthia Abarategui Garrido, Margarita López-Trascasa, Pilar Sánchez-Corral, B. Paul Morgan, and Santiago Rodríguez de Córdoba. (2007) Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PNAS* **104**, 240-245.
3. Saunders R.E., Abarategui Garrido C., Fremeaux-Bacchi V., **Goicoechea de Jorge E.**, Goodship T.H., Lopez-Trascasa M., Noris M., Ponce Castro I.M., Remuzzi G., Rodríguez de Córdoba S., Sánchez-Corral p., Sherka C., Zipfel P.F., Pekins S.J. (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**(3): 222-234.
4. Esparza-Gordillo, J., **Goicoechea de Jorge, E.**, Abarategui Garrido, C., Carreras, L., López-Trascasa, M., Sánchez-Corral, P., Rodríguez de Córdoba, S. (2005) Insights into hemolytic uremic syndrome: segregation of three independent predisposition factors in a large, multiple affected pedigree. *Mol. Immunol.* **43**, 1769-1775.
5. Esparza-Gordillo, J., **Goicoechea de Jorge, E.**, Buil, A., Carreras Berges, L., 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. Gen.* **14**, 703-712.

6. Rodríguez de Córdoba, S., Esparza-Gordillo, J., **Goicoechea de Jorge, E.**, López-Trascasa, M., Sánchez-Corral, P. (2004) The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol. Immunol.* **41**, 355-367.
7. Sánchez-Corral, P., Pérez-Caballero, D., Huarte, O., Simckes, A.M., **Goicoechea, E.**, López-Trascasa, M., Rodríguez de Córdoba, S. (2002) Structural and functional characterization of factor H mutations associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **71**,1285-1295.

**B) Otras publicaciones:**

8. Uyguner O, **Goicoechea de Jorge E**, Cefle A, Baykal T, Kayserili H, Cefle K, Demirkol M, Yuksel-Apak M, Rodríguez de Córdoba S, Wollnik B. (2003) Molecular analyses of the HGO gene mutations in Turkish alcaptonuria patients suggest that the R58fs mutation originated from central Asia and was spread throughout Europe and Anatolia by human migrations. *J Inherit Metab Dis.* **26**(1):17-23.
9. **Goicoechea de Jorge E**, Lorga I, Gallardo ME, Pérez B, Pérez de Ferrán C, Mendoza H, Rodríguez de Córdoba S. (2002) Alkaptonuria in the Dominican Republic: identification of the founder AKU mutation and further evidence of mutation hot spots in the HGO gene". *J Med Genet.* **39**(7):E40.