

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOCENCIAS  
MOLECULARES**



**CONTRIBUCIÓN DEL FH Y LAS PROTEÍNAS FHRs DEL  
COMPLEMENTO EN LA PREDISPOSICIÓN Y EVOLUCIÓN DEL  
SÍNDROME HEMOLÍTICO-URÉMICO ATÍPICO Y LA  
NEFROPATÍA POR IgA**

**TESIS DOCTORAL**

**Irene Isabel Gómez Delgado**

**Madrid, 2022**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**TESIS DOCTORAL**

**CONTRIBUCIÓN DEL FH Y LAS PROTEÍNAS FHRs DEL COMPLEMENTO  
EN LA PREDISPOSICIÓN Y EVOLUCIÓN DEL SÍNDROME HEMOLÍTICO-  
URÉMICO ATÍPICO Y LA NEFROPATÍA POR IgA**

**Memoria presentada por Irene Isabel Gómez Delgado, Graduada en Biología,  
para optar al grado de Doctora**

**Directora: Dra. Pilar Sánchez-Corral Gómez**

**Tutor: Oscar Martínez Costa**

**Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ**

**Madrid, 2022**

Esta Tesis ha sido realizada gracias a la financiación del Programa Complemento II-CM (S2017/BMD-3673) de la Comunidad de Madrid, coordinado por el Prof. Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba, y por una Ayuda a la Investigación Básica 2018 de la Fundación SENEfro (Sociedad Española de Nefrología; <http://www.senefro.org>), coordinada por la Dr. Pilar Sánchez-Corral.

A mis Padres, Julia y Mariano,  
por ser mi mayor apoyo.

# **AGRADECIMIENTOS**

## AGRADECIMIENTOS

Son muchísimas las personas que me han acompañado durante todo este proceso y que han hecho posible de una manera u otra, que hoy este escribiendo estas páginas, culminando este importante proyecto. A todas ellas les tengo mucho que agradecer.

En primer lugar quiero dar las gracias a mi Directora de Tesis, la Dra. Pilar Sánchez-Corral Gómez por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección, por toda su dedicación, apoyo y consejos, por enseñarme los que se y por confiar en mí. A mi tutor el Pr. Oscar Martínez Costa por su supervisión y seguimiento de las actividades del doctorado durante el desarrollo de este trabajo.

No me puedo olvidar de los miembros del grupo IdiPAZ Margarita, Teresa, Fernando Alberto y Laura quienes han vivido en primera persona toda la evolución de esta Tesis. Ni de toda la gente que ha pasado por el laboratorio en estos años y han formado parte de esta etapa de mi vida. César, Cristina, Sonia, Monse, Vero, Arancha.....me acogieron cuando entre en el laboratorio haciéndome sentir parte de una gran familia, con gran tristeza les tuve que ir despidiendo; pero pronto llegaron otras personas igualmente maravillosas Ana, Blanca, Celia, Carmen, Alfonso, Laura, Carla, Karima....No puedo imaginarme mejor compañeros que vosotros, habéis puesto el listón muy alto. Son tantos los momentos y experiencias compartidas que llevaré siempre en el corazón. ¡Muchas gracias a todos por haber convertido la rutina del trabajo en algo extraordinario! Gracias también a todas las personas que accedieron a ser voluntarios y donar sangre, formando parte de mi cohorte de controles, sois una parte fundamental de esta Tesis.

Agradecer a todos mis amigos que han pasado por mi vida, en especial a mis amigas de siempre Raquel, Luisa y Lady. Gracias por aguantarme todos estos años, por compartir buenos y malos momentos, por distraerme y ayudarme a desconectar cuando estaba estresada, por estar siempre a mi lado.

Y por último, gracias a mi familia: tíos, primos, sobrinos... por su amor y apoyo incondicional. Pero sobre todo quiero agradecer a mis padres, quienes que me han enseñado que el esfuerzo y el sacrificio tienen recompensa, por su entrega, determinación y pasión, por darme siempre lo mejor.

Quisiera mencionar también a una parte de mi familia que ya no están con nosotros, pero que desde el cielo me han estado dando sus ánimos y fuerzas, sé que hoy estarían muy orgullosos de mí.

*¡Muchas Gracias a Todos!*

# **RESUMEN/ABSTRACT**

## RESUMEN

El Síndrome Hemolítico Urémico atípico (SHUa) y la Nefropatía por IgA (NIgA) son enfermedades renales con una importante morbilidad que frecuentemente conducen a insuficiencia renal terminal. Estas patologías están asociadas con la desregulación de la vía alternativa del Complemento, que puede ser consecuencia de la existencia de factores genéticos como de la generación de autoanticuerpos. Uno de los principales componentes implicados en estas patologías es el Factor H (FH), principal regulador de la vía alternativa. Existen varias proteínas homólogas de FH, denominadas “*Factor H-Related Proteins*” (FHRs) cuyos genes se encuentran adyacentes al gen del FH en una región denominada *CFH-CFHRs*. Se considera que las proteínas FHRs tienen una función antagónica a la del FH en la vía alternativa del Complemento, que podría verse afectada por sus concentraciones plasmáticas. Esta Tesis tiene como objetivo principal determinar los niveles plasmáticos de FH y FHRs en pacientes de SHUa y de NIgA, y analizar su posible asociación con polimorfismos en la región *CFH-CFHRs*.

En la primera parte se determinan los niveles de FH y proteínas FHRs en controles y pacientes mediante *Western-blot* y ensayos ELISA. Se observa que los pacientes tienen niveles más elevados que los controles, pero hay una gran variabilidad interindividual en los niveles de cada una de las proteínas, es decir, existen perfiles de expresión FH/FHRs muy diferentes. El análisis de estos perfiles muestra distinta distribución en controles y pacientes, e identifica algunos perfiles asociados con SHUa y NIgA. Además, estudiamos la influencia de los alelos de riesgo al SHUa *CFHR3\*B*, *CFHR1\*B* y *CFHR4\*B* en los niveles de las proteínas FHR-3, FHR-1 y FHR-4A, y observamos que sólo el alelo *CFHR3\*B* influye en los niveles, aumentando la expresión de FHR-3.

La segunda parte de esta tesis se centra en la caracterización genética e inmunológica de una cohorte de pacientes con Síndrome Hemolítico Urémico secundario a infecciones por *Streptococcus pneumoniae* (SP-SHU). Comprobamos que los pacientes de SP-SHU pueden tener variantes raras en genes del Complemento, como ocurre en el SHUa primario, por lo que debería considerarse su inclusión en el cribado genético del Complemento. En los estudios inmunológicos de los pacientes SP-SHU observamos una desialilación transitoria de FH y proteínas FHRs por la neuraminidasa bacteriana. Tras analizar la relevancia funcional de la desialilación de FH mediante ensayos con proteínas purificadas, observamos que la eliminación de los ácidos siálicos de FH reduce aparentemente su capacidad para regular el Complemento sobre las superficies celulares, pudiendo ser éste un nuevo mecanismo patogénico en el desarrollo del SP-SHU.



## ABSTRACT

Atypical Haemolytic Uraemic Syndrome (aHUS) and IgA Nephropathy (IgAN) are renal diseases with significant morbidity that frequently lead to end-stage renal disease. These pathologies are associated with Complement alternative pathway dysregulation, which can be a consequence of the existence of genetic factors as well as the generation of autoantibodies. One of the main components involved in these pathologies is Factor H (FH), the main regulator of the alternative pathway. There are several FH homologous proteins, called "Factor H-Related Proteins" (FHRs) whose genes are located adjacent to the FH gene in a region called *CFH-CFHRs*. FHRs proteins are considered to have an antagonistic function to FH in the alternative pathway of Complement, which could be affected by their plasma concentrations. The main objective of this Thesis is to determine the plasma levels of FH and FHRs in aHUS and IgAN patients, and to analyse their possible association with polymorphisms in the *CFH-CFHRs* region.

In the first part, we determine the levels of FH and FHRs proteins in controls and patients by Western-blot and ELISA. We observe that patients have higher levels than controls, but there is a great interindividual variability in the levels of each of the proteins which means there are very different FH/FHRs expression profiles. The analysis of these profiles shows different distribution in controls and patients, and associated some profiles with HUSa and IgAN. In addition, we analysed the influence of the aHUS risk alleles *CFHR3\*B*, *CFHR1\*B* and *CFHR4\*B* on the levels of FHR-3, FHR-1 and FHR-4A, and observed that only the *CFHR3\*B* allele influences the levels, increasing the expression of FHR-3.

The second part of this thesis focuses on the genetic and immunological characterization of a cohort of patients with Hemolytic Uremic Syndrome secondary to *Streptococcus pneumoniae* infections (SP-HUS). We found that SP-HUS patients can have rare variants in Complement genes, as occurs in primary aHUS, and should be considered for inclusion in Complement genetic screening. In the immunological studies of SP-HUS patients, we observed transient desialylation of FH and FHRs proteins by the bacterial neuraminidase. After analysing the functional relevance of FH desialylation by different assays with purified proteins, we observed that the removal of sialic acids from FH apparently reduces its ability to regulate Complement activation on cell surfaces, and this may be a new pathogenic mechanism in the development of SP-HUS.

# **ÍNDICE**

INDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN /ABSTRACT</b> .....	7
<b>ABREVIATURAS</b> .....	13
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	16
1. El Sistema del Complemento .....	17
1.1. Vías de Activación del Complemento .....	18
1.2. Regulación del Complemento.....	21
2. Familia de proteínas FH y FHRs .....	22
2.1. FH y FHL-1 .....	22
2.2. Proteínas FHRs .....	23
2.3. Actividad de FH y proteínas FHRs en el Complemento.....	25
3. Asociación FH y FHRs y Patología Renal .....	27
3.1. Variantes Genéticas Raras .....	27
3.2. Variantes Généticas Comunes .....	28
3.3. Niveles de FH y proteínas FHRs .....	29
4. Síndrome Hemolítico Urémico Atípico (SHUa) .....	31
4.1. SHUa secundario a infecciones por <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP-SHU).....	33
5. Nefropatía por IgA (NIgA) .....	34
<b>OBJETIVOS</b> .....	36
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	38
1. Procesamiento de Muestras Biológicas de Pacientes y Controles.....	39
2. Análisis Electroforéticos .....	39
2.1 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida y Análisis de <i>Western-blot</i> .....	39
2.2. Electroforesis Bidimensional (Isoelectroenfoque y SDS-PAGE).....	41
3. Cuantificación de Proteínas .....	42
3.1. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Ensayos ELISA).....	42
3.2. Cuantificación por <i>Western-blot</i> .....	44
4. Ensayos Funcionales .....	44
4.1. Desialilación de Factor H .....	44
4.2. Ensayos de Actividad Neuraminidasa .....	45
4.3. Ensayo ELISA de Unión a C3b .....	45
4.4. Ensayo ELISA de Disociación de la Convertasa de C3 .....	45
4.5. Ensayos de Actividad Cofactora (Proteólisis de C3b por Factor I).....	46
4.3. Ensayos Hemolíticos .....	47
5. Análisis Genéticos .....	47

5.1. Análisis de Polimorfismos mediante Secuenciación Sanger .....	47
5.2. Análisis de Polimorfismos mediante Ensayo SNaPshot .....	49
5.3. Análisis de la Variante $\Delta CFHR3-CFHR1$ mediante MLPA ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> ) .....	50
6. Análisis Estadístico .....	51
<b>RESULTADOS</b> .....	52
1. Descripción Demográfica y Análisis Genéticos de las Cohortes de Controles y Pacientes .....	53
2. Análisis de los Niveles de FH y proteínas FHRs .....	57
2.1. Niveles de FH y Proteínas FHRs en Controles y Pacientes por <i>Western-Blot</i> .....	57
2.2. Perfiles de Expresión de FH y Proteínas FHRs por <i>Western-blot</i> .....	59
2.3. Niveles de FH y FHRs en Controles y Pacientes de SHUa por ELISA .....	62
2.3.1. Influencia de las variantes de riesgo a SHUa <i>CFHR1*B</i> y <i>CFHR3*B</i> en los niveles plasmáticos de FHR-1 y FHR-3. ....	64
2.3.2. Influencia de la variante de riesgo a SHUa <i>CFHR4 c.626A</i> en los niveles plasmáticos de FHR-4A. ....	68
2.3.3. Influencia de la situación clínica en los niveles de FH y proteínas FHRs .....	69
2.4. Niveles de FH y Proteínas FHRs en Controles y en Pacientes de NIgA por ELISA .....	71
2.4.1. Influencia de la función renal en los niveles de FH y proteínas FHRs .....	73
2.5. Resumen de Polimorfismos, Niveles y Perfiles de Expresión .....	74
3. SHUa Secundario a Infecciones por <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP-SHU).....	76
3.1. Análisis Genéticos en la Cohorte Española de SP-SHU .....	76
3.2. Caracterización de FH y Proteínas FHRs por <i>Western-blot</i> .....	77
3.3. Caracterización Funcional de FH desialilado (dFH). ....	81
3.3.1. Ensayos de Unión de FH/dFH a C3b Pegado en Placa.....	82
3.3.2. Ensayos de Actividad Cofactora de FH/dFH en la Proteólisis de C3b por FI. ....	82
3.3.3. Análisis de la Capacidad de FH/dFH para Disociar la C3 Convertasa. ....	83
3.3.4. Ensayos Hemolíticos en Eritrocitos de Carnero.....	84
<b>DISCUSIÓN</b> .....	86
1. Niveles de FH y Proteínas FHRs en SHUa y NIgA .....	87
2. Relevancia de FH y Proteínas FHRs en SP-SHU .....	92
<b>CONCLUSIONES</b> .....	98
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	100
<b>ANEXOS</b> .....	113

# **ABREVIATURAS**

ABREVIATURAS

**AR-** Artritis Reumatoide

**BSA-** *Bovine serum albumin*

**C1-INH-** Inhibidor de C1

**Cr-** Creatinina

**CR1-** *Complement Receptor 1*

**CRP-** *C reactive protein*

**dFH-** Factor H desialilado

**DAF-** *Decay Accelerating Factor*

**DGKE** – *Diacylglycerol kinase epsilon*

**DMAE-** Degeneración macular asociada a la edad.

**ELISA-** *Enzyme linked immunoadsorbent assay*

**FB-** Factor B

**FD-** Factor D

**FH-** Factor H

**FHRs-** *Factor H related proteins*

**FI-** Factor I

**GAGs** -Glicosaminoglicanos

**GC3-** Glomerulopatía C3

**LES-** Lupus Eritematoso Sistémico

**MAC-** *Membrane Attack Complex*

**MASPs-** *MBL-Associated Serin Proteases*

**MAT-** Microangiopatía trombótica

**MBL-** *Mannose Binding Lectin*

**MCP-** *Membrane cofactor protein*

**MLPA-** *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

**Mw-** *Molecular Weight*

**NIgA-** Nefropatía por IgA

**PBS-** Tampón fosfato salino

**PCR-** *Polymerase chain reaction*

**PR-** Polimialgia Reumática

**PRM-** Patrones moleculares

**PTX3-** Pentraxina-3

**RCA-** Reguladores de la Activación del Complemento

**SCRs-** *Short Consensus Repeats*

**SDS-** Dodecil sulfato sódico

**SHUa-** Síndrome hemolítico urémico atípico

**SNPs-** *Single nucleotide polymorphisms*

**TFG-** *Tasa de Filtración Glomerular*

**THBD-** *Thrombomodulin*

**VA-** Vía alternativa

**VC-** Vía clásica

**VL-** Vía de las lectinas

**VT-** Vía terminal

**WB-** *Western Blot*

# **INTRODUCCIÓN**



## 1. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El Sistema del Complemento constituye uno de los principales mecanismos de protección frente a patógenos y es clave en la respuesta inmune innata. Evolutivamente es anterior a la aparición de los anticuerpos y de la inmunidad celular (Zhu et al. 2005).

A pesar de su antigüedad, no fue hasta finales del siglo XIX cuando se realizaron las primeras observaciones de la existencia del Sistema del Complemento. Estas primeras observaciones demostraron la existencia en plasma de un factor lábil al calor y con actividad bactericida al que Hans Buchner denominó con el término de “*alexina*” (que en griego significa prevenir/proteger). Jules Bordet corroboró esta teoría, demostrando en 1894 que la lisis de la bacteria requería la presencia de dos componentes: un componente lábil al calor (*alexina*) y un componente estable al calor. Años más tarde, Paul Ehrlich demostró que ese componente termolábil era en realidad un conjunto de proteínas que complementaban la acción de los anticuerpos, motivo por el cual reemplazó el término alexina por “complemento”; sus teorías sentaron las bases de lo que hoy conocemos como Sistema del Complemento. (Carroll and Sim 2011; Nesargikar, Spiller, and Chavez 2012).

Generalmente, se ha considerado que la principal función del Sistema del Complemento es la eliminación de patógenos; sin embargo, en las últimas décadas se ha descubierto su contribución en la homeostasis de múltiples procesos fisiológicos (Reis et al. 2019; Ricklin et al. 2010). Algunas de las funciones en las que está implicado el Complemento son:

- Defensa frente a patógenos, bien por lisis directa o por opsonización.
- Modulación de la respuesta inflamatoria.
- Eliminación de inmunocomplejos y restos celulares (células apoptóticas/necróticas).
- Coordinación de la respuesta inmune innata en colaboración con los receptores “Toll-like”
- Regulación de la respuesta inmune adaptativa, tanto a nivel humoral (regulación de la producción de anticuerpos), como a nivel celular (mantenimiento de las células B de memoria, y maduración y activación de los linfocitos T).
- Amplificación de la coagulación e inhibición de la fibrinólisis.

Además, el Complemento participa en otros procesos como la maduración de la sinapsis neurológica, la movilización de las células madre progenitoras hematopoyéticas, y el metabolismo lipídico.

El Sistema del Complemento está compuesto por más de 30 proteínas plasmáticas o de membrana sintetizadas constitutivamente y que funcionan como activadores o como reguladores para mantener su integridad funcional. Algunas de las proteínas plasmáticas son proteasas que se sintetizan en forma

de pro-enzimas, o zimógenos, y que tras la activación del Complemento escinden a otros componentes. Se forma así una cascada enzimática que amplifica la señal inicial y culmina con la formación de un complejo multimolecular que origina un poro en la superficie activadora (células o microorganismos) y acaba lisándola.

### 1.1 Vías de Activación del Complemento

El Complemento puede activarse a través de tres vías distintas: la vía clásica (VC), la vía de las lectinas (VL) y la vía alternativa (VA). Todas las vías convergen en la formación de las “convertasas de C3”, complejos enzimáticos que activan la molécula C3, principal componente del sistema del Complemento. Con la activación de C3 se inicia la vía terminal (VT), común para todas las vías de activación.

La VC y la VL se activan cuando las proteínas del Complemento reconocen determinados patrones moleculares (PRM) en la superficie de patógenos, mientras que la VA se encuentra constitutivamente activa.

La VA recibió este nombre porque se descubrió después que la VC, pero es la más antigua desde el punto de vista evolutivo y tiene una gran importancia en el conjunto del funcionamiento del Complemento. La activación basal de la VA se debe a la hidrólisis espontánea de un enlace tioéster interno en algunas moléculas de C3, generando una proteína con una conformación diferente que se denomina C3(H<sub>2</sub>O). La molécula C3(H<sub>2</sub>O) se une al Factor B (FB), que se escinde en Ba y Bb por la acción proteolítica del factor D (FD) y forma un complejo enzimático denominado “convertasa inicial de C3”, C3(H<sub>2</sub>O)Bb. Esta convertasa corta un enlace peptídico en C3, que se fragmenta en C3a y C3b; C3b, a su vez, puede depositarse en la superficie de células o de patógenos y formar otra convertasa de C3, C3bBb, cuya vida media se incrementa notablemente gracias a la unión de Properdina (P), el único regulador positivo del Complemento. El complejo enzimático C3bBb(P) es capaz de generar un gran número de moléculas de C3b que formarán más moléculas de enzima. Este bucle de amplificación es característico de la VA e incrementa enormemente la activación del Complemento (Lachmann 2009; Ricklin et al. 2010).

La VC es la primera que se descubrió. La proteína C1q es la que reconoce la molécula o superficie activadora, y se encuentra unida a las serínproteasas C1r y C1s, formando un complejo denominado C1. C1q se une principalmente a complejos antígeno-anticuerpo (pueden ser IgG o IgM), pero también puede unirse a otras moléculas, como la proteína C reactiva (CRP) o la pentraxina-3 (PTX-3), y a productos resultantes del daño tisular, como DNA y membranas mitocondriales (Bajic et

al. 2015). La unión de C1q activa a C1r y C1s, que escinden las moléculas de C4 y C2 en los fragmentos C4a y C4b, y en C2a y C2b, respectivamente. Los fragmentos C4b y C2b generados van a formar una convertasa de C3 (C4b2b), que activa C3 de manera análoga a como lo hace la convertasa de la VA (C3bBb) (Ricklin et al. 2010).

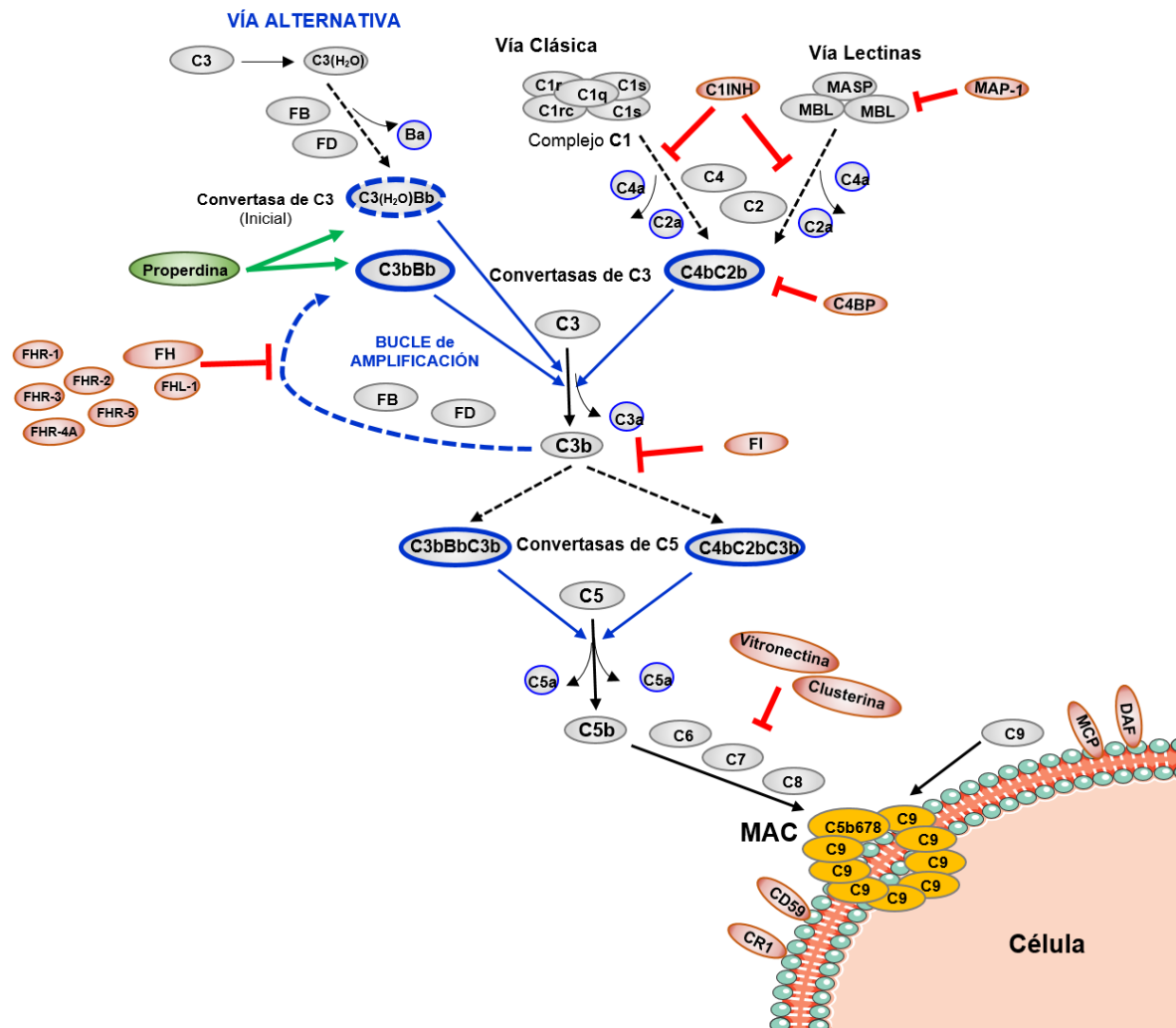
La VL es la última que se descubrió. Esta vía tiene varias proteínas que reconocen carbohidratos presentes en la superficie de patógenos y/o en células apoptóticas/necróticas, como la lectina de unión a manosa (MBL) y las ficolinas. Al igual que en la VC, las proteínas MBL y las ficolinas circulan en forma de complejos junto a varias serínproteasas, que se denominan por tanto MASP s (*MBL-Associated Serin Proteases*). La unión de MBL o ficolinas activa las MASP s, que actúan entonces sobre los componentes C4 y C2 y generan la misma convertasa de C3 (C4b2b) que la VC (Matsushita, Endo, and Fujita 2013).

Cuando las moléculas de C3b alcanzan una densidad crítica sobre las superficies, se unen a las convertasas de C3 para generar las convertasas de C5 (C4b2b3b en la VC y VL, y C3bBb3b en la VA). Las convertasas de C5 hidrolizan la molécula de C5 y generan los fragmentos C5a y C5b; este último fragmento es el que va a iniciar la formación de un complejo multimolecular denominado “complejo de ataque a la membrana” (*Membrane Attack Complex*, MAC). En primer lugar, C5b une de forma secuencial una molécula de C6, C7 y C8, generando el complejo C5b-8 que se inserta en la membrana; a continuación, este complejo incorpora 18 moléculas de C9, que se distribuyen circularmente y forman un poro que permite el paso de iones y agua, y provoca la lisis celular (Figura 1) (Bayly-Jones, Bubeck, and Dunstone 2017).

La molécula de C3b generada en la activación del Complemento es también una potente opsonina. Los fragmentos de C3b pueden recubrir patógenos y células dañadas y favorecer su fagocitosis, pero también pueden unirse a varios receptores presentes en las membranas de células inmunes, como linfocitos B y células dendríticas foliculares, favoreciendo la maduración celular, la generación de anticuerpos y el cambio de isotipo (Carroll and Sim 2011). La activación del Complemento también genera anafilotoxinas (C3a, C4a y C5a), que son potentes mediadores pro-inflamatorios. El papel de C4a está en debate, aunque se ha descrito que puede activar a macrófagos y monocitos (Merle et al. 2015). En cambio, C3a y C5a tienen un gran potencial pro-inflamatorio, especialmente C5a. Estas anafilotoxinas ejercen sus funciones (reclutamiento de células inmunes al lugar de activación del Complemento, inducción de la liberación de histamina, y síntesis de leucotrienos e interleucinas) al unirse a los receptores C3aR y C5aR1. Su activación está regulada por

carboxipeptidasas que escinden un residuo de arginina, dando lugar a C3adesArg y C5adesArg, que son las formas inactivas de C3a y C5a (Bajic et al. 2015; Merle et al. 2015).

La activación basal del Complemento, la potente activación por patógenos y la protección de nuestras propias células y tejidos tienen que estar en equilibrio; para lograrlo, cada etapa del proceso de activación del Complemento está fuertemente controlada por diversas proteínas reguladoras, tanto plasmáticas como de membrana.



**Figura 1: Activación y regulación del Sistema del Complemento.** En la figura se muestran las 3 vías de activación de la cascada del Complemento, que convergen en la formación de las convertasas de C3. La activación se encuentra regulada a varios niveles por distintas proteínas solubles y de membrana (en rojo se muestran las proteínas que inhiben la activación y en verde las que la favorecen). Figura adaptada de (Gómez Delgado and Sánchez-Corral 2021). Nomenclatura del Complemento: (Bohlson et al. 2019; Kemper, Pangburn, and Fishelson 2014).

## 1.2 Regulación del Complemento

Al funcionar como una cascada proteolítica muy potente, el Complemento requiere una regulación muy estricta. Si no se mantiene bajo control, la activación del Complemento dañaría las células y tejidos propios circundantes; además, se consumiría C3 muy rápidamente, dejando al organismo más vulnerable frente a procesos infecciosos. El equilibrio entre la activación y la regulación es fundamental para que el Complemento sea eficaz y específico, y esto se consigue gracias a un conjunto de proteínas reguladoras que actúan en distintas etapas del proceso de activación.

Proteínas reguladoras como el inhibidor de C1 (C1-INH), MAP-44 y MAP-19 controlan el inicio de la VC y la VL, inhibiendo la activación de los complejos C1 y MBL/MASPs, respectivamente (Beltrame et al. 2015). Otras proteínas, como vitronectina, clusterina y protectina/CD59, actúan en la etapa final de la cascada, impidiendo la formación del MAC y/o su inserción en la membrana (Schmidt, Lambris, and Ricklin 2016). Pero el punto clave en la regulación del Complemento es el proceso de activación de C3 a C3b por las convertasas de C3 (C4b2b y C3bBb). Por este motivo, existen varias proteínas reguladoras que actúan sobre estas convertasas, ya sea acelerando su disociación espontánea (DAF/CD55, MCP/CD46) o promoviendo la degradación enzimática de C3b (FI, C4BP, FH, CR1/CD35) (Schmidt et al. 2016). El principal regulador de la VA es el Factor H (FH), que aunque es una proteína plasmática es capaz de reconocer y unirse a las superficies celulares propias; por eso, FH acelera la disociación de la convertasa de C3 tanto en fase soluble como en superficies, y actúa como cofactor de FI en la proteólisis de C3b, evitando que se formen nuevas moléculas de convertasa.

Cualquier desequilibrio entre la activación y la regulación del Sistema del Complemento, por una activación excesiva o por una deficiencia en la regulación, podría dañar las células y los tejidos autólogos. Uno de los órganos más vulnerables al daño por Complemento es el riñón, dado que las células tubulares del glomérulo renal carecen de proteínas reguladoras en su superficie (Vernon and Cook 2012). Las patologías renales comúnmente asociadas a la desregulación del Complemento son el Síndrome Hemolítico-Urémico atípico (SHUa), la Glomerulopatía C3 (GC3) y la Nefropatía por IgA (NIgA). La vía más afectada en estas patologías es la VA, que amplifica la activación inicial del Complemento; entre todos los componentes de esta vía que se han visto alterados destaca FH, del cual se han descrito tanto variantes genéticas patogénicas como polimorfismos de riesgo y autoanticuerpos. Además de FH, en plasma también circulan 5 proteínas homólogas que se denominan *Factor H-Related Proteins* (FHRs): FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4A y FHR-5 (Figura 2); también se han descrito variantes genéticas de estas proteínas asociadas con patología renal.

## 2. FAMILIA DE PROTEÍNAS FH Y FHRs

### 2.1 FH y FHL-1

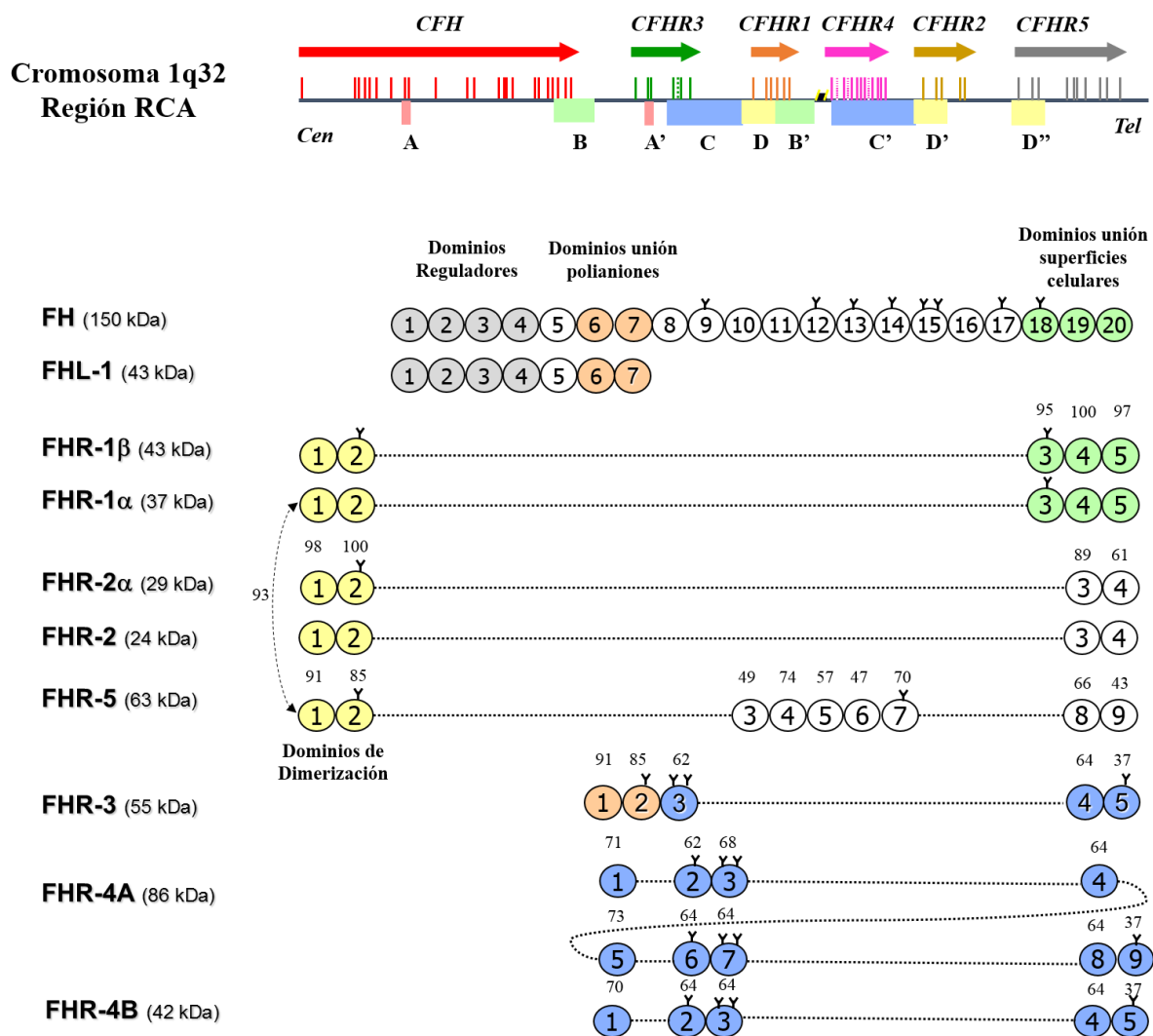
FH es el principal regulador de la VA del Complemento. Es una proteína bastante abundante en plasma, con una concentración media de aproximadamente 250 µg/ml (2µM) (Ansari et al. 2013; Cipriani et al. 2020; Hakobyan et al. 2008; Medjeral-Thomas et al. 2017; Pouw et al. 2016; Tortajada et al. 2017). El FH plasmático se sintetiza mayoritariamente en el hígado, aunque también se expresa en leucocitos de sangre periférica, plaquetas, células endoteliales y epiteliales y células madre mesenquimales (Ferreira, Pangburn, and Cortés 2010).

FH es una proteína altamente glicosilada que tiene un tamaño de 150kDa y está compuesta por 20 dominios globulares denominados SCRs (*Short Consensus Repeats*); cada dominio SCR está formado por aproximadamente 60 aminoácidos, y los 8 sitios de N-glicosilación de FH se distribuyen entre los SCRs 9-18 (Fenaille et al. 2007). En la molécula de FH se distinguen dos regiones relevantes para la regulación del Complemento: la región N-terminal (SCRs 1-4) y la región C-terminal (SCRs 19-20). La región N-terminal contiene un sitio de unión a C3b y es la responsable de la capacidad de FH para actuar como cofactor del FI y acelerar la disociación de la convertasa de C3 (C3bBb) (Gordon et al. 1995). La región C-terminal contiene otro sitio de unión a C3b y el sitio de unión a ácidos siálicos de las superficies celulares, y es por tanto la región de FH donde reside su capacidad para unirse a esas superficies y regular la activación del Complemento sobre las mismas. Además de estas dos regiones tan importantes, los SCRs 6-8 de FH contienen sitios de unión a glicosaminoglicanos como la heparina y en menor medida a C3b (Schmidt et al. 2008).

El gen de FH, *CFH*, se encuentra en un agrupamiento génico denominado “Reguladores de la Activación del Complemento” (RCA) ubicado en el cromosoma 1q32 (Rodríguez De Córdoba et al. 2004). Existe también una variante de *splicing* alternativo de *CFH* denominada FHL-1, que está formada por los 7 primeros SCRs de FH más una cola de 4 aminoácidos (SFLT). Esta similitud hace que FHL-1 pueda regular el Complemento en plasma como FH, pero que no pueda hacerlo en superficies celulares. Se ha estimado que la concentración en plasma de la proteína FHL-1 es unas 10 veces menor que la de FH (Friese et al. 2000).

## 2.2 Proteínas FHRs

La razón de la homología de las proteínas FHRs con FH radica en que los genes de las 5 proteínas FHRs (*CFHR1*, *CFHR2*, *CFHR3*, *CFHR4* y *CFHR5*) y el gen *CFH* tienen un origen evolutivo común, y se han originado mediante eventos sucesivos de duplicación génica, localizándose todos ellos en tándem en una subregión del agrupamiento RCA. Por ello, las proteínas FHRs también están formadas exclusivamente por SCRs, que presentan una identidad de aminoácidos con FH que varía desde un 37% hasta un 100%. (Figura 2).



**Figura 2: Familia de proteínas FH y FHRs.** En la parte superior se muestra la región RCA con los genes *CFH*-*CFHR1-5* situados en tándem en el cromosoma 1q32. Las zonas con el mismo color corresponden a regiones genómicas homólogas. En la parte inferior se muestran las proteínas FH y FHRs. Los números encima de cada dominio SCR indican el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos con el dominio homólogo en FH, excepto en los dominios de dimerización, que se comparan entre sí. Los símbolos “Y” sobre los dominios SCR representan las moléculas de carbohidratos. *Figura adaptada de* (Rodríguez De Córdoba et al. 2004) *y de* (Cserhalmi et al. 2019).

**FHR-1** está compuesta por 5 dominios SCRs. Los dominios SCRs 1-2 son muy parecidos a los SCRs 1-2 de las proteínas FHR-2 y FHR-5; estos dos SCRs forman un dominio de dimerización que permite a estas proteínas generar homodímeros y heterodímeros, que circulan en plasma (Goicoechea De Jorge et al. 2013). Los SCRs 3-5 de FHR-1, en cambio, son muy similares a los dominios SCRs 18-20 de FH, y confieren a FHR-1 la capacidad de competir por algunos ligandos de FH. Se han descrito 2 dos variantes alélicas mayoritarias de FHR-1 (2 alotipos): FHR-1\*A (forma ácida) y FHR-1\*B (forma básica), que se diferencian en 3 aminoácidos situados en el SCR3; esta diferencia hace que el SCR3 de FHR-1\*B sea idéntico al SCR18 de FH (Abarrategui-Garrido et al. 2009). Además, FHR-1 tiene dos sitios de glicosilación, que originan dos isoformas: FHR-1 $\alpha$  (37kDa; una molécula de carbohidratos) y FHR-1 $\beta$  (43 kDa; 2 moléculas de carbohidratos). La concentración de FHR-1 en plasma varía mucho de unos estudios a otros, oscilando entre 95 $\mu$ g/mL (Medjeral-Thomas et al. 2017; Tortajada et al. 2017) y concentraciones 10 veces menores (van Beek et al. 2017). Lo que sí es consistente en todos los estudios es el amplio rango de variación de los niveles normales de FHR-1.

**FHR-2** está formada por 4 dominios SCRs, y es la proteína más pequeña de la familia. Al igual que la proteína FHR-1, tiene dos isoformas: FHR-2 (24kDa, sin glicosilar) y FHR-2 $\alpha$  (29kDa, con una molécula de carbohidrato); también contiene dos dominios de dimerización (SCRs1-2), por lo que circula en plasma en forma de homodímeros y heterodímeros. La concentración media de FHR-2 es de 6  $\mu$ g/mL (van Beek et al. 2017).

**FHR-3** está formada por 5 dominios SCRs. Los SCRs 1-2 tienen un alto grado de similitud con los SCRs 6-7 de FH, mientras que los SCRs 3-5 se parecen más a los SCRs de FHR-4A. Tiene varias isoformas con diferentes grados de glicosilación, cuyos tamaños varían entre 35-50 kDa (Hellwage et al. 1999). Además de estas isoformas, FHR-3 presenta dos variantes alélicas (FHR-3\*A y FHR-3\*B) que se diferencian en 1 aminoácido del SCR4 (Bernabéu-Herrero et al. 2015). La concentración media de FHR-3 en plasma es de 0,5  $\mu$ g/mL, con un rango normal de variación de 0,38-0,83 $\mu$ g/mL (Pouw et al. 2016).

**FHR-4A** está formada por 9 dominios SCRs y tiene un tamaño molecular de 84 kDa. Curiosamente, los SCRs 1-4 y los SCRs 5-8 son muy similares entre sí, mientras que el SCR9 es diferente. No se han descrito isoformas de FHR-4A con distinto grado de glicosilación. En cambio, se ha predicho la existencia de una isoforma, FHR-4B, producto de *splicing* alternativo del gen *CFHR4*. La proteína FHR-4B estaría formada por 5 dominios SCRs (idénticos a los SCRs 1, 6, 7, 8 y 9 de FHR-4A) y tendría un tamaño molecular de 42 kDa (Józsi et al. 2005). En las primeras cuantificaciones no



se podía diferenciar FHR-4A y FHR-4B, estimándose una concentración media de 25,4  $\mu\text{g/ml}$  (Hebecker and Józsi 2012). Con el posterior desarrollo de anticuerpos específicos se ha determinado que FHR-4A tiene una concentración media de 2,55  $\mu\text{g/mL}$  (10 veces menor de la estimada anteriormente), y no se ha detectado FHR-4B, lo que arroja dudas sobre si esta isoforma realmente se secreta al plasma (Pouw et al. 2018).

**FHR-5** está formada por 9 dominios SCRs y tiene un tamaño molecular de 65 kDa. Los dos primeros SCRs (SCRs 1-2) tienen una gran similitud de secuencia con los dominios SCRs 1-2 de FHR-1 y FHR-2, y son dominios de dimerización. A diferencia de FHR-1 y FHR-2, FHR-5 sólo circula en plasma en forma de homodímeros, con una concentración media de 1,66  $\mu\text{g/mL}$  (van Beek et al. 2017); esta concentración no es muy diferente de los valores de 2,5-5,5  $\mu\text{g/mL}$  observados en otros estudios (Medjeral-Thomas et al. 2017; Vernon et al. 2012; Zhu et al. 2018).

### 2.3 Actividad de FH y proteínas FHRs en el Complemento

Como se ha mencionado anteriormente, la principal función de FH es regular la activación de la convertasa de C3 de la VA (C3bBb), mediante los siguientes mecanismos:

- Compitiendo con FB por la unión a C3b, impidiendo así la formación del complejo inicial C3bB.
- Acelerando la disociación espontánea de la convertasa en sus componentes C3b y Bb. El componente Bb no puede generar más convertasa, pero el componente C3b podría interactuar con otra molécula de FB y generar más enzima.
- Actuando como cofactor de FI en la degradación proteolítica de C3b al fragmento iC3b, que no puede dar lugar a más moléculas de convertasa.

A pesar de que FH es una proteína plasmática, estos mecanismos de control se producen tanto cuando la convertasa de C3 se genera en plasma como cuando lo hace sobre superficies celulares, ya que FH puede unirse a moléculas polianiónicas (ácidos siálicos y glicosaminoglicanos (GAGs)) de las mismas. Esta propiedad de FH reside principalmente en sus dominios SCR19-20, que le confieren la capacidad de discriminar entre superficies celulares propias y extrañas, puesto que estas últimas suelen carecer de este tipo de moléculas polianiónicas. FHL-1, por el contrario, carece de los dominios SCR19-20, y por tanto no puede regular el Complemento en superficies, aunque sí en fase soluble. Esta es una diferencia entre FH y FHL-1 muy importante para la regulación del Complemento (Blaum et al. 2015; Meri 2016; Rodríguez De Córdoba et al. 2004).

Las funciones de las proteínas FHRs están poco caracterizadas y hay bastantes dudas sobre su efecto final en el Complemento. En primer lugar, las proteínas FHRs carecen de los SCRs homólogos

a los SCRs1-4 de FH, responsables de inhibir la activación del Complemento en fase soluble, y por tanto no pueden regularlo de la misma forma que FH y FHL-1. Tampoco pueden unirse a las mismas moléculas polianiónicas de las superficies celulares; ni siquiera FHR-1, que tiene dominios muy similares a los SCRs19-20 de FH, es capaz de unirse a los ácidos siálicos de la misma manera que FH. Sin embargo, todas las proteínas FHRs pueden interactuar con otros ligandos de FH, como C3b y sus productos de activación iC3b, C3d y C3dg, pentraxinas como PTX3 y CRP, y algunos ligandos presentes en superficies y en células apoptóticas; (Csincsi et al. 2015, 2017; Hebecker and Józsi 2012; Kárpáti et al. 2020; Mihlan et al. 2009). Esta capacidad de reconocer ligandos de FH pero no poder regular el Complemento ha hecho que tradicionalmente se pensara que las proteínas FHRs podían actuar como de-reguladores de FH (Józsi et al. 2015). La excepción sería FHR-2, que una vez unido a C3b es capaz de inhibir la convertasa de C3 (Eberhardt et al. 2013), por lo que se comportaría como un regulador negativo del complemento, al igual que FH.

Por otro lado, se ha demostrado que algunas proteínas FHRs pueden actuar como activadores del Complemento. En este sentido, FHR-4A y FHR-5 pueden unirse al C3b depositado en superficies celulares y promover la formación de la Convertasa de C3, activando la VA; además, mediante su unión a PTX3 y CRP pueden activar también la VC (Csincsi et al. 2015; Hebecker and Józsi 2012). FHR-1 también podría activar la VA del Complemento en superficies, ya que una vez unido al C3b es capaz de interactuar con C3 y favorecer la generación y depósito de nuevas moléculas de C3b (Martin Merinero et al. 2021).

En cuanto a la proteína FHR-3, sus funciones están poco claras. Se sabe que puede unirse a C3b y a C3d, pero esta unión no parece influir en la formación y/o disociación de la convertasa, ni tampoco en la proteólisis de C3b por FI (Hellwage et al. 1999). Se ha observado que FHR-3 puede tener relevancia en las infecciones por bacterias que unen FH, como *Neisseria meningitidis*; la proteína fHbp de *N. meningitidis*, que une FH y protege a la bacteria del Complemento, también puede unir FHR-3, en cuyo caso la supervivencia bacteriana se reduce (Caesar et al. 2014).

### 3. ASOCIACIÓN FH Y FHRs Y PATOLOGÍA RENAL

En los últimos años, diferentes estudios en cohortes de pacientes y controles han mostrado la existencia de distintas variantes genéticas de FH y proteínas FHRs asociadas a patología renal. Algunas de estas variantes genéticas son variantes patogénicas raras (la mayoría, consecuencia de reordenamientos anómalos) y otras son polimorfismos. También se ha mostrado que los pacientes tienen niveles más elevados de algunas proteínas FHRs.

#### 3.1 Variantes Genéticas Raras

La homología de la secuencias de los genes *CFH* y *CFHRs* hace que la región genómica RCA que los engloba sea propensa a eventos de conversión génica y recombinaciones no homólogas que dan lugar a duplicaciones o deleciones genómicas o a genes híbridos. La mayoría de estos reordenamientos tienen repercusiones patológicas, bien porque afectan a la función de FH y proteínas FHRs o a sus niveles, asociándose a enfermedades como SHUa, GC3, NiGA (Nester et al. 2015; Sánchez-Corral et al. 2018; Zipfel et al. 2020).

Se han descrito reordenamientos anómalos tanto en casos individuales como familiares. En general, los podemos diferenciar en dos grandes grupos: a) genes híbridos que involucran a *CFH* y *CFHRs* (*CFH::CFHRs* o *CFHRs::CFH*), en los cuales se ve afectada la región C-Terminal de FH y por tanto la unión a superficies celulares, y que se asocian principalmente con SHUa; b) reordenamientos que sólo involucran a los *CFHRs*, en los cuales se produce una duplicación de los dominios de dimerización que aumenta la avidéz por los ligandos, y que se asocian principalmente con GC3.

Los mecanismos que explican estos reordenamientos génicos son fundamentalmente 3:

- Deleciones que eliminan los últimos exones del gen *CFH*, de forma que queda unido con el gen *CFHR3* (*CFH::CFHR3*) o con los últimos exones del gen *CFHR1* (*CFH::CFHR1*), y que originan las proteínas híbridas FH::FHR3 y FH::FHR1, respectivamente. En ambos casos, la proteína resultante carece de la región C-terminal de FH, que ha sido sustituida por la proteína FHR-3 o por los últimos dominios SCR de FHR-1; como consecuencia, estas proteínas híbridas no pueden regular la activación del complemento sobre superficies celulares (Challis et al. 2016; Francis et al. 2012; Maga et al. 2011; Venables et al. 2006).
- Duplicaciones de un segmento génico que incluye los primeros exones del gen *CFHR1* y los exones finales de *CFH*, generando un gen híbrido *CFHR1::CFH*. En la proteína híbrida

resultante, FHR-1::FH, los dos últimos dominios SCR de FHR-1 se han sustituido por los últimos SCR de FH, y por tanto es capaz de competir de forma eficaz la unión de FH a superficies endoteliales (Eyler et al. 2013). Existe también otro gen híbrido CFHR-1::CFH que produce una proteína FHR-1 con el último SCR de FH (Valoti et al. 2015). Además, esta proteína también puede generarse por un mecanismo de conversión génica (De Jorge et al. 2018).

- Reordenamientos en los genes *CFHR1*, *CFHR2* y *CFHR5* (duplicaciones parciales intragénicas o formación de genes híbridos) que resultan en la duplicación de los dominios de dimerización de las proteínas FHR-1, FHR-2 y FHR-5. La existencia de estos dominios de dimerización extra hace que estas proteínas puedan formar estructuras oligoméricas con mayor avidéz por sus ligandos, y capaces de competir más eficazmente con FH (Athanasίου et al. 2011; Chen et al. 2014; Gale et al. 2010; Togarsimalemath et al. 2017; Tortajada et al. 2013; Xiao et al. 2016).

### 3.2 Variantes Genéticas Comunes

Uno de los reordenamientos génicos más comunes en la región *CFH-CFHRs*, es la delección de los genes *CFHR3* y *CFHR1* ( $\Delta CFHR3-CFHR1$ ), con una frecuencia alélica que varía de 0 a 55% dependiendo de las poblaciones, siendo muy rara en poblaciones asiáticas y muy común en poblaciones africanas (Holmes et al. 2013); esta delección resulta en la deficiencia de las proteínas FHR-1 y FHR-3. La delección  $\Delta CFHR3-CFHR1$  es un factor de protección frente a la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) (Hughes et al. 2006) y NIGA (Gharavi et al. 2011), y un factor de riesgo a SLE (Zhao et al. 2011). También es un factor de riesgo a SHUa cuando está en homocigosis porque se asocia con la generación de autoanticuerpos anti-FH (Zipfel et al. 2007). La delección  $\Delta CFHR3-CFHR1$  es responsable de la gran variabilidad que hay en los niveles de las proteínas FHR-3 y FHR-1, dado que éstos van depender en gran medida del número de copias de sus genes respectivos (Pouw et al. 2016). La delección de los genes *CFHR1* y *CFHR4* ( $\Delta CFHR1-CFHR4$ ) es mucho menos frecuente, con una frecuencia alélica alrededor del 1%, y hasta ahora sólo se ha descrito 1 individuo con la delección en homocigosis (Abarrategui-Garrido et al. 2009; Moore et al. 2010).

En los últimos años, también se han descrito numerosos polimorfismos de cambio de nucleótido (SNPs) en la región *CFH-CFHRs*, aunque sólo unos pocos se han asociado con mayor o menor susceptibilidad a patología. En el gen *CFH* destacan varios SNPs que se encuentran en desequilibrio de ligamiento y forman diferentes haplotipos, siendo los más frecuentes los denominados *CFH(H1)*,

*CFH(H2)*, *CFH(H3)* y *CFH(H4)*. El haplotipo *CFH(H1)*, se asocia con riesgo a DMAE y GC3, mientras que el haplotipo *CFH(H2)*, se ha descrito como un factor de protección frente a SHUa, DMAE y GC3 (De Córdoba and De Jorge 2008; Hageman et al. 2005). El haplotipo *CFH(H3)* se asocia con riesgo a SHUa, y determina menores niveles de FH (Bernabéu-Herrero et al. 2015). El haplotipo *CFH(H4)* se encuentra en desequilibrio de ligamento con la delección  $\Delta CFHR3-CFHR1$ , y por tanto está relacionado con la deficiencia de las proteínas FHR-3 y FHR-1.

Al igual que el gen *CFH*, los genes *CFHR1* y *CFHR3* tienen varios SNPs en desequilibrio de ligamiento que dan lugar a los dos alelos mayoritarios de estos genes: *CFHR1\*A* y *CFHR1\*B* (Abarrategui-Garrido et al. 2009) y *CFHR3\*A* y *CFHR3\*B* (Bernabéu-Herrero et al. 2015). El alelo *CFHR1\*A* se asocia con riesgo a DMAE (Martínez-Barricarte et al. 2012) y el alelo *CFHR1\*B* con riesgo a SHUa (Abarrategui-Garrido et al. 2009). El alelo *CFHR3\*B* también es un alelo de riesgo a SHUa (Bernabéu-Herrero et al. 2015). Curiosamente, el haplotipo *CFH(H3)* se encuentra generalmente asociado a los alelos *CFHR3\*B* y *CFHR1\*B*, conformando un haplotipo extendido de riesgo a SHUa (Bernabéu-Herrero et al. 2015).

Recientemente se han descrito algunos SNPs en el gen *CFHR4* asociados con patología. Dentro de estos SNPs destaca uno en el intrón 1 (rs6685931 c.59-4315T>C) que se asocia con riesgo a DMAE y mayores niveles de FHR-4A (Cipriani et al. 2020). En el gen *CFHR5* también se han encontrado varios SNPs asociados con riesgo a GC3 (Abrera-Abeleda et al. 2006).

### 3.3 Niveles de FH y proteínas FHRs

El hecho de que algunas variantes genéticas como la  $\Delta CFHR3-CFHR1$  o el haplotipo *CFH(H3)* se asocien con riesgo o protección a distintas patologías renales sugiere que los niveles de estas proteínas podrían ser también relevantes. Además, dado que FH y las proteínas FHRs compiten por algunos ligandos y pueden realizar funciones antagónicas dentro del Complemento (FH como regulador principal y las proteínas FHRs como posibles activadores), es posible que sus niveles plasmáticos sean muy importantes para la homeostasis del sistema. Pequeños cambios en las concentraciones de estas proteínas, o en la ratio FH/FHRs, pueden ser especialmente relevantes para controlar la activación del Complemento a nivel local, y contribuir al desarrollo de enfermedades como el SHUa, la NIgA y la DMAE (Sánchez-Corral et al. 2018).

Por todo ello, la determinación de los niveles fisiológicos de las proteínas FHRs y de la ratio FHRs/FH tiene gran relevancia. Sin embargo, la obtención de anticuerpos específicos para cada proteína se ha encontrado con dos problemas principales, que han dificultado su cuantificación mediante ensayos ELISA: 1) el alto grado de homología entre las proteínas de la familia y 2) la presencia de homodímeros y heterodímeros. Los datos actuales, que incluyen también la cuantificación mediante espectrometría de masas, muestran que hay una gran diferencia en los niveles de las proteínas FHRs en controles sanos, dependiendo de los protocolos y reactivos empleados (Poppelaars et al. 2021)

A pesar de las diferencias entre ensayos, las cuantificaciones en muestras de pacientes muestran como característica común que los niveles de proteínas FHRs son mayores que en los controles. Una de las patologías en la que más se ha estudiado la relevancia de los niveles de las proteínas FHRs es la NIgA. Varios estudios han visto que los pacientes con NIgA tienen mayores niveles de FHR-1 y FHR-5 que los controles, y que las ratios FHR-1/FH y FHR-5/FH también están más elevadas en los pacientes. Además, hay una correlación entre los niveles elevados de FHR-1 y FHR-5 y la progresión de la enfermedad (Medjeral-Thomas et al. 2017; Tortajada et al. 2017; Zhu et al. 2018). FHR-3, por su parte, está elevada en pacientes con enfermedades autoinmunes, como Lupus Sistémico Eritematoso (LES), Artritis Reumatoide (AR) y Polimialgia Reumática (PR), y sus niveles correlacionan con los de la CRP (Schäfer et al. 2016). En un estudio más reciente en pacientes con DMAE se ha visto que todas las proteínas FHRs, a excepción del FHR-5, están elevadas respecto a los controles (Lorés-Motta et al. 2021). Estas observaciones en pacientes han suscitado un debate sobre si niveles basales elevados de las proteínas FHRs predisponen a estas patologías, o si es el desarrollo del proceso patológico lo que induce un aumento en los niveles. En cualquier caso, sí que hay que tener en cuenta que el estado clínico de los pacientes puede influir en los niveles de las proteínas FHRs.

#### 4. SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO ATÍPICO (SHUa)

El Síndrome Hemolítico-Urémico (SHU) es una microangiopatía trombótica (MAT) caracterizada por la triada clínica de anemia hemolítica microangiopática (hemoglobina < 10 g/dl), trombocitopenia (plaquetas < 150.000/ $\mu$ l) e insuficiencia renal aguda (creatinina en orina (Cr)  $\geq$ 0,3mg/dl en 48 horas) (Kellum et al. 2013; Loirat and Frémeaux-Bacchi 2011).

El 90% de los casos de SHU son causados por una infección por cepas de *Escherichia coli* productoras de la toxina *shiga*, y se denominan SHU típico. El 10% restante son casos no relacionados con infecciones por *E.coli*, que históricamente se han denominado SHU atípico (SHUa) (Noris and Remuzzi 2009).

El SHUa es una enfermedad ultra-rara con pronóstico grave, con una tasa de mortalidad de hasta el 25%, y más de la mitad de los pacientes progresan hasta enfermedad renal terminal (Franchini 2015). La incidencia estimada es 0.5-2 casos/millón y puede darse a cualquier edad, desde neonatos hasta adultos, aunque es menos frecuente en niños que en adultos. La mayoría de los casos son esporádicos, pero también se han descrito casos familiares (Bernabeu et al. 2020).

Actualmente, el SHUa se divide en:

**SHUa primario:** asociado fundamentalmente con desregulación de la VA del Complemento, bien por causas genéticas, como las mutaciones en los genes del Complemento, o adquiridas, como los autoanticuerpos anti-FH.

**SHUa secundario:** causado por una gran variedad de agentes ambientales: infecciones, tratamientos farmacológicos, cáncer, trasplantes, embarazo/posparto o enfermedades autoinmunes.

Esta distinción entre casos primarios y secundarios no excluye que los agentes ambientales sean desencadenantes del SHUa primario, y que en los casos secundarios también pueda haber una predisposición genética.

La fisiopatología en los dos tipos de SHUa es similar. Las lesiones histológicas son de MAT, caracterizada por el engrosamiento de las paredes de arteriolas y capilares, la inflamación del endotelio y la acumulación de plaquetas y restos celulares, que forman trombos que ocluyen la luz de los vasos sanguíneos; esta oclusión produce la fragmentación mecánica de los hematíes y es la responsable de la anemia hemolítica microangiopática y la presencia de esquistocitos en sangre periférica. Aunque la patología afecta principalmente a los glomérulos renales, también puede dañar otros órganos, como

cerebro, corazón, pulmones, tracto gastrointestinal y páncreas; de hecho, en torno al 25% de los pacientes presentan también daño a nivel neurológico, hepático y digestivo (Loirat and Frémeaux-Bacchi 2011; Nester et al. 2015).

El 50-60% de los casos de SHUa se producen por mutaciones en genes del complemento que desregulan la VA. Las mutaciones en los genes de las proteínas reguladoras FH, FI y MCP, disminuyen la regulación de la VA, y las mutaciones de ganancia de función en los genes de FB y C3, aumentan la estabilidad de la convertasa de C3 y potencian la activación del Complemento. También se han descrito mutaciones en los genes de las proteínas FHRs y en los genes *THBD* (*Thrombomodulin*) y *DGKE* (*Diacylglycerol kinase epsilon*) (Bernabeu et al. 2020). Las mutaciones más frecuentes son las de FH, que se localizan principalmente en la región C-terminal y afectan a su capacidad para regular el Complemento sobre superficies. En general, las mutaciones se presentan en heterocigosis y tienen una penetrancia incompleta que se incrementa con la edad, la existencia de mutaciones combinadas y la presencia de polimorfismos de riesgo (Bresin et al. 2013). Los polimorfismos de riesgo a SHUa descritos son: el haplotipo *MCPggaac*, el haplotipo *CFH(H3)* y los alelos *CFHR1\*B* y *CFHR3\*B*. Como se mencionó anteriormente, el haplotipo *CFH(H3)* se encuentra en desequilibrio de ligamiento con los alelos *CFHR3\*B* y *CFHR1\*B*, formando un haplotipo extendido *CFH(H3)-CFHR3\*B-CFHR1\*B* que es más frecuente en pacientes de SHUa que en controles sanos (Bernabéu-Herrero et al. 2015).

El tratamiento estándar para los pacientes de SHUa hasta 2011 eran las infusiones de plasma y/o el recambio plasmático. Estas terapias se comenzaron a usar para eliminar las proteínas responsables de la desregulación de la actividad del Complemento y aportar componentes esenciales para su correcto funcionamiento. La eficacia de estos tratamientos nunca se ha estudiado formalmente; se ha visto que la remisión hematológica es muy buena pero la remisión del daño renal no lo es. La utilidad terapéutica de la plasmaféresis depende de la alteración genética subyacente; es eficaz en pacientes con mutaciones en *CFH* o *CFI*, pero no en pacientes con mutaciones en *MCP* (Nester et al. 2015). Uno de los avances más importantes en el tratamiento llegó en 2013 con los primeros ensayos clínicos del fármaco Eculizumab en SHUa (Legendre et al. 2013). El Eculizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce la proteína C5 e inhibe, por tanto, la formación del MAC. El Eculizumab es eficaz en la gran mayoría de los pacientes de SHUa, independientemente de la alteración genética, y mejora no sólo los parámetros hematológicos, sino también la función renal. No obstante, este tratamiento también tiene algunas desventajas; una de ellas es que el Eculizumab aumenta el riesgo de infecciones por *N. meningitidis*, por lo que los pacientes deben vacunarse frente a este patógeno antes de iniciar el tratamiento. Otra desventaja es que el Eculizumab se tiene que administrar por vía intravenosa y no



hay consenso en cuanto a la duración del tratamiento. En los últimos años, con el avance en el conocimiento de la fisiopatología del Sistema del Complemento y ante los buenos resultados con el Eculizumab, se están buscando nuevos fármacos inhibidores del Complemento (Zeleg et al. 2019).

Estos avances en terapias y en diagnóstico genético benefician principalmente a los pacientes de SHUa primario, ya que el conocimiento sobre la implicación del Complemento en la patogenia del SHUa secundario es en general escaso. Los casos mejor estudiados son los de SHUa debido al embarazo/postparto, en los que se han descrito mutaciones en genes del Complemento en un porcentaje similar al observado en los casos primarios; también se ha visto que el tratamiento con Eculizumab mejora los parámetros hematológicos y la función renal (Huerta et al. 2018).

Las observaciones en pacientes de SHUa secundario al embarazo abren la puerta a que en otros casos secundarios también se encuentren mutaciones en genes del Complemento. De hecho, se han realizado estudios genéticos en pequeñas cohortes de SHUa secundario a infecciones por *Streptococcus pneumoniae* (SP-SHU) que corroboran esta hipótesis (Szilágyi et al., 2013).

#### **4.1 SHUa secundario a infecciones por *Streptococcus pneumoniae* (SP-SHU)**

Las infecciones por *S.pneumoniae* pueden dar lugar a enfermedades graves como neumonía, meningitis o sepsis, especialmente en niños menores de 2 años. En estos casos, una complicación rara pero con una alta tasa de mortalidad es el SHU (Banerjee et al. 2011). Se considera que el proceso patológico es consecuencia de la actividad de la neuraminidasa bacteriana, y se han propuesto dos posibles mecanismos. En el primer mecanismo, la desialilación de la superficie de eritrocitos y plaquetas por la acción de la neuraminidasa expondría el antígeno Thomsen-Friedenreich (TF), permitiendo su reconocimiento por anticuerpos naturales anti-TF (IgM) presentes en plasma; la unión de estos anticuerpos con el antígeno TF provocaría aglutinación de los eritrocitos y plaquetas, hemolisis y daño endotelial (Spinale et al. 2013). En el segundo mecanismo, la desialilación de las superficies celulares en el glomérulo impediría la unión del FH y por tanto esas células quedarían desprotegidas frente a la acción del Complemento (Johnson and Waters 2012). Por este motivo, los pacientes de SP-SHU se consideran casos de SHUa secundario en los que la contribución de variantes genéticas del Complemento es irrelevante. No obstante, se han descrito algunos pacientes con mutaciones en los genes del Complemento (Szilágyi et al. 2013), lo que sugiere que su contribución al desarrollo de esta patología puede estar subestimada.

La eliminación del neumococo por el Complemento se realiza principalmente por la activación de la VC y en menor medida por la VL y la VA, y provoca la opsonización del patógeno y su posterior fagocitosis. La formación del MAC, por el contrario, contribuye poco a la eliminación del neumococo debido a que es una bacteria encapsulada (Andre et al. 2017). De hecho, uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune con los que cuenta el *S.pneumoniae* es la expresión en su superficie de varias proteínas que impiden la activación del Complemento, entre las que destaca la proteína PspC, que es capaz de unir FH a su superficie, protegiéndose así de la acción del Complemento (Herbert et al. 2015; Lu et al. 2008).

## 5. NEFROPATÍA POR IgA (NIgA)

La nefropatía por IgA (NIgA, descrita por primera vez por Jean Berger en 1968) es una de las formas más comunes de glomerulonefritis primaria en el mundo y una de las principales causas de insuficiencia renal (Gutiérrez et al. 2020; Hassler 2020). Tiene una amplia distribución geográfica, aunque es más frecuente en poblaciones asiáticas y menos en poblaciones africanas (Gutiérrez et al. 2020). La NIgA es una enfermedad autoinmune compleja que se caracteriza por una hipoglicosilación de la IgA1 (*galactose-deficient IgA1*, gd-IgA1). En la actualidad, la patogenia de la NIgA y el daño renal resultante se explica mediante un modelo en 4 etapas:

1. Aumento en los niveles plasmáticos de gd-IgA1
2. Síntesis de anticuerpos frente a la gd-IgA1 (Abgd-IgA1)
3. Formación de inmunocomplejos (gd-IgA1:Abgd-IgA1)
4. Depósito de los inmunocomplejos en el mesangio del glomérulo renal, provocando la activación de las células mesangiales y del Sistema del Complemento, dando como resultado daño renal (Suzuki et al. 2011).

La nefropatía por IgA presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde casos prácticamente asintomáticos con sólo una leve hematuria, hasta casos que progresan rápidamente a insuficiencia renal terminal. La hematuria es una de las manifestaciones clínicas más frecuentes; otros parámetros clínicos que además se asocian con un peor pronóstico son: proteinuria (>1g/día), hipertensión arterial y reducción en el filtrado glomerular al diagnóstico. El curso clínico de la NIgA es también muy diverso; en un 5-15% de los casos se produce una remisión espontánea, mientras que en otros pacientes la función renal se deteriora lentamente (30-40%) o de forma rápida (<10%). (Gutiérrez et al. 2020; Tortajada et al. 2019).

El diagnóstico de la NIgA se confirma mediante una biopsia renal, que se caracteriza por el depósito predominante de IgA1 en el mesangio. Los hallazgos de depósitos de proteínas del Complemento en las biopsias revelan su importancia en esta patología. Estos depósitos están formados mayoritariamente por C3 (o fragmentos de su activación), que colocalizan con los de IgA1 en más del 90% de los casos; también pueden encontrarse C4d, MBL, properdina, C5b-9, FH y proteínas FHRs, pero no C1q. En base a estos y otros hallazgos, se piensa que la activación del Complemento en la NIgA se debe fundamentalmente a la VA, aunque el mecanismo todavía no se conoce bien (Tortajada et al. 2019). Otra evidencia de la relevancia de la VA del Complemento en la NIgA es la disminución en los niveles plasmáticos de C3 y el aumento de sus fragmentos de activación que se ha observado en algunos pacientes, mientras que los niveles de C4 se mantienen; este hecho, junto con los depósitos de C3 en el mesangio renal, correlacionan con una peor evolución, lo que sugiere que la activación de la VA del Complemento juega un papel en la progresión de la enfermedad (Kim et al. 2012; Paunas et al. 2017).

La asociación de la NIgA con la activación de la VA del Complemento ha hecho que el estudio de las proteínas FH y FHRs en los pacientes adquiera cada vez más relevancia, y se hayan empezado a analizar sus niveles plasmáticos. En dos estudios independientes se ha visto que los niveles plasmáticos de FHR-1 están más elevados en pacientes de NIgA que en controles, observándose una correlación entre los niveles y la progresión hacia enfermedad renal crónica. También se ha observado que la ratio FHR-1/FH está elevada en los pacientes y se asocia con los parámetros clínicos de peor pronóstico (Medjeral-Thomas et al. 2017; Tortajada et al. 2017). Los niveles plasmáticos de FHR-5 están también elevados en los pacientes de NIgA respecto a los controles, y correlacionan con peor pronóstico; la progresión de la enfermedad se asocia también con el depósito glomerular de FHR-5, que correlaciona con los depósitos de C3 y C5b-9 (Medjeral-Thomas et al. 2017; Zhu et al. 2018).

Además de la determinación de los niveles de FH y proteínas FHRs, se han caracterizado variantes genéticas en la región *CFH-CFHRs*. La variante  $\Delta CFHR3-CFHR1$  es un factor de protección frente a la NIgA (Gharavi et al. 2011), mientras que algunas variantes raras en el gen *CFHR5* se asocian con mayor susceptibilidad (Zhai et al. 2016).

# **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO 1:**

**Determinar los niveles plasmáticos de FH y proteínas FHRs en pacientes de SHUa y NigA, y su posible asociación con polimorfismos de la región *CFH-CFHRs*.**

- Cuantificar FH y proteínas FHRs en muestras de plasma de controles y pacientes, e identificar perfiles de expresión asociados con patología
- Genotipar variantes comunes en la región *CFH-CFHRs* en controles y pacientes.
- Analizar la correlación de los niveles plasmáticos con las variantes genéticas

### **OBJETIVO 2:**

**Analizar la relevancia de FH y proteínas FHRs en el SHU secundario a infecciones por neumococo (SP-SHU).**

- Identificar variantes patogénicas y haplotipos de riesgo.
- Determinar los niveles plasmáticos de FH y proteínas FHRs, e identificar posibles deficiencias o formas anómalas

# **MATERIALES Y** **MÉTODOS**

## 1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES Y CONTROLES

En esta Tesis se muestran resultados obtenidos en pacientes de SHUa (n=328) incluidos en el registro español de SHUa/GC3 (<https://www.ahusc3g.es>), registro compartido por la Dra. Pilar Sánchez-Corral Gómez, el Profesor Santiago Rodríguez de Córdoba (Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, CSIC, Madrid) y la Dra. Margarita López Trascasa (Hospital Universitario la Paz/IdiPAZ). Se muestran también resultados de una cohorte de pacientes de NIgA (n=69) reclutada por la Dra. Teresa Olea Tejero (Servicio de Nefrología del Hospital La Paz/IdiPAZ) en colaboración con la Dra. Sánchez-Corral, y de una cohorte Control de individuos adultos sanos (n=97), mayoritariamente trabajadores del hospital La Paz/IdiPAZ. Tanto los pacientes como los controles fueron informados previamente de los estudios que se querían realizar, y firmaron el correspondiente Consentimiento Informado, aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario la Paz.

Para la realización de los distintos estudios se obtuvieron muestras de sangre periférica de pacientes y controles. Generalmente se extrajeron 5-10 mL de sangre-EDTA y 5 mL de sangre en tubo seco, para suero. Las muestras de sangre-EDTA se centrifugaron a 2.500 rpm durante 10 minutos para separar el plasma y la capa de leucocitos (*Peripheral-blood leukocytes*, PBLs). El plasma se alicuotó y guardó a -20°C/-80°C hasta su uso en los análisis de proteínas. La capa de PBLs se empleó para obtener el ADN según un protocolo estándar, y realizar los estudios genéticos. Las muestras de suero se emplearon para determinar los niveles de C3 y C4 mediante nefelometría, y para analizar la presencia de autoanticuerpos anti-FH; estos análisis se realizaron en el servicio de Inmunología del Hospital La Paz.

## 2. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS

### 2.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida y análisis de *Western-blot*

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli 1970). Las muestras de plasma se diluyeron en tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2% y azul de bromofenol 0,02%); cuando se requirieron condiciones reductoras, se añadió  $\beta$ -mercaptoetanol 430 nM al tampón de carga. Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos, y se cargaron por duplicado en dos minigeles de poliacrilamida (8% o 10%) caseros. La electroforesis se realizó en una cubeta MiniProtean (Bio-Rad), en las siguientes condiciones: 15 min a 50V, 15 min a 75V, 90 min a 100V.

Tras la electroforesis, las proteínas se visualizaron mediante tinción del gel con Azul Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250, USB Corporation), o se analizaron mediante *Western-blot* (WB).

Para la tinción con Azul Coomassie, las proteínas del gel se fijaron con una solución de etanol 50% y ácido fosfórico 2%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con agua destilada para rehidratar el gel, y se añadieron 25 ml de solución de tinte (metanol 32%, ácido fosfórico 3%, sulfato amónico 1,28 M) durante 30 minutos. La solución de tinte se completó con 750  $\mu$ L de una solución stock de Azul Coomassie coloidal (Azul Coomassie 6,6% en metanol) y se dejaron incubando toda la noche en agitación. Al día siguiente se retiró la solución de tinción y se añadió agua destilada para conservar el gel.

Para la realización del WB, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia en seco (iBlot, Invitrogen). Tras la transferencia, las membranas se bloquearon toda la noche a 4°C en una solución de ECL *blocking agent* (GE Healthcare) al 2% en Tris-Tween (Tris-HC 150 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween 20 0,2%). Al día siguiente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (diluidos en ECL al 2%) durante dos horas a temperatura ambiente y en agitación. Después de realizar 6 lavados de 5 minutos con Tris-Tween para eliminar el exceso de anticuerpos, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo (30 minutos a temperatura ambiente y en agitación). Tras otros 6 lavados de 5 minutos, las membranas se revelaron con un reactivo quimioluminiscente (ECL Advance, GE Healthcare), y las imágenes correspondientes se detectaron en un equipo CCD (Uvitec Cambridge).

Se utilizaron distintas combinaciones de anticuerpos primarios, que se describen a continuación:

Anticuerpos Primarios (Set 1):

- Policlonal rb34, que reconoce las proteínas FH/FHR-1/FHR-2. Generado en conejo y proporcionado por la Dra. P. Sánchez-Corral y el Dr. S. Rodríguez de Córdoba. Dilución 1:250.000.
- Policlonal anti-FHR-5. Generado en conejo y proporcionado por la Dra. J. McRae (St Vincent's Public Hospital, Melbourne, Australia). Dilución 1:100.000.
- Policlonal que reconoce las proteínas FH/FHR-3/FHR-4A/FHR-4B. Generado en conejo y proporcionado por los Drs. P. Zipfel y C. Skerka (Hans Knöll Institute, Jena, Germany). Dilución 1:250.000.



## Anticuerpos Primarios (Set 2):

- Monoclonal que reconoce las proteínas FHR-1/FHR-2 (Hycult Biotech, HM2301). Dilución 1:8000.
- Monoclonal anti-FHR-5 (R&D systems, MAB3845). Dilución 1:500.
- Policlonal anti-FHR-4A. Generado en conejo y proporcionado por el Dr. M. Józsi (ELTE Eötvös Loránd University Budapest, Hungary). Dilución 1:250.000.
- Policlonal rb84 que reconoce las proteínas FH, FHL-1, FHR-3 y FHR-4A. Generado en conejo y proporcionado por el Dr. R. Pouw (SANQUIN Research, Amsterdam, The Netherlands). Dilución 1:500.000.

## Anticuerpos Secundarios:

- Policlonal anti-IgGs de ratón marcado con HRP (Santa Cruz, sc-2055), dilución 1:40.000.
- Policlonal anti-IgGs de conejo marcado con HRP (Santa Cruz, sc-2054), dilución 1:40.000.

**2.2 Electroforesis Bidimensional (Isoelectroenfoque y SDS-PAGE)**

En esta técnica las proteínas se separaran primero por su punto isoeléctrico mediante Isoelectroenfoque analítico (IEF), y posteriormente por su tamaño molecular mediante SDS-PAGE.

Las muestras de plasma se prepurificaron en agarosa-Heparina, en condiciones de fuerza iónica en las que FH y las proteínas FHRs quedaban retenidas, y la albúmina y las inmunoglobulinas se eliminaban en los lavados. Para ello, las muestras de plasma (200-1000  $\mu$ L) se dializaron frente a tampón de equilibrado (Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM) durante 3h a 4°C y en agitación. Después de centrifugarlas (13000rpm/5min), los sobrenadantes se incubaron con el mismo volumen de agarosa-Heparina (3h a 4°C y en agitación). La agarosa-Heparina se lavó con tampón de equilibrado hasta que la A<sub>280</sub> fue menor de 0,005. Las proteínas retenidas se eluyeron con Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, recogándose diferentes fracciones que se guardaron a -20°C hasta su uso.

Para el IEF, se utilizaron tiras comerciales IPG (ImmobilineDrystrips, GE Healthcare) de 7cm de longitud y 2 rangos de pH (pH 3-10 y pH 4-7), que admiten un máximo de 140  $\mu$ g de proteína total. Se precipitaron 140 $\mu$ g de proteína total de las fracciones eluidas de la agarosa-Heparina, añadiendo 4 volúmenes de acetona a -20°C, durante un mínimo de 4 horas. Después de centrifugar y eliminar el exceso de acetona, las proteínas precipitadas se resuspendieron en tampón de hidratación (IPG buffer 0,5%, urea 8 M, CHAPS 2%, azul de bromofenol 0,002%) y se añadieron a las tiras de isoelectroenfoque, previamente colocadas en sus correspondientes “sárcofosfos”. El proceso de IEF se realizó en un equipo de alto voltaje (IPGphor, GE Healthcare), en las siguientes condiciones:

Temperatura: 20°C / Intensidad: 50 mA por tira / Voltaje: 50 V (15 h) + 100 V (1 h) + 1000V (1 h) + 5000V (5,5 h)

Una vez finalizado el IEF, las tiras se guardaron a -20°C hasta la realización de la segunda dimensión. Antes de llevar a cabo la SDS-PAGE, las tiras se descongelaron a temperatura ambiente y se incubaron con tampón de equilibrado (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, urea 6 M, glicerol 87%, SDS 2% y azul de bromofenol 0,002%) durante 20 minutos. A continuación, las tiras se colocaron en la parte superior de minigeles de poliacrilamida, y una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se visualizaron directamente con Azul Coomassie, o mediante análisis de *Western-blot*, según se describe en el apartado anterior.

### 3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

#### 3.1 Ensayos de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Ensayos ELISA)

Los niveles de las proteínas FH y FHRs en muestras de plasma-EDTA se determinaron mediante ensayos ELISA sándwich caseros, utilizando placas de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp®).

A cada pocillo se le añadieron 100 ng del correspondiente anticuerpo de captura, diluido en tampón carbonato/bicarbonato 0,1M, pH 9.3, y se incubaron las placas a 4°C toda la noche. Las placas se lavaron 2 veces con PBS-Tween al 0.2%, se bloquearon con PBS-BSA al 1% (tampón de bloqueo) y se incubaron 1 h a 37°C. Después de 2 nuevos lavados, se añadieron las muestras por duplicado, diluidas en tampón de bloqueo, y se incubaron 1 h a 37°C. Después de otros cuatro lavados, se añadió el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo, y se incubó durante 1h a 37°C. Tras otros 4 lavados, se añadió el anticuerpo secundario diluido en tampón de bloqueo y se incubó durante 30 min a 37°C. Tras 5 lavados finales, se reveló la placa utilizando como sustrato OPD (Sigma-Aldrich) o ABTS (Merck); tras 4-7 minutos de incubación a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con Ácido sulfúrico al 10% o Azida sódica al 0,01 %, y se midió la A<sub>492</sub> o A<sub>405</sub>, respectivamente, en un lector de placas Epoch Biotek. La concentración de las proteínas FHRs en las muestras de plasma se calculó interpolando el resultado de absorbancia en una curva patrón obtenida con una muestra de plasma con una concentración de proteínas FHRs conocida. En el caso de FH, la curva patrón se obtuvo utilizando FH purificado de plasma (Hycult). Además, como referencia adicional de la variabilidad interensayo, en todas las placas se incluyeron también otras 2 muestras control con una concentración de FH y proteínas FHRs conocida.

La mayoría de los anticuerpos utilizados son comerciales, salvo el anticuerpo policlonal anti-R4 (también utilizado en el WB) y el anticuerpo monoclonal 2C6 (reconoce FHR-1/FHR-2/FHR-5), proporcionado por el Dr. S. Rodríguez de Córdoba. Los detalles de los diferentes ensayos ELISA se muestran en la Tabla 1.

	FH	FHR-1	FHR-2	FHR-4A	FHR-5
Anticuerpo adicional para mejorar la especificidad	Innecesario	Innecesario	100ng goat anti-mouse IgG2A (Southernbiotech 1/5000)	Innecesario	100ng goat anti-mouse IgG2A (Southernbiotech 1/5000)
Anticuerpo de Captura	100 ng goat anti-FH (Quidel, A312)	100 ng moAb anti-R1 (R&D, MAB4247)	50 µL moAb 2C6-IgG2A (1/4000)	400 ng rb anti-R4	50µL moAb 2C6-IgG2A (1/4000)
Muestras de plasma	100 µL (1/8000 y 1/16000)	100µL (1/8000 y 1/16000)	50 µL (1/1600 y 1/3200)	100 µL (1/400 y 1/800)	50µL (1/800 y 1/1600)
Anticuerpo Primario	100 µL moAb anti-FH (Quidel A255, 1/2000)	100 µL moAb anti-R1/R2 (Hycult, HM2301 1/2000)	50 µL moAb anti-R2 (R&D, MAB5484, 1/500)	100 µL moAb anti-R4 (R&D, MAB5980, 1/250)	50µL moAb anti-R5 (R&D, MAB3845, 1/500)
Anticuerpo Secundario	100 µL HRP-goat anti- mouse IgG (1/5000)	100 µL HRP-goat anti- mouse IgG1 (1/5000)	50 µL HRP-goat anti- mouse IgG1 (1/5000)	100 µL HRP-goat anti- mouse IgG (1/2500)	50µL HRP-goat anti- mouse IgG1 (1/5000)
Sustrato	100 µL ABTS	100 µL OPD	50 µL OPD	100 µL ABTS	50µL OPD
Reactivo Parada	50 µL Azida sódica 0.01%	50µL Ácido sulfúrico 10%	25 µL Ácido sulfúrico 10%	50 µL Azida sódica 0.01%	25µL Ácido sulfúrico 10%

**Tabla 1: Detalles de los anticuerpos y diluciones empleadas en los ELISA de FH y FHRs.** Anticuerpos y reactivos utilizados en cada ensayo; las diluciones empleadas se expresan entre paréntesis. Los ensayos ELISA de FHR-2 y FHR-5 tienen un paso previo a la adición del anticuerpo de captura, que se diluye en PBS en vez de en carbonato/bicarbonato. Los nombres de las proteínas FHRs se han simplificado: R1, R2, R3, R4, R5. El volumen final de cada ELISA se ajustó en función de la cantidad de anticuerpo necesaria.

### 3.2. Cuantificación por *Western-blot*

La cuantificación de las bandas de las proteínas FH, FHR-1, FHR-3, FHR-4A y FHR-5 obtenidas en los WB, se realizó mediante la herramienta de análisis de geles 1D del programa ImageQuant TL (GE Healthcare). El reconocimiento automático de las bandas requiere que las imágenes de las membranas del WB estén en condiciones óptimas, es decir, carriles rectos, bien separados con banda de intensidad similar en todos ellos; cuando estas condiciones no se dan hay que pasar al reconocimiento manual. En el caso del reconocimiento manual lo primero es indicar los carriles y establecer el fondo, a continuación vamos señalando las bandas de interés en cada carril. La intensidad de cada banda se relativizó con la misma banda en la muestra de referencia, a la que se dio valor 1. Para la cuantificación de FHR-1 se analizó la banda de la isoforma FHR-1 $\beta$ , dado que la isoforma FHR-1 $\alpha$  solapa con la banda de la proteína FHL-1. Las señales de quimioluminiscencia se registraron a diferentes tiempos de exposición (desde 5 segundos hasta varios minutos), eligiendo una exposición diferente para cada proteína, de forma que se pudieran detectar las bandas de la proteína pero sin llegar a la saturación.

## 4. ENSAYOS FUNCIONALES.

Todas las proteínas utilizadas en estos ensayos, FH, FI, C3b, FD y FB son de la compañía CompTech (Texas, EE.UU).

### 4.1. Desialilación de Factor H

Para generar FH desialilado, 25  $\mu$ g de FH purificado en un volumen de 25  $\mu$ L se mezclaron con 100  $\mu$ L de NaOAc 0,1 M, pH 5 y 25  $\mu$ L BSA 1%. Se añadieron 25  $\mu$ L de una dilución 1/5 de Neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (0,05U, Sigma-Aldrich), y tras 4 horas de incubación a 37°C en agitación, la reacción se detuvo añadiendo 25  $\mu$ L de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M, pH 9.8. La misma cantidad de FH se incubó en paralelo en las mismas condiciones, pero añadiendo tampón en vez de neuraminidasa. La desialilación se comprobó mediante SDS-PAGE y tinción del gel con Azul Coomassie coloidal.

#### 4.2. Ensayos de Actividad Neuraminidasa

La actividad neuraminidasa en las muestras de plasma de los pacientes con SP-SHU se determinó utilizando el Kit comercial *Neuraminidase Activity Assay* (Sigma-Aldrich; MAK121), según las indicaciones del fabricante. Brevemente, 20  $\mu\text{L}$  de plasma original y de diluciones 1/5, 1/10 y 1/50 se añadieron a placas de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp®); tras añadir 80  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción enzimática, las placas se incubaron a 37°C durante un total de 50 min, midiendo la  $A_{570}$  a los 20 min y a los 50 min. El aumento de la absorbancia de 20 a 50 minutos se utilizó para calcular la actividad de la neuraminidasa en una curva estándar.

#### 4.3. Ensayo ELISA de Unión a C3b

Se utilizó un protocolo ELISA (Sánchez-Corral et al. 2002), con ligeras modificaciones. Placas de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp®) se incubaron toda la noche a 4°C después de añadir a cada pocillo 0,4  $\mu\text{g}$  de C3b en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, pH 9.5. Después de tres lavados con tampón TNT (Tris/HCl, pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,2%), la placa se bloqueó con TNT-BSA 1% durante 1 hora a 37°C. Tras otros tres lavados, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de diluciones seriadas (0,0325  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  - 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de FH o dFH en TNT-BSA 1% y se incubaron 1 hora a 37°C. Tras realizar otros tres lavados, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de un anticuerpo policlonal anti-FH casero (rb34) y se incubaron 1 hora a 37°C. Después de tres nuevos lavados, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Santa Cruz, dilución 1/1.000), y la placa se incubó 30 minutos a 37°C. Por último, después de tres últimos lavados, la placa se reveló añadiendo el sustrato ABTS (Merck), y la reacción enzimática se paró con azida sódica al 0,1% después de unos minutos. La unión de FH/dFH al C3b unido a la placa se calculó midiendo la absorbancia a 405nm en un lector de placas Epoch Biotek.

#### 4.4. Ensayo ELISA de Disociación de la Convertasa de C3

El efecto de FH y dFH en la disociación de la convertasa de C3 se analizó generando una convertasa de C3 estabilizada con Properdina (C3bBbP) en placas de 96 pocillos. Los pocillos se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de C3b (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en PBS, durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Barbital sódico 2,5 mM, pH 7.4, NaCl 71 mM, Tween 0,15%,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{NiSO}_4$  1 mM) y se bloquearon durante 1 hora a 37°C con tampón de bloqueo (tampón lavado con BSA 1%). La convertasa de C3 se generó añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de una disolución que contenía FB (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), FD (0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y Properdina (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), en tampón de bloqueo; a continuación, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de FH/dFH a concentraciones crecientes (de 0,039  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó la mezcla a

37°C durante 30 min. Se realizaron tres lavados, y las moléculas de C3bBbP que no se habían disociado se detectaron tras una incubación de una hora a 37°C con un anticuerpo monoclonal anti-Bb (Quidel A227; dilución 1:500). Después de volver a lavar, la placa se incubó durante otra hora a 37°C con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, dilución 1:2.500). Para el revelado, se utilizó ABTS como sustrato de la peroxidasa y azida sódica al 0,1% para detener la reacción. La  $A_{405}$  se midió en un lector de placas Epoch Biotek.

#### 4.5. Ensayos de Actividad Cofactora (Proteólisis de C3b por Factor I)

La actividad cofactora de FH/dFH en la proteólisis de C3b por FI en fase fluida se determinó siguiendo el protocolo descrito en (Merinero et al. 2018). 750 ng de C3b, 125 ng de FI, y 100 ng de FH/dFH se diluyeron en 25  $\mu$ L de tampón HEPES, pH 7.5, Tween 20 0,002% (concentración final: C3b 170 nM, FI 57 nM, FH/dFH 26 nM). Después de una incubación a 37°C durante 2,5 o 12,5 minutos, la reacción se detuvo añadiendo 5  $\mu$ L de una solución 5X de tampón de carga para SDS-PAGE que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol. 3  $\mu$ L de la mezcla se utilizaron para análisis de Western-blot, utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo anti-C3 generado en conejo (Abcam, ab200999) que reconoce la cadena  $\alpha'$  del C3b (C3b $\alpha'$ ) y el fragmento  $\alpha$ 45 del iC3b (iC3b $\alpha$ 45), pero no la cadena  $\beta$  (C3b $\beta$ ). Las imágenes del WB quimioluminiscente se analizaron con el programa ImageQuantTL (GE Healthcare). Para cada tiempo de incubación, la suma de las intensidades de las bandas C3b $\alpha'$  e iC3b $\alpha$ 45 se consideró como el 100%, y la degradación de C3b se calculó como el porcentaje de iC3b $\alpha$ 45 generado.

La actividad cofactora de FH/dFH en la proteólisis de C3b por FI en fase sólida se analizó mediante un ensayo ELISA en placas de 96 pocillos. Los pocillos se incubaron con 600 ng de C3b en 30  $\mu$ L de PBS durante 1 hora a 37°C. Después de 3 lavados con PBS, se añadieron 30  $\mu$ L de una solución con 100 ng de FI y 80 ng de FH/dFH (concentración final: C3b 100 nM, FI 38 nM, FH/dFH 17nM). Inmediatamente después se añadieron 5  $\mu$ L de tampón de carga 5X con  $\beta$ -mercaptoetanol a uno de los pocillos (tiempo 0 min); los otros pocillos se incubaron a 37°C durante 2,5, 12,5 o 22,5 minutos, y la reacción proteolítica se paró de la misma forma. El contenido de los pocillos se resuspendió de forma suave y se analizó mediante Western-blot de la misma forma que la proteólisis en fase fluida.

#### 4.6. Ensayos Hemolíticos

El efecto de la desialilación de FH en la regulación de la vía alternativa del complemento sobre superficies celulares se analizó mediante 2 ensayos hemolíticos previamente descritos, con pequeñas modificaciones.

En el primer ensayo (Sánchez-Corral et al. 2004), se utilizó plasma de un paciente de SHUa portador de la mutación W<sub>1183</sub>L en FH, y se determinó el volumen que era capaz de lisar el 60% de una preparación de eritrocitos de carnero. A continuación, se comparó la lisis producida cuando ese mismo volumen de plasma se incubaba con concentraciones crecientes de FH/dFH (desde 2,5 hasta 20 µg/mL). En el segundo ensayo (Strobel et al. 2011), se analizó la lisis de eritrocitos de carnero que se produce al incubar un plasma control con diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-FH que reconocen su región N-terminal (anticuerpo OX24, Thermo-Fisher) o su región C-terminal (anticuerpo C18, Thermo-Fisher). Una vez determinada la cantidad de anticuerpo necesaria para inducir la lisis del 60-70% de los eritrocitos por el plasma control, se analizó la capacidad de prevenir dicha lisis añadiendo cantidades crecientes de FH/dFH (1 to 15 µg/mL). En todos los experimentos, el porcentaje de lisis se calculó leyendo la absorbancia a 414 nm, y refiriéndola a la obtenida al lisar los eritrocitos con agua.

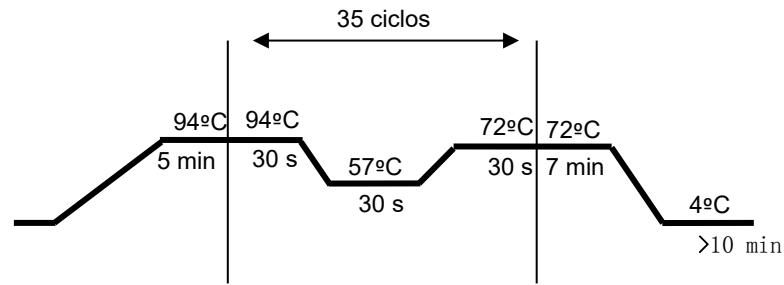
### 5. ANÁLISIS GENÉTICOS

#### 5.1. Análisis de Polimorfismos mediante Secuenciación Sanger

La amplificación de los fragmentos con los polimorfismos (SNPs) de interés en los genes *CFH* y *CFHR1-CFHR5* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada SNP (Tabla 2). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, con los siguientes componentes:

- ❖ H<sub>2</sub>O estéril: 12.5µL
- ❖ Enzima Taq-polimerasa (5U/µl Roche): 0.1µL (0.1Unidad)
- ❖ Buffer 10X: 2µL
- ❖ dNTPs 10mM: 0.4µL
- ❖ Oligonucleótido *Forward* 5µM: 1µL
- ❖ Oligonucleótido *Reverse* 5µM: 1µL
- ❖ ADN (50 ng/µL): 3µL

Las condiciones de la reacción fueron:

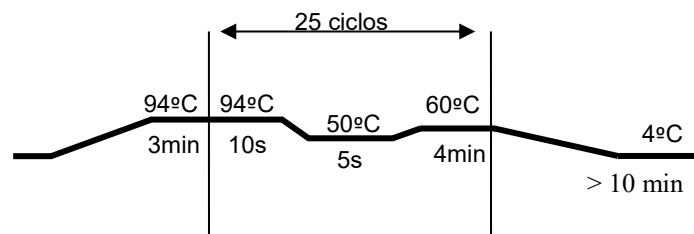


La especificidad de la reacción se comprobó analizando 10  $\mu$ L la PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, que contenían también Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH) para su posterior visualización con luz UV. Antes de cargar las muestras en el gel, se les añadió 4  $\mu$ L de tampón de carga (EDTA 40 mM, Ficoll 400 al 30% [p/V], azul de bromofenol 0,2%, xilenocianol 0,2%, pH 8). Como tampón de electroforesis se utilizó TAE (Tris-HCl 40 mM, pH 8, AcOH 20 mM, EDTA 2 mM). Los otros 10  $\mu$ L de la reacción de PCR se emplearon para purificar los productos generados, mediante tratamiento enzimático con fosfatasa alcalina (SAP, Thermo-Fisher) y exonucleasa I (Exo I, Thermo-Fisher), según las indicaciones del fabricante.

Los fragmentos purificados se secuenciaron mediante el método Sanger, utilizando el reactivo Big Dye v1.1 (Thermo-Fisher) que contiene los dNTPs fluorescentes y la enzima; los detalles de la reacción son los siguientes:

- ❖ H<sub>2</sub>O estéril: 5  $\mu$ L
- ❖ Big Dye v1.1: 0.5  $\mu$ L
- ❖ Oligonucleótido *Forward* o *Reverse* (5  $\mu$ M): 1  $\mu$ L
- ❖ Tampón de secuenciación 5X: 1.5  $\mu$ L
- ❖ Producto PCR purificado: 2  $\mu$ L

Las condiciones de la reacción fueron:





Los fragmentos generados se precipitaron con etanol para eliminar el exceso de reactivos fluorescentes, que podrían dificultar la secuenciación automática. A cada muestra se le añadieron 90  $\mu$ L de etanol al 70% y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante. El material precipitado se lavó con 250  $\mu$ L de etanol al 70%, y el sobrenadante se eliminó después de otra centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos. El precipitado, correspondiente a los fragmentos de la reacción de secuenciación, se dejó secar unos minutos para eliminar los restos de etanol. Las muestras así preparadas se secuenciaron en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del Hospital La Paz, utilizando un secuenciador automático ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer. Los resultados se analizaron con los programas BioEdit sequence Alignment Editor y Chromas.

## 5.2. Análisis de Polimorfismos mediante Ensayo SNaPshot

Se diseñó un ensayo SNaPshot para identificar de forma más rápida que mediante secuenciación Sanger los haplotipos/genotipos de riesgo asociados con patología renal en la región *CFH-CFHR3-CFHRI*. Este ensayo incluye 5 SNPs en *CFH* (rs3753394, rs800292, rs1061170, rs3753396 y rs1410996), 2 SNPs en *CFHR3* (rs385390 y rs138675433) y 2 SNPs en *CFHRI* (rs4230 y rs414628).

El ensayo SNaPshot consta de 2 etapas de PCR multiplex. En la primera PCR se utiliza DNA genómico para amplificar los fragmentos que contienen los SNPs de interés, utilizando los mismos oligonucleótidos que en la PCR descrita anteriormente; a continuación, se eliminan los restos de dNTPs y oligonucleótidos mediante una reacción ExoSAP. En la segunda PCR, cada uno de los fragmentos con los SNPs de interés se amplifica empleando ddNTPs y un oligonucleótido específico y de distinta longitud para cada SNP (Tabla 2), de manera que los productos de cada SNP tendrán distinto tamaño. Finalmente, y previa purificación, los productos obtenidos se secuencian por electroforesis capilar en el INGEMM, utilizando el ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer.

Los 9 SNPs se analizaron en 2 “pooles” diferentes para evitar reacciones inespecíficas. Un primer pool con los polimorfismos rs3753394, rs800292, rs3753396, rs4230 y rs414628; y un segundo pool con los polimorfismos rs1061170, rs1410996, rs385390 y rs138675433 (Tabla 2).

	ID	Gen	SNPs	PCR 1	PCR 2
				Secuencia 5'-3'	
POOL 1	rs 3753394	CFH (exón 1)	C>T	<b>TCTTTACCTTCTCAATATCCAGC</b> CTAATGATGCTTTTCACAGGAGT	12poliA- GGTTTATGAAATCCAGAGGATAT
	rs 800292	CFH (exón 2)	G>A	<b>GATAGACCTGIGACTGICTAG</b> GTGAAATTTATGAAAACTAGGTGTA	19poliA- CTGGATATAGATCTCTTGAAAT
	rs 3753396	CFH (exón 14)	A>G	<b>TATATGTAAAAACAGACAATTTAACC</b> CTTGTCAAAACTTTTGATTTTGTAT	32poliA- AATGAAGGGACCTAATAAAATTCA
	rs4230	CFHR1 (exón 6)	G>T	<b>ATTTAAATCAATATGATGTTTTACATAGTC</b> CAGAAATAAAGTCTGAAAAATTGCA	48poliA-CAGCTGAATTTGTGTGTAACG
	rs414628	CFHR1 (exón 6)	A>T	<b>ATTTAAATCAATATGATGTTTTACATAGTC</b> CAGAAATAAAGTCTGAAAAATTGCA	56poliA-ATCACGTTCTCACACATTGCG
POOL 2	rs 1061170	CFH (exón 9)	T>C	<b>CCTTGTGTTAGTAACTTAGTTCGTC</b> CCTTGTTTTACCAATGGACC	23poliA- ATTTGGAAATGGATATAATCAAAAT
	rs 1410996	CFH (intrón 15)	A>G	<b>TTTAGGCACCTGAGAAGCAAAG</b> ATCAGCAAGAAGGCAAGG	42poliA-CATCAGTGGTATAGCTGAGTG
	rs385390	CFHR3 (exón 1)	A>C	<b>CTAGCTTCATGGIAGTGCCAC</b> TTTAAGAGGGGAAGCTGAGTG	61poliA- ATGGTAGTGCACTTAAATTGAGA
	rs138675433	CFHR3 (exón 5)	C>T	<b>TTGAAAATGCAGATGCTCTCC</b> GAACTCCTGACCTCATGG	70poliA-GAGTCGAGTACCAATGCCAG

**Tabla 2: Descripción de SNPs analizados en el ensayo SNaPshot.** En la tabla se detalla la localización de cada poliformismo, el pool en el que se encuentran y la secuencia 5'-3' de los oligonucleótidos empleados en cada PCR. En la PCR1, en azul se indican los oligonucleótidos *Forward* y en negro los *Reverse*.

### 5.3. Análisis de la Variante $\Delta CFHR3-CFHR1$ mediante MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

La variación en el número de copias de la variante  $\Delta CFHR3-CFHR1$  se analizó a partir de ADN genómico mediante la técnica MLPA. El análisis se realizó utilizando el kit P236 A3 ARMDmix (MRC-Holland; Amsterdam, Netherlands), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados se analizaron con el programa Coffalyser (MRC-Holland). Se incluyeron 3 controles con dos copias de los genes *CFHR3* y *CFHR1* como referencia y además se comprobó la detección de la  $\Delta CFHR3-CFHR1$  analizando un control que previamente sabíamos que tenían la variante en heterocigosis y otro en homocigosis.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La comparación de los niveles de proteínas FH y FHRs obtenidos por ELISA, y la comparación de los niveles relativos obtenidos por WB en las cohortes de controles y pacientes se analizó mediante un test no paramétrico Mann-Whitney (dos grupos) o Kruskal-Wallis (comparaciones múltiples), considerando como diferencias significativas los p-valor  $p \leq 0,05$ . Los ensayos funcionales de FH se analizaron mediante un test Two-way ANOVA, considerando diferencias significativas los p-valor  $p \leq 0,05$ . Para el análisis estadístico y las representaciones gráficas se empleó el programa GraphPad PRISM.

Para el análisis de los perfiles de expresión obtenidos por *q-Western-Blot*, utilizamos el software de análisis gratuito de la página web <http://heatmapper.ca/expression/> para representar los datos en forma de un mapa de calor (*Heatmap*), escogiendo las opciones predeterminadas (distancia euclídea y el método del vecino más próximo (*Average linkage*)) como las variables para realizar el agrupamiento (*clustering*) de los datos

# **RESULTADOS**

## 1. DESCRIPCIÓN DEMOGRÁFICA Y ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS COHORTES DE CONTROLES Y PACIENTES

En esta Tesis se han realizado estudios de FH y las proteínas FHRs en un total de 494 individuos, 97 controles y 397 pacientes. Los datos demográficos y genéticos se recogen en la tabla 3, y se describen con mayor detalle a continuación.

### Cohorte de Controles

La cohorte de controles está formada por 97 individuos adultos, reclutados mayoritariamente entre el personal del IdiPAZ y del Servicio de Inmunología del hospital La Paz, durante los años 2017-2020. La mayoría de los individuos son de origen español, con un porcentaje de mujeres y hombres del 66% y 34%, respectivamente, y una edad media de 31 años (rango 20-59 años).

La cohorte se ha caracterizado a nivel genético, para determinar variantes comunes en la región *CFH-CFHRs* relevantes en SHUa o NIgA; 6 individuos tienen la variante  $\Delta CFHR3-CFHR1$  en homocigosis y 23 en heterocigosis, por lo que la frecuencia alélica de esta variante es de 0,18. Dos individuos tienen la variante  $\Delta CFHR1-CFHR4$  en heterocigosis. También se genotiparon las variantes *CFH(H3)*, *CFHR3\*B*, *CFHR1\*B* y *CFHR4\*B*, asociadas con riesgo a SHUa; la frecuencia de estas variantes relevantes se detalla en la tabla 3. Esta tabla incluye también los resultados de la cohorte de pacientes de SHUa y de la cohorte de pacientes de NIgA, que se describen a continuación.

También se han cuantificado las proteínas FH y FHRs mediante Western-blot cuantitativo (qWB) y/o ELISA; el número de controles empleados en estas cuantificaciones depende del método empleado, y se especifica en el apartado correspondiente.

### Cohorte de pacientes de SHUa

La cohorte de SHUa utilizada en esta Tesis está incluida en el registro SHUa/GC3 (<https://www.ahusc3g.es>). Está formada por 328 pacientes de origen mayoritariamente europeo, de los cuales el 45% son hombres y el 53% son mujeres (desconocemos el género de 4 casos); la edad media al diagnóstico es de 26 años (0-77) mientras que la edad media en el momento de extracción de la muestra analizada es de 32 años (0-78). En relación con la edad al debut, el 30% son casos pediátricos y el 66% son casos adultos (en 14 casos no disponemos de esa información). La extracción de las muestras analizadas en esta Tesis se realizó en diferentes momentos de la evolución clínica de los pacientes, de forma que el 29% de las muestras se obtuvieron en la fase aguda (durante el primer

mes después del debut), y el 54% se obtuvieron cuando había transcurrido más de un mes; no se dispone de esta información en 76 casos.

Se han caracterizado las variantes comunes en la región *CFH-CFHRs* relevantes en SHUa en 215 pacientes. 21 individuos tienen la variante  $\Delta CFHR3-CFHR1$  en homocigosis y 54 en heterocigosis, por lo que la frecuencia alélica de esta variante es de 0,22. La frecuencia de las variantes de riesgo *CFH(H3)*, *CFHR3\*B*, *CFHR1\*B* y *CFHR4\*B* se detalla en la tabla 3.

FH y las proteínas FHRs se cuantificaron en muestras de plasma de un total de 328 pacientes (215 por ELISA, 138 por qWB y 24 por ambos métodos)

Además, dentro de esta cohorte hemos seleccionado un subgrupo de 13 pacientes en los que el SHU se desarrolló como consecuencia de una infección por *Streptococcus pneumoniae*. Esta subcohorte (SP-SHU) se describe en detalle en el apartado 3.

Cohorte	Género (Mujer)	Edad muestra (Rango)	Edad Debut (Rango)	Del <i>CFHR3-CFHR1</i>	<i>CFH(H3)</i>	<i>CFHR3*B</i>	<i>CFHR1*B</i>	<i>CFHR4*B</i>
<b>Controles (n=97)</b>	58 (66%)	31 (20-59)	-	35 (18%)	34 (18%)	49 (25%)	70 (36%)	69 (36%)
<b>SHU (n=215)</b>	175 (54%)	32 (0-78)	26 (0-77)	96 (22%)	149 (35%)*	168 (39%)*	206 (48%)*	214 (55%)
<b>NIgA (n=69)</b>	21 (31%)	49 (17-79)	39 (17-79)	18 (13%)	33 (24%)	40 (29%)	54 (39%)	52 (38%)

**Tabla 3: Análisis genético de las variantes comunes en la región *CFH-CFHRs*.** Frecuencia de las variantes asociadas a SHUa en las cohortes de controles, SHUa y NIgA. Las diferencias en las frecuencias se analizaron mediante un test de asociación X<sup>2</sup>; las diferencias significativas respecto a la cohorte control se indican mediante un asterisco.

### Cohorte de pacientes de NIgA

La cohorte de NIgA analizada está formada por 69 pacientes del Hospital La Paz, reclutados entre 2013 y 2017. La mayoría de los pacientes son españoles, 70% hombres y 30% mujeres. La edad media al diagnóstico era de 39 años (17-79), mientras que la edad en el momento de extracción de la muestra era de 49 años (17-79). En base al tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la fecha de obtención de la muestra para el análisis de las proteínas FH y FHRs, podemos subdividir la cohorte en tres subgrupos: un primer subgrupo de 15 pacientes en los que el tiempo transcurrido fue inferior a 1 año; un segundo subgrupo de 17 pacientes en los que el tiempo fue 1-5 años; y un tercer subgrupo de 35 pacientes en los que el tiempo transcurrido fue superior a los 5 años. Entre las características

clínicas de la cohorte cabe destacar que 22 pacientes tenían insuficiencia renal crónica y 19 recibieron un trasplante renal. Los datos de función renal y de Complemento se detallan en la tabla 4.

	Cohorte Total (n=69)	Subgrupo 1 (n=15)	Subgrupo 2 (n=17)	Subgrupo 3 (n=35)
<b>TFG (&gt;60mL/min/1.73 m<sup>2</sup>)</b>	68,94 ±31,95	68,39 ±30,66	68,38 ±32,46	69,46 ±33,14
<b>Cr (0.6-1.3mg/dl)</b>	1,79 ±1,42	1,427 ±0,73	1,811 ±1,00	1,937 ±1,78
<b>IgA (70-400 mg/dl)</b>	323,18 ±126,6	340,7 ±109,1	345,5 ±140,2	304,8 ±127,4
<b>C3 (90-200 mg/dl)</b>	104,33 ±24,02	105,4 ±22,64	102,3 ±31,98	104,9 ±20,62
<b>C4 (15-45 mg/dl)</b>	24,03 ±7,73	24,9 ±10,03	22,42 ±9,31	24,44 ±5,65
<b>Ratio IgA/C3</b>	3,12 ±1,27	3,115 ±0,85	3,174 ±1,12	3,091 ±1,5

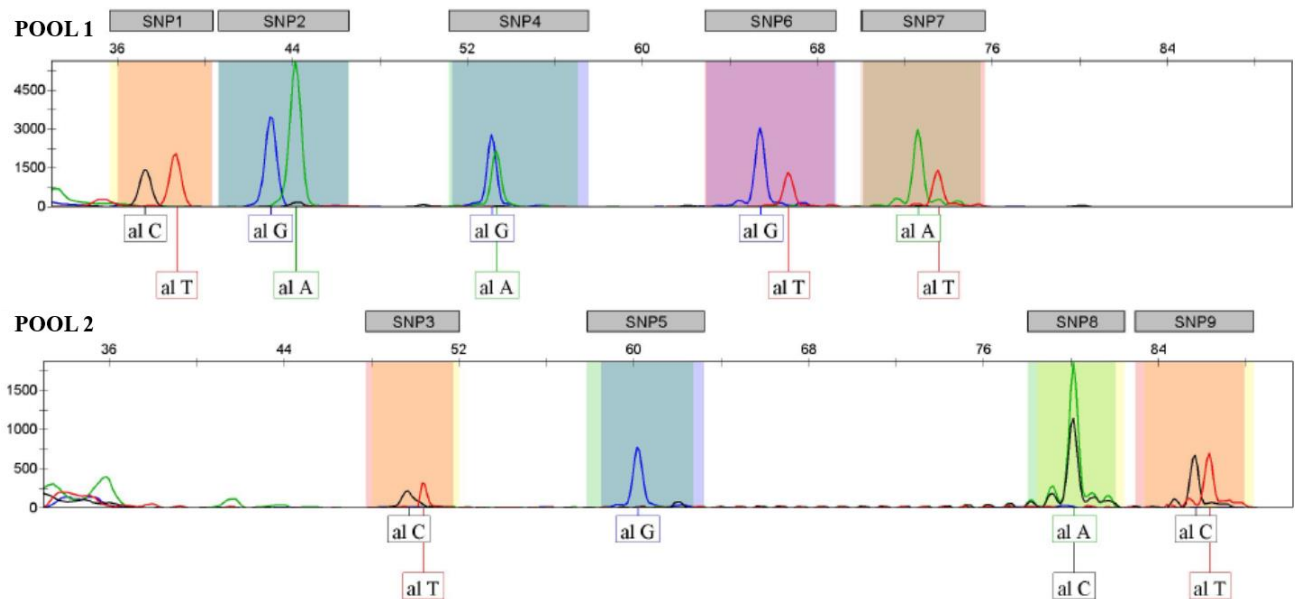
**Tabla 4: Función Renal y Niveles de IgA y Complemento en pacientes de NIgA.** Se muestran los niveles medios y la desviación estándar para la cohorte completa y para los tres subgrupos de pacientes; no se encontraron diferencias significativas. Los valores de TFG (Tasa de Filtración Glomerular) y creatinina plasmática (Cr) se extrajeron de la historia clínica de los pacientes, y corresponden a la analítica más cercana a la fecha de extracción de la muestra en la que se hicieron los estudios de Complemento.

En todos los pacientes de la cohorte se caracterizaron las variantes comunes en la región *CFH-CFHRs* relevantes en SHUa o NIgA. El número de copias de la delección  $\Delta CFHR3-CFHRI$ , asociada con protección a NIgA, se analizó mediante MLPA, encontrándose 12 pacientes heterocigotos y 3 homocigotos, por lo que la frecuencia alélica de esta variante es de 0,13. Aunque esta frecuencia es menor que la observada en la cohorte de controles, las diferencias no son significativas. El análisis de MLPA nos permitió también identificar un paciente con delección del gen *CFHR3* en heterocigosis y otro paciente con delección del gen *CFHRI* en heterocigosis.

El análisis de los polimorfismos de *CFH*, *CFHR3* y *CFHRI* se realizó mediante el ensayo SNaPshot desarrollado en esta Tesis. Este ensayo incluye 5 SNPs en *CFH* (rs3753394, rs800292, rs1061170, rs3753396 y rs1410996), 2 SNPs en *CFHR3* (rs385390 y rs138675433) y 2 SNPs en *CFHRI* (rs4230 y rs414628).

Aunque el objetivo inicial era poder analizar los 9 SNPs simultáneamente, debido a la gran similitud de secuencia de los genes *CFH*, *CFHR3* y *CFHRI* hubo que dividir los 9 SNPs en dos *pools*. En el *pool 1* se analizaron los polimorfismos rs3753394, rs800292, rs3753396, rs4230 y rs414628 (SNP1, SNP2, SNP4, SNP6 y SNP7, respectivamente), y en el *pool 2*, los polimorfismos

rs1061170, rs1410996, rs385390 y rs138675433, (SNP3, SNP5, SNP8, y SNP9, respectivamente) (Figura 3).



**Figura 3: Electroferograma con los resultados de los 9 SNPs de la región *CFH-CFHR3-CFHR1* analizados.** Los resultados corresponden a un individuo heterocigoto para todos los SNPs del *pool 1* y del *pool 2*, a excepción del SNP5, para el que es homocigoto. El color de cada pico identifica el nucleótido existente en esa posición.

Gracias al ensayo SNaPshot hemos podido genotipar de forma más rápida las variantes *CFH(H3)*, *CFHR3\*B*, *CFHR1\*B* y *CFHR4\*B*, cuyas frecuencias se detallan en la tabla 3, no encontrándose diferencias con las frecuencias observadas en controles.

En la cohorte de NigA también se cuantificaron las proteínas FH y FHRs mediante qWB y/o ELISA; el número de controles empleados en estas cuantificaciones depende del método empleado, y se especifica en el apartado correspondiente.

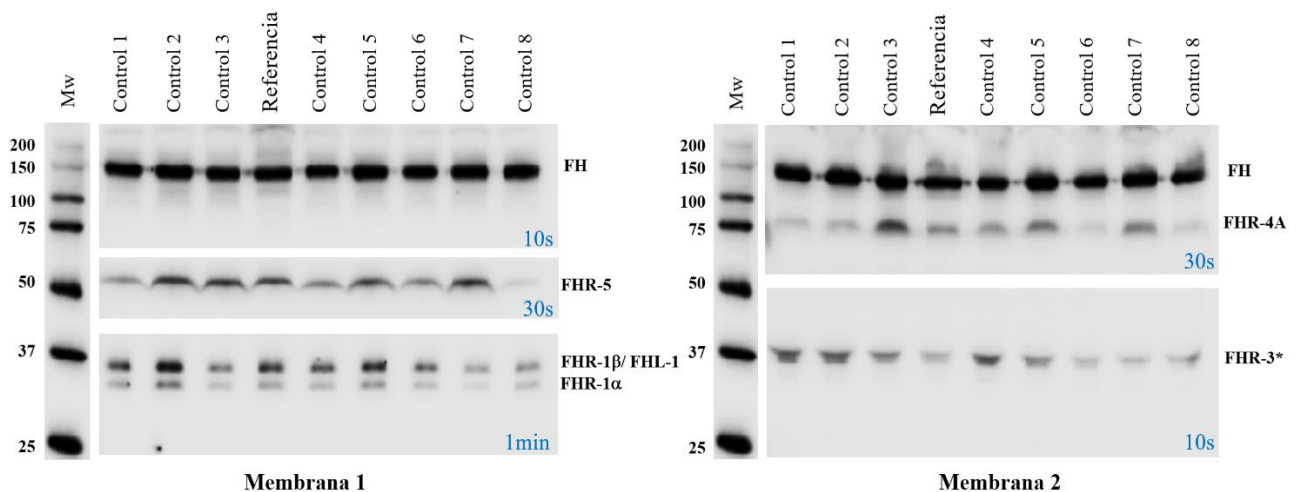


## 2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE FH Y PROTEÍNAS FHRs

### 2.1 Niveles de FH y Proteínas FHRs en Controles y Pacientes por *Western-Blot*

Como ya hemos mencionado, la generación de anticuerpos específicos para las diferentes proteínas de la familia de FH ha supuesto un hándicap para desarrollar ensayos ELISAs específicos. Por este motivo, decidimos abordar la cuantificación de FH y FHRs mediante Western-blot; esta técnica permite diferenciar claramente cada proteína, dado que las separa por su tamaño molecular, y además evita el problema de detección de homodímeros y heterodímeros de FHR-1, FHR-2 y FHR-5, ya que se lleva a cabo en condiciones desnaturalizantes.

En el laboratorio se disponía de un elevado número de WBs de muestras de pacientes y controles, que se analizaban de forma sistemática para identificar deficiencias o formas anómalas de FH y proteínas FHRs. Para optimizar el uso cuantitativo de estos WBs, se seleccionaron 40 de ellos, correspondientes al análisis de un total de 222 muestras, obtenidas entre 2015 y 2017. En estos WBs, la visualización de FH y FHRs se realizaba mediante el set 1 de anticuerpos primarios, que permite la cuantificación de las bandas de FH, FHR-3, FHR-1 $\alpha$ /FHR-1 $\beta$ , FHR-4A y FHR-5 (Figura 4). Para cuantificar FHR-1 se utilizó la banda de la isoforma FHR-1 $\alpha$ , ya que la isoforma FHR-1 $\beta$  solapa en tamaño con la banda de FHL-1. La cuantificación de las bandas se realizó con el programa de análisis de imagen ImageQuant TL (GE Healthcare).



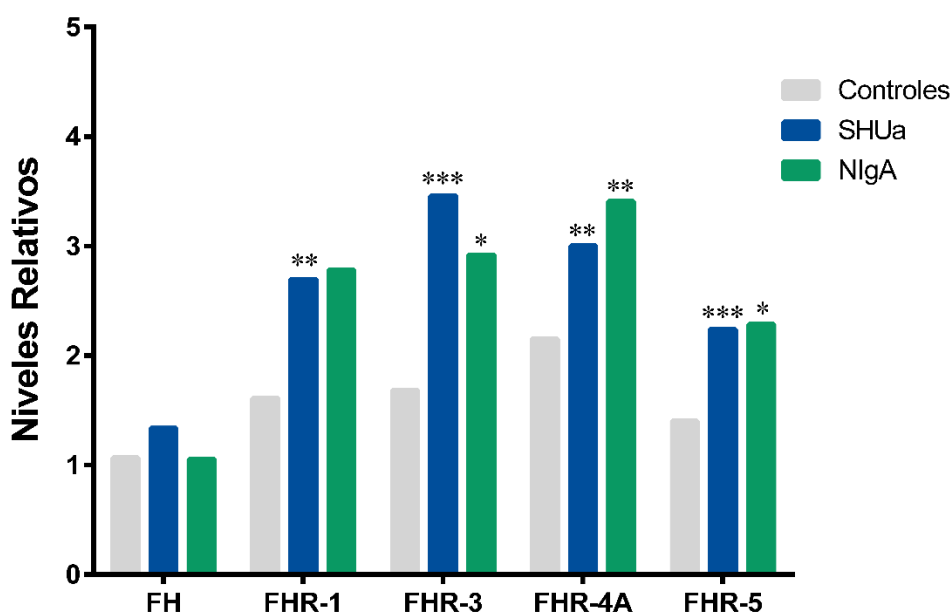
**Figura 4: Visualización de FH y proteínas FHRs por Western-Blot.** Se muestran las bandas de FH y proteínas FHRs observadas en la membrana 1 y en la membrana 2, con el tiempo de exposición óptimo para su cuantificación; en la cuantificación de FH se utiliza la membrana 1.

En total, se cuantificaron 55 muestras de controles, 138 muestras de pacientes SHUa y 29 muestras de pacientes NIgA. Una vez determinada la intensidad de la banda de cada proteína, dicha intensidad se relativizó respecto a la misma banda en una muestra de referencia (utilizada en todos los WB) a la que se dio el valor de 1. Se calculó también la media y la desviación estándar de los niveles relativos de todas las proteínas (Tabla 5)

	FH		FHR-3		FHR-1		FHR-4A		FHR-5	
	N	Niveles	N	Niveles	N	Niveles	N	Niveles	N	Niveles
<b>Controles</b>	55	1,07±0,36	53	1,69±1,06	51	1,61±1,21	55	2,15±1,43	55	1,40±0,71
<b>SHUa</b>	138	1,34±0,70	126	3,42±2,11	120	2,77±2,63	137	2,99±2,04	138	2,22±1,59
<b>NIgA</b>	29	1,05±0,56	28	2,92±2,31	27	2,78±2,74	29	3,41±2,14	29	2,29±1,51

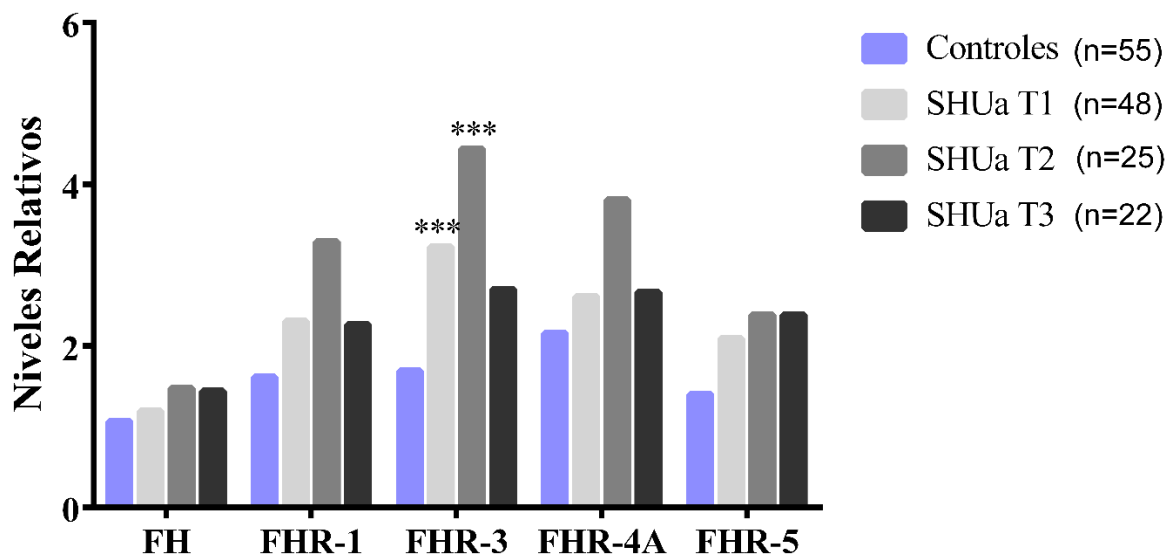
**Tabla 5: Niveles relativos de FH y proteínas FHRs.** Se muestran los niveles medios y la desviación estándar de cada proteína, así como el número de muestras analizadas. Para el cálculo de los niveles de FHR-3 y FHR-1 se han excluido los individuos homocigotos para la variante  $\Delta CFHR3-CFHR1$ .

La comparación entre las cohortes de controles y pacientes, muestra que los niveles de FH son similares en todas ellas. Por el contrario, los niveles de FHR-3, FHR-4A y FHR-5 están significativamente más elevados en los pacientes de SHUa y NIgA que en los controles. Los niveles de FHR-1 también están más elevados en los pacientes, pero la dispersión y los diferentes tamaños muestrales hacen que estas diferencias sólo sean significativas en los pacientes de SHUa (Figura 5)



**Figura 5: Niveles relativos de FH y FHRs en controles y pacientes.** Se representa el nivel medio de cada proteína en la cohorte control y en las cohortes de SHUa y NIgA. Las diferencias significativas se expresan con asteriscos (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ ). Los niveles de proteínas se han relativizado con una misma muestra de referencia.

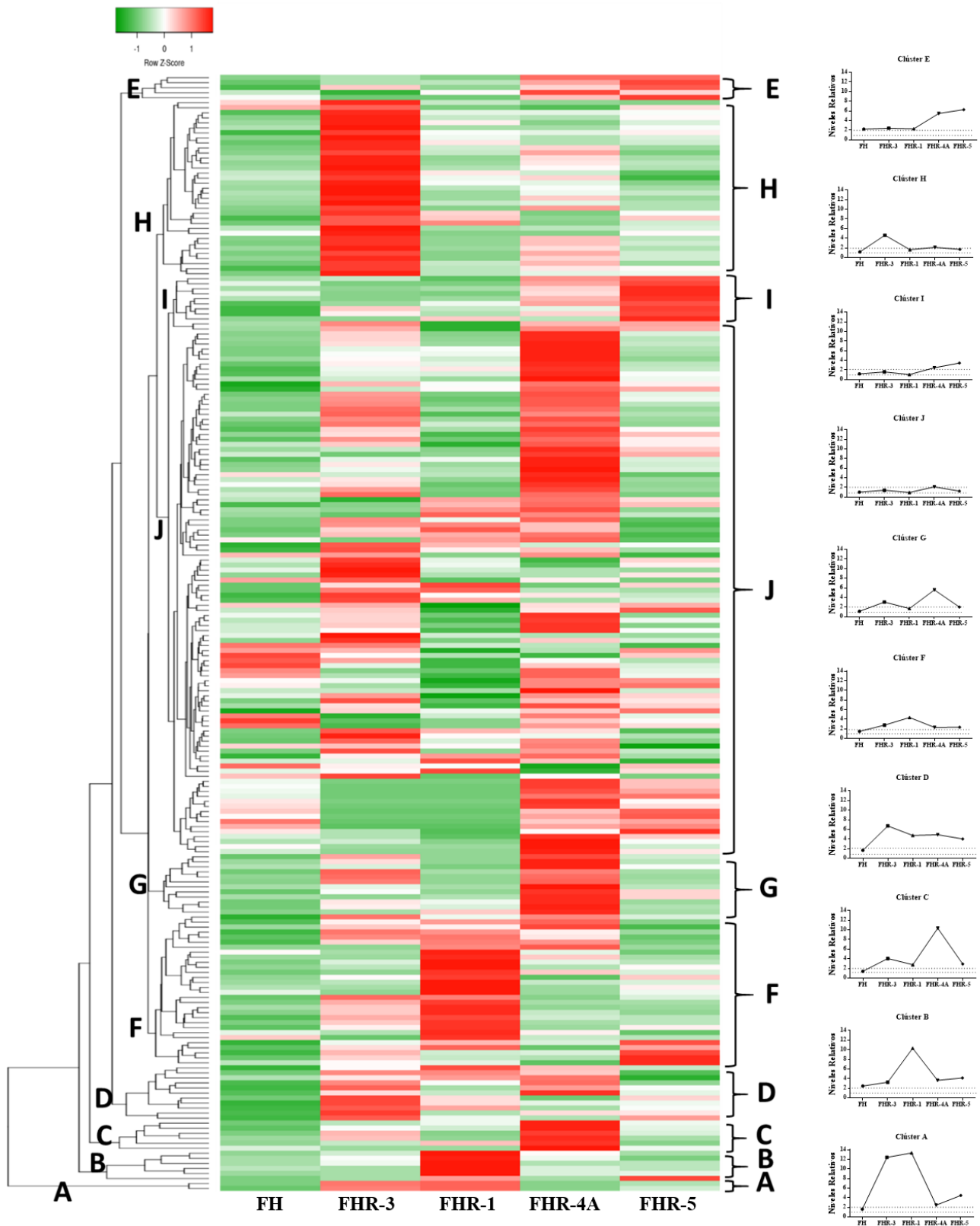
El hecho de que los niveles de las proteínas FHRs sean más elevados en los pacientes nos plantea la duda de si debe a la situación clínica, o si por el contrario estos pacientes tienen niveles constitutivamente más elevados que favorecen el desarrollo de estas patologías. Para resolver esta cuestión, habría que determinar los niveles en distintos momentos de la evolución clínica de cada paciente (debut vs remisión). En ausencia de estos datos, otra opción es comparar los niveles de muestras de pacientes de SHUa obtenidas durante la fase aguda (considerando como tal la muestra obtenida en el primer mes después del debut) con las muestras obtenidas posteriormente. Al llevar a cabo esta comparación, se observa solo los niveles de FHR-3 están significativamente elevados respecto en los controles, tanto en las muestras en fase aguda como las obtenidas tiempo después. Además se observa que los niveles de FH y FHRs en general son ligeramente inferiores en las inferiores en las muestras correspondientes a la fase aguda, aunque no se alcanza la significación estadística, quizá por el tamaño muestral (Figura 6).



**Figura 6: Niveles relativos de FH y FHRs en muestras obtenidas en distintos momentos de la evolución clínica.** Los pacientes de SHUa se dividieron en 2 subgrupos, en función del tiempo transcurrido desde el debut hasta la obtención de la muestra. T1: primer mes; T2: 1-12 meses. T3: >1 año. Se representa el nivel medio de cada proteína. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

## 2.2 Perfiles de Expresión de FH y Proteínas FHRs por *Western-blot*

Los resultados anteriores muestran que hay una gran variabilidad en los niveles de FH y FHRs. Dado que estas proteínas pueden actuar como desreguladores de FH y/o activar al Complemento por sí mismas, el desequilibrio en la ratio FHRs/FH podría predisponer al desarrollo de patologías renales, y sería más informativo conocer estas ratios en cada individuo. Por este motivo, decidimos comparar el perfil de expresión, es decir, las concentraciones relativas de FH y FHRs, de cada uno de los pacientes y controles. Los perfiles se analizaron mediante agrupamiento jerárquico no supervisado, y se representaron mediante un *heatmap* (Figura 7).



**Figura 7: Análisis de agrupamiento jerárquico de los perfiles de expresión de FH y FHRs en controles y pacientes.** *Heatmap* de los niveles relativos de las proteínas FH, FHR-3, FH-1 FHR-4A y FHR-5 en 55 controles, 138 pacientes SHUa y 29 pacientes NiGA. Los distintos perfiles de expresión obtenidos se agruparon en 10 clústeres, designados con las letras A-J, para su posterior análisis. A la derecha del *Heatmap* se muestra la gráfica del perfil de expresión característico de cada clúster.

Como se ve en la figura 7, hay multitud de perfiles de expresión que hacen que el análisis e interpretación del *heatmap* sea realmente complejo. Por este motivo, decidimos agrupar los diferentes perfiles de expresión en 10 clústeres, denominados con las letras A-J, que se corresponden con diferentes ramas del dendrograma y contienen, por tanto, muestras con perfiles de expresión de FH y FHRs similares. Hay clústeres muy numerosos, mientras que otros están formados por un número reducido de muestras.

Los clústeres A, B, C y D corresponden exclusivamente a muestras de pacientes, y se caracterizan por niveles elevados de 3 o 4 proteínas FHRs. De ellos, el clúster B agrupa los perfiles de expresión con los mayores niveles de FHR-1, y el clúster C con los mayores niveles de FHR-4A.

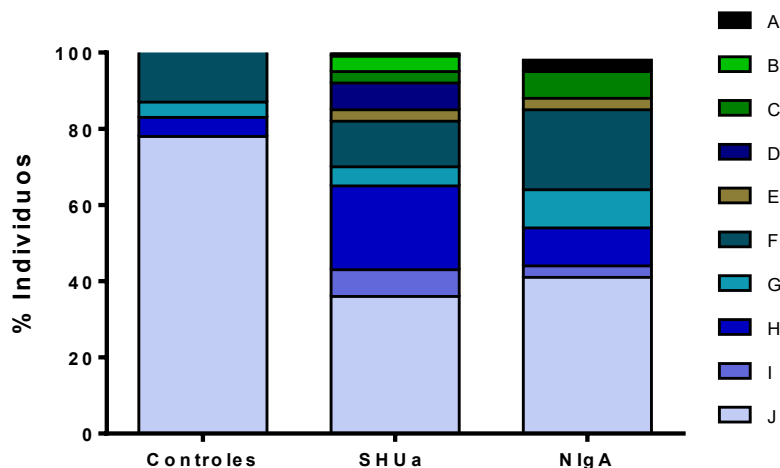
Los clústeres E y G se caracterizan por niveles elevados de FHR-4A y de otra proteína. De ellos, el clúster E agrupa los perfiles de expresión con los mayores niveles de FHR-5 y el clúster G con los mayores niveles de FHR-3.

Los clústeres F, H e I se caracterizan por niveles elevados de una única proteína FHR. De ellos, el clúster F agrupa los perfiles de expresión con los mayores niveles de FHR-1, el clúster H con los mayores niveles de FHR-3, y el clúster I con los mayores niveles de FHR-5.

Finalmente, el clúster J se caracteriza por agrupar los perfiles de expresión con niveles similares a la muestra de referencia.

La distribución de los 10 clústeres en las 2 cohortes de pacientes es similar, y diferente a la observada en la cohorte de controles (Figura 8). En los controles sólo se observan 4 clústeres, siendo el clúster J el que agrupa a la mayoría de los individuos (76%). En los pacientes, en cambio, la frecuencia del clúster J es mucho menor (alrededor del 40%), y se identifican clústeres que no aparecen en los controles.

En resumen, aunque no parece haber clústeres específicos de pacientes, el clúster H (niveles elevados de FHR-3) se asocia con SHUa, y el clúster F (niveles elevados de FHR-1) con NIgA. En ambos casos, este aumento en los niveles de FHR-3 o FHR-1 se corresponde con lo descrito en la literatura.



**Figura 8: Frecuencia de los perfiles de expresión de FH y proteínas FHRs en pacientes y controles.** Distribución de los clústeres obtenidos en el análisis jerárquico de las muestras de las 3 cohortes.

### 2.3 Niveles de FH y FHRs en Controles y Pacientes de SHUa por ELISA

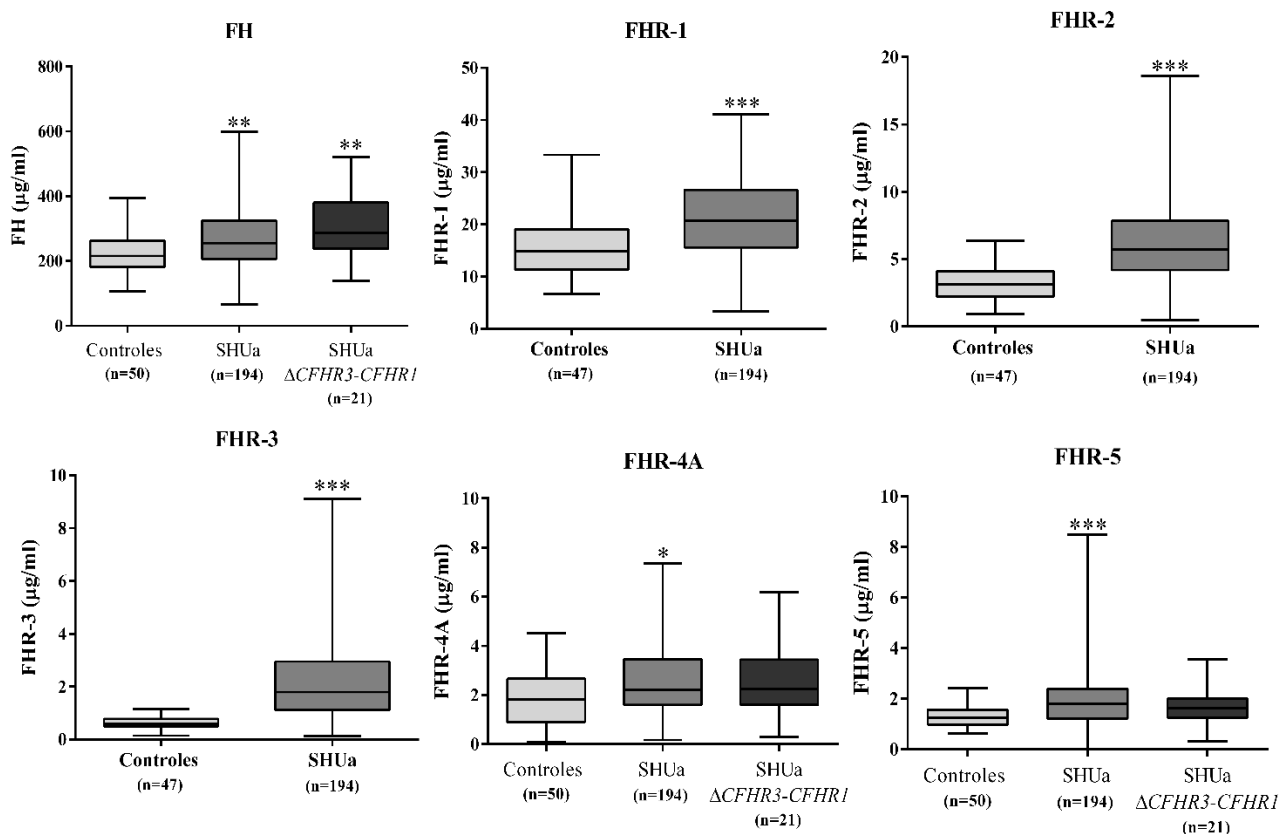
Dado que en el grupo se habían descrito dos alelos del gen *CFHR3* que se diferenciaban por 2 SNPs en la región promotora, y uno de ellos (*CFHR3\*B*) se asociaba con mayor riesgo a SHUa (Bernabéu-Herrero et al. 2015), nos preguntamos si este alelo generaba mayores niveles de FHR-3. Para ello, se inició una colaboración con el grupo holandés de la Dra. Diana Wouters (responsable del departamento de Inmunopatología de SANQUIN Blood Supply Foundation), que disponía de un ensayo ELISA específico para esta proteína (Pouw et al. 2016). Además de FHR-3, se cuantificaron FH y el resto de proteínas FHRs en nuestras muestras de controles y pacientes SHUa. Todos los pacientes y controles estaban genotipados para la delección  $\Delta CFHR3-CFHR1$  y para los SNPs de *CFH(H3)*, *CFHR3\*B* y *CFHR1\*B*, asociados con riesgo de SHUa.

Los niveles de las proteínas FH, FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4A y FHR-5 en pacientes y controles se detallan en la tabla 6. El orden de las proteínas de mayor a menor abundancia es: FH, FHR-1, FHR-2, FHR-4A, FHR-5 y FHR-3. La proteína FHR-4B no se detectó por ELISA.

Cohorte	Proteína	Media (nM)	Media (µg/ml)	SD	Mediana	MIN	MAX
Controles (n=50)	FH	1485	222,8	63,40	215,4	106	395
	FHR-1*	387	15,48	5,13	14,88	6,64	33,3
	FHR-2*	114	3,3	1,18	3,15	0,94	6,37
	FHR-3*	14	0,62	0,23	0,6	0,14	1,16
	FHR-4	22	1,91	1,15	1,83	0,09	4,5
	FHR-5	20	1,3	0,43	1,26	0,63	2,43
Pacientes SHUa (n=215)	FH	1823	273,4	98,8	258,1	65,4	599
	FHR-1*	536	21,43	7,47	20,72	3,36	41,11
	FHR-2*	214	6,2	3,04	5,72	0,5	18,58
	FHR-3*	49	2,12	1,42	2,95	0,12	9,11
	FHR-4	30	2,56	1,44	2,23	0,17	7,35
	FHR-5	29	1,9	1,0	1,78	0,02	8,49

**Tabla 6: Niveles de FH y proteínas FHRs en controles y pacientes SHUa por ELISA.** Se muestran los valores medios en base nM y en µg/ml; en estos últimos se muestra también la SD, mediana, mínimo (MIN) y máximo (MAX). \*Los individuos con la variante  $\Delta CFHR3-CFHRI$  en homocigosis (3 controles y 21 pacientes) se excluyeron de la cuantificación de FHR-1 y FHR-3, y de la cuantificación de FHR-2, por las características de este ELISA.

La representación gráfica de los niveles (figura 9) muestra que los pacientes tienen concentraciones de FHR-3 significativamente mayores que los controles, situación que también se observa para el resto de las proteínas FHRs y para FH. No obstante, cuando comparamos las ratios FHRs/FH entre controles y pacientes, se observa que sólo están significativamente elevadas en los pacientes las ratios FHR-2/FH y FHR-3/FH.

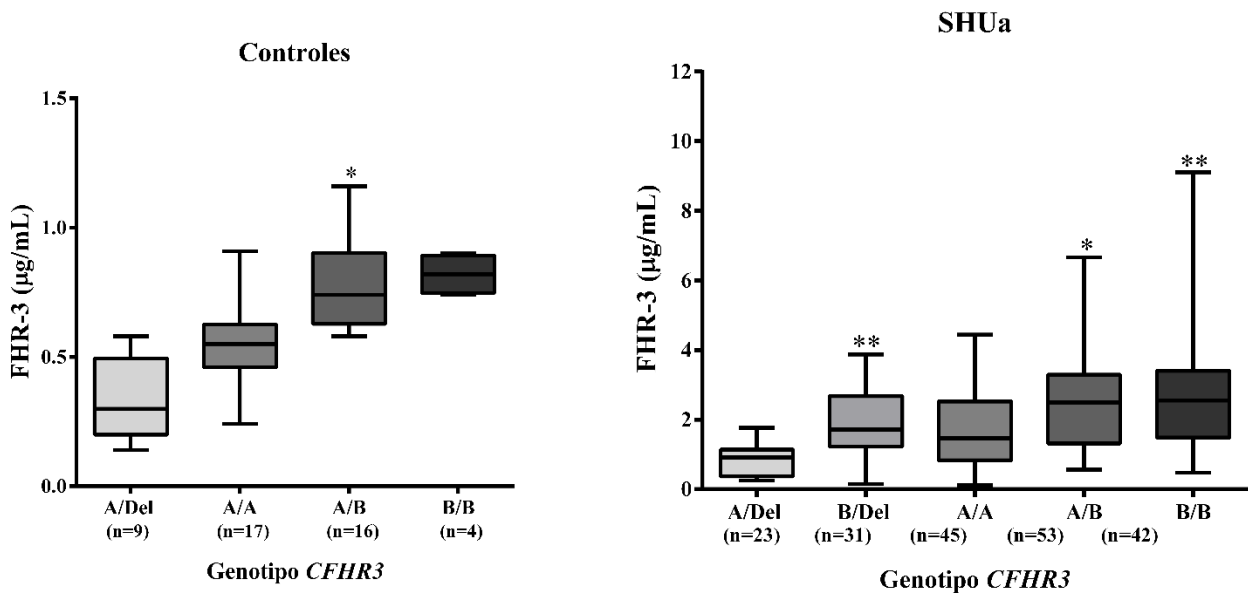


**Figura 9: Análisis estadístico de los niveles de FH y proteínas FHRs en controles y pacientes SHUa.** Se comparan los niveles de FH y FHRs en controles, pacientes SHUa y pacientes SHUa con la delección  $\Delta CFHR3-CFHR1$  en homocigosis. La significación estadística se muestra mediante asteriscos: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

### 2.3.1. Influencia de las variantes de riesgo a SHUa $CFHR1^*B$ y $CFHR3^*B$ en los niveles plasmáticos de FHR-1 y FHR-3.

El hecho de que los pacientes de SHUa tuviesen niveles de FHR-3 mucho mayores que los controles podría deberse a que el alelo  $CFHR3^*B$  (más frecuente en los pacientes) generase mayor cantidad de proteína que el alelo  $CFHR3^*A$  (más frecuente en los controles)(Bernabéu-Herrero et al. 2015)(Bernabéu-Herrero et al. 2015)(Bernabéu-Herrero et al. 2015)(Bernabéu-Herrero et al. 2015)(Bernabéu-Herrero et al. 2015)(Bernabéu-Herrero et al. 2015). Para estudiar la influencia de estos 2 alelos en los niveles de FHR-3, estratificamos los controles y los pacientes de SHUa según el genotipo de  $CFHR3$  (Figura 10).

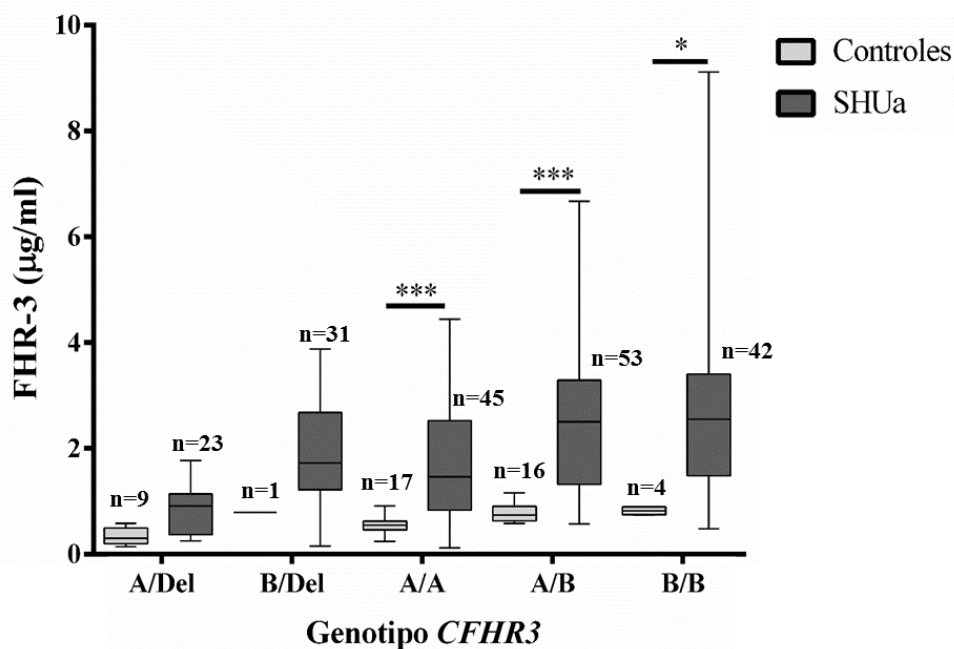




**Figura 10: Niveles plasmáticos de FHR-3 en función del genotipo de *CFHR3*.** Se comparan individuos con el mismo número de copias del gen *CFHR3*, por lo que las diferencias significativas que se muestran se refieren a los genotipos A/Del con B/Del, y a los genotipos A/B y B/B con A/A. Sólo un individuo control tenía el genotipo B/Del, por lo que no se incluyó en este análisis. Del: alelo  $\Delta CFHR3-CFHR1$ . La significación estadística se muestra mediante asteriscos: \* $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ .

En la gráfica de los controles podemos observar que los individuos con 1 o 2 copias del alelo *CFHR3\*B* tienen niveles más elevados de FHR-3 que los individuos sin ninguna copia, aunque por el reducido tamaño muestral de algunos de los genotipos sólo son estadísticamente significativas las diferencias entre los genotipos A/A y A/B. El análisis en pacientes de SHUa, donde el tamaño muestral de todos los genotipos es mayor, confirma que los individuos con 1 o 2 copias del alelo *CFHR3\*B* tienen niveles plasmáticos de FHR-3 más elevados.

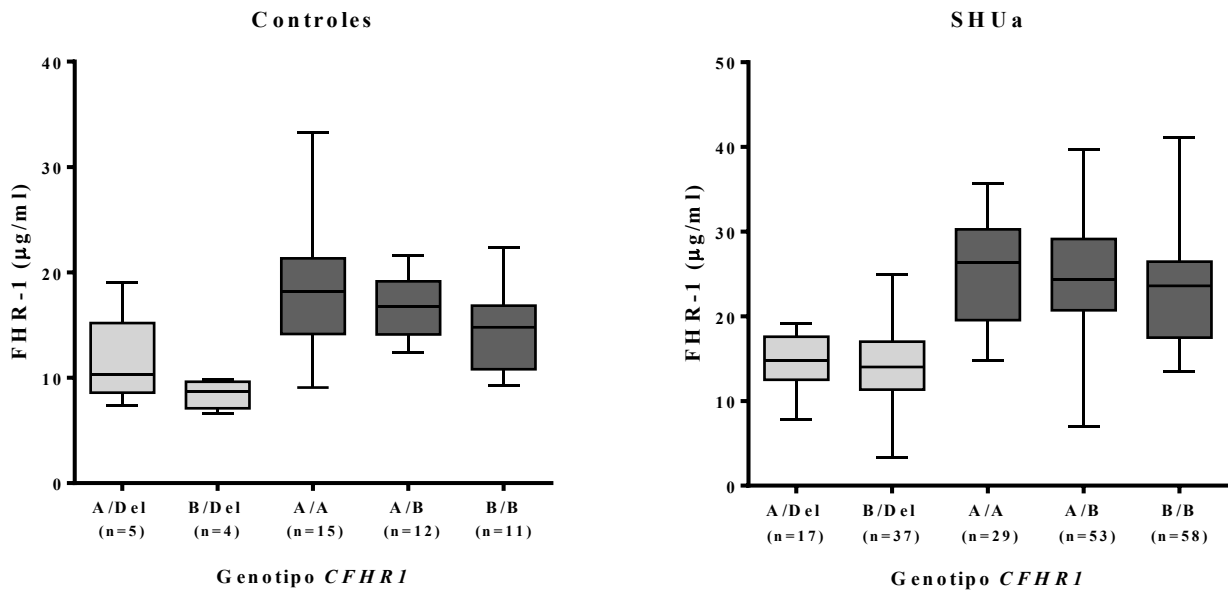
Por tanto, podemos concluir que el alelo *CFHR3\*B* es un alelo de alta expresión que genera mayores niveles de proteína. Para confirmar si ésta es la única razón para las diferencias de niveles de FHR-3 observadas, comparamos los niveles de esta proteína entre pacientes y controles con el mismo genotipo (Figura 11).



**Figura 11: Niveles plasmáticos de FHR-3 en pacientes y controles con el mismo genotipo de *CFHR3*.** Se indica también el número de individuos de cada genotipo. Del: alelo  $\Delta CFHR3-CFHR1$ . La significación estadística se muestra mediante asteriscos: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$

Al comparar controles y pacientes con el mismo genotipo observamos que los pacientes siempre tienen mayores niveles de FHR-3 que los controles, siendo estadísticamente significativas las diferencias entre los genotipos A/A, A/B y B/B. Por tanto, los niveles de FHR-3, además de estar determinados genéticamente, también podrían verse afectados por el estado clínico de los pacientes.

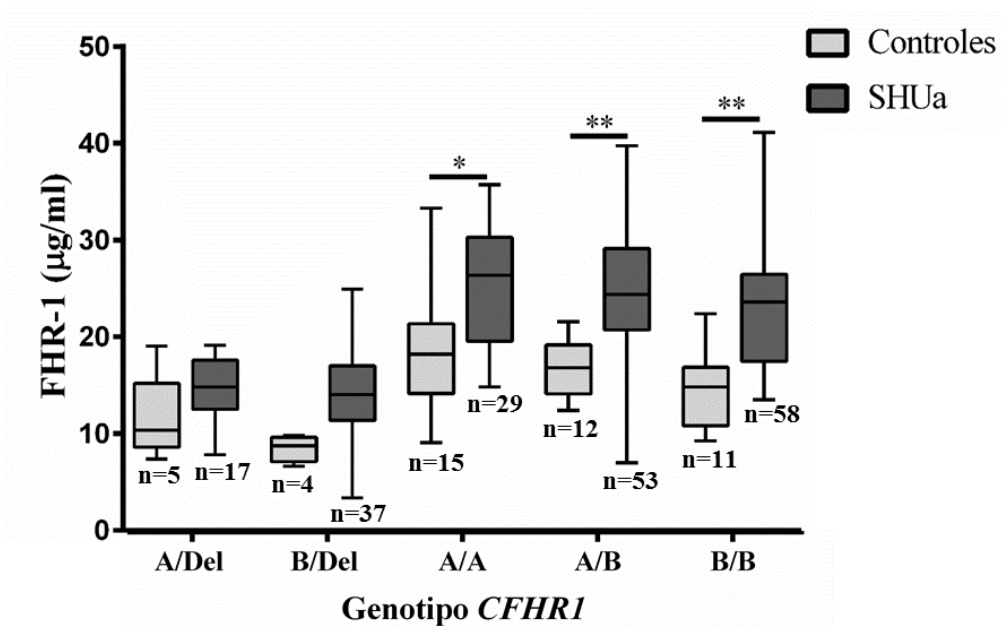
Los alelos *CFHR1*\*A y *CFHR1*\*B no se diferencian en la región promotora, pero dado que el alelo *CFHR1*\*B se asocia con riesgo a SHUa, decimos comprobar si los elevados niveles de FHR-1 de los pacientes tenían alguna relación con la frecuencia de estos 2 alelos. Para ello, estratificamos los controles y los pacientes SHUa según el genotipo de *CFHR1* (Figura 12), de forma análoga a lo que hicimos en el caso de los genotipos de *CFHR3*.



**Figura 12: Niveles plasmáticos de FHR-1 en función del genotipo de *CFHR1*.** Los genotipos con una sola copia de *CFHR1* se representan en gris claro y los genotipos con dos copias en gris oscuro. Sólo se observan diferencias significativas entre individuos con distinto número de copias, por lo que no se muestran en la gráfica. Del: alelo  $\Delta CFHR3-CFHR1$ .

Si observamos las gráficas tanto de controles como de pacientes SHUa, vemos que sólo hay diferencias significativas en los niveles de FHR-1 entre los genotipos con 1 o 2 copias del gen *CFHR1*. Por tanto, concluimos que los niveles de FHR-1 sólo están determinados por el número de copias del gen, independientemente de que se trate del alelo *CFHR1*\*A o *CFHR1*\*B.

Aunque los niveles de FHR-1 no están determinados por el genotipo de *CFHR1*, comparamos los niveles de FHR-1 en controles y pacientes con el mismo genotipo (Figura 13). Al igual que en el caso de FHR-3, observamos que los niveles de FHR-1 son mayores en los pacientes que en los controles con el mismo genotipo, siendo estadísticamente significativas las diferencias en los genotipos A/A, A/B y B/B. Concluimos que, al igual que con FHR-3, el estado clínico de los pacientes podría influir en los niveles de FHR-1.

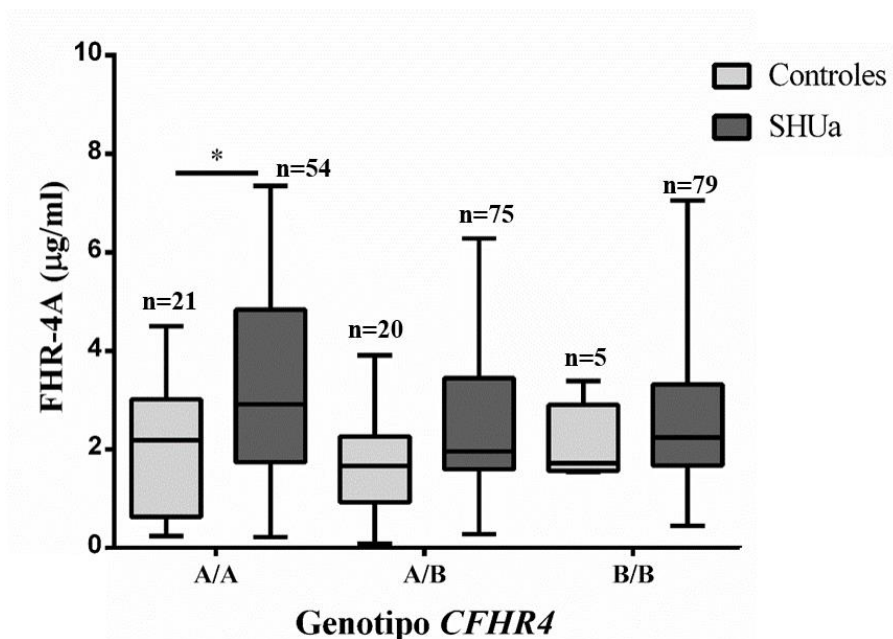


**Figura 13: Niveles plasmáticos de FHR-1 en pacientes y controles con el mismo genotipo de *CFHR1*.** Se indica también el número de individuos de cada genotipo. Del: alelo  $\Delta CFHR3-CFHR1$ . La significación estadística se muestra mediante asteriscos: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$

### 2.3.2. Influencia de la variante de riesgo a SHUa *CFHR4* c.626A en los niveles plasmáticos de FHR-4A.

Otra proteína que presenta una gran variabilidad de niveles en controles y en pacientes es FHR-4A. En el grupo se había analizado mediante WB la posible asociación de los niveles de FHR-4A con el polimorfismo c.626G>A (rs7417769), resultados presentados en el TFM de Sara Segovia Rodriguez (Máster de Investigación en Inmunología, UCM, Julio 2015). Este polimorfismo se localiza en el exón 5 del gen *CFHR4* y genera un cambio de Asparagina por Serina en el dominio SCR4 de FHR-4A (p.Asn209Ser). Al analizar el polimorfismo en controles y pacientes de SHUa, observamos que la variante alélica G era la más frecuente en controles, y la variante alélica A era la más frecuente en pacientes SHUa, asociándose con el alelo de riesgo a SHUa *CFHR3\*B* (Gomez Delgado et al 2017). Para unificar criterios con las otras variantes alélicas de los genes *CFHR1* y *CFHR3*, decidimos denominar *CFHR4\*A* a la variante más frecuente en controles (c.626G) y *CFHR4\*B* a la variante más frecuente en pacientes (c.626A).

Para determinar si el polimorfismo *CFHR4\*A/B* se asociaba con los niveles de FHR-4A, estratificamos las cohortes de controles y pacientes según el genotipo. También comparamos los niveles de FHR-4A entre pacientes y controles con el mismo genotipo (Figura 14).

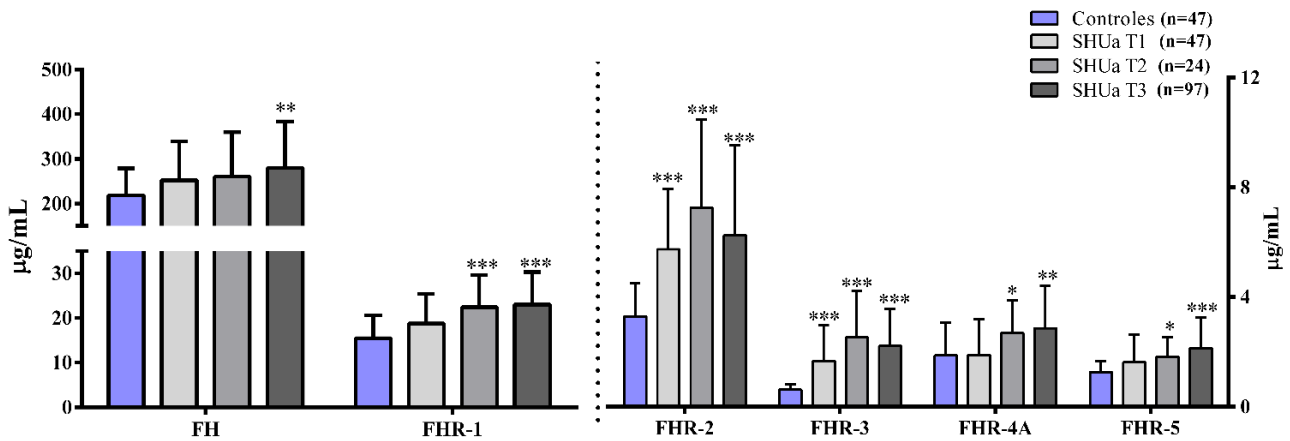


**Figura 14: Niveles plasmáticos de FHR-4A en pacientes y controles con el mismo genotipo de *CFHR4*.** Se indica también el número de individuos de cada genotipo. La significación estadística se muestra mediante asteriscos: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

Al analizar los niveles de FHR-4A según el genotipo, vimos que no había diferencias ni en controles ni en pacientes SHUa, por lo que el polimorfismo c.626G>A de *CFHR4* no parece que influya en los niveles de la proteína FHR-4A. No obstante, en el caso del genotipo *CFHR4*\*A/A, los niveles de FHR-4A son mayores en pacientes que en controles; este resultado, junto a los obtenidos en los niveles de FHR-3 y FHR-1, nos hace pensar que la situación clínica puede alterar los niveles de FH y proteínas FHRs.

### 2.3.3 Influencia de la situación clínica en los niveles de FH y proteínas FHRs

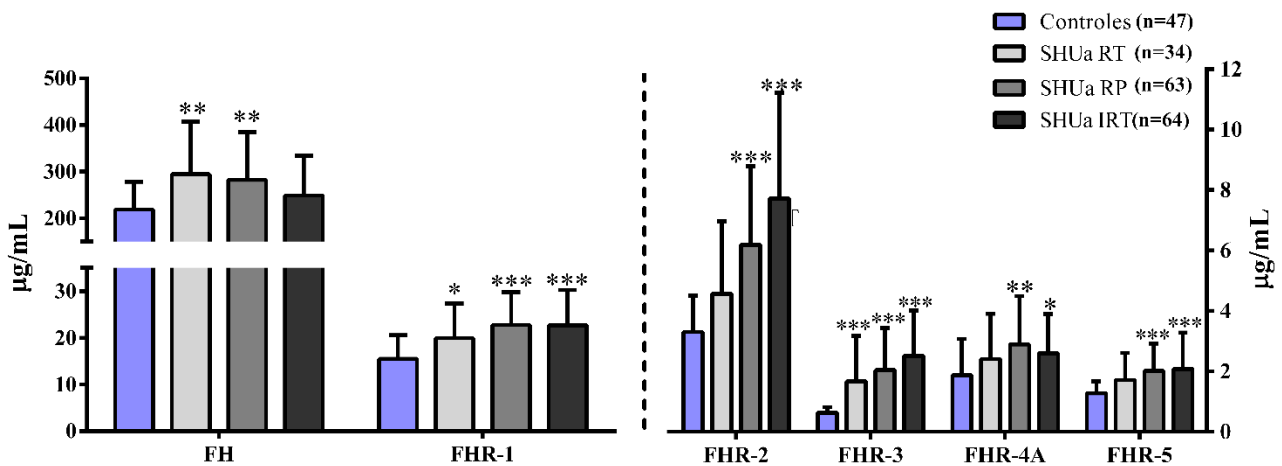
Para determinar si el estado clínico de los pacientes influye en los niveles de FH y proteínas FHRs, estratificamos los pacientes de SHUa según el tiempo transcurrido entre el debut de la enfermedad y la obtención de la muestra en la que se determinaron esos niveles (Figura 15).



**Figura 15: Niveles plasmáticos de FH y proteínas FHRs en muestras de pacientes de SHUa cercanas o lejanas al debut.** Los pacientes de SHUa se dividieron en subgrupos en función del tiempo transcurrido desde el debut hasta la obtención de la muestra. T1: primer mes; T2: 1-12 meses; T3: > 1 año. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas con el grupo control (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  y \*\*\* $p<0,001$ ).

Al estratificar a los pacientes según el tiempo transcurrido entre el debut y la obtención de la muestra se observa que las muestras correspondientes al debut tienen niveles de FH, FHR-1, FHR-4A y FHR-5 similares a los controles, mientras que los niveles de FHR-2 y FHR-3 están elevados de forma significativa. Por el contrario, los niveles de FH y FHRs en las muestras correspondientes a la situación clínica de remisión están elevados de forma significativa respecto a los controles. Para poder confirmar que la evolución de la enfermedad eleva los niveles de estas proteínas sería necesario cuantificar muestras seriadas de los pacientes y comparar los niveles de las proteínas a lo largo del tiempo.

Otra posible situación que podría influir en los niveles plasmáticos de las proteínas FH y FHRs, sería el estado de la función renal de cada paciente. Para analizarlo, estratificamos a los pacientes en tres subgrupos según la evolución de la función renal en el debut: recuperación total, recuperación parcial o insuficiencia renal terminal (Figura 16).



**Figura 16: Niveles plasmáticos de FH y proteínas FHRs en pacientes de SHUa según la evolución de la función renal.** Los pacientes de SHUa se dividieron en 3 subgrupos: RT (recuperación total); RP (Recuperación Parcial); IRT: Insuficiencia Renal Terminal. Sólo se muestran las diferencias significativas con el grupo control. La significación estadística se muestra mediante asteriscos: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

En este caso, al estratificar a los pacientes observamos que la elevación de los niveles de FHR-1 y FHR-3 es independiente de la situación renal, mientras que el aumento de los niveles de FHR-2, FHR-4A y FHR-5 sí que parece asociarse con el deterioro de la función renal. No obstante, habría que cuantificar estas proteínas en muestras seriadas de los pacientes, y analizar su correlación con parámetros de función renal (TFG, proteinuria, creatinina).

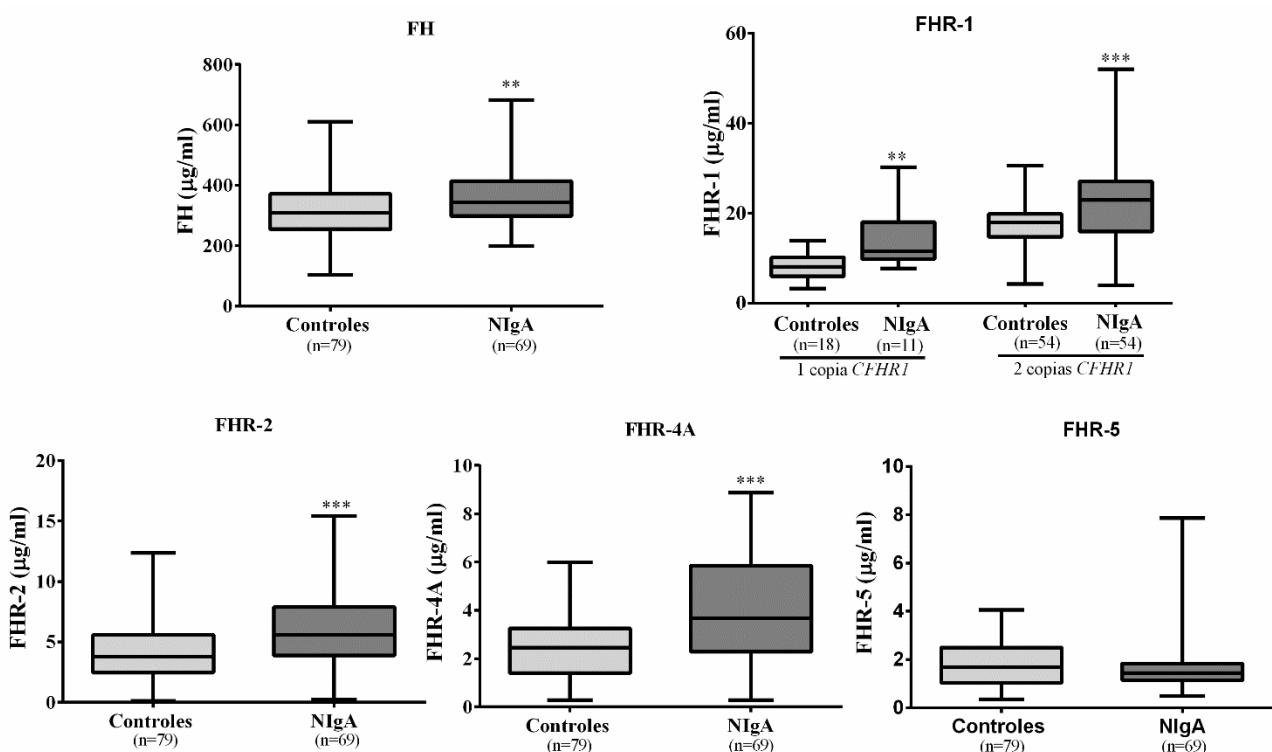
#### 2.4 Niveles de FH y Proteínas FHRs en Controles y en Pacientes de NIgA por ELISA

Los niveles de FH y proteínas FHRs en la cohorte de NIgA (n=69) y en la cohorte de controles (n=79) se cuantificaron mediante ensayos ELISA puestos a punto en nuestro laboratorio (Tabla 7); la proteína FHR-3 no se pudo cuantificar por falta de reactivos específicos.

Cohortes	Proteínas	Media (nM)	Media (µg/mL)	SD	Mediana	MIN	MAX
Controles (n=79)	FH	2085	312,7	92,8	309,4	103,5	611
	FHR-1 <sup>a</sup>	380	15,2	6,	16,2	3,3	30,6
	FHR-2	148	4,3	2,7	3,8	0,12	12,4
	FHR-4	29	2,5	1,2	2,5	0,27	6,0
	FHR-5	28	1,82	0,9	1,7	0,36	4,1
Pacientes NIgA (n=69)	FH	2438	365,7	103,7	343,6	199,9	683,1
	FHR-1 <sup>a</sup>	548	21,9	9,9	22,9	4,0	52,0
	FHR-2	215	6,2	3,6	5,6	0,23	15,4
	FHR-4	45	3,9	2,1	3,7	0,27	8,9
	FHR-5	24	1,59	0,9	1,4	0,5	7,9

**Tabla 7: Análisis descriptivo de los niveles de FH y proteínas FHRs en controles y en pacientes de NIgA.** Se muestran los valores medios en base nM y en µg/mL; en estos últimos se muestra también la SD, mediana, mínimo (MIN) y máximo (MAX). <sup>a</sup> Los individuos con la variante  $\Delta CFHR3-CFHR1$  en homocigosis se excluyeron de la cuantificación de FHR-1

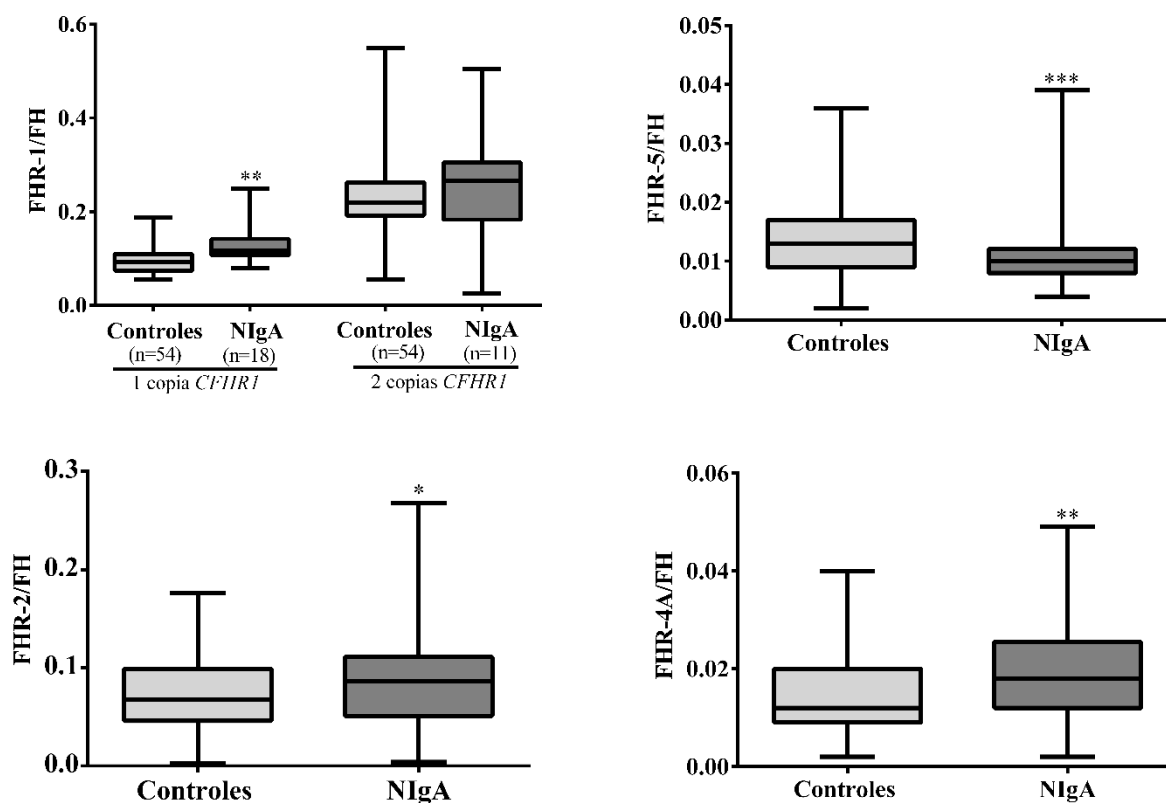
Los pacientes de NIgA tienen niveles más elevados de todas las proteínas, con excepción de FHR-5, en la que las diferencias entre pacientes y controles no son significativas (Figura 17).



**Figura 17: Niveles de FH y proteínas FHRs en controles y pacientes de NIgA.** Se comparan los niveles de las proteínas FH y FHRs en controles (gris claro) y pacientes NIgA (gris oscuro). La significación estadística se muestra mediante asteriscos: \*p<0,05; \*\* p<0,01 y \*\*\*p<0,001.



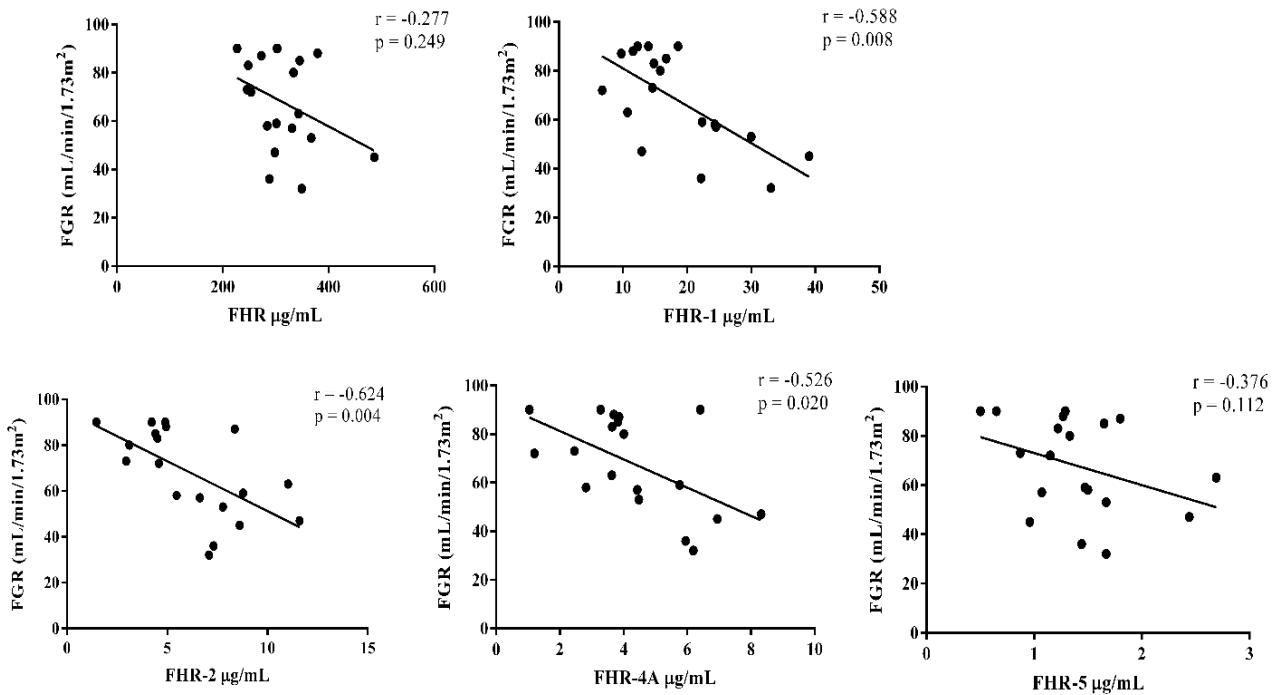
Cuando comparamos las ratios FHRs/FH entre controles y pacientes, se observa que FHR-1/FH, FHR-2/FH y FHR-4A/FH están significativamente elevadas en los pacientes de NIgA respecto a los controles, mientras que la ratio FHR-5/FH es menor en los pacientes, quizá porque estos tienen mayores niveles de FH que los controles (Figura 18).



**Figura 18: Ratio FHRs/FH en controles y pacientes de NIgA.** Se comparan las ratios en controles (gris claro) y en pacientes NIgA (gris oscuro). La significación estadística se muestra mediante asteriscos: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 2.4.1. Influencia de la función renal en los niveles de FH y proteínas FHRs

Para analizar si los niveles de FH y proteínas FHRs se veían afectados por el estado de la función renal de los pacientes, utilizamos como indicador la tasa de filtración glomerular (TFG); este parámetro se obtuvo de la analítica más próxima a la fecha de extracción de la muestra en la que se cuantificaron FH y proteínas FHRs. El análisis de correlación sólo se pudo llevar a cabo en 19 pacientes, en los que el tiempo transcurrido entre las 2 determinaciones (TFG y niveles de FH/FHRs) era inferior a 4 meses. Como se muestra en la figura 19, los niveles de FHR-1 correlacionaban inversamente con la TFG. Esta observación concuerda con lo publicado en la bibliografía. También se observa una correlación inversa entre los niveles de FHR-2 y FHR-4A y la TFG, mientras que no se observa correlación con los niveles de FHR-5 ni con los de FH.



**Figura 19: Correlación de los niveles de FH y proteínas FHRs con la TFG en pacientes de NigA.** Se representan las gráficas de correlación entre la TFG (eje Y) y los niveles de FH y FHRs (eje X) en 19 pacientes de NigA.

### 2.5 Resumen de Polimorfismos, Niveles y Perfiles de Expresión

De acuerdo con nuestros resultados, los niveles de FH y FHRs están más elevados en los pacientes que en los controles, tanto en las cuantificaciones por *Western-blot* como por ELISA. La situación clínica de los pacientes (tiempo desde el debut y estado de la función renal) probablemente influye en los niveles de estas proteínas. Por otro lado, el perfil de expresión en los pacientes de SHUa se caracteriza por niveles elevados de FHR-3, que se explican en parte por la mayor frecuencia del alelo de riesgo *CFHR3\*B*. En los pacientes de NigA, en cambio, es la proteína FHR-1 la que presenta niveles más elevados, pero no se ha encontrado ninguna asociación genética que explique este aumento (Tabla 8).

		Controles	SHUa	NIgA
Variantes Genéticas Comunes	<i>CFH(H3)</i>	0,18	0,35 ↑	0,24
	<i>ΔCFHR3-CFHR1</i>	0,18	0,22	0,13 ↓
	<i>CFHR1*B</i>	0,36	0,48 ↑	0,39
	<i>CFHR3*B</i>	0,25	0,39 ↑	0,29
	<i>CFHR4*B</i>	0,36	0,55 ↑	0,38
Niveles de Proteínas	FH	1	1,23 ↑	1,17 ↑
	FHR-1	1	1,39 ↑	1,45 ↑
	FHR-2	1	1,88 ↑	1,45 ↑
	FHR-3	1	3,5 ↑↑	no hecho
	FHR-4A	1	1,36 ↑	1,55 ↑
	FHR-5	1	1,45 ↑	0,86 ↓
Perfiles de expresión	Incremento específico FHR-3	5%	22% ↑↑	10%
	Incremento específico FHR-1	15%	12%	21% ↑

Tabla 8: Resumen de las variantes genéticas comunes y de los niveles de FH y proteínas FHRs. Se muestran las frecuencias alélica en Controles, SHUa y NIgA y el aumento de los niveles de FH y FHRs respecto a los controles.

### 3. SHUa Secundario a Infecciones por *Streptococcus pneumoniae* (SP-SHU)

#### 3.1. Análisis Genéticos en la Cohorte Española de SP-SHU

La cohorte SP-SHU analizada en esta Tesis está formada por 13 pacientes de SHUa desarrollado durante un proceso infeccioso por *S. pneumoniae*, y que se reclutaron entre los años 2006-2019. Todos los pacientes, excepto uno, eran menores de 3 años en el debut de la enfermedad. La mayoría de las muestras de sangre-EDTA se obtuvieron cuando el paciente estaba en remisión; en el caso de dos pacientes (H837 y H946) se obtuvo una muestra inmediatamente después del debut y otra muestra en remisión.

Se realizó el estudio genético del Complemento en 9 pacientes y en 3 más de forma parcial. Se encontraron variantes raras, en heterocigosis, en 5 pacientes (Tabla 8). El paciente H859 portaba una variante rara en el gen *CIQB*, que da lugar a un cambio de aminoácido en la cadena de C1qB que no afecta a los niveles de proteína. El paciente H640 portaba una variante intrónica en el gen *CFI*; esta variante se localiza en un sitio de *splicing* del exón 11, pero no parece que afecte a los niveles de proteína. Además de las variantes raras en estos dos genes del Complemento, se encontraron 3 variantes más en los genes *CFHR3* y *CFHR5*. La variante en el gen *CFHR3*, presente en el paciente H150, altera la expresión de la proteína y da lugar a un alelo nulo; este paciente tiene también la variante  $\Delta CFHR3-CFHR1$  en heterocigosis, por lo que presenta deficiencia completa de la proteína FHR-3 (Abarrategui-Garrido et al. 2009). En el gen *CFHR5* se encontraron tres variantes. El paciente H731 tiene una variante de cambio de aminoácido (c.832G>A; p.G278S) que está descrita como benigna, y otra variante que genera un alelo nulo (c.368A>G; p.N123S), por lo que el paciente tiene haploinsuficiencia de FHR-5. La tercera variante en *CFHR5* (c.486\_487insAA; p.E163Kfs\*10) se encontró en el paciente H619; una variante muy similar (c.486\_487insA; p.Glu163Argfs\*35) la hemos identificado también en un paciente con glomerulonefritis membranoproliferativa e infección crónica por VHC. Estas dos variantes de *CFHR5* generan un codón de parada prematuro que produce haploinsuficiencia de FHR-5 en plasma. Los dos casos clínicos los hemos descrito en un trabajo publicado en 2021.

En la tabla 8 se muestra también la frecuencia de los polimorfismos de riesgo a SHUa en la cohorte SP-SHU. La frecuencia del haplotipo de riesgo *MCPggaac* es de 0,111, menor a la observada en la cohorte completa de SHUa. En cambio, la frecuencia del haplotipo de riesgo *CFH(H3)* y de los alelos de riesgo *CFHR3\*B* y *CFHR1\*B* (0,269, 0,346 y 0,615, respectivamente), son comparables a las frecuencias observadas en la cohorte completa de SHUa.

Código Paciente	Sexo	Edad Debut	Variantes Raras	Polimorfismos de riesgo a SHUa				Del CFHR3 CFHR1	C3/C4 (mg/dl)
				MCPggaac	CFH(H3)	CFHR3*B	CFHR1*B		
H118	M	2 y	No	No	HET	HET	HOM	No	178/27,2
H150 <sup>(a)</sup>	H	12 m	CFHR3 (c.796AG>A)	No	No	No	HET	HET	132/34
H171 <sup>(b)</sup>	M	3 y	No	No	HET	HET	HET	No	81,3/40,6
H201	M	19 m	Estudio parcial	No realizado	No	HET	HOM	No	111/42,3
H202	M	2 y	Estudio parcial	No realizado	No	No	HET	No	145/33,1
H582	M	47 y	No	No	HET	HET	No	No	150/46,1
H619 <sup>(c)</sup>	H	2 y	CFHR5 (c.486_487insAA; p.E163Kfs*10)	HET	No	No	HET	No	166/44,8
H640	H	5 m	CFI (c.1534+5G>T)	No	No	No	No	No	153/30,3
H678	H	12m	Estudio parcial	No realizado	HET	HET	HOM	No	123/26,2
H731	M	17m	CFHR5 (c.368A>G;p.N123 S/ c.832G>A; p.G278S)	HET	HET	HOM	HET	No	143/36
H837	H	21m	No	No	No	No	HET	No	87,1/9,6
H859	H	16m	C1QB (c.223G>A p.G75R)	No	HET	HET	HOM	No	146/60
H946	H	21m	No realizado	No realizado	HET	HET	HOM	No	58,9/9,56

**Tabla 9: Datos demográficos y de Complemento de los pacientes SP-SHU.**

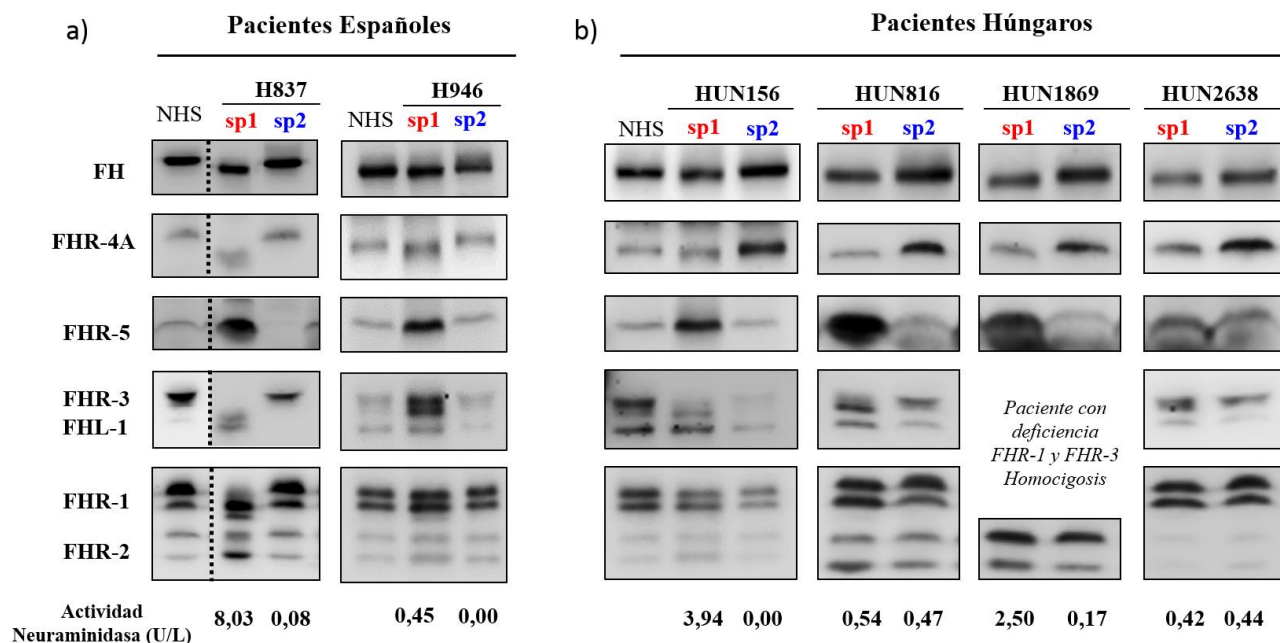
<sup>a</sup> Descrito en Abarrategui-Garrido *et al.* 2009. <sup>b</sup> Pacientes con anticuerpos anti-FH. <sup>c</sup> Descrito en Gómez-Delgado *et al.* 2021.

Se determinaron también los niveles de C3, C4, FH, FI y autoanticuerpos anti-FH en las muestras de plasma de todos los pacientes. Como se observa en la tabla 9, sólo 3 pacientes presentan niveles bajos de C3 y C4: H837 y H946 (muestras obtenidas en el debut de la enfermedad), y H171 (muestra con autoanticuerpos anti-FH). Dado que los niveles bajos de C3 y C4 son un signo de activación del Complemento, no podemos descartar que el resto de los pacientes también presentaran niveles de C3 y C4 bajos durante la fase aguda de la infección.

### 3.2 Caracterización de FH y Proteínas FHRs por *Western-blot*

Las muestras de plasma de los pacientes se utilizaron para analizar las proteínas FH y FHRs mediante WB, utilizando el set 2 de anticuerpos (sección 2.1 de materiales y métodos).

El análisis de WB reveló que en las muestras de los pacientes H837 y H946 extraídas en el debut de la enfermedad, las proteínas FH y FHRs tenían un peso molecular (Mw) menor que las proteínas de la muestra de referencia. Se obtuvo una segunda muestra de estos pacientes cuando ya estaban en remisión, observándose que en esta segunda muestra el Mw de las proteínas FH y FHRs era normal (Figura 20a).



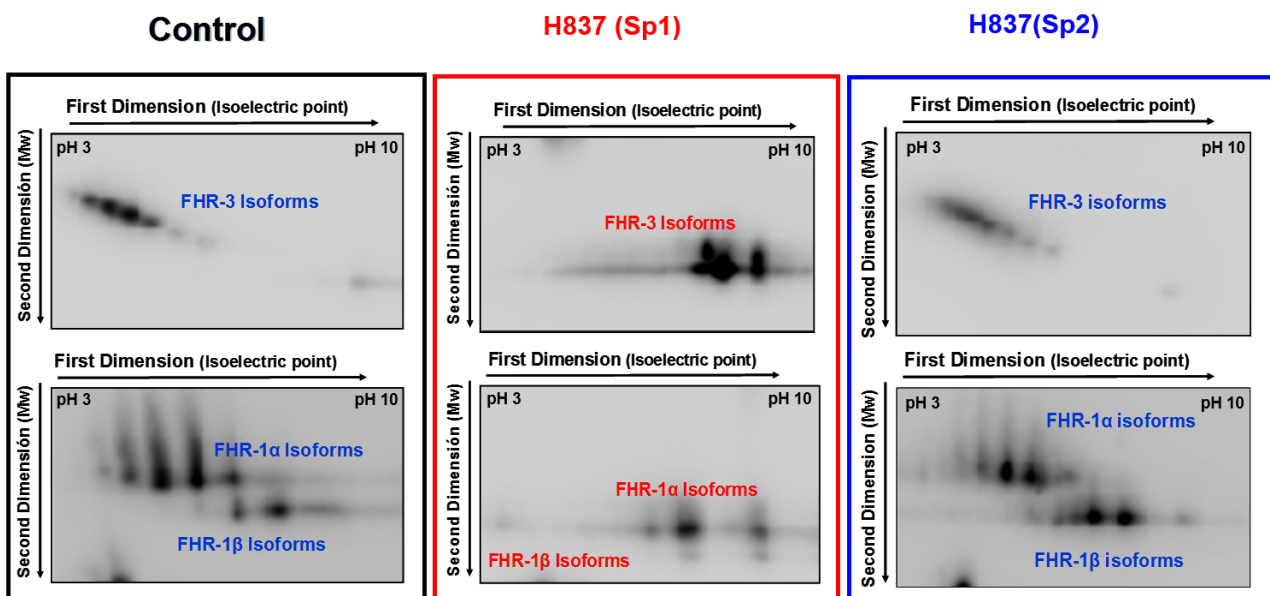
**Figura 20: Análisis por WB de FH y las proteínas FHRs.** En el apartado a) se muestran dos pacientes españoles y en el apartado b) 4 pacientes húngaros. En todos los pacientes se analiza una muestra en fase aguda (sp1) y otra en remisión (sp2). Los números en la parte inferior de la imagen corresponden a los valores de la actividad neuraminidasa de la muestra.

La disminución del Mw sugería que la neuraminidasa bacteriana había eliminado los ácidos siálicos de FH y las proteínas FHRs. Para comprobar que efectivamente había actividad neuraminidasa en las muestras del debut, decidimos cuantificar la actividad neuraminidasa, que sólo se detectó en las muestras obtenidas al debut (Figura 20a). Ante la sospecha de que este fenómeno ocurriera en todas las muestras extraídas al debut, y dado que no disponíamos de más muestras en esta situación, se estableció una colaboración con el Dr. Zoltán Prohaska (Budapest, Hungría). Esta colaboración permitió extender el estudio a 11 pacientes más, de los que analizamos muestras cercanas al debut y en remisión. Ese análisis demostró una disminución del Mw de FH y las proteínas FHRs en las muestras de 4 pacientes obtenidas durante el debut (figura 20b). En estos pacientes también se analizó la actividad neuraminidasa, que sólo se observaba en las muestras del debut. A pesar de que no observamos una correlación clara entre la actividad neuraminidasa y el grado de desialilación de las proteínas, la muestra con la desialilación más evidente por WB es también la que

presentabas mayores niveles de neuraminidasa. Tampoco parece haber una correlación clara entre la actividad neuraminidasa y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico, pero las muestras con mayor actividad corresponden siempre a la fase aguda del proceso.

Se analizó también por WB la desialilación de la transferrina, glicoproteína plasmática de 77kDa que se utiliza como proteína de referencia para ver defectos en la glicosilación. Como era de esperar, en todas las muestras que presentaban desialilación de las proteínas FH y FHRs, el Mw de la transferrina era inferior al de la muestra control, sugiriendo que la desialilación por la neuraminidasa del neumococo estaba afectando a todas las glicoproteínas plasmáticas.

La eliminación de los ácidos siálicos no influye sólo en el Mw de las proteínas, sino que afecta también a su punto isoeléctrico (pI), porque se pierden cargas negativas. Para caracterizar mejor la pérdida de los ácidos siálicos, realizamos un WB bidimensional (2D-WB), comparando las muestras al debut y en remisión del paciente H837 con un individuo control. En la figura 21, podemos observar que el patrón de isoformas característico de FHR-3 y FHR-1 está completamente alterado en la muestra al debut del paciente, mientras que en la muestra en remisión este patrón se recupera y es comparable al patrón observado en la muestra control. Este resultado confirma que las proteínas FH y FHRs del paciente han sufrido una desialilación transitoria debido a la actividad de la neuraminidasa bacteriana.



**Figura 21: Análisis de las proteínas FHR-3 y FHR-1 por WB bidimensional.** El patrón de isoformas de FHR-3 y FHR-1 que se observa en la muestra control es mucho más sencillo (menor número de isoformas) en la muestra del paciente H837 al debut, y se recupera en la muestra del paciente en remisión.

Otro resultado interesante del análisis de estas proteínas por WB es que la intensidad de la banda de FHR-5 era mayor en las muestras obtenidas al debut de la enfermedad que en la de las muestras obtenidas en remisión, sugiriendo que los niveles de FHR-5 aumentaban durante el proceso infeccioso (Figura 20). La diferencia en la intensidad de las bandas de FHR-5 es especialmente evidente en los pacientes H837, HUN816 y HUN 1869. Para confirmar esta observación, se determinaron los niveles de FHR-5 en las muestras sp1 y sp2 de los 2 pacientes españoles, y de una tercera muestra (sp3) obtenida un año después (H946) o cuatro años después (H837). En ambos casos se observa una evolución similar en los niveles de FHR-5, que son mayores en la muestra inicial (sp1), disminuyen en la muestra sp2 y varían poco en la tercera muestra (sp3) (Figura 22). Para comprobar si los niveles de las otras proteínas FHRs evolucionaban de forma similar, determinamos sus niveles por ELISA. En la figura 22 también se observa una evolución similar de los niveles del resto de proteínas en ambos pacientes.

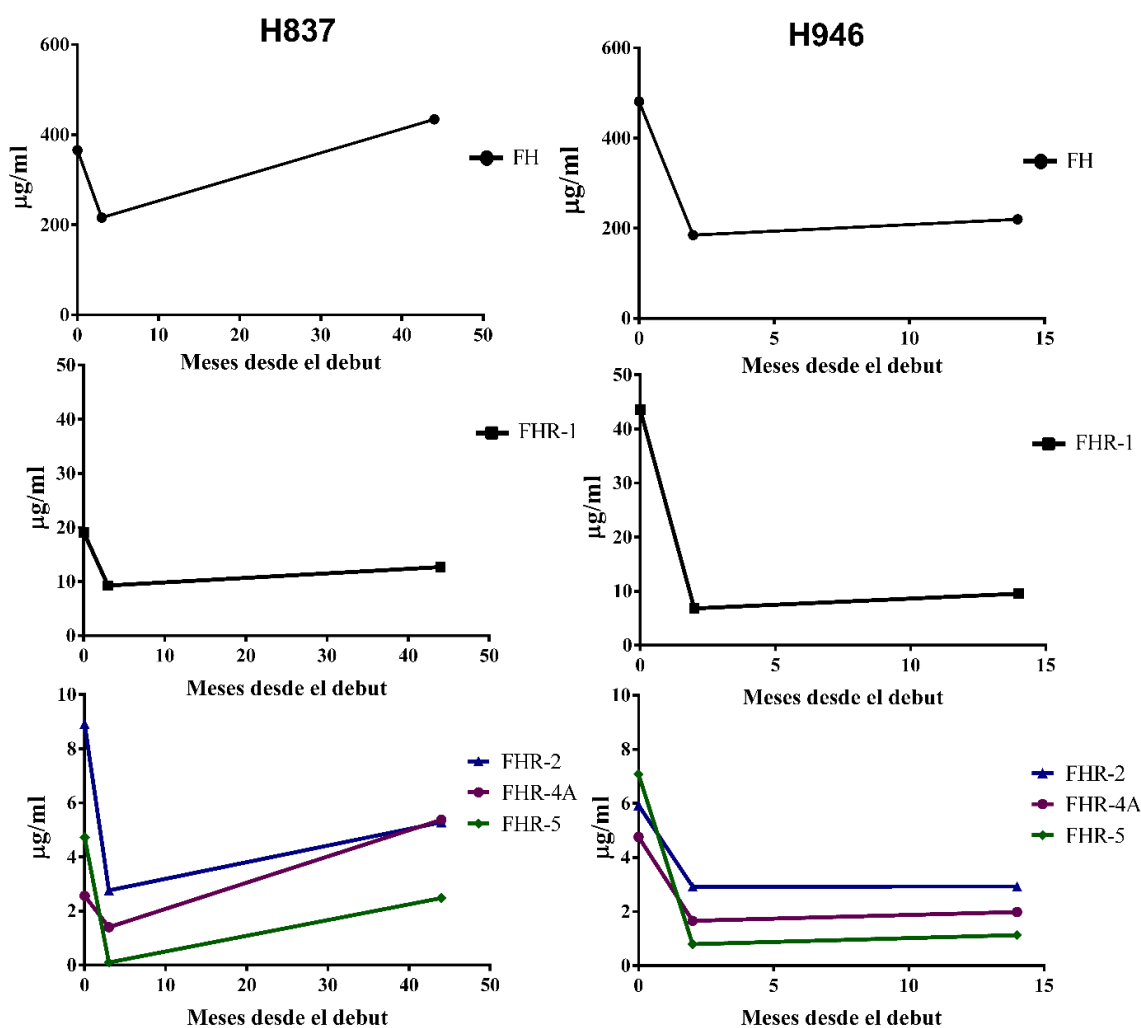
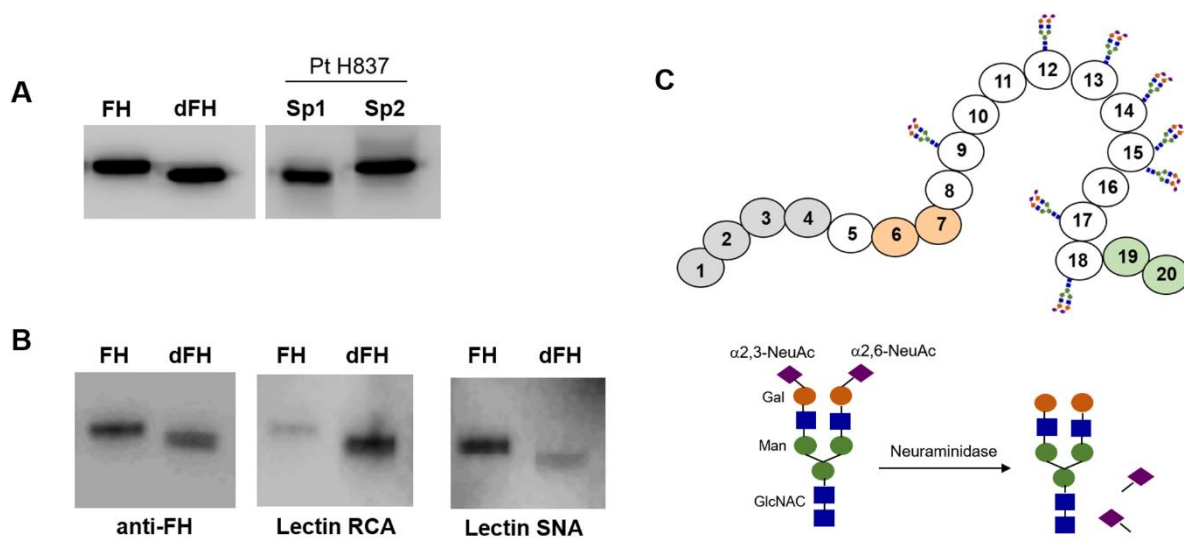


Figura 22: Niveles de proteínas FHRs en muestras seriadas de los pacientes H837 y H946. Se muestran las gráficas con la variación de los niveles de FH y proteínas FHRs en 3 muestras de los pacientes.



### 3.3 Caracterización Funcional de FH desialilado (dFH)

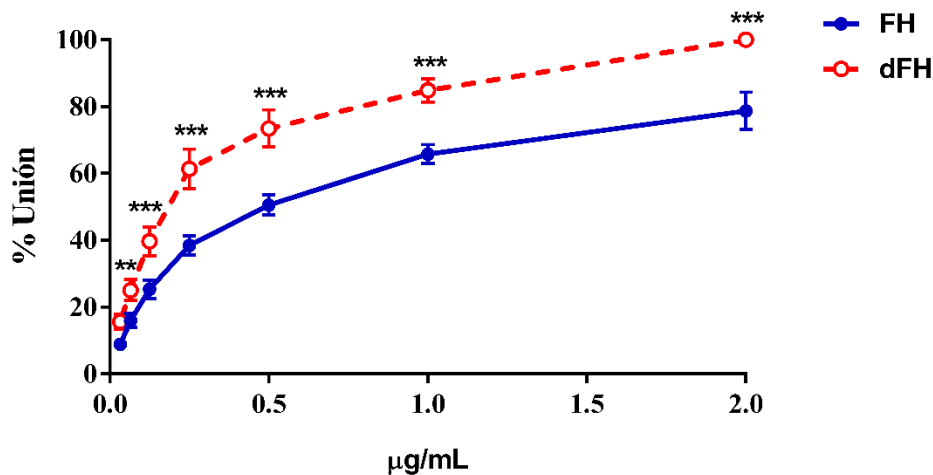
Para analizar si la desialilación de FH alteraba su actividad funcional, decidimos desialilar FH “in vitro” a partir de FH comercial purificado, dado que el limitado volumen de plasma de las muestras de los pacientes no permitía purificarlo. La desialilación de FH (dFH) se comprobó analizando la unión diferencial a las lectinas RCA-I y SNA por WB, ya que la lectina SNA se une preferentemente a los enlaces  $\alpha(2-6)$  de los ácidos siálicos del FH nativo, mientras que la lectina RCA-I se une preferentemente a los residuos  $\beta$ -Galactosa, que se encuentran completamente accesibles tras la desialilación. La unión preferente de la lectina SNA a FH y la de RCA-I a dFH confirmó la correcta desialilación de FH “in vitro”(Figura 23).



**Figura 23: Análisis de la desialilación de FH por *Western-blot*.** A) Comparación de los tamaños de FH y dFH con las muestras del paciente H837. B) Reconocimiento diferencial de FH y dFH por las lectinas RCA y SNA. C) Esquema de la molécula de FH con los dominios SCR que contienen carbohidratos, y composición detallada de los mismos (basada en Schmidt et al., 2018).

### 3.3.1. Ensayos de Unión de FH/dFH a C3b Pegado en Placa.

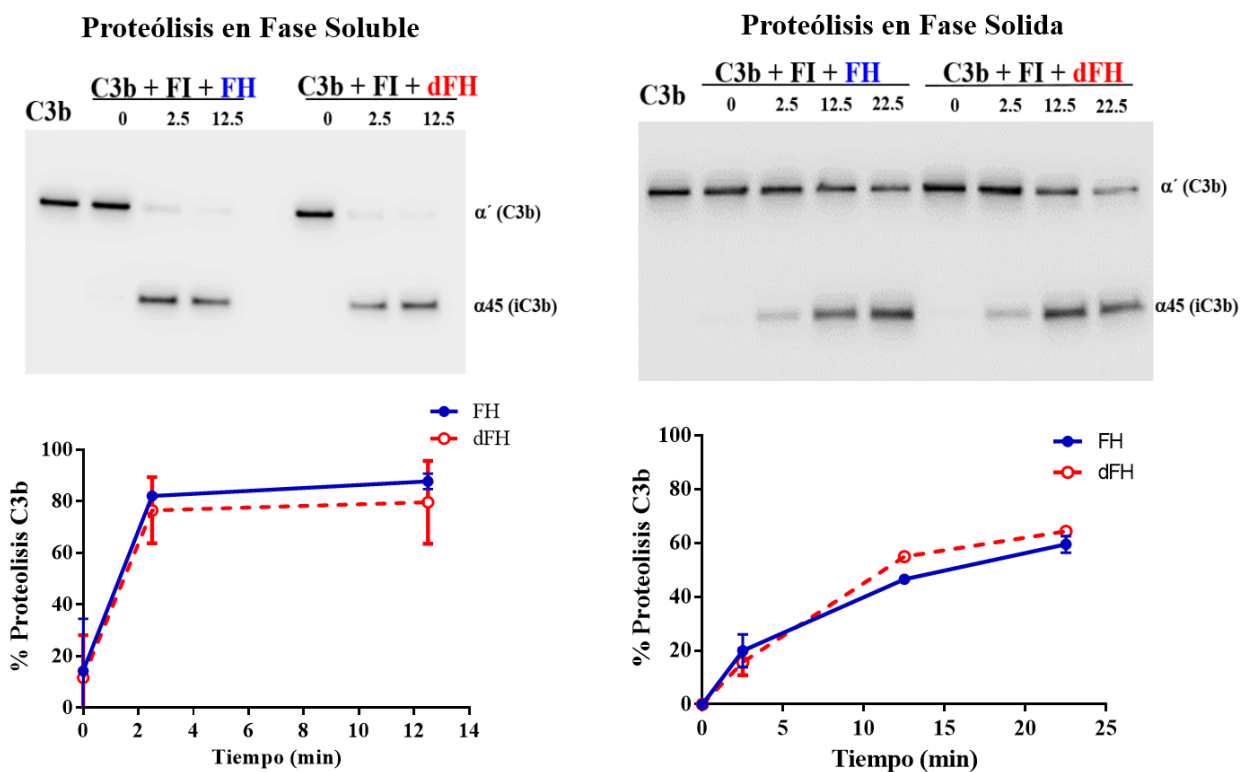
La capacidad de unión de FH y dFH a C3b se analizó mediante un ensayo ELISA. Los resultados obtenidos (Figura 24) muestran que el dFH se une de forma más eficiente al C3b pegado en la placa que el FH nativo, lo que sugiere que la eliminación de los siálicos favorece la interacción de FH con C3b depositado en la superficie.



**Figura 24: Unión de FH y dFH a C3b pegado en placa.** Las curvas corresponden a la de unión de concentraciones crecientes de FH (azul) y dFH (rojo) a 400 ng de C3b. Se representa la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos ELISA independientes. \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.3.2. Ensayos de Actividad Cofactora de FH/dFH en la Proteólisis de C3b por FI.

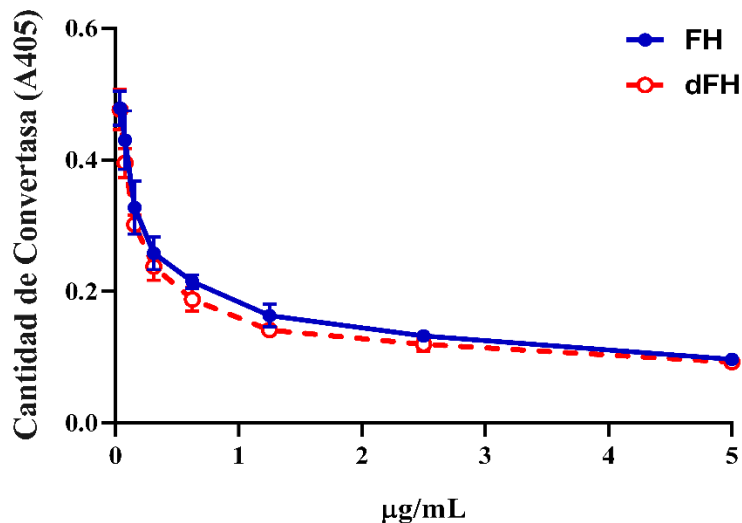
Mediante estos ensayos analizamos si la ausencia de ácidos siálicos afecta a la actividad cofactora de FH en la escisión proteolítica de C3b por FI. Estos ensayos se realizaron en fase soluble y en microplacas. La actividad cofactora de FH/dFH se visualizó mediante análisis de WB, cuantificando la desaparición de la cadena  $\alpha'$  de C3b y la aparición del fragmento  $\alpha_{45}$  (iC3b). Aunque la proteólisis de C3b a iC3b en fase sólida es más lenta que en fase soluble, en ambos casos no hay diferencias significativas cuando se utiliza FH o dFH como cofactor del FI (Figura 25).



**Figura 25: Actividad cofactora de FH y dFH en la proteólisis de C3b por FI.** El WB y la gráfica de la izquierda corresponden a la proteólisis en fase soluble y los de la derecha en fase sólida. La proteólisis se analizó a diferentes tiempos con un anticuerpo que reconoce la cadena  $\alpha'$  de C3b y la cadena  $\alpha45$  de iC3b. El porcentaje de proteólisis de C3b corresponde a la intensidad relativa  $\alpha45/\alpha'$ . Todas las curvas representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (azul: FH nativo; Rojo: dFH).

### 3.3.3. Análisis de la Capacidad de FH/dFH para Disociar la C3 Convertasa

Se analizó también si la pérdida de los ácidos siálicos del FH afectaba a su capacidad para disociar la convertasa de C3. Se utilizó un ensayo ELISA en el que se formaba la C3 convertasa (C3bBbP) sobre los pocillos, se incubaba con concentraciones crecientes de FH/dFH y posteriormente se determinaba la cantidad de convertasa restante. Los resultados muestran que no hay diferencias en la capacidad de FH y dFH para disociar la C3 convertasa (Figura 26).

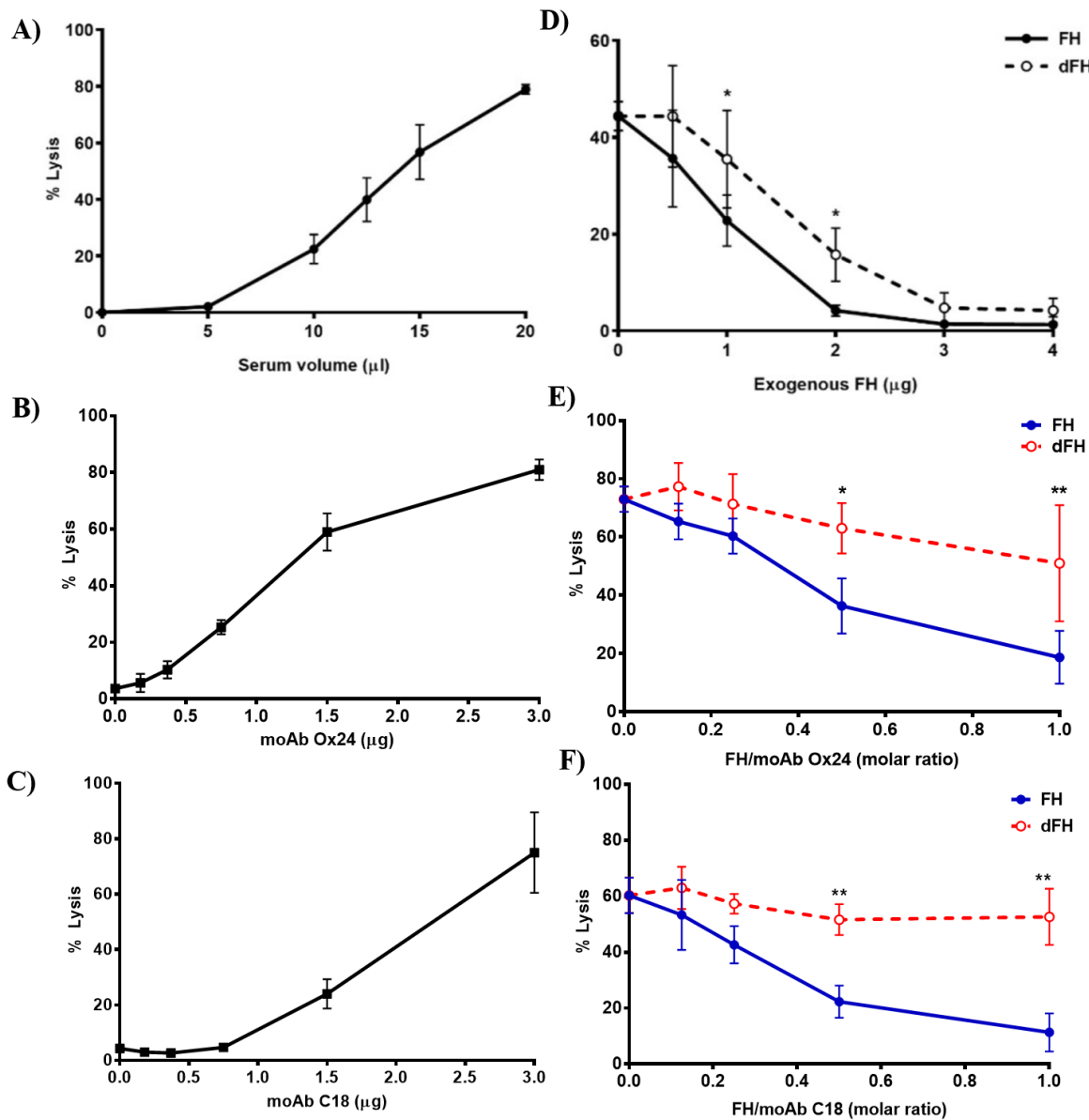


**Figura 26: Disociación de la convertasa de C3 por FH y dFH.** Se representa el porcentaje de moléculas de convertasa (C3bBbP) que permanece en las placas después de añadir cantidades crecientes de FH (azul) o dFH (rojo). Las curvas representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

### 3.3.4. Ensayos Hemolíticos en Eritrocitos de Carnero

Para analizar el efecto global de la desialilación de FH en su capacidad para regular el Complemento sobre superficies celulares, utilizamos dos formatos de ensayos hemolíticos con eritrocitos de carnero. En estos ensayos la lisis de los eritrocitos refleja el resultado conjunto de la activación del Complemento y la regulación del FH.

El primer formato es el ensayo hemolítico original que describe la lisis de eritrocitos de carnero por el suero de un paciente de SHUa con la mutación W1183L en FH (Sánchez-Corral et al. 2004). El segundo formato es una modificación del ensayo original, en el que se consigue que un SHN lise los eritrocitos al añadir anticuerpos monoclonales anti-FH (Strobel et al. 2011). En ambos formatos se comparó la capacidad de la adición de FH/dFH exógeno para prevenir la lisis de los eritrocitos. Como se puede apreciar en la figura 27, el dFH tiene menor capacidad para prevenir la lisis de los eritrocitos, tanto la que se observa en el suero con el FH mutado, como la inducida por los anticuerpos. Estos resultados sugieren que los ácidos siálicos de FH contribuyen a su actividad reguladora sobre las superficies celulares.



**Figura 27: Capacidad de FH/dFH para prevenir la lisis de eritrocitos de carnero.** Lisis resultante de la incubación de los eritrocitos con distintas cantidades de suero de un paciente de SHUa con la mutación FH W1183L (A), o de la adición de cantidades crecientes del anticuerpo monoclonal Ox24 (B) o C18 (C) a 20  $\mu\text{L}$  de un suero humano normal. En todos los casos, la lisis de los eritrocitos puede prevenirse al añadir concentraciones crecientes de FH (azul) o dFH (rojo) (D,E y F). Las curvas representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ .

# **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

### 1. Niveles de FH y Proteínas FHRs en SHUa y NIgA

La homología de las proteínas FHRs y FH, la existencia de isoformas de “*splicing*” (FHL-1 y FHR-4B) y de formas diméricas (FHR-1, FHR-2 y FHR-5 circulan en plasma en forma de homodímeros y heterodímeros) ha hecho que la cuantificación de estas proteínas mediante ensayos ELISA sea todo un reto al no disponerse de anticuerpos específicos. Como consecuencia, hay una gran discrepancia en los niveles de FH y FHRs obtenidos por diferentes grupos de investigación. Una alternativa a la falta de anticuerpos específicos es la cuantificación por espectrometría de masas, pero de momento tampoco parece un método muy fiable (Poppelaars et al. 2021). La estrategia que proponemos a estos métodos de cuantificación es el análisis de FH y proteínas FHRs por Western-blot (WB). En este tipo de análisis las proteínas se separan por su peso molecular, de forma que no es necesario tener anticuerpos específicos de cada una de ellas para identificarlas de forma inequívoca. Además, al desnaturalizar previamente las muestras, no hay que preocuparse por la existencia de formas diméricas. Dado que en el laboratorio se habían analizado por WB un elevado número de muestras de pacientes y controles, con el objetivo de identificar deficiencias o formas anómalas de FH y proteínas FHRs, quisimos utilizar estos mismos WBs para cuantificar estas proteínas.

En esta Tesis hemos cuantificado las proteínas FH, FHR-1, FHR-3, FHR-4A y FHR-5 por WB en controles (n=55), pacientes SHUa (n=138) y pacientes NIgA (n=29). Para ello, determinamos la intensidad de cada banda de proteína y la relativizamos respecto a la banda correspondiente en una muestra de referencia que corresponde a un control sano. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de estas proteínas están significativamente elevados en los pacientes respecto a los controles (Tabla 5, Figura 5). Estos resultados concuerdan con las cuantificaciones mediante ensayos ELISA descritas en pacientes de NIgA y GC3 (Medjeral-Thomas et al. 2017; Tortajada et al. 2017; Zhu et al. 2018). En general, nuestras cuantificaciones por WB también concuerdan con los resultados obtenidos mediante ensayos ELISA realizados en esta Tesis, que comentamos más adelante.

Aunque los niveles de FH y FHRs en las cohortes de pacientes están elevados respecto a los controles, hay una gran variabilidad interindividual, por lo que nos planteamos comparar el perfil de expresión, es decir, los niveles de FH y proteínas FHRs, en cada individuo. El análisis de los perfiles de expresión FH/FHRs en nuestras cohortes de controles y pacientes SHUa y NIgA, muestra que hay muchos perfiles diferentes, y para facilitar su análisis y la interpretación de los datos, realizamos un agrupamiento jerárquico no supervisado, que unifica perfiles de expresión similares. Este análisis nos

permite agrupar los diferentes perfiles en 10 clústeres (Figura 7). La distribución de los clústeres en las dos cohortes de pacientes es similar, y diferente a la distribución observada en los controles. En la cohorte SHUa los clústeres mayoritarios engloban perfiles de expresión caracterizados por niveles elevados de FHR-3, mientras que los clústeres mayoritarios en la cohorte NIgA agrupan perfiles de expresión con niveles elevados de FHR-1.

Como hemos mencionado anteriormente, los resultados obtenidos con la cuantificación mediante WB corroboran observaciones previas de que los pacientes tienen mayores niveles de FH y proteínas FHRs que los controles, lo que nos da cierta confianza en la utilidad cuantitativa de nuestro análisis de WB. No obstante, al comparar estos resultados con los obtenidos mediante nuestros propios ensayos ELISA, desarrollados posteriormente, observamos coincidencias en algunas muestras y discrepancias en otras. Durante el desarrollo de esta Tesis hemos introducido algunos cambios para mejorar la cuantificación por WB y hacerla más eficiente. Hemos cambiado algunos anticuerpos, y ahora podemos cuantificar también FHR-2, pero necesitamos mejorar la detección y cuantificación de las bandas para que sea un proceso completamente automático. Con el programa de análisis de imagen ImageQuant TL que hemos utilizado el proceso acaba siendo bastante manual y subjetivo, especialmente a la hora de determinar el área de cada banda de proteína y el tiempo óptimo de exposición. Una posibilidad que contemplamos es utilizar un programa de análisis de imágenes basado en inteligencia artificial.

Dado que en el grupo se habían descrito dos alelos del gen *CFHR3* que se diferenciaban por 2 SNPs en la región promotora, y uno de ellos (*CFHR3\*B*) se asociaba con mayor riesgo a SHUa (Bernabéu-Herrero et al. 2015), nos preguntamos si este alelo podría influir en los niveles de proteína y explicar así el aumento de los niveles de FHR-3 observado en los pacientes de SHUa. Para ello, se inició una colaboración con la Dra. Diana Wouters, que había desarrollado un ensayo ELISA específico para esta proteína (Pouw et al. 2016). En el contexto de esta colaboración, se decidió cuantificar también FH y el resto de proteínas FHRs en muestras de controles y pacientes SHUa de nuestras cohortes.

La cuantificación de FH y proteínas FHRs mediante ELISA nos ha permitido comparar sus valores en nuestras cohortes de controles y pacientes. El rango de variación de cada una de estas proteínas en los controles es muy amplio, siendo FH la proteína más abundante (106-395 µg/mL), seguida de FHR-1 (6,64-33,3 µg/mL), FHR-2 (0,94-6,37 µg/mL) y FHR-3, FHR-4 y FHR-5, con niveles similares (0,14-1,16; 0,09-4,5; y 0,63-2,43 µg/mL respectivamente).



Para determinar si el alelo *CFHR3\*B* generaba mayores niveles de FHR-3, se estratificaron las cohortes de controles y pacientes de SHUa en función del genotipo de *CFHR3* (alelos *CFHR3\*A*, *CFHR3\*B* y *CFHR3\*Del*) (Figura 10). En ambos casos, observamos que los individuos con 1 o 2 copias del alelo *CFHR3\*B* tienen niveles más elevados de FHR-3 que los individuos con 1 o 2 copias del alelo *CFHR3\*A*, aunque en los controles algunas diferencias no son significativas por el reducido tamaño muestral. Podemos afirmar, por tanto, que *CFHR3\*B* es un alelo de alta expresión que determina niveles de proteína más elevados, por lo que los niveles de FHR-3 no dependen sólo del número de copias de la variante  $\Delta CFHR3-CFHR1$ , sino también del número de copias de los alelos *CFHR3\*A* y *CFHR3\*B*. No obstante, cuando comparamos los niveles de FHR-3 en pacientes y controles con el mismo genotipo de *CFHR3*, observamos que en todos los casos los pacientes tenían mayores niveles de FHR-3 que los controles (Figura 11). Esta observación sugiere que los niveles de FHR-3, además de estar determinados genéticamente por el número de copias de los alelos *CFHR3\*A*, *CFHR3\*B* y *CFHR3\*Del*, también podrían verse afectados por el estado clínico de los pacientes.

Dado que el alelo *CFHR1\*B* también es un alelo de riesgo a SHUa (Abarrategui-Garrido et al. 2009) y además se encuentra asociado con el alelo de riesgo *CFHR3\*B* (Bernabéu-Herrero et al. 2015), nos preguntamos si podría influir en los niveles de FHR-1. Cuando estratificamos los controles y los pacientes de SHUa en función del genotipo de *CFHR1*, las únicas diferencias observadas en los niveles plasmáticos de FHR-1 se debían al número de copias de la variante  $\Delta CFHR3-CFHR1$ , y eran independientes del número de copias de los alelos *CFHR1\*A* y *CFHR1\*B*. Por tanto, podemos concluir que el alelo de riesgo a SHUa *CFHR1\*B* no influye en los niveles plasmáticos de FHR-1. No obstante, decidimos comparar los niveles de esta proteína entre controles y pacientes con el mismo genotipo. Al igual que lo observado en FHR-3, los niveles de FHR-1 son mayores en pacientes que en controles con el mismo genotipo (Figura 13). Por tanto, también los niveles de FHR-1 podrían verse afectados por el estado clínico de los pacientes.

Los niveles de FHR-4A, aunque mucho menores que los de FH, FHR-1 y FHR-2, también presentan una gran variabilidad. En el grupo se había estudiado la posible asociación del polimorfismo c.626G>A del gen *CFHR4* (rs7417769) con los niveles de plasmáticos de FHR-4A. El análisis de este polimorfismo en controles y pacientes SHUa nos permitió determinar que la variante alélica A era más frecuente en los pacientes que en los controles y que se asociaba con el alelo de riesgo a SHUa *CFHR3\*B* (Gómez Delgado et al 2017). Para unificar criterios con las variantes alélicas *CFHR1\*B* y *CFHR3\*B*, decidimos denominar *CFHR4\*B* a la variante más frecuente en los pacientes (c.626A), y analizar si la misma explicaba los elevados niveles de FHR-4A que se observan en los pacientes.

Cuando estratificamos las cohortes de controles y pacientes según el genotipo de *CFHR4* no observamos diferencias en los niveles de FHR-4A entre los distintos genotipos (Figura 14). Si se comparan controles y pacientes, sólo se observan diferencias significativas en los niveles de FHR-4A en el genotipo *CFHR4\*A/A*, pero no en los otros genotipos. Por tanto, concluimos que la variante *CFHR4\*B* no parece influir en los niveles plasmáticos de la proteína FHR-4A.

Los resultados de los niveles de FHR-4A, junto con los obtenidos en FHR-3 y FHR-1, nos hacen pensar que las concentraciones plasmáticas de las proteínas FHRs podrían estar influidas por el estado clínico de los pacientes. Se ha descrito que factores ambientales como las infecciones pueden provocar variaciones esporádicas en los niveles de proteínas FHRs (Närkiö-Mäkelä et al. 2001), y también que el daño renal podría provocar un aumento de los mismos (Medjeral-Thomas et al. 2017). La pregunta, por tanto, sería si los niveles elevados que se observan en los pacientes, tanto de SHUa como de NIgA, son causa o consecuencia del proceso patológico. Para responder a esta pregunta sería necesario realizar estudios prospectivos, en los que fuera posible obtener muestras seriadas de los pacientes en distintos momentos de su evolución clínica.

Como en esta Tesis se han realizado estudios retrospectivos, las cohortes de los pacientes incluían muestras obtenidas en diferentes momentos de su evolución, desde el momento del debut hasta varios años después, y con distinto grado de función renal, circunstancias que condicionan y complican la interpretación de los resultados. Para tratar de aproximar estas cuestiones con los datos disponibles, se decidió analizar si los niveles de FH y proteínas FHRs variaban según el tiempo transcurrido entre el debut de la enfermedad y la obtención de la muestra. Como se observa en la figura 15, en las muestras de pacientes obtenidas durante el primer mes del debut sólo FHR-2 y FHR-3 están significativamente elevadas, mientras que en las muestras de pacientes obtenidas en etapas posteriores esta elevación se observa en todas las proteínas. Del mismo modo, los niveles de todas las proteínas FHRs están significativamente elevados en los pacientes que no llegan a recuperar la función renal durante el primer episodio (figura 16).

Paralelamente, nuestro grupo puso a punto ensayos ELISA para cuantificar FH y proteínas FHRs (excepto FHR-3), en muestras de plasma de 69 de pacientes de NIgA y 79 controles. Las características demográficas de nuestra cohorte control no son totalmente equiparables a las de la cohorte de NIgA, observándose diferencias en la edad media (49 años en pacientes y 31 en controles) y en el porcentaje de mujeres (31% en pacientes y 66% en controles) que pueden condicionar la interpretación de los resultados. Las diferencias de edad entre las 2 cohortes no es probable que afecten a los niveles de proteínas FHRs, dado que estos niveles se estabilizan alrededor de los 3 años (van Beek et al. 2018);

los niveles de FH sí que aumentan ligeramente con la edad (Esparza-Gordillo et al. 2004), pero no parece que las diferencias que observamos puedan explicarse exclusivamente por esta circunstancia. Tampoco el género parece afectar a los niveles de FH y proteínas FHRs (van Beek et al. 2018), por lo que consideramos que las diferencias observadas no se deben a la diferente proporción de hombres y mujeres en las cohortes.

Cuando comparamos los niveles de FH y proteínas FHRs en controles y pacientes de NIgA observamos que los pacientes tenían niveles de FHR-1 más elevados, situación que concuerda con lo descrito en otras cohortes (Tortajada et al. 2017; Medjeral-Thomas et al. 2017). Los niveles de FH, FHR-2 y FHR-4A también estaban más elevados en los pacientes, mientras que en FHR-5 no observamos diferencias. Este último resultado nos sorprendió porque contrasta con los resultados de las otras cohortes de NIgA, en las que los niveles de FHR-5 son mayores que en los controles (Guo et al. 2021; Medjeral-Thomas et al. 2017; Zhu et al. 2018). Esta discrepancia podría deberse a diferencias en la situación clínica de los pacientes estudiados, ya que en nuestra cohorte el porcentaje de pacientes con insuficiencia renal terminal es muy bajo, y es en estos pacientes en los que se han observado los mayores niveles de FHR-5.

Los niveles elevados de FHR-1 también se han asociado con progresión de la enfermedad, y además correlacionan inversamente con la TFG, algo que no se observa con FHR-5. En nuestra cohorte sólo pudimos analizar la correlación entre los niveles de FH y FHRs y la TFG en 19 pacientes, en los cuales el tiempo transcurrido entre la determinación de la TFG y los niveles plasmáticos de FH y proteínas FHRs era inferior a 4 meses. Aun así, observamos que en estos pacientes los niveles de FHR-1 (pero no los de FHR-5) correlacionan inversamente con la TFG, correlación que también se observa con los niveles de FHR-2 y FHR-4A. Habría que realizar estos análisis en un número mayor de pacientes, y emplear la misma muestra para cuantificar FH y proteínas FHRs y determinar parámetros de función renal (TFG, proteinuria y creatinina).

## 2. Relevancia de las Proteínas FH y FHRs en SP-SHU

El principal mecanismo patogénico en el SHUa primario es una activación exacerbada del Complemento, como consecuencia principalmente de la desregulación de la VA, mientras que en el SHUa secundario a infecciones por *S.pneumoniae* (SP-SHU) el principal mecanismo patogénico se atribuye a la acción de la neuraminidasa bacteriana. No obstante, cada vez hay más pruebas de que en el SP-SHU también hay activación, al menos transitoria, del Complemento. En varios estudios se ha visto que los niveles plasmáticos de C3 y C4 están disminuidos en la fase aguda de la enfermedad, lo que sugiere activación del Complemento y consumo de sus componentes (Bitzan et al. 2018; Gilbert, Nagra, and Haq 2013; Szilágyi et al. 2013). Esta activación transitoria del Complemento también se ha observado en la cohorte de SP-SHU analizada en esta Tesis. En nuestro caso, sólo disponíamos de muestras en fase aguda de dos pacientes (H837 y H946), que presentan niveles bajos de C3 y C4; las muestras del resto de los pacientes se obtuvieron en remisión y tenían niveles normales de C3 y C4, salvo el paciente H171, que tiene autoanticuerpos anti-FH.

La activación transitoria del Complemento en el SP-SHU ha hecho que se haya comenzado a estudiar la posible contribución de variantes patogénicas en los genes *CFH*, *MCP*, *CFI*, *CFB*, *C3* y *CFHRs* en estos pacientes. En un estudio retrospectivo de 5 casos húngaros, se observó que 3 de ellos presentaban mutaciones en genes previamente asociados con SHUa (Szilágyi et al. 2013). Nosotros hemos podido realizar el estudio genético completo del Complemento en 9 pacientes e identificado 6 variantes genéticas raras en 5 de ellos. Tres pacientes tienen variantes en los genes *CFHR3* (H150) o *CFHR5* (H619 y H731) que generan alelos nulos, causando haploinsuficiencia de las proteínas FHR-3 o FHR-5. En infecciones por *Neisseria meningitidis*, que tiene la capacidad de unir FH para protegerse de la acción del Complemento, se ha descrito que FHR-3 puede competir con FH por su unión a la bacteria, disminuyendo así su supervivencia (Caesar et al. 2014). Dado que uno de los mecanismos de evasión del sistema inmune que tiene *S.pneumoniae* es la capacidad para reclutar FH, es posible que FHR-3 también pueda competir con FH en estos casos, de forma que una deficiencia de FHR-3, o en su defecto una disminución en los niveles, podría ser ventajosa para la supervivencia de la bacteria. Sin embargo, la variante genética  $\Delta CFHR3-CFHR1$ , que no produce FHR-3, es un polimorfismo relativamente frecuente y no hay ninguna prueba de que predisponga a estas infecciones. En el caso de FHR-5, se ha descrito que puede activar el Complemento por sí mismo (Csincsi et al. 2015) por lo que la haploinsuficiencia de esta proteína podría disminuir la activación del Complemento y aumentar la susceptibilidad a infecciones. Por otra parte, la misma mutación de *CFHR5* del paciente

H619 se ha descrito también en pacientes de GC3 (Vernon et al. 2012), por lo que también podría predisponer a patología renal.

La relevancia patogénica de las otras tres variantes encontradas en nuestros pacientes de SP-SHU se desconoce. La variante c.368A>G (p.Asn123Ser) en *CFHR5* (paciente H731) es probablemente benigna, ya que sólo conlleva la pérdida de un sitio de N-glicosilación en la proteína FHR-5. La variante c.223G>A (p. Gly75Arg) en *C1QB* (paciente H859), se describió en 1 paciente con enfermedad inflamatoria intestinal, y la predicción sugiere que podría afectar a la función de la proteína; es posible que esta variante genere un C1q con menor capacidad para activar la vía clásica, que es la vía principal de activación del Complemento en las infecciones por *S.pneumoniae*, por lo que su presencia podría ser ventajosa para la supervivencia de la bacteria. Por último, la variante c.1534+5G>T (rs114013791) en *CFI* (paciente H640) se ha descrito en varios pacientes con SHU, todos ellos con niveles normales de FI; dado que esta variante se encuentra en el 1,55% de los controles europeos, su contribución al SHUa es dudosa.

Hemos analizado también los polimorfismos *MCPggaac*, *CFH(H3)*, *CFHR3\*B*, y *CFHR1\*B*, asociados con riesgo a SHUa, comparando su frecuencia en la cohorte SP-SHU con la frecuencia en la cohorte control y en los demás casos de SHUa. Dado el pequeño tamaño de la cohorte SP-SHU (n=11) no podemos sacar conclusiones estadísticamente significativas; no obstante, observamos que el haplotipo de riesgo *MCPggaac* está infrarrepresentado en esta cohorte, con una frecuencia de 0,111 frente al 0,414 observado en SHUa. Este resultado sugiere que el regulador de membrana *MCP* no juega un papel importante en la patogénesis del SP-SHU, pero para confirmarlo habría que analizar un número mayor de pacientes. Por el contrario, las frecuencias de los polimorfismos de riesgo *CFHR3\*B* (0,346) y *CFHR1\*B* (0,615) en nuestra cohorte de SP-SHU son mayores que las frecuencias observadas en la cohorte control (0,242 y 0,368, respectivamente) y comparables a las frecuencias observadas en la cohorte completa de SHUa (0,355 y 0,467, respectivamente). Este resultado sugiere que los polimorfismos *CFHR3\*B* y *CFHR1\*B* también pueden ser factores de predisposición al SP-SHU. Estos polimorfismos de riesgo están en desequilibrio de ligamiento y generalmente segregan juntos en el haplotipo extendido *CFH(H3)-CFHR3\*B-CFHR1\*B* (Bernabéu-Herrero et al. 2015), que se ha asociado con niveles bajos de FH y elevados de FHR-3; la posible contribución del desequilibrio en la ratio FHR-3/FH al desarrollo del SP-SHU requerirá más investigación.

El análisis de FH y las proteínas FHRs por WB reveló que en 6 de los pacientes (2 españoles y 4 húngaros) se observaba una disminución del tamaño molecular en la muestra obtenida en fase aguda, tamaño que se recuperaba en la muestra en remisión. La disminución del tamaño molecular se debe a la eliminación de los ácidos siálicos de las proteínas por acción de la neuraminidasa bacteriana, y es más evidente en las proteínas con mayor número o complejidad de carbohidratos (FH, FHR-1, FHR-3 y FHR-4A) y más sutil en las demás proteínas (FHR-2 y FHR-5). No es la primera vez que se observa este fenómeno de desialilación de proteínas en pacientes con infecciones por *S.pneumoniae*, aunque nunca antes se había descrito en proteínas del Complemento. En pacientes con enfermedad neumocócica invasiva (con y sin sintomatología compatible con SHU), se ha descrito desialilación de la transferrina por acción de la neuraminidasa. La transferrina circula en plasma como una única isoforma de unos 75-80kDa, y cuando se eliminan los ácidos siálicos aparecen diferentes isoformas que corresponden a formas hiposialiladas (Burin Des Roziers et al. 2015). En nuestro caso, observamos que las proteínas FHR-1 y FHR-3, que presentan un patrón bidimensional con varias isoformas, tenían un patrón mucho más sencillo tras la pérdida de los ácidos siálicos (Figura 15). Además, las muestras de los pacientes en los que observamos desialilación de FH y de las proteínas FHRs, también tienen la transferrina desialilada. Todas estas observaciones sugieren que la desialilación de las proteínas plasmáticas es un fenómeno frecuente en los primeros días de las infecciones por *S.pneumoniae*.

Por otro lado, el grado de desialilación (es decir, el grado de disminución del tamaño molecular) de FH y proteínas FHRs en las muestras de nuestros 6 pacientes no es el mismo, y esta diferencia podría deberse a la diferente actividad neuraminidasa de cada muestra. Todos los serotipos de *S.pneumoniae* secretan neuraminidasas, pero es posible que haya diferencias en la cantidad o en la actividad neuraminidasa entre subtipos, y que estas diferencias influyan en el desarrollo del SHU. En nuestra cohorte no hemos podido identificar los serotipos de neumococo responsables en cada caso. Desde la introducción de las vacunas PCV7 (año 2000) y PCV13 (año 2010) las infecciones por neumococo se deben en general a serotipos que no están incluidos en ellas; a pesar de ello, uno de los serotipos más frecuentemente asociado con SP-SHU es el 19A (incluido en la PCV13) (Scobell, Kaplan, and Copelovitch 2020).

Otro dato a tener en cuenta es que *S.pneumoniae* expresa varios tipos de neuraminidasa (*NanA*, *NanB* y *NanC*). La neuraminidasa *NanA* está presente en todos los serotipos y parece ser la principal responsable de la desialilación. La neuraminidasa *NanC* por el contrario, no está presente en todas las cepas, y algunos autores proponen que podría tener un efecto aditivo a las otras neuraminidasas y favorecer el desarrollo de SHU en casos de enfermedad neumocócica invasiva (Janapatla et al. 2013).

La cuantificación de la actividad neuraminidasa en las muestras de nuestros pacientes revela que hay una gran variabilidad, y no se observa una relación clara entre dicha actividad y el grado de desialilación de FH y proteínas FHRs; no obstante, la muestra con mayores niveles de actividad neuraminidasa (la correspondiente al debut del paciente H837) es también la que presenta el mayor grado de desialilación. Estos resultados no son sorprendentes, ya que se ha descrito que hay grandes variaciones en la actividad neuraminidasa en los pacientes con infecciones por *S.pneumoniae*. No obstante, hay controversia en cuanto a la correlación de la actividad neuraminidasa con el desarrollo o la gravedad de la patología; algunos estudios muestran que los pacientes con SP-SHU tienen mayor actividad neuraminidasa que los que no desarrollan SHU (Burin Des Roziers et al. 2015; De Loos et al. 2002), mientras que otros estudios no corroboran esta información (Singh et al. 2016; Smith et al. 2013). Estas discrepancias pueden deberse al tipo de estudio realizado, ya que los estudios que encuentran correlación se han realizado con el plasma de los pacientes, mientras que los estudios en los que no se observa corresponden a experimentos de cultivos celulares “in vitro”.

La eliminación transitoria de los ácidos siálicos de FH y proteínas FHRs por la neuraminidasa neumocócica podría contribuir al mecanismo patogénico del SP-SHU. Las consecuencias funcionales de la desialilación de FH no se han analizado exhaustivamente, aunque estudios al respecto parecen indicar que su función no se ve afectada (Jouvin et al. 1984; Schmidt et al. 2011). Para corroborar estas observaciones, decidimos comparar la actividad reguladora de FH desialilado (dFH) “in vitro” y FH nativo, realizando ensayos funcionales en fase soluble y sobre superficies que se habían utilizado anteriormente para caracterizar mutantes de FH purificados de pacientes de SHUa (Sánchez-Corral et al. 2002).

Cuando analizamos la capacidad del dFH para unirse al C3b pegado a una microplaca, observamos que la desialilación aumentaba la unión (Figura 24); este resultado coincide con el aumento de la unión de FH recombinante parcialmente deglicosilado y desialilado, en experimentos realizados en biosensores (Schmidt et al. 2011). La capacidad de FH para actuar como cofactor de FI en la proteólisis de C3b en fase soluble o sobre superficies no se vio afectada por la eliminación de los ácidos siálicos, ya que no observamos diferencias entre el FH nativo y el desialilado (Figura 25). De nuevo, estos resultados coinciden con otros anteriores donde se analizó la actividad cofactora en fase soluble (Schmidt et al. 2011), por lo que podríamos concluir que los ácidos siálicos de FH no tienen ningún papel en la inactivación proteolítica de C3b a iC3b. Otra función de FH que no se ve afectada por la pérdida de los ácidos siálicos es su capacidad para disociar la convertasa C3bBb(P) preformada (Figura 26). Estos resultados difieren ligeramente de los observados con FH recombinante, y de resultados

anteriores que muestran mayor capacidad del FH deglicosilado para disociar la convertasa preformada sobre la superficie de eritrocitos (Jouvin et al. 1984; Schmidt et al. 2011). Estas diferencias podrían deberse a que en los trabajos anteriores se eliminan total o parcialmente las moléculas de carbohidratos del FH, mientras que nuestro caso sólo se quitan los ácidos siálicos.

Estos ensayos funcionales, que se realizaron con componentes purificados, no permiten analizar la contribución de los carbohidratos de las superficies celulares en la regulación por FH. Para estudiar también este efecto, realizamos dos tipos de ensayos hemolíticos con eritrocitos de carnero. Estos eritrocitos son capaces de unir el FH de un suero humano a las moléculas polianiónicas de su superficie, evitando así la lisis por el Complemento, pero la unión del FH no se produce cuando está mutado o el suero contiene anticuerpos anti-FH; en estos casos, los eritrocitos quedan desprotegidos frente al Complemento humano y se lisan (Abarrategui-Garrido et al. 2008).

En el primer ensayo hemolítico, los eritrocitos de carnero se incubaron con el suero de un paciente de SHUa con una mutación en el SCR20 de FH que no le permite unirse a los eritrocitos y protegerlos de la acción del Complemento (Sánchez-Corral et al. 2004). En el segundo ensayo, los eritrocitos de carnero se incubaron con un suero humano normal y anticuerpos monoclonales anti-FH que bloquean su unión a los eritrocitos, que se vuelven así susceptibles a la lisis por el Complemento (Strobel et al. 2011). Utilizando estos 2 formatos de ensayos hemolíticos, comparamos la capacidad de un FH exógeno, nativo o desialilado, para prevenir la lisis de los eritrocitos. En ambos ensayos observamos que el FH desialilado tiene menor capacidad para prevenir la lisis que el FH nativo (Figura 27), lo que sugiere que la desialilación de FH reduce su capacidad para regular el Complemento sobre superficies celulares.

En resumen, los ensayos funcionales con componentes purificados no muestran un papel relevante de los ácidos siálicos del FH en la disociación de la convertasa de C3 o en la inactivación proteolítica de C3b, pero los ensayos hemolíticos sí sugieren que la desialilación de FH podría alterar su interacción con los carbohidratos de las superficies celulares, y disminuir la regulación del Complemento sobre las mismas. Se necesitan más estudios para confirmar estos resultados en otras superficies celulares, así como para determinar el mecanismo por el cual la desialilación altera la regulación del FH en superficies, y establecer si la desregulación transitoria del Complemento tiene un papel relevante en la patogénesis del SP-SHU.

El papel del Complemento durante las infecciones bacterianas es complejo; su activación es necesaria para la eliminación del patógeno, pero una activación excesiva genera daño autólogo y podría



contribuir al desarrollo de patología renal. *S.pneumoniae*, al igual que *N. meningitidis*, son capaces de unir FH para evadir la acción del Complemento (Lu et al. 2008). Esta capacidad hace que los niveles de FH tengan gran importancia: los niveles elevados favorecerían la protección de los propios tejidos, pero también aumentarían la supervivencia del patógeno al incrementar sus posibilidades de evadir la acción del Complemento. Por el contrario, niveles bajos de FH disminuirían la capacidad del patógeno para evadir el Complemento, pero aumentarían el riesgo del daño autólogo. Este delicado equilibrio en los niveles de FH se complica todavía más por la presencia de las proteínas FHRs, que actúan como antagonistas de FH; la competencia entre estas proteínas podría ser especialmente relevante para controlar la activación del Complemento a nivel de superficies.

Como ya hemos mencionado, *N. meningitidis* es capaz de unir FH y FHR-3; por ello, nos preguntamos si *S.pneumoniae* también sería capaz de unir FHR-3 o alguna de las otras proteínas FHRs, de manera que los niveles de FH y proteínas FHRs fueran relevantes en el desarrollo de la patología. En la bibliografía se ha descrito una disminución en los niveles de FH y FHRs durante la fase aguda de las infecciones por *N. meningitidis*, que se recuperan durante la remisión (van Beek 2019, Ph.D Thesis). Por el contrario, en los pacientes de SP-SHU H837 y H946, nosotros observamos niveles elevados en la muestra aguda (sp1), que se recuperan en remisión (sp2) y se mantienen más o menos estables 1-4 años después (Figura 28). Esta discrepancia podría deberse a que en los casos de infecciones por *N. meningitidis* analizados no se desarrolla SHU, y podría ser esta patología la que determinara la elevación de los niveles de FH y FHRs durante la fase aguda. Si esta hipótesis fuera correcta, en situaciones de enfermedad neumocócica invasiva, los niveles de FH y FHRs podrían ser un factor predictor de riesgo a desarrollar SHU; para comprobarlo, habría que analizar los niveles en fase aguda y en remisión en una cohorte mayor de pacientes con SP-SHU, y también en pacientes con enfermedad neumocócica invasiva pero sin patología renal.

# **CONCLUSIONES**

**CONCLUSIONES**

- 1) La cuantificación de FH y proteínas FHRs mediante ensayos ELISA o mediante *Western-blot* muestra una gran variabilidad individual, tanto en controles como en pacientes.
- 2) En general, los pacientes tienen mayores niveles de FH y proteínas FHRs que los controles. Aunque no se identifican perfiles de expresión FH/FHRs exclusivos de pacientes o de controles, el perfil correspondiente a niveles elevados de FHR-3 se asocia con SHUa, y el correspondiente a niveles elevados de FHR-1 se asocia con NIgA.
- 3) Los niveles de FH y proteínas FHRs pueden verse afectados por la situación clínica y el deterioro de la función renal. Los pacientes de SHUa que no recuperan por completo la función renal tienen mayores niveles de FHR-2, FHR-4A y FHR-5. En los pacientes de NIgA, los niveles de FHR-1, FHR-2 y FHR-4A correlacionan inversamente con la tasa de filtración glomerular
- 4) Los niveles plasmáticos de FHR-3 están determinados en gran medida por el número de copias de los alelos *CFHR3\*A* (alelo de baja expresión), *CFHR3\*B* (alelo de alta expresión) y  $\Delta$ *CFHR3-CFHR1* (alelo nulo). La asociación del alelo *CFHR3\*B* con riesgo a SHUa explicaría los mayores niveles de FHR-3 observados en estos pacientes.
- 5) Los pacientes de SP-SHU pueden tener variantes genéticas raras en genes del Complemento, anticuerpos anti-FH y variantes comunes asociadas con riesgo a SHUa, por lo que habría que incluirlos en el cribado genético del Complemento.
- 6) En las infecciones por neumococo, la eliminación de los ácidos siálicos del FH por la neuraminidasa bacteriana podría reducir la capacidad del FH para regular el Complemento sobre las superficies celulares propias, y favorecer de esta forma el desarrollo del SHU.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abarrategui-Garrido, Cynthia, Rubén Martínez-Barricarte, Margarita López-Trascasa, Santiago Rodríguez De Córdoba, and Pilar Sánchez-Corral. 2009. "Characterization of Complement Factor H-Related (CFHR) Proteins in Plasma Reveals Novel Genetic Variations of CFHR1 Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome." *Blood* 114(19):4261–71. doi: 10.1182/blood-2009-05-223834.
- Abarrategui-Garrido, Cynthia, Marta Melgosa, Antonia Peña-Carrión, Elena Goicoechea de Jorge, Santiago Rodríguez de Córdoba, Margarita López-Trascasa, and Pilar Sánchez-Corral. 2008. "Mutations in Proteins of the Alternative Pathway of Complement and the Pathogenesis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome." *American Journal of Kidney Diseases* 52(1):171–80. doi: 10.1053/j.ajkd.2008.01.026.
- Abreira-Abeleda, M. A., C. Nishimura, J. L. H. Smith, S. Sethi, J. L. McRae, B. F. Murphy, G. Silvestri, C. Skerka, M. Józsi, P. F. Zipfel, G. S. Hageman, and R. J. H. Smith. 2006. "Variations in the Complement Regulatory Genes Factor H (CFH) and Factor H Related 5 (CFHR5) Are Associated with Membranoproliferative Glomerulonephritis Type II (Dense Deposit Disease)." *Journal of Medical Genetics* 43(7):582–89. doi: 10.1136/jmg.2005.038315.
- Andre, Greiciely O., Thiago R. Converso, Walter R. Politano, Lucio F. C. Ferraz, Marcelo L. Ribeiro, Luciana C. C. Leite, and Michelle Darrieux. 2017. "Role of Streptococcus Pneumoniae Proteins in Evasion of Complement-Mediated Immunity." *Frontiers in Microbiology* 8(FEB). doi: 10.3389/FMICB.2017.00224.
- Ansari, Morad, Paul M. Mckeigue, Christine Skerka, Caroline Hayward, Igor Rudan, Veronique Vitart, Ozren Polasek, Ana Maria Armbricht, John R. W. Yates, Zoran Vataavuk, Goran Bencic, Ivana Kolcic, Ben A. Oostra, Cornelia M. Van Duijn, Susan Campbell, Chloe M. Stanton, Jennifer Huffman, Xinhua Shu, Jane C. Khan, Humma Shahid, Simon P. Harding, Paul N. Bishop, I. J. Deary Ian J., Anthony T. Moore, Baljean Dhillon, Pavao Rudan, Peter F. Zipfel, Robert B. Sim, Nicholas D. Hastie, Harry Campbell, and Alan F. Wright. 2013. "Genetic Influences on Plasma CFH and CFHR1 Concentrations and Their Role in Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration." *Human Molecular Genetics* 22(23):4857–69. doi: 10.1093/hmg/ddt336.
- Athanasiou, Yiannis, Konstantinos Voskarides, Daniel P. Gale, Loukas Damianou, Charalambos Patsias, Michalis Zavros, Patrick H. Maxwell, H. Terence Cook, Panayiota Demosthenous, Andreas Hadjisavvas, Kyriacos Kyriacou, Ioanna Zouvani, Alkis Pierides, and Constantinos Deltas. 2011. "Familial C3 Glomerulopathy Associated with CFHR5 Mutations: Clinical Characteristics of 91 Patients in 16 Pedigrees." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 6(6):1436–46. doi: 10.2215/CJN.09541010.
- Bajic, Goran, Søren E. Degn, Steffen Thiel, and Gregers R. Andersen. 2015. "Complement Activation, Regulation, and Molecular Basis for Complement-related Diseases." *The EMBO Journal* 34(22):2735–57. doi: 10.15252/embj.201591881.
- Banerjee, Ritu, Adam L. Hersh, Jason Newland, Susan E. Beekmann, Philip M. Polgreen, Jeffrey Bender, Jana Shaw, Lawrence Copelovitch, Bernard S. Kaplan, Samir S. Shah, and Emerging Infections Network Hemolytic-Uremic Syndrome Study Group. 2011. "Streptococcus Pneumoniae-Associated Hemolytic Uremic Syndrome among Children in North America." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 30(9):736–39. doi: 10.1097/INF.0b013e3182191c58.
- Bayly-Jones, Charles, Doryen Bubeck, and Michelle A. Dunstone. 2017. "The Mystery behind Membrane Insertion: A Review of the Complement Membrane Attack Complex." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372(1726).

- van Beek, Anna E., Angela Kamp, Simone Kruithof, Ed J. Nieuwenhuys, Diana Wouters, Ilse Jongerius, Theo Rispens, Taco W. Kuijpers, and Kyra A. Gelderman. 2018. "Reference Intervals of Factor H and Factor H-Related Proteins in Healthy Children." *Frontiers in Immunology* 9(AUG). doi: 10.3389/fimmu.2018.01727.
- van Beek, Anna E., Richard B. Pouw, Mieke C. Brouwer, Gerard van Mierlo, Judy Geissler, Pleuni Ooijevaar-de Heer, Martin de Boer, Karin van Leeuwen, Theo Rispens, Diana Wouters, and Taco W. Kuijpers. 2017. "Factor H-Related (FHR)-1 and FHR-2 Form Homo- and Heterodimers, While FHR-5 Circulates Only As Homodimer in Human Plasma." *Frontiers in Immunology* 8(OCT):1328. doi: 10.3389/fimmu.2017.01328.
- Beltrame, Marcia H., Angelica B. W. Boldt, Sandra J. Catarino, Hellen C. Mendes, Stefanie E. Boschmann, Isabela Goeldner, and Iara Messias-Reason. 2015. "MBL-Associated Serine Proteases (MASPs) and Infectious Diseases." *Molecular Immunology* 67(1). doi: 10.1016/j.molimm.2015.03.245.
- Bernabéu-Herrero, Maria E., Miguel Jiménez-Alcázar, Jaouad Anter, Sheila Pinto, Daniel Sánchez Chinchilla, Sofia Garrido, Margarita López-Trascasa, Santiago Rodríguez de Córdoba, and Pilar Sánchez-Corral. 2015. "Complement Factor H, FHR-3 and FHR-1 Variants Associate in an Extended Haplotype Conferring Increased Risk of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome." *Molecular Immunology* 67(2):276–86. doi: 10.1016/j.molimm.2015.06.021.
- Bernabeu, Ana Isabel Avila, Teresa Cavero Escribano, and Mercedes Cao Vilarino. 2020. "Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: New Challenges in the Complement Blockage Era." *Nephron* 144(11):537–49.
- Bitzan, Martin, Omar AlKandari, Blair Whittemore, and Xiao ling Yin. 2018. "Complement Depletion and Coombs Positivity in Pneumococcal Hemolytic Uremic Syndrome (PnHUS). Case Series and Plea to Revisit an Old Pathogenetic Concept." *International Journal of Medical Microbiology* 308(8):1096–1104. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.08.007.
- Blaum, Bärbel S., Jonathan P. Hannan, Andrew P. Herbert, David Kavanagh, Dušan Uhrín, and Thilo Stehle. 2015. "Structural Basis for Sialic Acid-Mediated Self-Recognition by Complement Factor H." *Nature Chemical Biology* 11(1):77–82. doi: 10.1038/nchembio.1696.
- Bohlon, Suzanne S., Peter Garred, Claudia Kemper, and Andrea J. Tenner. 2019. "Complement Nomenclature-Deconvoluted." *Frontiers in Immunology* 10(JUN).
- Bresin, Elena, Erica Rurali, Jessica Caprioli, Pilar Sanchez-Corral, Veronique Fremeaux-Bacchi, Santiago Rodriguez De Cordoba, Sheila Pinto, Timothy H. J. Goodship, Marta Alberti, David Ribes, Elisabetta Valoti, Giuseppe Remuzzi, and Marina Noris. 2013. "Combined Complement Gene Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Influence Clinical Phenotype." *Journal of the American Society of Nephrology* 24(3):475–86. doi: 10.1681/ASN.2012090884/-/DCSUPPLEMENTAL.
- Burin Des Roziers, Nicolas, Philippe Chadebech, Gwellaouen Bodivit, Emmanuelle Guinchard, Arnaud Bruneel, Thierry Dupré, Laurent Chevret, Myriam Jugie, Philippe Gallon, Philippe Bierling, and France Noizat-Pirenne. 2015. "Red Blood Cell Thomsen-Friedenreich Antigen Expression and Galectin-3 Plasma Concentrations in Streptococcus Pneumoniae-Associated Hemolytic Uremic Syndrome and Hemolytic Anemia." *Transfusion* 55(6):1563–71. doi: 10.1111/trf.12981.
- Caesar, Joseph JE, Hayley Lavender, Philip N. Ward, Rachel M. Exley, Jack Eaton, Emily Chittock, Talat H. Malik, Elena Goicoechea De Jorge, Matthew C. Pickering, Christoph M. Tang, and

- Susan M. Lea. 2014. “Competition between Antagonistic Complement Factors for a Single Protein on N. Meningitidis Rules Disease Susceptibility.” *ELife* 3. doi: 10.7554/eLife.04008.
- Carroll, Maria V., and Robert B. Sim. 2011. “Complement in Health and Disease.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 63(12):965–75. doi: 10.1016/j.addr.2011.06.005.
- Challis, Rachel C., Geisilaine S. R. Araujo, Edwin K. S. Wong, Holly E. Anderson, Atif Awan, Anthony M. Dorman, Mary Waldron, Valerie Wilson, Vicky Brocklebank, Lisa Strain, B. Paul Morgan, Claire L. Harris, Kevin J. Marchbank, Timothy H. J. Goodship, and David Kavanagh. 2016. “A De Novo Deletion in the Regulators of Complement Activation Cluster Producing a Hybrid Complement Factor H/Complement Factor H-Related 3 Gene in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome.” *J Am Soc Nephrol* 27:1617–24. doi: 10.1681/ASN.2015010100.
- Chen, Qian, Michael Wiesener, Hannes U. Eberhardt, Andrea Hartmann, Barbara Uzonyi, Michael Kirschfink, Kerstin Amann, Maike Buettner, Tim Goodship, Christian Hugo, Christine Skerka, and Peter F. Zipfel. 2014. “Complement Factor H-Related Hybrid Protein Deregulates Complement in Dense Deposit Disease.” *Journal of Clinical Investigation* 124(1). doi: 10.1172/JCI71866.
- Cipriani, Valentina, Laura Lorés-Motta, Fan He, Dina Fathalla, Viranga Tilakaratna, Selina McHarg, Nadhim Bayatti, İlhan E. Acar, Carel B. Hoyng, Sascha Fauser, Anthony T. Moore, John RW Yates, Eiko K. de Jong, B. Paul Morgan, Anneke I. den Hollander, Paul N. Bishop, and Simon J. Clark. 2020. “Increased Circulating Levels of Factor H-Related Protein 4 Are Strongly Associated with Age-Related Macular Degeneration.” *Nature Communications* 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-14499-3.
- De Córdoba, S. Rodríguez, and E. Goicoechea De Jorge. 2008. “Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Genetics and Disease Associations of Human Complement Factor H.” *Clinical and Experimental Immunology* 151(1):1–13. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03552.x.
- Cserhalmi, Marcell, Alexandra Papp, Bianca Brandus, Barbara Uzonyi, and Mihály Józsi. 2019. “Regulation of Regulators: Role of the Complement Factor H-Related Proteins.” *Seminars in Immunology* 45.
- Csincsi, Ádám I., Anne Kopp, Miklós Zöldi, Zsófia Bánlaki, Barbara Uzonyi, Mario Hebecker, Joseph J. E. Caesar, Matthew C. Pickering, Kenji Daigo, Takao Hamakubo, Susan M. Lea, Elena Goicoechea de Jorge, and Mihály Józsi. 2015. “Factor H-Related Protein 5 Interacts with Pentraxin 3 and the Extracellular Matrix and Modulates Complement Activation.” *The Journal of Immunology* 194(10):4963–73. doi: 10.4049/jimmunol.1403121.
- Csincsi, Ádám I., Zsóka Szabó, Zsófia Bánlaki, Barbara Uzonyi, Marcell Cserhalmi, Éva Kárpáti, Agustín Tortajada, Joseph J. E. Caesar, Zoltán Prohászka, T. Sakari Jokiranta, Susan M. Lea, Santiago Rodríguez de Córdoba, and Mihály Józsi. 2017. “FHR-1 Binds to C-Reactive Protein and Enhances Rather than Inhibits Complement Activation.” *The Journal of Immunology* 199(1):292–303. doi: 10.4049/jimmunol.1600483.
- Eberhardt, Hannes U., Denise Buhlmann, Peter Hortschansky, Qian Chen, Sascha Böhm, Markus J. Kemper, Reinhard Wallich, Andrea Hartmann, Teresia Hallström, Peter F. Zipfel, and Christine Skerka. 2013. “Human Factor H-Related Protein 2 (CFHR2) Regulates Complement Activation.” edited by C. M. Stover. *PloS One* 8(11):e78617. doi: 10.1371/journal.pone.0078617.
- Esparza-Gordillo, Jorge, José Manuel Soria, Alfonso Buil, Laura Almasy, John Blangero, Jordi

- Fontcuberta, and Santiago Rodríguez De Córdoba. 2004. "Genetic and Environmental Factors Influencing the Human Factor H Plasma Levels." *Immunogenetics* 56(2):77–82. doi: 10.1007/s00251-004-0660-7.
- Eyler, Stephen J., Nicole C. Meyer, Yuzhou Zhang, Xue Xiao, Carla M. Nester, and Richard J. H. Smith. 2013. "A Novel Hybrid CFHR1/CFH Gene Causes Atypical Hemolytic Uremic Syndrome." *Pediatric Nephrology* 28(11):2221–25. doi: 10.1007/s00467-013-2560-2.
- Fenaille, François, Maxime Le Mignon, Catherine Groseil, Christine Ramon, Sandrine Riandé, Laurent Siret, and Nicolas Bihoreau. 2007. "Site-Specific N-Glycan Characterization of Human Complement Factor H." *Glycobiology* 17(9):932–44. doi: 10.1093/glycob/cwm060.
- Ferreira, Viviana P., Michael K. Pangburn, and Claudio Cortés. 2010. "Complement Control Protein Factor H: The Good, the Bad, and the Inadequate." *Molecular Immunology* 47(13):2187–97.
- Franchini, Massimo. 2015. "Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: From Diagnosis to Treatment." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 53(11):1679–88. doi: 10.1515/CCLM-2015-0024.
- Francis, Nigel J., Bairbre McNicholas, Atif Awan, Mary Waldron, Donal Reddan, Denise Sadlier, David Kavanagh, Lisa Strain, Kevin J. Marchbank, Claire L. Harris, \* Timothy, and H. J. Goodship. 2012. "A Novel Hybrid CFH/CFHR3 Gene Generated by a Microhomology-Mediated Deletion in Familial Atypical Hemolytic Uremic Syndrome." doi: 10.1182/blood-2011-03.
- Friese, M. A., J. Hellwage, T. S. Jokiranta, S. Meri, H. J. Müller-Quernheim, H. H. Peter, H. Eibel, and P. F. Zipfel. 2000. "Different Regulation of Factor H and FHL-1/Reconectin by Inflammatory Mediators and Expression of the Two Proteins in Rheumatoid Arthritis (RA)." *Clinical and Experimental Immunology* 121(2):406–15. doi: 10.1046/j.1365-2249.2000.01285.x.
- Gale, Daniel P., Elena Goicoechea De Jorge, H. Terence Cook, Rubén Martínez-Barricarte, Andreas Hadjisavvas, Adam G. McLean, Charles D. Pusey, Alkis Pierides, Kyriacos Kyriacou, Yiannis Athanasiou, Konstantinos Voskarides, Constantinos Deltas, Andrew Palmer, Véronique Frémeaux-Bacchi, Santiago Rodríguez De Córdoba, Patrick H. Maxwell, and Matthew C. Pickering. 2010. "Identification of a Mutation in Complement Factor H-Related Protein 5 in Patients of Cypriot Origin with Glomerulonephritis." *The Lancet* 376(9743):794–801. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60670-8.
- Gharavi, Ali G., Krzysztof Kiryluk, Murim Choi, Yifu Li, Ping Hou, Jingyuan Xie, Simone Sanna-Cherchi, Clara J. Men, Bruce A. Julian, Robert J. Wyatt, Jan Novak, John C. He, Haiyan Wang, Jicheng Lv, Li Zhu, Weiming Wang, Zhaohui Wang, Kasuhito Yasuno, Murat Gunel, Shrikant Mane, Sheila Umlauf, Irina Tikhonova, Isabel Beerman, Silvana Savoldi, Riccardo Magistroni, Gian Marco Ghiggeri, Monica Bodria, Francesca Lugani, Pietro Ravani, Claudio Ponticelli, Landino Allegri, Giuliano Boscutti, Giovanni Frasca, Alessandro Amore, Licia Peruzzi, Rosanna Coppo, Claudia Izzi, Battista Fabio Viola, Elisabetta Prati, Maurizio Salvadori, Renzo Mignani, Loreto Gesualdo, Francesca Bertinetto, Paola Mesiano, Antonio Amoroso, Francesco Scolari, Nan Chen, Hong Zhang, and Richard P. Lifton. 2011. "Genome-Wide Association Study Identifies Susceptibility Loci for IgA Nephropathy." *Nature Genetics* 43(4):321–29. doi: 10.1038/ng.787.
- Gilbert, Rodney D., Arvind Nagra, and Mushfequr R. Haq. 2013. "Does Dysregulated Complement Activation Contribute to Haemolytic Uraemic Syndrome Secondary to Streptococcus Pneumoniae?" *Medical Hypotheses* 81(3):400–403. doi: 10.1016/j.mehy.2013.05.030.



- Goicoechea De Jorge, Elena, Joseph J. E. Caesar, Talat H. Malik, Mitali Patel, Matthew Colledge, Steven Johnson, Svetlana Hakobyan, B. Paul Morgan, Claire L. Harris, Matthew C. Pickering, and Susan M. Lea. 2013. “Dimerization of Complement Factor H-Related Proteins Modulates Complement Activation in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(12):4685–90. doi: 10.1073/pnas.1219260110.
- Gómez Delgado, Irene, César Vélez, and Pilar Sánchez-Corral. 2017. “Quantitative Western-blot profiles of factor H and Factor H-Related Proteins in atypical Haemolytic Uraemic Syndrome and C3 Glomerulopathy” *Abstract 16th European Meeting on Complement in Human Disease 2017*.
- Gómez Delgado, Irene, and Pilar Sánchez-Corral. 2021. “Contribución de Variantes Funcionales y Cuantitativas Del Factor H y Las Proteínas FHRs (Factor H-Related Proteins) Del Complemento En Patología Renal.” *Nefrología*. doi: 10.1016/j.nefro.2021.07.003.
- Gordon, D. L., R. M. Kaufman, T. K. Blackmore, J. Kwong, and D. M. Lublin. 1995. “Identification of Complement Regulatory Domains in Human Factor H.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155(1):348–56.
- Guo, Wei yi, Li jun Sun, Hong rui Dong, Guo qin Wang, Xiao yi Xu, Zhi rui Zhao, and Hong Cheng. 2021. “Glomerular Complement Factor H-Related Protein 5 Is Associated with Histologic Injury in Immunoglobulin A Nephropathy.” *Kidney International Reports* 6(2):404–13. doi: 10.1016/j.ekir.2020.11.019.
- Gutiérrez, Eduardo, Fernando Carvaca-Fontán, Leonella Luzardo, Enrique Morales, Marina Alonso, and Manuel Praga. 2020. “A Personalized Update on IgA Nephropathy: A New Vision and New Future Challenges.” *Nephron* 144(11):555–71.
- Hageman, Gregory S., Don H. Anderson, Lincoln V. Johnson, Lisa S. Hancox, Andrew J. Taiber, Lisa I. Hardisty, Jill L. Hageman, Heather A. Stockman, James D. Borchardt, Karen M. Gehrs, Richard J. H. Smith, Giuliana Silvestri, Stephen R. Russell, Caroline C. W. Klaver, Irene Barbazetto, Stanley Chang, Lawrence A. Yannuzzi, Gaetano R. Barile, John C. Merriam, R. Theodore Smith, Adam K. Olsh, Julie Bergeron, Jana Zernant, Joanna E. Merriam, Bert Gold, Michael Dean, and Rando Allikmets. 2005. “A Common Haplotype in the Complement Regulatory Gene Factor H (HF1/CFH) Predisposes Individuals to Age-Related Macular Degeneration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(20):7227–32. doi: 10.1073/pnas.0501536102.
- Hakobyan, Svetlana, Claire L. Harris, Agustín Tortajada, Elena Goicochea De Jorge, Alfredo Garcia-Layana, Patricia Fernandez-Robredo, Santiago Rodriguez De Cordoba, and B. Paul Morgan. 2008. “Measurement of Factor H Variants in Plasma Using Variant-Specific Monoclonal Antibodies: Application to Assessing Risk of Age-Related Macular Degeneration.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 49(5):1983–90. doi: 10.1167/iovs.07-1523.
- Hassler, Jared R. 2020. “IgA Nephropathy: A Brief Review.” *Seminars in Diagnostic Pathology* 37(3):143–47. doi: 10.1053/j.semdp.2020.03.001.
- Hebecker, Mario, and Mihály Józsi. 2012. “Factor H-Related Protein 4 Activates Complement by Serving as a Platform for the Assembly of Alternative Pathway C3 Convertase via Its Interaction with C3b Protein.” *Journal of Biological Chemistry* 287(23):19528–36. doi: 10.1074/jbc.M112.364471.
- Hellwege, Jens, T. Sakari Jokiranta, Vesa Koistinen, Outi Vaarala, Seppo Meri, and Peter F. Zipfel. 1999. “Functional Properties of Complement Factor H-Related Proteins FHR-3 and FHR-4:

- Binding to the C3d Region of C3b and Differential Regulation by Heparin.” *FEBS Letters* 462(3):345–52. doi: 10.1016/S0014-5793(99)01554-9.
- Herbert, Andrew P., Elisavet Makou, Zhuo A. Chen, Heather Kerr, Anna Richards, Juri Rappsilber, and Paul N. Barlow. 2015. “Complement Evasion Mediated by Enhancement of Captured Factor H: Implications for Protection of Self-Surfaces from Complement.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195(10):4986–98. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1501388.
- Holmes, Lucy V., Lisa Strain, Scott J. Staniforth, Iain Moore, Kevin Marchbank, David Kavanagh, Judith A. Goodship, Heather J. Cordell, and Timothy H. J. Goodship. 2013. “Determining the Population Frequency of the CFHR3/CFHR1 Deletion at 1q32.” *PLoS ONE* 8(4):60352. doi: 10.1371/journal.pone.0060352.
- Huerta, Ana, Emilia Arjona, Jose Portoles, Paula Lopez-Sanchez, Cristina Rabasco, Mario Espinosa, Teresa Cavero, Miquel Blasco, Mercedes Cao, Joaquin Manrique, Virginia Cabello-Chavez, Marta Suñer, Manuel Heras, Xavier Fulladosa, Lara Belmar, Amparo Sempere, Carmen Peralta, Lorena Castillo, Alvaro Arnau, Manuel Praga, and Santiago Rodriguez de Cordoba. 2018. “A Retrospective Study of Pregnancy-Associated Atypical Hemolytic Uremic Syndrome.” *Kidney International* 93(2):450–59. doi: 10.1016/j.kint.2017.06.022.
- Hughes, Anne E., Nick Orr, Hossein Esfandiary, Martha Diaz-Torres, Timothy Goodship, and Usha Chakravarthy. 2006. “A Common CFH Haplotype, with Deletion of CFHR1 and CFHR3, Is Associated with Lower Risk of Age-Related Macular Degeneration.” *Nature Genetics* 38(10):1173–77. doi: 10.1038/ng1890.
- Janapatla, R. P., M. H. Hsu, Y. C. Hsieh, H. Y. Lee, T. Y. Lin, and C. H. Chiu. 2013. “Necrotizing Pneumonia Caused by NanC-Carrying Serotypes Is Associated with Pneumococcal Haemolytic Uraemic Syndrome in Children.” *Clinical Microbiology and Infection* 19(5):480–86. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03894.x.
- Johnson, Sally, and Aoife Waters. 2012. “Is Complement a Culprit in Infection-Induced Forms of Haemolytic Uraemic Syndrome?” *Immunobiology* 217(2):235–43. doi: 10.1016/j.imbio.2011.07.022.
- De Jorge, Elena Goicoechea, Agustín Tortajada, Sheila Pinto García, Sara Gastoldi, Héctor Martín Merinero, Jesús García-Fernández, Emilia Arjona, Mercedes Cao, Giuseppe Remuzzi, Marina Noris, and Santiago Rodríguez De Córdoba. 2018. “Factor H Competitor Generated by Gene Conversion Events Associates with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome.” *Journal of the American Society of Nephrology* 29(1):240–49. doi: 10.1681/ASN.2017050518.
- Jouvin, M. H., M. D. Kazatchkine, A. Cahour, and N. Bernard. 1984. “Lysine Residues, but Not Carbohydrates, Are Required for the Regulatory Function of H on the Amplification C3 Convertase of Complement.” *J Immunol* 133(6):3250–54.
- Józsi, Mihály, Heiko Richter, Ina Löschmann, Christine Skerka, Friedrich Buck, Ulrike Beisiegel, Anna Erdei, and Peter F. Zipfel. 2005. “FHR-4A: A New Factor H-Related Protein Is Encoded by the Human FHR-4 Gene.” *European Journal of Human Genetics* 13(3):321–29. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201324.
- Józsi, Mihály, Agustin Tortajada, Barbara Uzonyi, Elena Goicoechea de Jorge, and Santiago Rodríguez de Córdoba. 2015. “Factor H-Related Proteins Determine Complement-Activating Surfaces.” *Trends in Immunology* 36(6):374–84. doi: 10.1016/j.it.2015.04.008.
- Kárpáti, Éva, Alexandra Papp, Andrea E. Schneider, Dávid Hajnal, Marcell Cserhalmi, Ádám I. Csincsi, Barbara Uzonyi, and Mihály Józsi. 2020. “Interaction of the Factor H Family Proteins

- FHR-1 and FHR-5 With DNA and Dead Cells: Implications for the Regulation of Complement Activation and Opsonization.” *Frontiers in Immunology* 11(July):1–17. doi: 10.3389/fimmu.2020.01297.
- Kellum, John A., Norbert Lameire, Peter Aspelin, Rashad S. Barsoum, Emmanuel A. Burdmann, Stuart L. Goldstein, Charles A. Herzog, Michael Joannidis, Andreas Kribben, Andrew S. Levey, Alison M. Macleod, Ravindra L. Mehta, Patrick T. Murray, Saraladevi Naicker, Steven M. Opal, Franz Schaefer, Miet Schetz, and Shigehiko Uchino. 2013. “Diagnosis, Evaluation, and Management of Acute Kidney Injury: A KDIGO Summary (Part 1).” *Critical Care* 17(1):204. doi: 10.1186/cc11454.
- Kemper, Claudia, Michael K. Pangburn, and Zvi Fishelson. 2014. “Complement Nomenclature 2014.” *Molecular Immunology* 61(2):56–58.
- Kim, Seung Jun, Hyang Mo Koo, Beom Jin Lim, Hyung Jung Oh, Dong Eun Yoo, Dong Ho Shin, Mi Jung Lee, Fa Mee Doh, Jung Tak Park, Tae-Hyun Yoo, Shin-Wook Kang, Kyu Hun Choi, Hyeon Joo Jeong, and Seung Hyeok Han. 2012. “Decreased Circulating C3 Levels and Mesangial C3 Deposition Predict Renal Outcome in Patients with IgA Nephropathy.” *PLoS ONE* 7(7):e40495. doi: 10.1371/journal.pone.0040495.
- Lachmann, Peter J. 2009. “The Amplification Loop of the Complement Pathways.” *Advances in Immunology* 104(C):115–49. doi: 10.1016/S0065-2776(08)04004-2.
- Laemmli, U. K. 1970. “Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.” *Nature* 227(5259):680–85. doi: 10.1038/227680A0.
- Legendre, C. M., C. Licht, P. Muus, L. A. Greenbaum, S. Babu, C. Bedrosian, C. Bingham, D. J. Cohen, Y. Delmas, K. Douglas, F. Eitner, T. Feldkamp, D. Fouque, R. R. Furman, O. Gaber, M. Herthelius, M. Hourmant, D. Karpman, Y. Lebranchu, C. Mariat, J. Menne, B. Moulin, J. Nürnberger, M. Ogawa, G. Remuzzi, T. Richard, R. Sberro-Soussan, B. Severino, N. S. Sheerin, A. Trivelli, L. B. Zimmerhackl, T. Goodship, and C. Loirat. 2013. “Terminal Complement Inhibitor Eculizumab in Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome.” *The New England Journal of Medicine* 368(23):2169–81. doi: 10.1056/NEJMoa1208981.
- Loirat, Chantal, and Véronique Frémeaux-Bacchi. 2011. “Atypical Hemolytic Uremic Syndrome.” *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6(1):60. doi: 10.1186/1750-1172-6-60.
- De Loos, Femke, Karin M. L. C. Huijben, Nicole C. A. J. Van der Kar, Leo A. H. Monnens, Lambertus P. W. J. Van den Heuvel, Johanna E. M. Groener, Ronald A. De Moor, and Ron A. Wevers. 2002. “Hemolytic Uremic Syndrome Attributable to Streptococcus Pneumoniae Infection: A Novel Cause for Secondary Protein N-Glycan Abnormalities.” *Clinical Chemistry* 48(5):781–84. doi: 10.1093/clinchem/48.5.781.
- Lorés-Motta, Laura, Anna E. van Beek, Esther Willems, Judith Zandstra, Gerard van Mierlo, Alfred Einhaus, Jean Luc Mary, Corinne Stucki, Bjorn Bakker, Carel B. Hoyng, Sascha Fauser, Simon J. Clark, Marien I. de Jonge, Everson Nogoceke, Elod Koertvely, Ilse Jongerius, Taco W. Kuijpers, and Anneke I. den Hollander. 2021. “Common Haplotypes at the CFH Locus and Low-Frequency Variants in CFHR2 and CFHR5 Associate with Systemic FHR Concentrations and Age-Related Macular Degeneration.” *American Journal of Human Genetics* 108(8):1367–84. doi: 10.1016/j.ajhg.2021.06.002.
- Lu, Ling, Zhuo Ma, T. Sakari Jokiranta, Adeline R. Whitney, Frank R. DeLeo, and Jing-Ren Zhang. 2008. “Species-Specific Interaction of Streptococcus Pneumoniae with Human Complement Factor H.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181(10):7138–46. doi:

10.4049/JIMMUNOL.181.10.7138.

- Maga, Tara K., Nicole C. Meyer, Craig Belsha, Carla J. Nishimura, Yuzhou Zhang, and Richard J. H. Smith. 2011. "A Novel Deletion in the RCA Gene Cluster Causes Atypical Hemolytic Uremic Syndrome." *Nephrology Dialysis Transplantation* 26(2):739–41. doi: 10.1093/ndt/gfq658.
- Martin Merinero, Héctor, Marta Subías, Amaia Pereda, Elena Gómez-Rubio, Lucia Juana Lopez, Constantino Fernandez, Elena Goicoechea de Jorge, Sonsoles Martin-Santamaria, Francisco Javier Cañada, and Santiago Rodríguez de Córdoba. 2021. "Molecular Bases for the Association of FHR-1 with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and Other Diseases." *Blood* 137(25):3484–94. doi: 10.1182/blood.2020010069.
- Martínez-Barricarte, Rubén, Sergio Recalde, Patricia Fernández-Robredo, Isabel Millán, Leticia Olavarrieta, Antonio Viñuela, Julín Pérez-Pérez, Alfredo García-Layana, and Santiago Rodríguez de Córdoba. 2012. "Relevance of Complement Factor H-Related 1 (CFHR1) Genotypes in Age-Related Macular Degeneration." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 53(3):1087–94. doi: 10.1167/iovs.11-8709.
- Matsushita, Misao, Yuichi Endo, and Teizo Fujita. 2013. "Structural and Functional Overview of the Lectin Complement Pathway: Its Molecular Basis and Physiological Implication." *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 61(4):273–83. doi: 10.1007/S00005-013-0229-Y.
- Medjeral-Thomas, Nicholas R., Hannah J. Lomax-Browne, Hannah Beckwith, Michelle Willicombe, Adam G. McLean, Paul Brookes, Charles D. Pusey, Mario Falchi, H. Terence Cook, and Matthew C. Pickering. 2017. "Circulating Complement Factor H-Related Proteins 1 and 5 Correlate with Disease Activity in IgA Nephropathy." *Kidney International* 92(4):942–52. doi: 10.1016/j.kint.2017.03.043.
- Meri, Seppo. 2016. "Self-Nonsel Self Discrimination by the Complement System." *FEBS Letters* 2418–34. doi: 10.1002/1873-3468.12284.
- Merinero, Héctor Martín, Sheila Pinto García, Jesús García-Fernández, Emilia Arjona, Agustín Tortajada, and Santiago Rodríguez de Córdoba. 2018. "Complete Functional Characterization of Disease-Associated Genetic Variants in the Complement Factor H Gene." *Kidney International* 93(2):470–81. doi: 10.1016/j.kint.2017.07.015.
- Merle, Nicolas S., Sarah Elizabeth Church, Veronique Fremeaux-Bacchi, and Lubka T. Roumenina. 2015. "Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation." *Frontiers in Immunology* 6(JUN):1–30. doi: 10.3389/fimmu.2015.00262.
- Mihlan, Michael, Mario Hebecker, Hans Martin Dahse, Steffi Hälbich, Markus Huber-Lang, Regine Dahse, Peter F. Zipfel, and Mihály Józsi. 2009. "Human Complement Factor H-Related Protein 4 Binds and Recruits Native Pentameric C-Reactive Protein to Necrotic Cells." *Molecular Immunology* 46(3):335–44. doi: 10.1016/j.molimm.2008.10.029.
- Moore, Iain, Lisa Strain, Isabel Pappworth, David Kavanagh, Paul N. Barlow, Andrew P. Herbert, Christoph Q. Schmidt, Scott J. Staniforth, Lucy V. Holmes, Roy Ward, Lynn Morgan, Timothy H. J. Goodship, and Kevin J. Marchbank. 2010. "Association of Factor H Autoantibodies with Deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with Mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in Patients with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome." *Blood* 115(2):379–87. doi: 10.1182/blood-2009-05-221549.
- Närkiö-Mäkelä, Mervi, Jens Hellwage, Olli Tahkokallio, and Seppo Meri. 2001. "Complement-Regulator Factor H and Related Proteins in Otitis Media with Effusion." *Clinical Immunology*

100(1):118–26. doi: 10.1006/CLIM.2001.5043.

- Nesargikar, Prabhu, B. Spiller, and R. Chavez. 2012. “The Complement System: History, Pathways, Cascade and Inhibitors.” *European Journal of Microbiology and Immunology* 2(2):103–11. doi: 10.1556/eujmi.2.2012.2.2.
- Nester, Carla M., Thomas Barbour, Santiago Rodriguez de Cordoba, Marie Agnes Dragon-Durey, Veronique Fremeaux-Bacchi, Tim H. J. Goodship, David Kavanagh, Marina Noris, Matthew Pickering, Pilar Sanchez-Corral, Christine Skerka, Peter Zipfel, and Richard J. H. Smith. 2015. “Atypical AHUS: State of the Art.” *Molecular Immunology* 67(1):31–42.
- Noris, Marina, and Giuseppe Remuzzi. 2009. “Atypical Hemolytic–Uremic Syndrome.” *New England Journal of Medicine* 361(17):1676–87. doi: 10.1056/NEJMra0902814.
- Paunas, Teodora Ioana Flavia, Kenneth Finne, Sabine Leh, Hans-Peter Marti, Tom Eirik Mollnes, Frode Berven, and Bjørn Egil Vikse. 2017. “Glomerular Abundance of Complement Proteins Characterized by Proteomic Analysis of Laser-Captured Microdissected Glomeruli Associates with Progressive Disease in IgA Nephropathy.” *Clinical Proteomics* 14(1):30. doi: 10.1186/s12014-017-9165-x.
- Poppelaars, Felix, Elena Goicoechea de Jorge, Ilse Jongerius, Antje J. Baeumner, Mark-Steven Steiner, Mihály Józsi, Erik J. M Toonen, Diana Pauly, The SciFiMed consortium, Michael Kirschfink, Simon John Clark, Goicoechea E. de Jorge, Steiner M-s, Józ M. Zsi, and Toonen Ejm. 2021. “A Family Affair: Addressing the Challenges of Factor H and the Related Proteins Citation.” *Article* 12:1. doi: 10.3389/fimmu.2021.660194.
- Pouw, Richard B., Mieke C. Brouwer, Anna E. van Beek, Mihály Józsi, Diana Wouters, and Taco W. Kuijpers. 2018. “Complement Factor H-Related Protein 4A Is the Dominant Circulating Splice Variant of CFHR4.” *Frontiers in Immunology* 9(APR):1. doi: 10.3389/fimmu.2018.00729.
- Pouw, Richard B., Mieke C. Brouwer, Judy Geissler, Laurens V Van Herpen, Sacha S. Zeerleder, Walter A. Wuillemin, Diana Wouters, and Taco W. Kuijpers. 2016. “Complement Factor H-Related Protein 3 Serum Levels Are Low Compared to Factor H and Mainly Determined by Gene Copy Number Variation in CFHR3.” *PLoS ONE* 11(3). doi: 10.1371/journal.pone.0152164.
- Reis, Edimara S., Dimitrios C. Mastellos, George Hajishengallis, and John D. Lambris. 2019. “New Insights into the Immune Functions of Complement.” *Nature Reviews Immunology* 19(8):503–16.
- Ricklin, Daniel, George Hajishengallis, Kun Yang, and John D. Lambris. 2010. “Complement: A Key System for Immune Surveillance and Homeostasis.” *Nature Immunology* 11(9):785–97. doi: 10.1038/Ni.1923. Mune Surveillance and Homeostasis.” *Nature Immunology* 11(9):785–97.
- Rodríguez De Córdoba, Santiago, Jorge Esparza-Gordillo, Elena Goicoechea De Jorge, Margarita Lopez-Trascasa, and Pilar Sánchez-Corral. 2004. “The Human Complement Factor H: Functional Roles, Genetic Variations and Disease Associations.” *Molecular Immunology* 41(4):355–67. doi: 10.1016/j.molimm.2004.02.005.
- Sánchez-Corral, P., C. González-Rubio, S. Rodríguez De Córdoba, and M. López-Trascasa. 2004. “Functional Analysis in Serum from Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Patients Reveals Impaired Protection of Host Cells Associated with Mutations in Factor H.” *Molecular Immunology* 41(1):81–84. doi: 10.1016/J.MOLIMM.2004.01.003.

- Sánchez-Corral, Pilar, David Pérez-Caballero, Olatz Huarte, Ari M. Simckes, Elena Goicoechea, Margarita López-Trascasa, and Santiago Rodríguez de Córdoba. 2002. “Structural and Functional Characterization of Factor H Mutations Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome.” *American Journal of Human Genetics* 71(6):1285–95. doi: 10.1086/344515.
- Sánchez-Corral, Pilar, Richard B. Pouw, Margarita López-Trascasa, and Mihály Józsi. 2018. “Self-Damage Caused by Dysregulation of the Complement Alternative Pathway: Relevance of the Factor H Protein Family.” *Frontiers in Immunology* 9(JUL):1.
- Schäfer, Nicole, Antje Grosche, Joerg Reinders, Stefanie M. Hauck, Richard B. Pouw, Taco W. Kuijpers, Diana Wouters, Boris Ehrenstein, Volker Enzmann, Peter F. Zipfel, Christine Skerka, and Diana Pauly. 2016. “Complement Regulator FHR-3 Is Elevated Either Locally or Systemically in a Selection of Autoimmune Diseases.” *Frontiers in Immunology* 7(NOV):542. doi: 10.3389/fimmu.2016.00542.
- Schmidt, Christoph Q., Andrew P. Herbert, David Kavanagh, Carina Gandy, Christopher J. Fenton, Bärbel S. Blaum, Malcolm Lyon, Dušan Uhrín, and Paul N. Barlow. 2008. “A New Map of Glycosaminoglycan and C3b Binding Sites on Factor H.” *The Journal of Immunology* 181(4):2610–19. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2610.
- Schmidt, Christoph Q., John D. Lambris, and Daniel Ricklin. 2016. “Protection of Host Cells by Complement Regulators.” *Immunological Reviews* 274(1):152–71.
- Schmidt, Christoph Q., Fern C. Slingsby, Anna Richards, and Paul N. Barlow. 2011. “Production of Biologically Active Complement Factor H in Therapeutically Useful Quantities.” *Protein Expression and Purification* 76(2):254–63. doi: 10.1016/j.pep.2010.12.002.
- Scobell, Rebecca R., Bernard S. Kaplan, and Lawrence Copelovitch. 2020. “New Insights into the Pathogenesis of Streptococcus Pneumoniae–Associated Hemolytic Uremic Syndrome.” *Pediatric Nephrology* 35(9):1585–91.
- Singh, Anirudh K., Amin S. Osman, Shireen A. Woodiga, Peter White, John D. Mahan, and Samantha J. King. 2016. “Defining the Role of Pneumococcal Neuraminidases and O-Glycosidase in Pneumococcal Haemolytic Uraemic Syndrome.” *Journal of Medical Microbiology* 65(9):975–84. doi: 10.1099/jmm.0.000322.
- Smith, Andrew, Calum Johnston, Donald Inverarity, Mary Slack, Mathew Diggle, and Timothy Mitchell. 2013. “Investigating the Role of Pneumococcal Neuraminidase A Activity in Isolates from Pneumococcal Haemolytic Uraemic Syndrome.” *Journal of Medical Microbiology* 62(PART 11):1735–42. doi: 10.1099/jmm.0.063479-0.
- Spinale, Joann M., Rebecca L. Ruebner, Bernard S. Kaplan, and Lawrence Copelovitch. 2013. “Update on Streptococcus Pneumoniae Associated Hemolytic Uremic Syndrome.” *Current Opinion in Pediatrics* 25(2):203–8. doi: 10.1097/MOP.0b013e32835d7f2c.
- Strobel, Stefanie, Cynthia Abarrategui-Garrido, Elena Fariza-Requejo, Harald Seeberger, Pilar Sánchez-Corral, and Mihály Józsi. 2011. “Factor H-Related Protein 1 Neutralizes Anti-Factor H Autoantibodies in Autoimmune Hemolytic Uremic Syndrome.” *Kidney International* 80(4):397–404. doi: 10.1038/KI.2011.152.
- Suzuki, Hitoshi, Krzysztof Kiryluk, Jan Novak, Zina Moldoveanu, Andrew B. Herr, Matthew B. Renfrow, Robert J. Wyatt, Francesco Scolari, Jiri Mestecky, Ali G. Gharavi, and Bruce A. Julian. 2011. “The Pathophysiology of IgA Nephropathy.” *Journal of the American Society of Nephrology* 22(10):1795–1803.

- Szilágyi, Ágnes, Nóra Kiss, Csaba Bereczki, Gyula Tálosi, Katalin Rácz, Sándor Túri, Zsuzsa Györke, Edina Simon, Eszter Horváth, Kata Kelen, György S. Reusz, Attila J. Szabó, Tivadar Tulassay, and Zoltán Prohászka. 2013. “The Role of Complement in Streptococcus Pneumoniae-Associated Haemolytic Uraemic Syndrome.” *Nephrology Dialysis Transplantation* 28(9):2237–45. doi: 10.1093/ndt/gft198.
- Togarsimalemath, Shambhuprasad K., Sidharth K. Sethi, Rajan Duggal, Moglie Le Quintrec, Pranaw Jha, Régis Daniel, Florence Gonnet, Shyam Bansal, Lubka T. Roumenina, Veronique Fremeaux-Bacchi, Vijay Kher, and Marie Agnes Dragon-Durey. 2017. “A Novel CFHR1-CFHR5 Hybrid Leads to a Familial Dominant C3 Glomerulopathy.” *Kidney International* 92(4):876–87. doi: 10.1016/j.kint.2017.04.025.
- Tortajada, Agustín, Eduardo Gutiérrez, Elena Goicoechea de Jorge, Jaouad Anter, Alfons Segarra, Mario Espinosa, Miquel Blasco, Elena Roman, Helena Marco, Luis F. Quintana, Josué Gutiérrez, Sheila Pinto, Margarita Lopez-Trascasa, Manuel Praga, and Santiago Rodriguez de Córdoba. 2017. “Elevated Factor H-Related Protein 1 and Factor H Pathogenic Variants Decrease Complement Regulation in IgA Nephropathy.” *Kidney International* 92(4):953–63. doi: 10.1016/j.kint.2017.03.041.
- Tortajada, Agustín, Eduardo Gutierrez, Matthew C. Pickering, Manuel Praga Terente, and Nicholas Medjeral-Thomas. 2019. “The Role of Complement in IgA Nephropathy.” *Molecular Immunology* 114(June):123–32. doi: 10.1016/j.molimm.2019.07.017.
- Tortajada, Agustín, Hugo Yébenes, Cynthia Abarrategui-Garrido, Jaouad Anter, Jesús M. García-Fernández, Rubén Martínez-Barricarte, María Alba-Domínguez, Talat H. Malik, Rafael Bedoya, Rocío Cabrera Pérez, Margarita López Trascasa, Matthew C. Pickering, Claire L. Harris, Pilar Sánchez-Corral, Oscar Llorca, and Santiago Rodríguez De Córdoba. 2013. “C3 Glomerulopathy-Associated CFHR1 Mutation Alters FHR Oligomerization and Complement Regulation.” *Journal of Clinical Investigation* 123(6):2434–46. doi: 10.1172/JCI68280.
- Valoti, Elisabetta, Marta Alberti, Agustín Tortajada, Jesus Garcia-Fernandez, Sara Gastoldi, Luca Besso, Elena Bresin, Giuseppe Remuzzi, Santiago Rodriguez de Cordoba, and Marina Noris. 2015. “A Novel Atypical Hemolytic Uremic Syndrome-Associated Hybrid *CFHR1/CFH* Gene Encoding a Fusion Protein That Antagonizes Factor H-Dependent Complement Regulation.” *Journal of the American Society of Nephrology* 26(1). doi: 10.1681/ASN.2013121339.
- Venables, Julian P., Lisa Strain, Danny Routledge, David Bourn, Helen M. Powell, Paul Warwicker, Martha L. Diaz-Torres, Anne Sampson, Paul Mead, Michelle Webb, Yves Pirson, Michael S. Jackson, Anne Hughes, Katrina M. Wood, Judith A. Goodship, and Timothy H. J. Goodship. 2006. “Atypical Haemolytic Uraemic Syndrome Associated with a Hybrid Complement Gene.” *PLoS Medicine* 3(10). doi: 10.1371/journal.pmed.0030431.
- Vernon, Katherine A., and H. Terence Cook. 2012. “Complement in Glomerular Disease.” *Advances in Chronic Kidney Disease* 19(2):84–92. doi: 10.1053/j.ackd.2012.02.015.
- Vernon, Katherine A., Elena Goicoechea De Jorge, Angela E. Hall, Veronique Fremeaux-Bacchi, Timothy J. Aitman, H. Terence Cook, Robert Hangartner, Ania Koziell, and Matthew C. Pickering. 2012. “Acute Presentation and Persistent Glomerulonephritis Following Streptococcal Infection in a Patient with Heterozygous Complement Factor H-Related Protein 5 Deficiency.” *American Journal of Kidney Diseases* 60(1):121–25. doi: 10.1053/j.ajkd.2012.02.329.
- Xiao, Xue, Cybele Ghossein, Agustín Tortajadam, Yuzhou Zhang, Nicole Meyer, Michael Jones, Nicolo Ghiringhelli Borsa, Carla M. Nester, Christie P. Thomas, Santiago Rodríguez de

- Córdoba, and Richard J. H. Smith. 2016. “Familial C3 Glomerulonephritis Caused by a Novel CFHR5-CFHR2 Fusion Gene.” *Molecular Immunology* 77:89–96. doi: 10.1016/j.molimm.2016.07.007.
- Zelek, Wioleta M., Long Xie, B. Paul Morgan, and Claire L. Harris. 2019. “Compendium of Current Complement Therapeutics.” *Molecular Immunology* 114:341–52. doi: 10.1016/j.molimm.2019.07.030.
- Zhai, Ya Ling, Si Jun Meng, Li Zhu, Su Fang Shi, Su Xia Wang, Li Jun Liu, Ji Cheng Lv, Feng Yu, Ming Hui Zhao, and Hong Zhang. 2016. “Rare Variants in the Complement Factor H-Related Protein 5 Gene Contribute to Genetic Susceptibility to IgA Nephropathy.” *Journal of the American Society of Nephrology* 27(9):2894–2905. doi: 10.1681/ASN.2015010012.
- Zhao, Jian, Hui Wu, Melanie Khosravi, Huijuan Cui, Xiaoxia Qian, Jennifer A. Kelly, Kenneth M. Kaufman, Carl D. Langefeld, Adrienne H. Williams, Mary E. Comeau, Julie T. Ziegler, Miranda C. Marion, Adam Adler, Stuart B. Glenn, Marta E. Alarcón-Riquelme, BIOLUPUS Network, GENLES Network, Bernardo A. Pons-Estel, John B. Harley, Sang Cheol Bae, So Young Bang, Soo Kyung Cho, Chaim O. Jacob, Timothy J. Vyse, Timothy B. Niewold, Patrick M. Gaffney, Kathy L. Moser, Robert P. Kimberly, Jeffrey C. Edberg, Elizabeth E. Brown, Graciela S. Alarcon, Michelle A. Petri, Rosalind Ramsey-Goldman, Luis M. Vilá, John D. Reveille, Judith A. James, Gary S. Gilkeson, Diane L. Kamen, Barry I. Freedman, Juan Manuel Anaya, Joan T. Merrill, Lindsey A. Criswell, R. Hal Scofield, Anne M. Stevens, Joel M. Guthridge, Deh Ming Chang, Yeong Wook Song, Ji Ah Park, Eun Young Lee, Susan A. Boackle, Jennifer M. Grossman, Bevra H. Hahn, Timothy H. J. Goodship, Rita M. Cantor, Chack Yung Yu, Nan Shen, and Betty P. Tsao. 2011. “Association of Genetic Variants in Complement Factor H and Factor H-Related Genes with Systemic Lupus Erythematosus Susceptibility.” *PLoS Genetics* 7(5). doi: 10.1371/journal.pgen.1002079.
- Zhu, Li, Wei yi Guo, Su fang Shi, Li jun Liu, Ji cheng Lv, Nicholas R. Medjeral-Thomas, Hannah J. Lomax-Browne, Matthew C. Pickering, and Hong Zhang. 2018. “Circulating Complement Factor H-Related Protein 5 Levels Contribute to Development and Progression of IgA Nephropathy.” *Kidney International* 94(1):150–58. doi: 10.1016/j.kint.2018.02.023.
- Zhu, Yong, Saravanan Thangamani, Bow Ho, and Jeak Ling Ding. 2005. “The Ancient Origin of the Complement System.” *EMBO Journal* 24(2):382–94. doi: 10.1038/sj.emboj.7600533.
- Zipfel, Peter F., Matthew Edey, Stefan Heinen, Mihály Józsi, Heiko Richter, Joachim Misselwitz, Bernd Hoppe, Danny Routledge, Lisa Strain, Anne E. Hughes, Judith A. Goodship, Christoph Licht, Timothy H. J. Goodship, and Christine Skerka. 2007. “Deletion of Complement Factor H-Related Genes CFHR1 and CFHR3 Is Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome.” *PLoS Genetics* 3(3):0387–92. doi: 10.1371/journal.pgen.0030041.
- Zipfel, Peter F., Thorsten Wiech, Emma D. Stea, and Christine Skerka. 2020. “CFHR Gene Variations Provide Insights in the Pathogenesis of the Kidney Diseases Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and C3 Glomerulopathy.” *Journal of the American Society of Nephrology* 31(2):241–56.



# **ANEXOS**

**ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS**



# High Complement Factor H-Related (FHR)-3 Levels Are Associated With the Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome-Risk Allele *CFHR3\*B*

Richard B. Pouw<sup>1,2</sup>, Irene Gómez Delgado<sup>3</sup>, Alberto López Lera<sup>4</sup>, Santiago Rodríguez de Córdoba<sup>5</sup>, Diana Wouters<sup>1</sup>, Taco W. Kuijpers<sup>2,6</sup> and Pilar Sánchez-Corral<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Immunopathology, Sanquin Research and Landsteiner Laboratory of the Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands, <sup>2</sup> Department of Pediatric Hematology, Immunology and Infectious Diseases, Emma Children's Hospital, Academic Medical Center, Amsterdam, Netherlands, <sup>3</sup> Complement Research Group, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), La Paz University Hospital, Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain, <sup>4</sup> Immunology Unit, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), La Paz University Hospital, Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain, <sup>5</sup> Biological Research Center (CIB)-CSIC, Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain, <sup>6</sup> Department of Blood Cell Research, Sanquin Research and Landsteiner Laboratory of the Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Zvi Fishelson,  
Tel Aviv University, Israel

### Reviewed by:

Veronique Fremeaux-Bacchi,  
Assistance Publique Hôpitaux  
De Paris (AP-HP),  
France  
Christine Skerka,  
Leibniz-Institut für Naturstoff-  
Forschung und Infektionsbiologie,  
Hans Knöll Institut,  
Germany

### \*Correspondence:

Pilar Sánchez-Corral  
pilar.sanchez-corral@idipaz.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Innate Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 16 January 2018

**Accepted:** 05 April 2018

**Published:** 24 April 2018

### Citation:

Pouw RB, Gómez Delgado I, López Lera A, Rodríguez de Córdoba S, Wouters D, Kuijpers TW and Sánchez-Corral P (2018) High Complement Factor H-Related (FHR)-3 Levels Are Associated With the Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome-Risk Allele *CFHR3\*B*. *Front. Immunol.* 9:848. doi: 10.3389/fimmu.2018.00848

Dysregulation of the complement alternative pathway (AP) is a major pathogenic mechanism in atypical hemolytic-uremic syndrome (aHUS). Genetic or acquired defects in factor H (FH), the main AP regulator, are major aHUS drivers that associate with a poor prognosis. FH activity has been suggested to be downregulated by homologous FH-related (FHR) proteins, including FHR-3 and FHR-1. Hence, their relative levels in plasma could be disease-relevant. The genes coding for FH, FHR-3, and FHR-1 (*CFH*, *CFHR3*, and *CFHR1*, respectively) are polymorphic and located adjacent to each other on human chromosome 1q31.3. We have previously shown that haplotype *CFH(H3)-CFHR3\*B-CFHR1\*B* associates with aHUS and reduced FH levels. In this study, we used a specific enzyme-linked immunosorbent assay to quantify FHR-3 in plasma samples from controls and patients with aHUS genotyped for the three known *CFHR3* alleles (*CFHR3\*A*, *CFHR3\*B*, and *CFHR3\*Del*). In the 218 patients carrying at least one copy of *CFHR3*, significant differences between *CFHR3* genotype groups were found, with *CFHR3\*A/Del* patients having the lowest FHR-3 concentration (0.684–1.032 µg/mL), *CFHR3\*B/Del* and *CFHR3\*A/A* patients presenting intermediate levels (1.437–2.201 µg/mL), and *CFHR3\*A/B* and *CFHR3\*B/B* patients showing the highest concentration (2.330–4.056 µg/mL) ( $p < 0.001$ ). These data indicate that *CFHR3\*A* is a low-expression allele, whereas *CFHR3\*B*, associated with increased risk of aHUS, is a high-expression allele. Our study reveals that the aHUS-risk haplotype *CFH(H3)-CFHR3\*B-CFHR1\*B* generates twofold more FHR-3 than the non-risk *CFH(H1)-CFHR3\*A-CFHR1\*A* haplotype. In addition, FHR-3 levels were higher in patients with aHUS than in control individuals with the same *CFHR3* genotype. These data suggest that increased plasma levels of FHR-3, altering the balance between FH and FHR-3, likely impact the FH regulatory functions and contribute to the development of aHUS.

**Keywords:** complement, factor H, factor H-related protein 3, *CFHR3* gene, atypical hemolytic-uremic syndrome

## INTRODUCTION

Atypical hemolytic-uremic syndrome (aHUS) is a thrombotic microangiopathy characterized by hematological and renal alterations, although neurological and cardiovascular damage is also frequent (1, 2). Genetic and/or acquired defects in the complement alternative pathway that disturb the activation-regulation balance are present in 40–60% of patients, potentiating the initial endothelial damage in the microvasculature (3–5). The prognosis of patients with aHUS who have mutations in complement factor H (FH) is particularly poor and is associated with terminal renal insufficiency at disease onset and disease recurrence in the transplanted kidney (6).

Factor H is the main complement regulator in the fluid phase, and it also binds to autologous cellular surfaces to protect them from complement-mediated damage (7). The FH gene, *CFH*, is located within a gene cluster that includes five additional genes (*CFHR1* to *CFHR5*) coding for the homologous FH-related proteins (FHR-1 to FHR-5), which likely compete with FH for ligand binding and act as complement deregulators (8, 9). Several aHUS-predisposing genetic variants within the *CFH/CFHR* gene cluster have been found. A particular *CFH* haplotype named *CFH(H3)* increases aHUS penetrance in carriers and modulates the clinical phenotype (10–12), and the homozygous deletion of the *CFHR3* and *CFHR1* genes ( $\Delta_{CFHR3-CFHR1}$ ) predisposes patients to an autoimmune form of aHUS characterized by the generation of anti-FH blocking antibodies (13–15). Additional aHUS-risk variants within the *CFH/CFHR* region are the *CFHR1\*B* and the *CFHR3\*B* alleles (16, 17).

The molecular basis for the contribution of the genetic variants *CFH(H3)*, *CFHR3\*B*, and *CFHR1\*B* to the pathogenic mechanism of aHUS have not yet been determined. These variants include non-synonymous single-nucleotide polymorphisms (SNPs) with potential functional consequences, but changes in gene expression cannot be excluded, particularly in the case of *CFH(H3)* and *CFHR3\*B*, which include SNPs within their 5'-untranslated region (UTR).

We have shown that the aHUS-risk haplotype *CFH(H3)* is nearly always associated with the *CFHR3\*B* and *CFHR1\*B* alleles, thus generating an extended *CFH(H3)-CFHR3\*B-CFHR1\*B* haplotype, which predisposes to aHUS and favors a poorer progression of renal function at disease onset (17); we also demonstrated that patients homozygous for this haplotype have lower FH levels. To check the hypothesis that the aHUS-risk *CFHR3\*B* allele (tagged by rs385390A; rs446868C; rs138675433C; rs149352569A) gives rise to higher protein levels than the non-risk *CFHR3\*A* allele (rs385390C; rs446868A; rs138675433T; rs149352569T), we determined FHR-3 levels in patients with aHUS and in control individuals genotyped for *CFHR3\*A*, *CFHR3\*B*, and  $\Delta_{CFHR3-CFHR1}$  (referred to as *CFHR3\*Del*). By using an FHR-3-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (18), we demonstrate that *CFHR3\*A* is a low-expression allele and *CFHR3\*B* is a high-expression allele and that increased FHR-3 levels in plasma are associated with aHUS.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and Controls

A total of 230 patients from the Spanish aHUS registry with known *CFH*, *CFHR3*, and *CFHR1* genotypes were selected for

the study. Genotyping had been previously determined by direct sequencing and copy number variation analyzed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) or by using an in-house comparative genomic hybridization microarray (19). Studies to identify mutations in complement genes had also been performed on most of these patients. Blood samples were drawn during an acute aHUS episode or during remission, centrifuged to obtain serum and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) plasma, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Peripheral-blood leukocytes (PBLs) were used to prepare genomic DNA by standard procedures. Plasma and DNA samples from 49 healthy Spanish individuals were also obtained and used in the study. Patients and controls provided written informed consent, as approved by the ethical committees from La Paz University Hospital or the Biological Research Center.

### CFHR3 Genotyping

Genotyping of the *CFHR3\*A* and *CFHR3\*B* alleles was performed by Sanger sequencing of *CFHR3* exon 5, as described previously (17). The *CFHR3-CFHR1* genomic deletion was analyzed by using the SALSA MLPA probemix P236-A3 ARMD mix-1 (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands); this deletion is referred to as the *CFHR3\*Del* allele, and it does not generate FHR-3 and FHR-1.

### FHR-3 Quantitation

FHR-3 levels in serum or EDTA plasma samples from the 230 patients with aHUS and the 49 controls were determined by using a specific sandwich FHR-3 ELISA as described previously (18).

### Statistical Analyses

The statistical significance of FHR-3 levels in the various genotype or age groups was analyzed with IBM SPSS Software.

## RESULTS

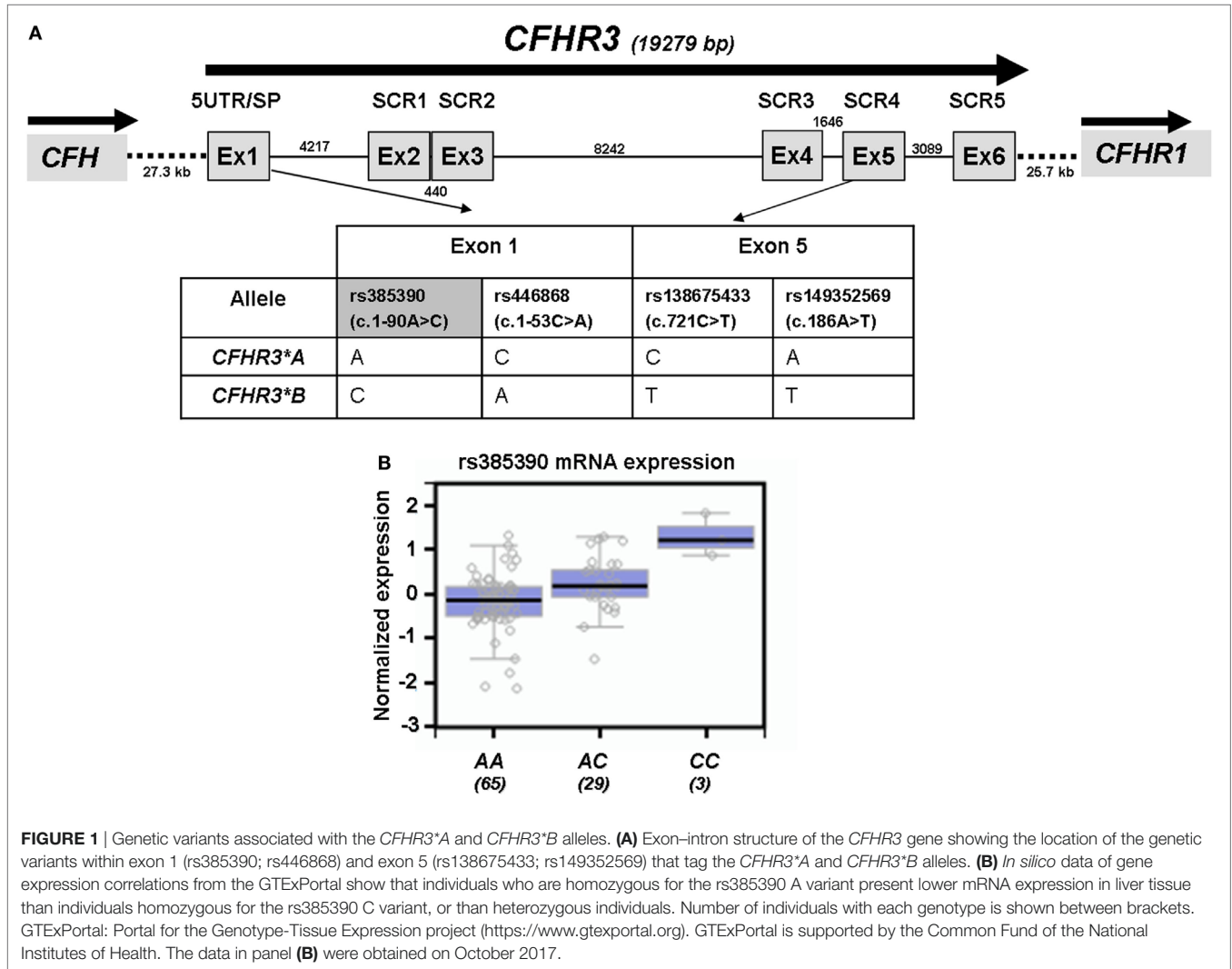
### FHR-3 Levels in Spanish Controls Suggest Differential Expression of *CFHR3\*A* and *CFHR3\*B*

We had previously determined FHR-3 levels in serum samples from 100 Dutch controls and had shown that FHR-3 concentration correlated with the number of *CFHR3* copies (18). We have now confirmed this observation in 47 Spanish control individuals containing 1 or 2 copies of *CFHR3*. FHR-3 levels ranged between 0.14 and 1.16  $\mu\text{g/mL}$  (mean  $0.61 \pm 2.40$ ; 95% CI 0.54–0.68), and FHR-3 concentration in individuals with 2 copies doubled the concentration observed in individuals with only one copy (0.68 vs. 0.36  $\mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0.0001$ ). Interestingly, genotyping of the Spanish controls for the *CFHR3\*A* and *CFHR3\*B* alleles provided additional data. FHR-3 levels were significantly lower in individuals with the *CFHR3\*A/A* genotype ( $0.55 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$ ) than in individuals with the *CFHR3\*A/B* ( $0.78 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ ;  $p = 0.001$ ) or *CFHR3\*B/B* ( $0.82 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ ;  $p = 0.033$ ) genotypes, thus suggesting a lower expression of the *CFHR3\*A* allele. A plausible explanation for this finding is that genetic variants located within the 5'-UTR of *CFHR3* exon 1 (rs385390 and rs446868) determine a different expression of the *CFHR3\*A*

and *CFHR3*\**B* alleles (Figure 1A). No data on the effect of these SNPs on *CFHR3* expression could be obtained from the Gene Expression Omnibus and Human Protein Atlas databases. However, data on gene expression correlations for the *CFHR3* SNP rs385390 (c.1-90A>C) available at the GTExPortal showed lower mRNA levels of the A variant (tagging the *CFHR3*\**A* allele) than the C variant (tagging the *CFHR3*\**B* allele) in liver tissue (Figure 1B).

### *CFHR3*\**A* Is a Low-Expression Allele, and *CFHR3*\**B* Is a High-Expression Allele

To confirm the association between FHR-3 levels and the *CFHR3*\**A* and *CFHR3*\**B* alleles, we determined FHR-3 levels in 230 patients with aHUS of known *CFHR3* genotypes (17). The 22 patients with aHUS with the *CFHR3*\**Del/Del* genotype presented minimal FHR-3 levels corresponding to the lower limit of detection of



**FIGURE 1** | Genetic variants associated with the *CFHR3*\**A* and *CFHR3*\**B* alleles. **(A)** Exon-intron structure of the *CFHR3* gene showing the location of the genetic variants within exon 1 (rs385390; rs446868) and exon 5 (rs138675433; rs149352569) that tag the *CFHR3*\**A* and *CFHR3*\**B* alleles. **(B)** *In silico* data of gene expression correlations from the GTExPortal show that individuals who are homozygous for the rs385390 A variant present lower mRNA expression in liver tissue than individuals homozygous for the rs385390 C variant, or than heterozygous individuals. Number of individuals with each genotype is shown between brackets. GTExPortal: Portal for the Genotype-Tissue Expression project (<https://www.gtportal.org>). GTExPortal is supported by the Common Fund of the National Institutes of Health. The data in panel **(B)** were obtained on October 2017.

**TABLE 1** | FHR-3 levels differ between *CFHR3* genotype groups.

Genotype	N	Mean	SD	SE	95% Confidence interval for mean		Minimum	Maximum
					Lower bound	Upper bound		
A/Del	24	0.85783	0.411379	0.083972	0.68412	1.03154	0.254	1.771
B/Del	32	1.82991	1.028643	0.182840	1.45904	2.20077	0.147	3.879
A/A	47	1.74011	1.033595	0.150765	1.43663	2.04358	0.124	4.443
A/B	58	2.70117	1.410761	0.185242	2.33023	3.07211	0.566	6.666
B/B	47	3.32538	2.487197	0.362795	2.59511	4.05565	0.481	13.450
Total	208	2.27832	1.722567	0.119438	2.04285	2.51379	0.124	13.450

SPSS Descriptives table from the analysis of FHR-3 levels (µg/mL) in 208 patients with atypical hemolytic uremic syndrome grouped by *CFHR3* genotype. Statistically significant differences between the five *CFHR3* genotype groups were found (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.0001$ ).

the ELISA. The other 208 patients, presenting *CFHR3* genotypes *A/Del*, *B/Del*, *A/A*, *A/B*, or *B/B*, showed a vast range of FHR-3 concentrations (0.124–13.450 µg/mL; mean 2.278 ± 1.723) (Table 1). Statistical analyses of these data were performed with nonparametric tests. The Kruskal–Wallis *H* test showed that there was a statistically significant difference in FHR-3 levels between the five *CFHR3* genotypes [ $\chi^2(4) = 53.568$ ;  $p < 0.001$ ]. Next, a pairwise two-sided multiple comparison analysis was performed using the Dwass-Steel-Critchlow-Fligner method. Significant differences between the *A/Del* and *B/Del* genotypes ( $p = 0.0043$ ), as well as between the *A/A* and *B/B* genotypes ( $p = 0.0008$ ) were found, thus revealing that the *CFHR3*\**A* allele was associated with lower FHR-3 concentrations than the *CFHR3*\**B* allele (Table 2; Figure 2).

### FHR-3 Levels and Genetic Background

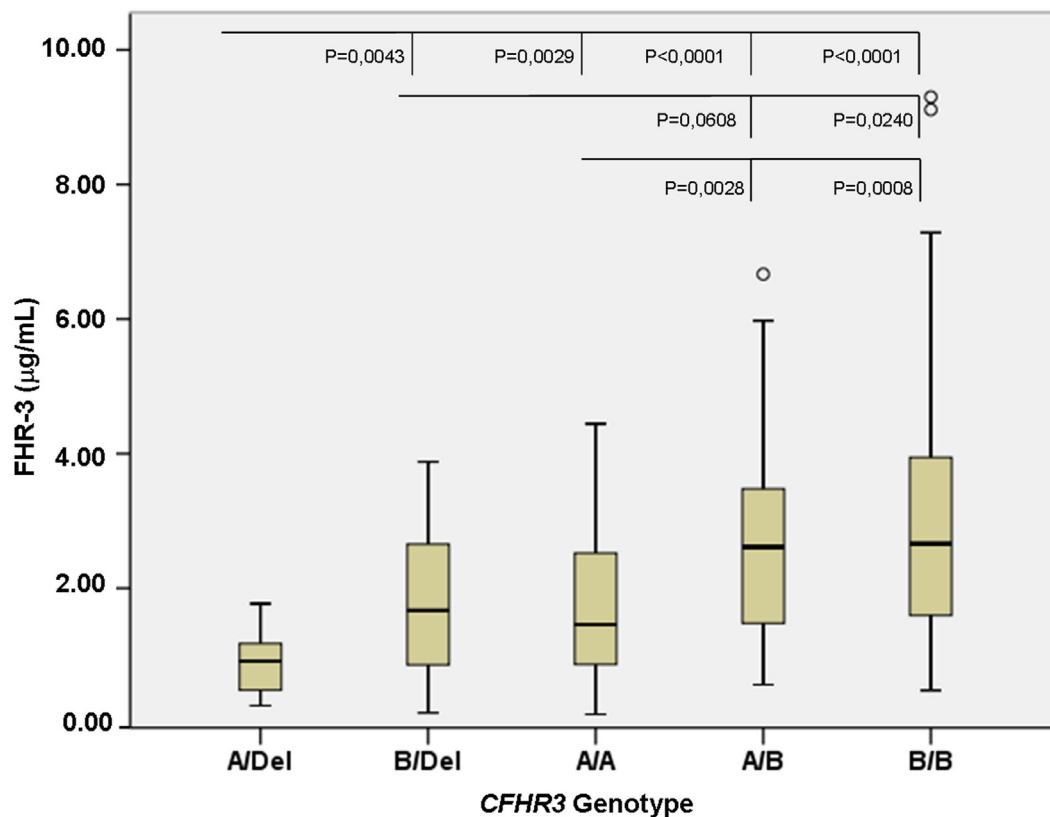
Statistical analyses showed that plasma FHR-3 levels were associated with the *CFHR3*\**A/B/del* genotypes; however, protein levels within each *CFHR3* genotype group showed great variation. To explore the possibility that *CFHR3* gene expression was also modulated by genetic factors in the adjacent *CFH* and *CFHR1* genes, we analyzed the *CFH*–*CFHR3*–*CFHR1* genotypes of the 230 patients with aHUS. Genotyping of *CFH* (*H1/H2/H3/H4a/*

*H4b/H5/H6/H7/H8*), *CFHR3* (*A/B/Del*), and *CFHR1* (*A/B/Del*) in these patients had already been performed [(17); Table S1 in Supplementary Material]. As many as 63 different *CFH*–*CFHR3*–*CFHR1* genotype combinations were observed (Table S2 in Supplementary Material), but only 23 of them were found in 3 or more patients (Table 3). The *CFHR3*\**Del/Del* genotype

**TABLE 2** | The *CFHR3*\**A* allele generates lower FHR-3 levels than the *CFHR3*\**B* allele.

Genotype	Wilcoxon Z	DSCF value	Pr > DSCF
A/Del vs. B/Del	−3.4935	4.9405	0.0043
A/Del vs. A/A	−3.6041	5.0970	0.0029
A/Del vs. A/B	−5.7174	8.0856	<0.0001
A/Del vs. B/B	−5.9927	8.4749	<0.0001
B/Del vs. A/A	0.4694	0.6638	0.9901
B/Del vs. A/B	−2.6552	3.7550	0.0608
B/Del vs. B/B	−2.9811	4.2159	0.0240
A/A vs. A/B	−3.6088	5.1036	0.0028
A/A vs. B/B	−3.9435	5.5770	0.0008
A/B vs. B/B	−0.8668	1.2258	0.9091

Results from pairwise two-sided multiple comparisons done by Dwass-Steel-Critchlow-Fligner method. Pr > DSCF values lower than 0.05 denote statistically significant differences.



**FIGURE 2** | FHR-3 levels are associated with the *CFHR3*\**A/B/Del* genotypes. Boxplot of FHR-3 levels in 208 patients with atypical hemolytic uremic syndrome who were grouped according to their *CFHR3* genotype; patients with the *CFHR3 Del/Del* genotype were not included because they have homozygous FHR-3 deficiency. The statistical significance obtained in pairwise two-sided multiple comparisons is also shown. Outliers in the *CFHR3 A/B* and *B/B* genotype groups are denoted by symbols (o).

**TABLE 3** | *CFH-CFHR3-CFHR1* genotypes and FHR-3 levels.

	<i>CFH-CFHR3-CFHR1</i> genotype <sup>a</sup>			FHR-3 (µg/mL)		Number of patients	Frequency <sup>b</sup> (%)
	<i>CFH</i>	<i>CFHR3</i>	<i>CFHR1</i>	Mean	SD		
G1 (22)	H4a,H4b	Del/Del	Del/Del	0.011	0.003	9	40.9
	H4a,H4a	Del/Del	Del/Del	0.010	0.000	7	31.8
	H2,H4a	Del/Del	Del/Del	0.022	0.024	4	18.2
G2 (24)	H2,H4a	A/Del	B/Del	0.784	0.363	7	29.2
	H1,H4b	A/Del	A/Del	0.778	0.444	6	25.0
	H1,H4a	A/Del	A/Del	0.719	0.418	5	20.8
G3 (32)	H3,H4a	B/Del	B/Del	2.155	0.862	15	46.9
	H3,H4b	B/Del	B/Del	1.872	0.981	7	21.9
	H3,H2	B/Del	B/Del	0.871	1.066	4	12.5
	H3,H4a	B/Del	A/Del	2.702	0.346	3	9.4
G4 (47)	H1,H1	A/A	A/A	1.871	0.867	12	25.5
	H1,H2	A/A	A/B	1.584	0.907	11	23.4
	H1,H2	A/A	A/A	2.297	1.152	4	8.5
	H1,H5	A/A	A/A	2.360	0.988	3	6.4
	H2,H2	A/A	B/B	1.679	2.397	3	6.4
	H2,H7	A/A	A/B	1.152	0.516	3	6.4
G5 (58)	H1,H3	A/B	A/B	2.445	1.171	17	29.3
	H2,H3	A/B	B/B	2.310	1.218	12	20.7
	H2,H3	A/B	A/B	3.241	0.749	6	10.3
	H3,H4a	A/B	B/B	2.889	1.226	3	5.2
	H1,H8	A/B	A/B	3.337	3.003	3	5.2
G6 (47)	H3,H3	B/B	B/B	3.673	3.048	28	59.6
	H3,H8	B/B	B/B	3.547	0.909	7	14.9

*CFH* and *CFHR1* variants observed in patients with atypical hemolytic uremic syndrome presenting one or two copies of the *CFHR3*\*A/B/Del alleles. Genotypes are ordered according to their relative frequency within the respective *CFHR3* genotype subgroup (G1 to G6). FHR-3 levels within each *CFH-CFHR3-CFHR1* genotype subgroup are also shown.

<sup>a</sup>Minor *CFH-CFHR3-CFHR1* genotypes (i.e., those observed in 1 or 2 patients) are not included in the table.

<sup>b</sup>Frequency of each *CFH-CFHR3-CFHR1* genotype within the corresponding subgroup (G1–G6); the total number of patients is shown between brackets.

is associated with three *CFH* genotypic variants (*H4a*, *H4b*, or *H2*), and 90% of patients with *CFHR3*\*A/Del or *CFHR3*\*B/Del present 1 out of 4 different *CFH-CFHR3-CFHR1* genotypes. Greater heterogeneity was found in the *CFHR3*\*A/A and *CFHR3*\*A/B groups, whereas 75% of the *CFHR3*\*B/B patients were found to carry only two different *CFH-CFHR3-CFHR1* genotypes. However, when comparing FHR-3 levels within each *CFHR3* genotype group, no statistically significant differences between *CFH-CFHR3-CFHR1* genotypes were found, suggesting that genetic variants in *CFH* and *CFHR1* do not substantially contribute to the expression of the *CFHR3*\*A and *CFHR3*\*B alleles.

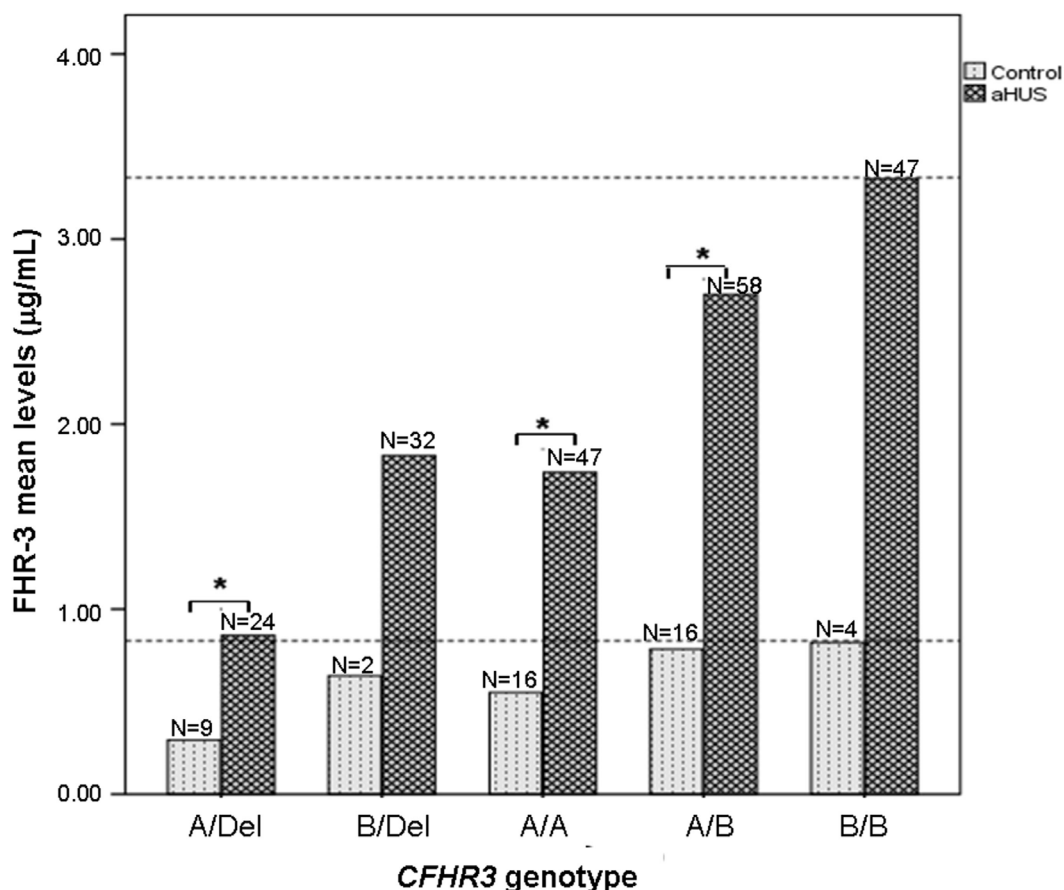
From the data in **Table 3**, we can also conclude that the *CFHR3*\*Del allele mostly presents in the *CFH*(*H4a*) and *CFH*(*H4b*) haplotypes, the *CFHR3*\*A allele in the *CFH*(*H1*) and *CFH*(*H2*) haplotypes and the *CFHR3*\*B allele in the *CFH*(*H3*) and *CFH*(*H8*) haplotypes. These conclusions were further supported by the inferred *CFH-CFHR3-CFHR1* haplotypes. Among the 208 patients expressing FHR-3 (groups G2–G6 in **Table 3**), 150 patients had *CFH-CFHR3-CFHR1* genotypes homozygous for at least two genes, thus allowing segregation of the corresponding *CFH-CFHR3-CFHR1* chromosomes. Some 25 different *CFH-CFHR3-CFHR1* haplotypes were observed, the most frequent being *CFH*(*H3*)–*CFHR3*\*B–*CFHR1*\*B (31.7%), *CFH*(*H4a*)–*CFHR3*\*Del–*CFHR1*\*Del (20%) and *CFH*(*H1*)–*CFHR3*\*A–*CFHR3*\*A (16.3%). An analysis of FHR-3 levels in

patients homozygous or hemizygous for these haplotypes revealed higher expression in those patients with the *CFH*(*H3*)–*CFHR3*\*B–*CFHR1*\*B than *CFH*(*H1*)–*CFHR3*\*A–*CFHR3*\*A haplotype ( $1.87 \pm 1.36$  µg/mL vs.  $0.9 \pm 0.43$  µg/mL; Kruskal–Wallis test,  $p < 0.001$ ).

FHR-3 levels were also higher in patients with mutations in the complement genes *CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3*, or *CFB*, than in patients without mutations ( $2.52 \pm 1.62$  vs.  $2.06 \pm 1.44$  µg/mL,  $p < 0.05$ ). This difference is probably explained by the different frequency of the *CFHR3*\*B allele in patients with mutations (79%) and without mutations (59%).

### FHR-3 Levels Are Higher in Patients With aHUS Than in Controls With the Same *CFHR3* Genotype

Having observed that FHR-3 levels are associated with *CFHR3*\*A/B/Del genotypes, we then compared FHR-3 levels in control individuals and in patients with aHUS with the same *CFHR3* genotype. FHR-3 levels were significantly higher in the patients with aHUS than in the controls with the same *CFHR3* genotypes A/Del, A/A or A/B, whereas in the *CFHR3* genotypes B/Del and B/B the differences in FHR-3 levels were not significant due to the small sample size of the control cohort (**Figure 3**). These results suggest that factors other than the *CFHR3*\*A/B/Del alleles



**FIGURE 3** | FHR-3 levels are higher in patients with atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) than in controls. Histogram showing the mean FHR-3 levels in controls and in patients with aHUS with different *CFHR3* genotypes. Statistically significant differences (Kruskal–Wallis test,  $p < 0.05$ ) are denoted by an asterisk. Dashed lines indicate the highest FHR-3 level observed in controls and patients.

contribute to FHR-3 levels. To determine whether FHR-3 levels change with age, all patients with aHUS and at least one copy of *CFHR3* were included in one of three subgroups, according to their age at blood sampling. No significant differences in FHR-3 concentration were observed when comparing all the patients together, or when they were further subdivided according to their *CFHR3* genotype (Figure 4).

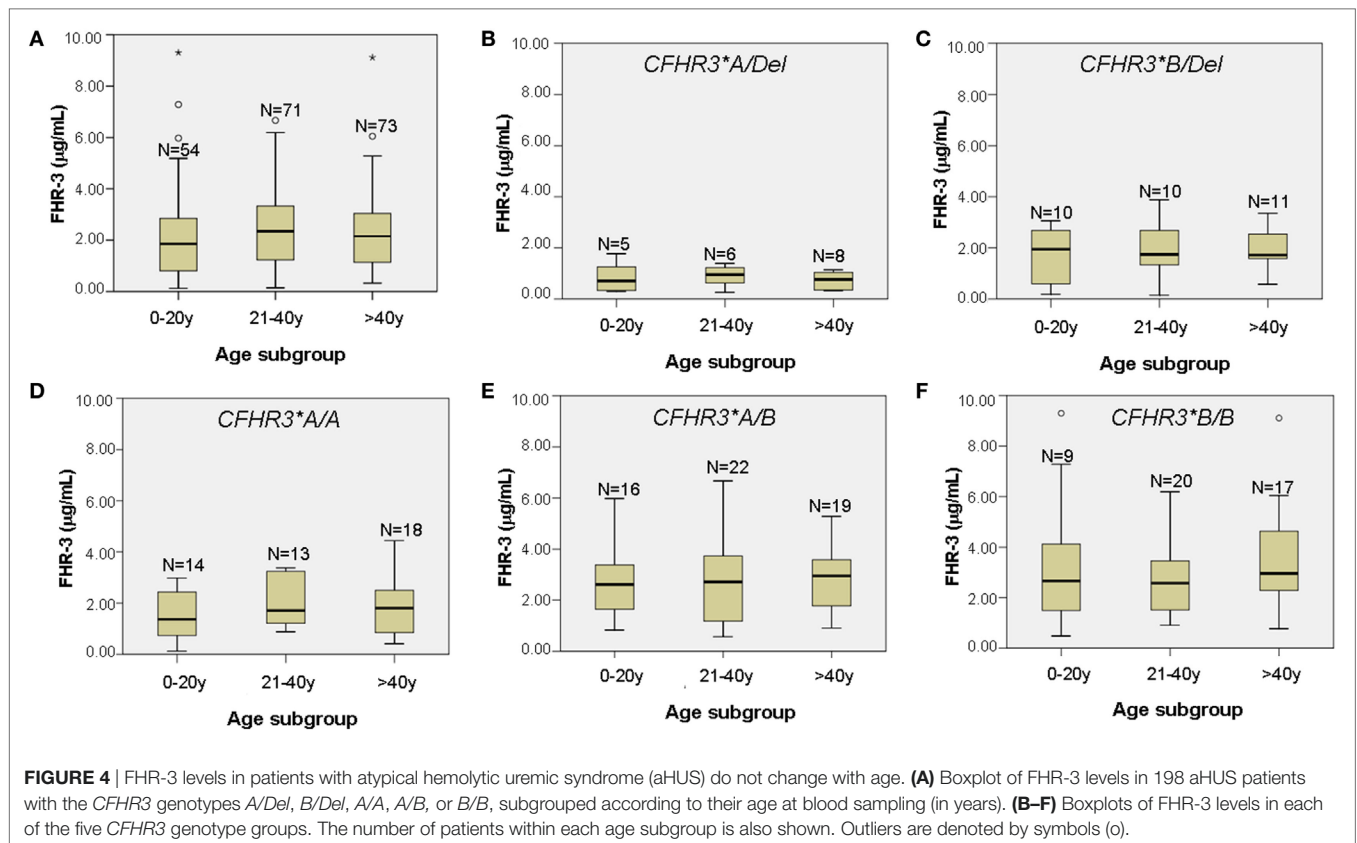
## DISCUSSION

In this study, we show that the aHUS-risk *CFHR3*\*B allele determines higher FHR-3 levels than the non-risk *CFHR3*\*A allele. This observation was anticipated by the analysis of 49 healthy Spanish controls genotyped for the *CFHR3*\*A/B/Del alleles and was further demonstrated in 230 patients with aHUS, most of Spanish origin.

FHR-3 levels in the 49 Spanish controls were  $0.58 \pm 0.26$  µg/mL, which was very similar to the 0.69 µg/mL previously determined in 100 Dutch controls (18). In fact, these results support the evidence indicating that the actual concentration of FHR-3 in plasma is indeed much lower than the initial estimation of

FHR-3 levels at 70–100 µg/mL (20). Moreover, we observed that the FHR-3 levels were significantly higher in the aHUS patients than in the control individuals ( $2.06 \pm 1.77$  vs.  $0.58 \pm 0.26$  µg/mL,  $p < 0.0001$ ). This result was not due to a significant difference in the allele frequency of *CFHR3*\*Del between patients and controls, because when the 22 aHUS patients and the 2 controls with the *CFHR3*\*Del/Del genotype and homozygous FHR-3 deficiency were excluded, a similar difference in FHR-3 levels was observed ( $2.28 \pm 1.72$  vs.  $0.61 \pm 0.24$  µg/mL,  $p < 0.0001$ ).

These results suggest that increased FHR-3 levels predispose to aHUS. This observation is in line with a previous study (21) that determined FHR-3 levels in 21 patients with aHUS ( $1.60 \pm 0.57$  µg/mL) and 21 controls ( $1.06 \pm 0.53$  µg/mL), although the difference in FHR-3 levels between their patient and control cohorts was smaller than in our study, which could well be related to the cohort size and the variation in allele frequency. In our study, 4% of the controls and 9% of the patients with aHUS carried the *CFHR3*\*Del/Del genotype (i.e., homozygous *CFHR3*-*CFHR1* deletion), frequencies comparable to the 2.9% and 12.4% observed in a French study comparing 70 controls and 117 patients with aHUS (22). However, in the study by Schäfer



et al. (Table S2 in Supplementary Material), as many as 14% of controls and 38% of patients with aHUS presented homozygous deficiency of FHR-3, and these high and very different frequencies limit the relevance of their observations when comparing aHUS patients and controls. High frequencies of homozygous *CFHR3–CFHR1* deletion have been reported in aHUS patients with anti-FH autoantibodies or with mutations in complement factor I (22), as well as in Middle Eastern and North African control populations (23, 24); the reason for the high frequency of the homozygous *CFHR3–CFHR1* deletion in certain control populations could be related with its protective role against age-related macular degeneration (25) and IgA nephropathy (26). In conclusion, the comparison of FHR-3 levels could be biased by the ethnic origin of controls and patients, and by the frequency of anti-FH autoantibodies or factor I mutations in the patient cohorts. These facts have to be taken into account when trying to establish proper comparisons between control and patient cohorts.

To adequately analyze the contribution of the *CFHR3\*A* and *CFHR3\*B* alleles to FHR-3 levels, patients and controls with the *CFHR3\*Del/Del* genotype were excluded. An analysis of the control cohort suggested a higher expression of the *CFHR3\*B* allele that was clearly confirmed in the aHUS cohort. Patients with the *CFHR3\*A/Del* genotype showed the lowest FHR-3 levels (0.684–1.032 µg/mL), patients with genotypes *B/Del* and *A/A* presented intermediate levels (1.437–2.201 µg/mL), and patients with genotypes *A/B* and *B/B* had the highest FHR-3

levels (2.330–4.056 µg/mL), explaining the wide individual range in FHR-3 concentrations between 0.684 and 4.056 µg/mL.

More importantly, statistically significant differences in FHR-3 levels were observed between the *CFHR3* genotypes *A/Del* and *B/Del* ( $p = 0.0043$ ), *A/A* and *A/B* ( $p = 0.0028$ ), and *A/A* and *B/B* ( $p = 0.0008$ ), demonstrating that the *CFHR3\*A* allele is associated with lower FHR-3 concentrations than the aHUS-risk *CFHR3\*B* allele. These data provide a genetic explanation for the increased FHR-3 levels observed in patients with aHUS, who present a higher frequency of the *CFHR3\*B* allele than control individuals. However, whether higher FHR-3 levels increase susceptibility to aHUS is currently unknown, and the potential pathogenic mechanism will remain elusive until the actual physiological role of FHR-3 within the complement system is fully understood.

Recombinant FHR-3 binds C3b and C3d with similar affinity to FH (27); once bound, however, it cannot regulate complement activation because it lacks domains homologous to the N-terminal region of FH (28, 29). Therefore, increased competition between FHR-3 and FH for C3b binding will theoretically result in reduced complement regulation. Because the molar FHR-3 concentration in plasma is approximately 140 times lower than the molar FH concentration (18), competition between FHR-3 and FH for plasma-C3b binding is likely to be irrelevant. Nevertheless, the FHR-3/FH ratio could be more relevant for appropriate regulation of complement activation on cellular surfaces, such as the damaged endothelium of patients



with aHUS. A recent study (30) shows a 1.3–1.9 increase in the FHR-1/FH molar ratio in patients with IgA nephropathy with disease progression. In our study, FHR-3 levels are 3.6 times higher in aHUS than in controls, while FH levels are only 1.2 times higher (not shown), but to demonstrate whether the increased FHR-3/FH ratio actually reduces complement regulation on the endothelial surface will require further investigation. Indirect evidence for competition between FH and FHR-3 on the cellular surface is provided by the functional characterization of a FH:FHR-3 hybrid protein identified in a familial case of aHUS (31). The authors suggest that the loss of FH regulatory activity of the hybrid FH:FHR-3 protein on cell-based assays could be explained because its C-terminal domains (belonging to FHR-3) prevent the correct orientation and function of the N-terminal domains (belonging to FH). A slightly different FH:FHR-3 hybrid protein, which also shows reduced FH regulatory activity on the cellular surface, has been reported in a sporadic case of aHUS (32). Based on these findings, we speculate that inefficient complement regulation on the cellular surface could also result from an altered FH/FHR-3 ratio. This would explain why the *CFH(H3)-CFHR3\*B-CFHR1\*B* haplotype, associated with reduced FH levels (17) and enhanced FHR-3 levels (this study) increases the risk of aHUS. The *CFH(H3)-CFHR3\*B-CFHR1\*B* haplotype also carries the *CFH* (rs1065489; p936D<E) and *CFHR3* variants (rs385390, rs426736, and rs371075) that were shown to confer protection against meningococcal disease (33); quantitation of FHR-3 levels and *CFHR3\*A/B/Del* genotyping in these patients will likely help establish the actual relationship between this haplotype and protection against *N. meningitidis* infection.

Another interesting conclusion from our study is that FHR-3 concentration is not only determined by the number of copies of the *CFHR3\*A* and *CFHR3\*B* alleles. Stratification by the *CFHR3\*A/B/Del* genotype still showed higher FHR-3 levels in patients with aHUS than in controls (Figure 3), suggesting that additional genetic and/or acquired factors contribute to the increased FHR-3 concentration in patients with aHUS. We cannot rule out the possibility that genetic variants within the adjacent *CFH* and *CFHR1* genes modulate *CFHR3* expression, but our current results do not favor this hypothesis (Table 3). Because plasma levels of FH have a wide range of variation and were shown to increase with age (34), we explored whether this was also the case for FHR-3 levels by analyzing data from the patients with aHUS. FHR-3 levels remain unchanged in the three age subgroups, either when considering the whole patient cohort, or when each *CFHR3* genotype was analyzed separately (Figure 4). A similar result was observed in the two age subgroups from the control cohort, but the small sample size and the absence of pediatric controls limit the relevance of this observation. Although FHR-3 does not appear to be an acute phase reactant (18), FHR-3 levels in patient samples could be associated with disease activity, in particular with the decreased renal function observed in aHUS. In this context, two recent studies in IgA nephropathy patients suggest that impaired renal function increases the FHR-1/FH ratio (30, 35). To fully understand the increased FHR-3 levels observed in patients with aHUS, it would

be necessary to monitor FHR-3 concentration in serial samples from patients along their clinical evolution, and renal function/damage over time.

In conclusion, in this study we show that *CFHR3\*A* is a low-expression allele, and *CFHR3\*B* is a high-expression allele, and that, next to *CFHR3* copies, other genetic factors determine the FHR-3 levels. We also show that the aHUS-risk *CFH(H3)-CFHR3\*B-CFHR1\*B* haplotype is associated with increased FHR-3 levels, and speculate that it leads to an imbalance between the local FH and FHR-3 concentration that predisposes patients to aHUS. These results uncover that genotyping for the *CFHR3\*A*, *CFHR3\*B*, and *CFHR3\*Del* alleles is necessary for a proper interpretation of FHR-3 levels within a certain pathological context, and we propose to incorporate these analysis to the current genetic workflow in aHUS patients.

## ETHICS STATEMENT

Patients and controls provided written informed consent, as approved by the ethical committees from La Paz University Hospital or the Biological Research Center.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RP, DW, and TK were responsible for quantitation of FHR-3 in patients and controls. IG genotyped the control individuals, performed statistical analyses, and prepared figures and tables. AL searched databases for *CFHR3* expression and prepared figures. SR was responsible for *CFH-CFHR3-CFHR1* genotyping in the patients with aHUS. PS-C designed the study, analyzed the data, and wrote the first draft of the manuscript. All the authors revised the data and contributed to the final version of the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate the technical assistance of Lorena Risueño, César Vélez, and Álex Otero in the management of biological samples of patients and controls. We thank Rosario Madero (IdiPAZ Biostatistics) for statistical help, and Vega Mauleón and Hoi Tong (IdiPAZ UCICEC) for blood sampling of the healthy Spanish volunteers. This study was funded by the Spanish Instituto de Salud Carlos III and the European Program FEDER (grants PI12/00597 and PI16/00723 to PS-C, and grant SAF2015-66287-R to SR), and by the Complement II-CM network (B2017/BMD-3673). RP and TK received funding from the European Union's seventh Framework program under EC-GA no. 279185 (EUCLIDS; www.euclids-project.eu). AL is supported by the Spanish Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00848/full#supplementary-material>.

## REFERENCES

1. Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* (2009) 361(17):1676–87. doi:10.1056/NEJMra0902814
2. Noris M, Remuzzi G. Cardiovascular complications in atypical haemolytic uraemic syndrome. *Nat Rev Nephrol* (2014) 10(3):174–80. doi:10.1038/nrneph.2013.280
3. Sánchez-Corral P, Melgosa M. Advances in understanding the aetiology of atypical Haemolytic Uraemic Syndrome. *Br J Haematol* (2010) 150(5):529–42. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08295.x
4. Kavanagh D, Goodship TH, Richards A. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Semin Nephrol* (2013) 33(6):508–30. doi:10.1016/j.semnephrol.2013.08.003
5. Rodríguez de Córdoba S, Hidalgo MS, Pinto S, Tortajada A. Genetics of atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS). *Semin Thromb Hemost* (2014) 40(4):422–30. doi:10.1055/s-0034-1375296
6. Le Quintrec M, Zuber J, Moulin B, Kamar N, Jablonski M, Lionet A, et al. Complement genes strongly predict recurrence and graft outcome in adult renal transplant recipients with atypical hemolytic and uremic syndrome. *Am J Transplant* (2013) 13(3):663–75. doi:10.1111/ajt.12077
7. Meri S. Self-nonsel discrimination by the complement system. *FEBS Lett* (2016) 590(15):2418–34. doi:10.1002/1873-3468.12284
8. Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Romenina LT. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol* (2013) 56:170–80. doi:10.1016/j.molimm.2013.06.001
9. Józsi M, Tortajada A, Uzonyi B, Goicoechea de Jorge E, Rodríguez de Córdoba S. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. *Trends Immunol* (2015) 36(6):374–84. doi:10.1016/j.it.2015.04.008
10. Caprioli J, Castelletti F, Bucchioni S, Bettinaglio P, Bresin E, Pianetti G, et al. 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* (2003) 12(24):3385–95. doi:10.1093/hmg/ddg363
11. Bresin E, Rurali E, Caprioli J, Sanchez-Corral P, Fremeaux-Bacchi V, Rodriguez de Cordoba S, et al. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol* (2013) 24(3):475–86. doi:10.1681/ASN.2012090884
12. Sansbury FH, Cordell HJ, Bingham C, Bromilow G, Nicholls A, Powell R, et al. Factors determining penetrance in familial atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet* (2014) 51(11):756–64. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102498
13. Dragon-Durey MA, Loirat C, Cloarec S, Macher MA, Blouin J, Nivet H, et al. Anti-factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* (2005) 16(2):555–63. doi:10.1681/ASN.2004050380
14. Zipfel PF, Edey M, Heinen S, Józsi M, Richter H, Misselwitz J, et al. Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet* (2007) 3(3):e41. doi:10.1371/journal.pgen.0030041
15. Józsi M, Licht C, Strobel S, Zipfel SL, Richter H, Heinen S, et al. Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood* (2008) 111(3):1512–4. doi:10.1182/blood-2007-09-109876
16. Abarrategui-Garrido C, Martínez-Barricarte R, López-Trascasa M, de Córdoba SR, Sánchez-Corral P. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* (2009) 114(19):4261–71. doi:10.1182/blood-2009-05-223834
17. Bernabéu-Herrero ME, Jiménez-Alcázar M, Anter J, Pinto S, Sánchez Chinchilla D, Garrido S, et al. Complement factor H, FHR-3 and FHR-1 variants associate in an extended haplotype conferring increased risk of atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol* (2015) 67(2 Pt B):276–86. doi:10.1016/j.molimm.2015.06.021
18. Pouw RB, Brouwer MC, Geissler J, van Herpen LV, Zeerleder SS, Wuillemin WA, et al. Complement factor H-related protein 3 serum levels are low compared to factor H and mainly determined by gene copy number variation in CFHR3. *PLoS One* (2016) 11(3):e0152164. doi:10.1371/journal.pone.0152164
19. Tortajada A, Yébenes H, Abarrategui-Garrido C, Anter J, García-Fernández JM, Martínez-Barricarte R, et al. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *J Clin Invest* (2013) 123(6):2434–46. doi:10.1172/JCI68280
20. Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, Stippa S, Keilhauer CN, Oppermann M, et al. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mol Genet* (2010) 19(23):4694–704. doi:10.1093/hmg/ddq399
21. Schäfer N, Grosche A, Reinders J, Hauck SM, Pouw RB, Kuijpers TW, et al. Complement regulator FHR-3 is elevated either locally or systemically in a selection of autoimmune diseases. *Front Immunol* (2016) 7:542. doi:10.3389/fimmu.2016.00542
22. Dragon-Durey MA, Blanc C, Marliot F, Loirat C, Blouin J, Sautes-Fridman C, et al. The high frequency of complement factor H related CFHR1 gene deletion is restricted to specific subgroups of patients with atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet* (2009) 46(7):447–50. doi:10.1136/jmg.2008.064766
23. Hageman GS, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, et al. Extended haplotypes in the complement factor H (CFH) and CFH-related (CFHR) family of genes protect against age-related macular degeneration: characterization, ethnic distribution and evolutionary implications. *Ann Med* (2006) 38(8):592–604. doi:10.1080/07853890601097030
24. Leban N, Abarrategui-Garrido C, Fariza-Requejo E, Amiñoso-Carbonero C, Pinto S, Chibani JB, et al. Factor H and CFHR1 polymorphisms associated with atypical haemolytic uraemic syndrome (aHUS) are differently expressed in Tunisian and in Caucasian populations. *Int J Immunogenet* (2012) 39(2):110–3. doi:10.1111/j.1744-313X.2011.01071.x
25. Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* (2006) 38(10):1173–7. doi:10.1038/ng1890
26. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet* (2011) 43(4):321–7. doi:10.1038/ng.787
27. Hellwege J, Jokiranta TS, Koistinen V, Vaarala O, Meri S, Zipfel PF. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett* (1999) 462(3):345–52. doi:10.1016/S0014-5793(99)01554-9
28. Kühn S, Skerka C, Zipfel PF. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H. *J Immunol* (1995) 155:5663–70.
29. Sharma AK, Pangburn MK. Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93(20):10996–1001. doi:10.1073/pnas.93.20.10996
30. Tortajada A, Gutiérrez E, Goicoechea de Jorge E, Anter J, Segarra A, Espinosa M, et al. Elevated factor H-related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation in IgA nephropathy. *Kidney Int* (2017) 92(4):953–63. doi:10.1016/j.kint.2017.03.041
31. Francis NJ, McNicholas B, Awan A, Waldron M, Reddan D, Sadlier D, et al. A novel hybrid CFH/CFHR3 gene generated by a microhomology-mediated deletion in familial atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* (2012) 119(2):591–601. doi:10.1182/blood-2011-03-339903
32. Challis RC, Araujo GS, Wong EK, Anderson HE, Awan A, Dorman AM, et al. A de novo deletion in the regulators of complement activation cluster producing a hybrid complement factor H/complement factor H-related 3 gene in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* (2016) 27(6):1617–24. doi:10.1681/ASN.2015010100
33. Davila S, Wright VJ, Khor CC, Sim KS, Binder A, Breunis WB, et al. Genome-wide association study identifies variants in the CFH region associated with host susceptibility to meningococcal disease. *Nat Genet* (2010) 42(9):772–6. doi:10.1038/ng.640
34. Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Almay L, Blangero J, Fontcuberta J, et al. Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics* (2004) 56(2):77–82. doi:10.1007/s00251-004-0660-7
35. Medjeral-Thomas NR, Lomax-Browne HJ, Beckwith H, Willicombe M, McLean AG, Brookes P, et al. Circulating complement factor H-related

proteins 1 and 5 correlate with disease activity in IgA nephropathy. *Kidney Int* (2017) 92(4):942–52. doi:10.1016/j.kint.2017.03.043


**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

*Copyright © 2018 Pouw, Gómez Delgado, López Lera, Rodríguez de Córdoba, Wouters, Kuijpers and Sánchez-Corral. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.*



## EXCEPTIONAL CASE

# Low factor H-related 5 levels contribute to infection-triggered haemolytic uraemic syndrome and membranoproliferative glomerulonephritis

Irene Gómez Delgado<sup>1</sup>, Josué Gutiérrez-Tenorio<sup>2</sup>, Gloria M. Fraga Rodríguez<sup>3</sup>, Teresa Caverro<sup>4</sup>, Emilia Arjona<sup>5,6</sup> and Pilar Sánchez-Corral <sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Complement Research Group, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), La Paz University Hospital, Madrid, Spain, <sup>2</sup>Department of Immunology, Complutense University and Research Institute Hospital 12 de Octubre, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, <sup>3</sup>Department of Paediatric Nephrology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>4</sup>Department of Nephrology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, <sup>5</sup>Department of Molecular Biomedicine, Centre for Biological Research, Madrid, Spain and <sup>6</sup>Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain

Correspondence to: Pilar Sánchez-Corral; E-mail: [pilar.sanchez-corral@idipaz.es](mailto:pilar.sanchez-corral@idipaz.es)

## ABSTRACT

Dysregulation of the alternative complement pathway is a major pathogenic mechanism in two rare renal diseases: atypical haemolytic uraemic syndrome (aHUS) and membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN). We report on a 66-year-old male with chronic hepatitis C virus (HCV) infection and a combined liver–kidney transplant that was diagnosed with MPGN at the age of 63 years and a 5-year-old boy who presented with aHUS at the age of 21 months following a *Streptococcus pneumoniae* infection. Both patients carried similar frameshift variants in the complement CFHR5 gene that segregate with reduced levels of factor H-related 5 (FHR-5). We conclude that low FHR-5 levels may predispose to viral and bacterial infections that then trigger different renal phenotypes.

**Keywords:** CFHR5, complement, HCV, HUS, MPGN, *Streptococcus pneumoniae*

## BACKGROUND

Pathogenic variants in complement genes that cause dysregulation of the alternative complement pathway are associated with several renal diseases. We describe two patients carrying similar frameshift variants in complement CFHR5 who developed haemolytic uraemic syndrome (HUS) or membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN).

## CASE REPORTS

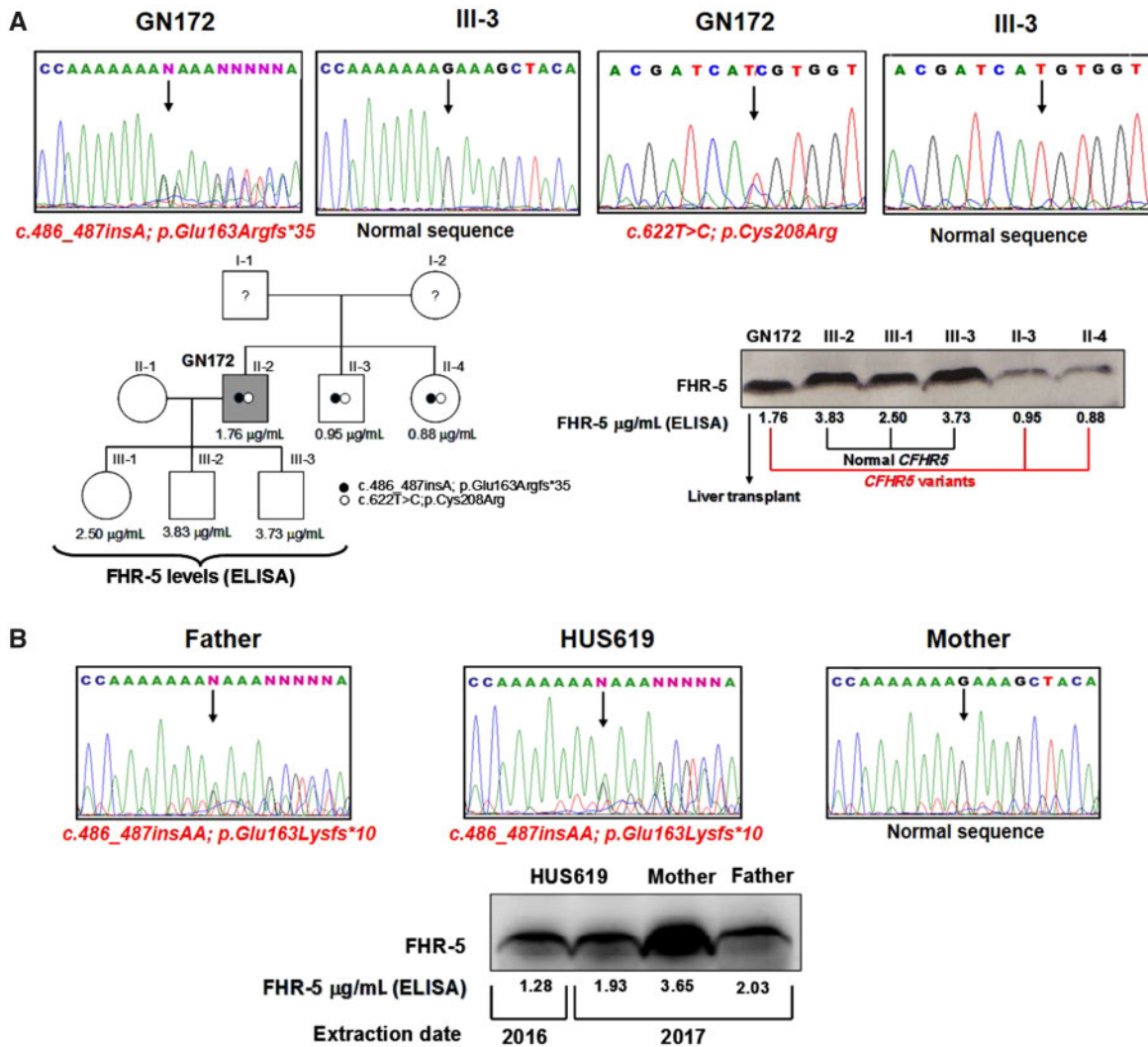
### Patient GN172

In 1997, a 45-year-old male with cirrhosis secondary to chronic hepatitis C virus (HCV) infection received his first orthotopic liver transplantation (OLT). In 2002 he presented with acute renal failure, mild proteinuria and microhaematuria. A renal biopsy was contraindicated because of thrombocytopenia and coagulopathy and the

Received: 5.6.2019; Editorial decision: 31.12.2019

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of ERA-EDTA.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)



**FIGURE 1:** Genetic variants and protein levels in patients GN172 and HUS619. (A) Two genetic variants in *CFHR5* exon 4 (c.486\_487insA; p.Glu163Argfs\*35) and *CFHR5* exon 5 (c.622T>C; p.Cys208Arg) that segregated in the same allele were observed in patient GN172 and his two brothers, but in none of his children. Carriers of the double-mutated *CFHR5* allele have lower FHR-5 levels, as determined by Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay. FHR-5 levels in the patient GN172 are higher than in his two brothers because he has a liver transplant. (B) Patient HUS619, who developed HUS in the context of a *Streptococcus pneumoniae* infection, has a similar variant in the *CFHR5* exon 4 (c.486\_487insA; p.Glu163Lysfs\*10) that was inherited from his father, and that determines lower FHR-5 levels. Patients GN172 and HUS619 did not present mutations in the *CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFB*, *CFHR1-4*, *THBD* or *DGKE* genes.

patient was started on haemodialysis. In 2003 he required a second OLT but the transplant failed acutely because of an arterial thrombosis. Subsequently the patient received his third OLT and his first kidney transplant. The patient progressed satisfactorily while receiving tacrolimus and prednisone. A further HCV recurrence on the liver graft was treated successfully with ribavirin and interferon. In 2015 the patient presented with oedema and hypertension. Laboratory tests revealed acute renal failure, hypoalbuminaemia, nephrotic proteinuria and microhaematuria. Anti-nuclear antibody, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, anti-DNA, anti-glomerular basement membrane, anti-human leucocyte antigen antibodies, cryoglobulins and HCV viraemia were all negative. A renal biopsy showed thickening of the capillary walls and mesangial matrix proliferation, with immunoglobulins, light chains and complement deposits suggesting immune complex-mediated MPGN (Supplementary data, Figure S1). Despite 6-methylprednisone and rituximab treatment, the patient finally required dialysis. C3 nephritic factor and anti-factor H antibodies were negative, but low C3 with normal C4 levels suggested

activation of the alternative complement pathway. Two heterozygous changes in the *CFHR5* gene determining low plasma factor H-related 5 (FHR-5) levels were detected (Figure 1A). After a second kidney transplant in 2017 with pre-emptive eculizumab for 6 months, the patient has remained stable while receiving the standard immunosuppression and there have been no signs of disease recurrence.

#### Patient HUS619

A 21-month-old boy not vaccinated against pneumococcus presented with pneumonia complicated by pleural empyema, and antibiotic treatment was started (Supplementary data, Figure S2). Polymerase chain reaction was positive for influenza B virus. Two days later he needed to be intubated and required mechanical ventilation; infusions of red blood cells, platelets and plasma, as well as vasoactive amines and continuous venovenous haemofiltration (CVVH) were also necessary. Analytical data were haemoglobin 6.4 g/dL, platelets 30 000/ $\mu$ L, ADAMTS13 54%, schistocytes 9%, haptoglobin <0.06 g/L, creatinine

119  $\mu\text{mol/L}$ , estimated glomerular filtration rate 30 mL/min/1.73  $\text{m}^2$ , cystatin C 1.62 mg/L, lactic dehydrogenase 4290 UI/L, direct Coombs test negative, erythrocyte poly-agglutination T test positive, CH50 <16.47 UI/mL, C3 46.4 mg/dL and C4 10.80 mg/dL. Serum analyses for cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human herpes virus type 6, hepatitis B virus, HCV, human immunodeficiency virus types 1 and 2, blood culture and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* were negative, but pneumococcal antigen was detected in urine and pleural fluid and the patient was diagnosed with *S. pneumoniae* HUS (SP-HUS). Urinalysis showed microhaematuria and proteinuria (29.20 g/L, protein/creatinine 33450 mg/mmol) and renal ultrasound revealed increased bilateral echogenicity. The patient became hypertensive and needed CVVH for 13 days. On Day 30, a blood sample was drawn for genetic studies. A variant in the *CFHR5* gene was found to be heterozygous and shown to determine low FHR-5 levels (Figure 1B). The patient progressed well and was discharged on Day 52, remaining stable 3 years later.

## DISCUSSION

Genetic and/or acquired factors that result in dysregulation of the alternative complement pathway are present in many atypical haemolytic uraemic syndrome (aHUS) and immune complex-mediated membranoproliferative glomerulonephritis (IC-MPGN) patients. A role for complement in the pathogenesis of HUS occurring after SP-HUS has been previously suggested [1], but only a few paediatric *Streptococcus pneumoniae*-associated HUS (SP-HUS) cases having complement genetic variants have been reported [2]. We describe a paediatric SP-HUS patient who had not been vaccinated against pneumococcus and an adult patient with chronic HCV infection status who developed IC-MPGN after liver-kidney transplant. The two patients presented with similar variants in the complement *CFHR5* gene that generate premature stop codons and result in reduced plasma levels of FHR-5. The *CFHR5* variant present in patient GN172 had been previously observed in a post-streptococcal MPGN case and suggested a predisposition to chronic kidney disease [3].

FHR-5 is a 65-kDa plasma protein that may locally enhance complement activation by different mechanisms, including binding to the extracellular matrix and to the acute phase protein pentraxin 3 [4]. Abnormal FHR-5 proteins that increase complement activation have been described in familial cases of C3 glomerulopathies, as initially reported in a large Cypriot pedigree [5]. Conversely, reduced FHR-5 levels should decrease complement activation and increase susceptibility to infections. Why an FHR-5 haploinsufficiency resulted in IC-MPGN (patient GN172) or SP-HUS (patient HUS619) is currently unknown; the viral or pneumococcal infections might have triggered different pathogenic mechanisms in these patients, but other genetic predisposing factors may also contribute.

In summary, we have shown that genetic variants leading to reduced FHR-5 levels may contribute to IC-MPGN or SP-HUS and recommend reconsidering complement genetic screening in these patients.

## PATIENT CONSENT

The patients gave informed consent to publish this case.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at ckj online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We appreciate the technical assistance of César Vélez Casanova in the management of biological samples of patients and controls. We also thank Dr Sonia Brio Sanagustin and Dr Marina Alonso for providing clinical data and Dr Elena Goicoechea de Jorge for helpful suggestions and critical reading of the manuscript.

## FUNDING

This study was funded by the Spanish 'Instituto de Salud Carlos III' (ISCIII) and the European Regional Development Fund from the European Union (grant PI16/00723 to P.S.-C.). I.G.D. is supported by the Autonomous Region of Madrid (Complement II-CM network; B2017/BMD-3673) and by the Spanish Fundación Senefro (<http://www.senefro.org/>). J.G.-T. is supported by the Spanish 'Ministerio de Economía y Competitividad' (SAF2014-52339P, BES-2015-073833). E.A. is supported by the Autonomous Region of Madrid (Complement II-CM network; B2017/BMD-3673).

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

I.G.D. performed genetic studies and Western blot analyses and prepared figures. J.G.-T. carried out Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay studies. G.M.F.R. and T.C. gathered and described clinical data and prepared figures. E.A. collected biological samples and searched the Spanish aHUS/C3G database ([www.ahusc3g.es](http://www.ahusc3g.es)). P.S.-C. designed the study, prepared figures and wrote the first draft of the manuscript. All the authors revised the data and contributed to the final version of the manuscript.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared. P.S.-C. and G.M.F.R. have received speaking fees from Alexion Pharmaceuticals.

The results presented in this article have not been published previously in whole or part, except in abstract format (Abstracts from the 27th International Complement Workshop. *Mol Immunol* 2018; 102: 155).

## REFERENCES

- Gilbert RD, Nagra A, Haq MR. Does dysregulated complement activation contribute to haemolytic uraemic syndrome secondary to *Streptococcus pneumoniae*? *Med Hypotheses* 2013; 81: 400–403
- Szilágyi Á, Kiss N, Bereczki C et al. The role of complement in *Streptococcus pneumoniae*-associated haemolytic uraemic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28: 2237–2245
- Vernon KA, Goicoechea de Jorge E, Hall AE et al. Acute presentation and persistent glomerulonephritis following streptococcal infection in a patient with heterozygous complement factor H-related protein 5 deficiency. *Am J Kidney Dis* 2012; 60: 121–125
- Csincsi ÁI, Kopp A, Zöldi M et al. Factor H-related protein 5 interacts with pentraxin 3 and the extracellular matrix and modulates complement activation. *J Immunol* 2015; 194: 4963–4973
- Gale DP, de Jorge EG, Cook HT et al. Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *Lancet* 2010; 376: 794–801



# Complement Genetic Variants and FH Desialylation in *S. pneumoniae*-Haemolytic Uraemic Syndrome

Irene Gómez Delgado<sup>1</sup>, Fernando Corvillo<sup>1,2</sup>, Pilar Nozal<sup>2,3</sup>, Emilia Arjona<sup>2,4</sup>, Álvaro Madrid<sup>5</sup>, Marta Melgosa<sup>6</sup>, Juan Bravo<sup>6</sup>, Ágnes Szilágyi<sup>7</sup>, Dorottya Csuka<sup>8</sup>, Nóra Veszeli<sup>8</sup>, Zoltán Prohászka<sup>7</sup> and Pilar Sánchez-Corral<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Complement Research Group, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), La Paz University Hospital, Madrid, Spain, <sup>2</sup> Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain, <sup>3</sup> Immunology Unit, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), La Paz University Hospital, Madrid, Spain, <sup>4</sup> Department of Cellular and Molecular Medicine, Margarita Salas Center for Biological Research, Madrid, Spain, <sup>5</sup> Pediatric Nephrology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, <sup>6</sup> Pediatric Nephrology Unit, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), La Paz University Hospital, Madrid, Spain, <sup>7</sup> Research Laboratory, Department of Internal Medicine and Hematology, Semmelweis University, Budapest, Hungary, <sup>8</sup> Research Group for Immunology and Haematology, Semmelweis University- Eötvös Loránd Research Network (Office for Supported Research Groups), Budapest, Hungary

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Seppo Meri,  
University of Helsinki, Finland

### Reviewed by:

Lubka T. Roumenina,  
INSERM U1138 Centre de Recherche  
des Cordeliers (CRC), France  
Christoph Q. Schmidt,  
University of Ulm, Germany

### \*Correspondence:

Pilar Sánchez-Corral  
pilar.sanchez-corral@idipaz.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Innate Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 14 December 2020

**Accepted:** 15 February 2021

**Published:** 11 March 2021

### Citation:

Gómez Delgado I, Corvillo F, Nozal P, Arjona E, Madrid Á, Melgosa M, Bravo J, Szilágyi Á, Csuka D, Veszeli N, Prohászka Z and Sánchez-Corral P (2021) Complement Genetic Variants and FH Desialylation in *S. pneumoniae*-Haemolytic Uraemic Syndrome.  
*Front. Immunol.* 12:641656.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.641656

Haemolytic Uraemic Syndrome associated with *Streptococcus pneumoniae* infections (SP-HUS) is a clinically well-known entity that generally affects infants, and could have a worse prognosis than HUS associated to *E. coli* infections. It has been assumed that complement genetic variants associated with primary atypical HUS cases (aHUS) do not contribute to SP-HUS, which is solely attributed to the action of the pneumococcal neuraminidase on the host cellular surfaces. We previously identified complement pathogenic variants and risk polymorphisms in a few Hungarian SP-HUS patients, and have now extended these studies to a cohort of 13 Spanish SP-HUS patients. Five patients presented rare complement variants of unknown significance, but the frequency of the risk haplotypes in the *CFH-CFHR3-CFHR1* region was similar to the observed in aHUS. Moreover, we observed desialylation of Factor H (FH) and the FH-Related proteins in plasma samples from 2 Spanish and 4 Hungarian SP-HUS patients. To analyze the functional relevance of this finding, we compared the ability of native and “*in vitro*” desialylated FH in: (a) binding to C3b-coated microtiter plates; (b) proteolysis of fluid-phase and surface-bound C3b by Factor I; (c) dissociation of surface bound-C3bBb convertase; (d) haemolytic assays on sheep erythrocytes. We found that desialylated FH had reduced capacity to control complement activation on sheep erythrocytes, suggesting a role for FH sialic acids on binding to cellular surfaces. We conclude that aHUS-risk variants in the *CFH-CFHR3-CFHR1* region could also contribute to disease-predisposition to SP-HUS, and that transient desialylation of complement FH by the pneumococcal neuraminidase may have a role in disease pathogenesis.

**Keywords:** factor H, *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus), Haemolytic Uraemic Syndrome, genetic variant, complement system

## INTRODUCTION

*Streptococcus pneumoniae* (SP) infections can give rise to potentially life-threatening infections such as pneumonia, meningitis or sepsis, especially in children under 2 years of age (1, 2). In the last 20 years, the generalization of vaccination against several SP serotypes have dramatically reduced the incidence and morbidity/mortality of these conditions, but many serotypes are not covered by vaccination and some are antibiotic-resistant (3).

Invasive *S. pneumoniae* infections sometimes result in a form of Haemolytic Uraemic Syndrome (SP-HUS) with high morbidity/mortality (1, 4, 5). It is thought that SP-HUS results from desialylation of host cells by the pneumococcal neuraminidase, which result in the exposition of the *Thomsen-Friedenreich* antigen (TF) in erythrocytes, platelets and glomeruli and its subsequent interaction with natural anti-TF antibodies (6, 7), and/or in reduced protection of host cells against autologous complement (8, 9). On the assumption that this is the main pathogenic mechanism, it is generally accepted that complement genetic variants are not involved in predisposition to SP-HUS (10). Nonetheless, we have already described a few SP-HUS patients presenting rare genetic variants in complement genes (11, 12), and these findings suggested that the complement contribution to SP-HUS could be underestimated.

Human Complement can eliminate *S. pneumoniae* through different mechanisms (13). *S. pneumoniae* activates the complement classical pathway, as illustrated by the high incidence of infections in individuals with deficiency of C1q, C2, or C4 (14). Nonetheless, the lectin and alternative pathways also contribute to bacterial killing, which is mainly done through opsonophagocytosis, and to a lesser extent through inflammation. Assembly of the Membrane Attack Complex on the pathogen surface, on the contrary, is of little relevance because of the presence of the *S. pneumoniae* capsule, which is a very important virulence factor and the first barrier against the immune system proteins.

*S. pneumoniae* can also avoid elimination by human complement by expressing several proteins (PspC, SpsA, Hic, C3-binding protein) that interact with human Factor H (FH), the main regulator of the complement alternative pathway (15, 16). FH is a 150-kDa plasma glycoprotein that is essential to control complement activation on plasma and on cellular surfaces, thus preventing hypocomplementemia and self-damage (17). The complement regulatory activities of FH rely on its interaction with soluble or surface-bound C3b, and with negatively-charged molecules (mainly sialic acids and glycosaminoglycans) present on host's cells and tissues. The distribution of ligand-binding sites in FH is well-known. The N-terminal, SCRs 1-4 domains bind to soluble C3b, SCRs 6-7 recognize soluble or surface polyanions, and the C-terminal, SCRs 19-20 domains recognize both C3b and polyanions on cellular surfaces (18, 19). Defective function of the N-terminal domains of FH provokes uncontrolled complement activation in plasma and deposition of C3b fragments on

autologous cells and tissues, thus favoring renal pathologies such as membranoproliferative glomerulonephritis. Defective function of the C-terminal domains of FH, in the other hand, predominantly alter complement regulation on cellular surfaces, and contributes to the endothelial damage characteristic of the thrombotic microangiopathy atypical HUS (aHUS) (20). FH function could be modulated by their homologous FH-Related (FHR) proteins, a group of plasma proteins whose precise role on complement physiopathology is not fully understood (21, 22).

In this report, we extend our complement findings to a cohort of 13 Spanish SP-HUS patients. We confirm the presence of rare complement genetic variants in SP-HUS patients, and show that there is a high frequency of some FH and FHRs polymorphisms associated to aHUS. Moreover, we report for the first time the transient desialylation of FH and FHR proteins by the pneumococcal neuraminidase in plasma samples from a few Spanish and Hungarian SP-HUS patients, and present functional data suggesting that FH sialic acids have a certain role in complement regulation on cellular surfaces.

## MATERIALS AND METHODS

### Blood Samples

Blood samples from 13 Spanish and 11 Hungarian SP-HUS patients were drawn during the acute episode or at remission. EDTA-plasma was aliquoted and stored at  $-20$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  until use, to avoid repeated freezing and thawing; peripheral blood leukocytes (PBLs) were used to prepare genomic DNA by standard procedures. Blood samples were also obtained from healthy volunteers. Patients and controls provided written informed consent, as approved by the ethical committees from La Paz University Hospital or the Semmelweis University.

### Genetic Studies

Mutational screening on the Spanish patients was determined by an in-house next generation sequencing (NGS) panel which includes all the complement genes relevant to aHUS (23). Copy number variation in the *CFH-CFHRs* region was analyzed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) with the P236 A1 ARMD mix 1 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Genotyping of the *CFHR3\* A/B* alleles was performed by Sanger sequencing of *CFHR3* exon 5 (24). Genetic analysis of the Hungarian patients was done as described previously (11).

### WBs Analyses of Plasma Samples Primary and Secondary Antibodies

Rabbit polyclonal antibodies recognizing FH and different FHRs were generated in-house, or kindly provided by Dr. Richard Pouw and Dr. Mihály Jozsi. The anti-FH monoclonal antibodies (mAb) OX24 and C18 were from ThermoFisher (MA170057 and GAU0180302); the anti-FHR-1/FHR-2 mAb JHD7 was from Hycult Biotech (HM2301); the anti-FHR-4 mAb (MAB5980) and the anti-FHR-5 mAb (MAB3845) were from R&D. Rabbit polyclonal anti-human transferrin antibody PA527306 was from ThermoFisher. HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG were obtained from Santa

**Abbreviations:** aHUS, Atypical HUS; HUS, Haemolytic Uraemic syndrome; FH, Factor H, FHR, Factor H-Related, FI, Factor I, RCA-I, *Ricinus Communis Agglutinin I*, SNA, *Sambucus Nigra Agglutinin*, SP, *Streptococcus pneumoniae*.



Cruz, and used as secondary antibodies. Primary and secondary antibodies were diluted in Tris/Tween buffer containing 2% ECL Advance blocking agent (GE Healthcare). Secondary antibodies solutions also contained the Streptactin reagent (Bio-Rad), to further visualize the molecular weight markers by chemiluminescence.

### Western Blot Protocol

Plasma proteins (1-2  $\mu$ L of EDTA-plasma) were separated on 10% polyacrylamide gels by SDS-PAGE under the following conditions: 50 mA/30 min; 75 mA/30 min; 100 mA/90 min. Molecular weight markers (WesternC blotting standards; Bio-Rad) were also loaded in every gel. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (iBlot™ Transfer Stacks) using an iBlot Dry Blotting System (ThermoFisher), and blocked overnight at 4°C with 2% ECL Advance blocking agent in Tris/Tween. The membranes were incubated at room temperature with primary antibodies for 2 h, and with secondary antibodies for 30 min, and developed with a chemiluminescent substrate (ECL Advance Kit; GE Healthcare). Gel images were detected in a CCD camera (UVITEC Cambridge). Tris/Tween buffer was used for all washing steps.

Two-dimensional Western-blot analysis of FH/FHRs was done following our previously described protocol (25). Briefly, 200  $\mu$ L of EDTA-plasma samples were adsorbed in heparin columns under low ionic strength, and 150  $\mu$ g of the protein eluate (free from plasma albumin and immunoglobulins) were subjected to analytical Isoelectrofocusing (first dimension) using 7 cm-IPG strips of pH 3-10 or pH 4-7 (GE Healthcare). The IPG strips were then subjected to SDS-PAGE (second dimension) and Western-blot as described above.

### ELISA Assay for FHR-5 Levels

A sandwich ELISA that uses two capture antibodies and was originally developed by Dr. Elena Goicoechea de Jorge (Department of Immunology, Complutense University of Madrid) was adopted with small modifications. 96-well microtiter plates were coated with 50  $\mu$ L of goat anti-mouse IgG<sub>2a</sub> (Southern Biotech, 1080-01, 1/5,000 in PBS) and incubated overnight at 4°C. Plates were washed twice with washing buffer (PBS-0.2% Tween 20), and blocked for 1 h at 37°C with 100  $\mu$ L of blocking buffer (PBS-1% BSA). After three washes, the plates were incubated for 1 h at 37°C with 50  $\mu$ L of an in-house monoclonal antibody which recognizes FHR-1, FHR-2, and FHR-5 (2C6, IgG<sub>2a</sub> isotype, 1/4,000 dilution). Plates were washed four times, and 50  $\mu$ L of 1/800 and 1/1,600 dilutions of plasma samples were incubated for 1 h at 37°C. After 4 washes, 50  $\mu$ L of a mouse anti-FHR-5 monoclonal antibody (MAB3845 from R&D, IgG<sub>1</sub> isotype, 1/500 dilution) were added, and incubated at 37°C for 1 h. Plates were washed 4 times, incubated at 37°C for 30 min with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG<sub>1</sub> (1/5,000 dilution), and washed five times. A colored reaction was developed by using O-phenylenediamine dihydrochloride as substrate, the reaction was stopped with 10% sulfuric acid, and the absorbance was measured at 492 nm. A plasma sample with known FHR-5 levels was used as a standard curve.

### Neuraminidase Activity Assay

Neuraminidase activity in plasma samples was determined by using the Neuraminidase Activity AssayKit (MAK121; Sigma-Aldrich) following the manufacturer's protocol. Briefly, 20  $\mu$ L of whole plasma or plasma dilutions (1/5, 1/10, 1/50) were loaded onto 96-well microtiter plates; upon addition of 80  $\mu$ L of the reaction mix, the plates were incubated at 37°C for a total of 50 min, with absorbance readings at 570 nm at 20 min and 50 min. The absorbance increase from 20 to 50 min was used to calculate neuraminidase activity using a standard curve.

### FH Desialylation and Lectin Blotting

Twenty-five  $\mu$ g of FH (CompTech) in a volume of 25  $\mu$ L were added to 100  $\mu$ L of 0.1 M sodium acetate, pH 5, 25  $\mu$ L of 1% BSA and 25  $\mu$ L of *Clostridium perfringens* Neuraminidase (Sigma-Aldrich). Upon incubation at 37°C for 4 h under gentle shaking, the reaction was stopped with 25  $\mu$ L of 0.5 M sodium hydrogen carbonate, pH 9.8. The same amount of FH was incubated in parallel in the same conditions, but without neuraminidase. The two FH samples (native and neuraminidase-treated) were loaded in triplicate on a 10% polyacrylamide gel, and after SDS-PAGE the samples were transferred to a nitrocellulose membrane as described above. The membrane was cut into 3 sections, each containing native and neuraminidase-treated FH; one section was incubated with rabbit polyclonal anti-FH antibodies, and the other two sections were incubated with two lectins with different sugar specificity, as described below.

Lectin RCA-I (*Ricinus Communis Agglutinin I*), which preferentially binds  $\beta$ -D-galactose residues, and lectin SNA (*Sambucus Nigra Agglutinin*), which binds  $\alpha$ (2-6)-linked sialic acids, were purchased from Vector Laboratories, and used for blotting as reported (26). Membranes were blocked with MAL buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% BSA, 0.2% Tween-20) for 1 h at room temperature, and incubated overnight with 10 mL of 1  $\mu$ g/mL biotinylated SNA or RCA-I in SNA buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% BSA, 0.1% Tween-20, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>). Membranes were washed three times for 10 min with 10 mL of SNA buffer, and then incubated for 1 h with 10 mL of 1  $\mu$ g/mL streptavidin coupled with horseradish peroxidase (HRP). After 3 additional washes, the membranes were developed with a chemiluminescent substrate (ECL Advance Kit; GE Healthcare).

### Binding of FH and Desialylated FH (dFH) to C3b-Coated Microtiter Plates

The binding of FH and dFH to surface-bound C3b was determined according to our reported ELISA protocol (27), with a few modifications. 96-well polystyrene microtiter plates (Nunc MaxiSorp®) were coated overnight at 4°C with 0.4  $\mu$ g of purified C3b in 100  $\mu$ L of 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.5. Plates were washed three times in TNT buffer (50 mM Tris/ HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20), and the wells were blocked at 37°C for 1 h with 1% BSA-TNT buffer. After washing, 100  $\mu$ L of serial dilutions (from 2  $\mu$ g/mL to 0.0325  $\mu$ g/mL) of FH or dFH in 1% BSA-TNT buffer were added in duplicate, and allowed to interact with the surface-bound C3b at 37°C for 1 h. After three washes, 100  $\mu$ L of an in-house rabbit anti-human FH polyclonal antibody

which lacks reactivity against human C3b were added, and the plates were incubated at 37°C for 1 h. After three more washes, 100 µL of a 1/1,000 dilution of goat anti-rabbit immunoglobulin G antibody coupled with HRP (Santa Cruz) was added, and the plates were kept at 37°C for other 30 min. The plates were washed three times, and the enzymatic reaction was developed with ABTS (Merck), and stopped with 0.1% sodium azide. The binding of FH/dFH to the C3b-coated wells was determined by reading absorbance at 405 nm.

### Proteolytic Assays of C3b by FI

The cofactor activity of FH and dFH in the proteolytic cleavage of C3b by FI in the fluid phase was determined basically as described (28). Purified C3b (750 ng), FI (125 ng), and FH/dFH (100 ng) were diluted in 25 µL of 10 mM HEPES buffer, pH 7.5, 0.02% Tween 20 in Eppendorf microtubes (final concentrations: 170 nM C3b, 57 nM FI, 26 nM FH/dFH). Proteins were incubated at 37°C during 2.5 or 12.5 min, and after addition of 5 µL of 5X SDS-sample buffer solution with β-mercaptoethanol, 3 µL aliquots were subjected to 10% SDS-PAGE and Western-blot, as described above. An anti-C3 antibody generated in rabbits (ab200999, Abcam) was used as a primary antibody; this antibody recognizes the α' chain of C3b and the α45 fragment of iC3b, but not the β chain. Upon completion of the Western-blot protocol, the gel images were analyzed with the ImageQuant TL software (GE Healthcare). For every incubation time, the intensity of the C3bα' band plus the intensity of the iC3bα45 band in the gel lane was set to 100%, and the amount of C3b cleavage was then calculated as the percentage of the remaining C3bα' band.

To analyse the cofactor activity of FH/dFH in the proteolytic cleavage of C3b by FI in the solid phase, 600 ng of C3b in 30 µL of PBS were added to microtiter wells, and incubated 1 h at 37°C. After 3 washing steps with PBS, 30 µL of a solution containing 100 ng of FI and 80 ng of FH/dFH were added (final concentrations: 100 nM C3b, 38 nM FI, 17 nM FH/dFH). Five µL of 5X SDS-sample buffer solution with β-mercaptoethanol were immediately added to one of the wells (0 time point). The plate was then incubated at 37°C, and the proteolytic reaction in the other wells was stopped after 2.5, 12.5, or 22.5 min by addition of 5 µL of 5X SDS-Sample buffer solution. The well content was carefully mixed by hand, and analyzed by 10% SDS-PAGE and Western-blot, using the same protocol as for the proteolysis in the fluid phase.

### ELISA Assay for C3 Convertase Decay-Accelerating Activity

The decay-accelerating activity of FH/dFH was analyzed by generating Properdin-stabilized C3bBb (C3bBbP) on microtiter plates. One hundred µL of 5 µg/mL C3b in PBS were immobilized overnight at 4°C on microtiter plates (Nunc Medisorb). Plates were washed three times with assay buffer (2.5 mM sodium barbitone, pH 7.4, 71 mM NaCl, 0.15% Tween, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NiSO<sub>4</sub>) and blocked for 1 h at 37°C with 1% BSA-assay buffer. C3bBbP was then generated by adding 50 µL of a solution containing 2 µg/mL FB, 0.2 µg/mL FD,

and 4 µg/mL Properdin, in 1% BSA-assay buffer. Increasing concentrations of FH/dFH (from 0.039 to 5 µg/mL) were then added, and incubated at 37 °C for 30 min. Plates were washed in assay buffer, and the remaining C3bBbP molecules were detected with a murine anti-Bb antibody (A227, Quidel; 1/500, 37°C, 1 h). After washing, a 1/2,500 dilution of a peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) was incubated for 1 h. A colored reaction was developed by using ABTS (Merck) as peroxidase substrate, and absorbance was read at 405 nm.

### Haemolytic Assays on Sheep Erythrocytes

Lysis of sheep erythrocytes by a serum sample from an aHUS patient carrying the FH mutation W1183L was performed as described (29). The amount of patient's serum giving about 50% lysis was then chosen to compare the capacity of increasing concentrations of FH/dFH (from 2.5 to 20 µg/mL) to prevent lysis.

Lysis of sheep erythrocytes by a normal human serum was induced by adding different amounts of the FH monoclonal antibodies OX24 (recognizing SCR5) or C18 (recognizing SCR20), as already reported (30). The amount of each antibody capable to induce 60–70% lysis was then used to test the capacity of increasing concentrations of FH/dFH (from 1 to 15 µg/mL) to prevent lysis.

In all the experiments, sheep erythrocyte lysis was calculated by reading absorbance at 414 nm.

## RESULTS

### Complement Rare Variants and Risk Polymorphisms in the Spanish Cohort of SP-HUS

From 2006 to 2019 we performed complement studies in 13 Spanish HUS patients (seven males and six females) who were diagnosed in the context of an *S. pneumoniae* infection (Table 1). All the patients but one were younger than 3 years at disease onset. Genetic screening of *CFH*, *MCP*, *CFI*, *CFB*, *C3*, the five *CFHR* genes, and other complement genes was undertaken in nine patients; genetic screening could not be done in one patient, and was uncompleted in three patients.

Rare complement variants were found in heterozygosis in five patients (four males and one female). Patient H150 carries a rare *CFHR3* variant (c.796+1G>A) that alters normal splicing and results in a null allele, and he also carries the *CFHR3-CFHR1* deletion (*DelCFHR3-CFHR1* or  $\Delta_{CFHR3-CFHR1}$ ); thus, the two variants generate homozygous FHR-3 deficiency in this patient (25). Patient H619 presents partial FHR-5 deficiency, and he has recently been described together with a glomerulonephritis patient carrying a very similar variant (12). The *CFI* intronic variant (c.1534+5G>T) found in patient H640 is located within the donor splicing site of exon 11, but the patient had normal FI levels. The *CFHR5* variant in patient H731 (c.368A>G; p. Asn123Ser) was predicted to be likely benign; nonetheless, this patient also carries another *CFHR5* variant

**TABLE 1** | Complement findings in the Spanish SP-HUS cohort.

Patient code	Gender	Age at onset	Rare Variants	Common aHUS-risk variants				DelCFHR3-CFHR1	C3/C4 (mg/dL)
				MCPggaac	CFH(H3)	CFHR3*B	CFHR1*B		
H118	Female	2 y	No	No	HET	HET	HOM	No	178/27.2
H150 <sup>a</sup>	Male	12 mo	CFHR3 (c.796+1G>A)	No	No	No	HET	HET	132/34
H171 <sup>a,b</sup>	Female	3 y	No	No	HET	HET	HET	No	81.3/40.6
H201	Female	19 mo	Uncomplete screening	Not done	No	HET	HOM	No	111/42.3
H202	Female	2 y	Uncomplete screening	Not done	No	No	HET	No	145/33.1
H582	Female	47 y	No	No	HET	HET	No	No	150/46.1
H619 <sup>c</sup>	Male	2 y	CFHR5 (c.486_487insAA; p.E163Kfs*10)	HET	No	No	HET	No	166/44.8
H640	Male	5 mo	CFI (c.1534+5G>T)	No	No	No	No	No	153/30.3
H678	Male	12 mo	Uncomplete screening	Not done	HET	HET	HOM	No	123/26.2
H731	Female	17 mo	CFHR5 (c.368A>G; p.N123S / c.832G>A; p.G278S)	HET	HET	HOM	HET	No	143/36
H837	Male	21 mo	No	No	No	No	HET	No	87.1/9.6
H859	Male	16 mo	C1QB (c.223G>A p.G75R)	No	HET	HET	HOM	No	146/60
H946	Male	21 mo	Genetic screening not done	Not done	HET	HET	HOM	No	58.9/9.56

Demographic and complement data of the 13 SP-HUS patients of Spanish origin studied during 2006–2019. Genetic data include rare complement variants, the aHUS-risk haplotypes MCPggaac, CFH(H3), CFHR3\*B, and CFHR1\*B, and the common DelCFHR3-CFHR1 variant. C3 and C4 levels in the first plasma sample available are also shown; normal ranges were 75–135 mg/dL for C3, and 14–60 mg/dL for C4. <sup>a</sup>Described in (25). <sup>b</sup>This patient presented anti-FH autoantibodies. <sup>c</sup>Described in (12).

**TABLE 2** | Contribution of aHUS-risk haplotypes to SP-HUS.

Haplotype		Control	aHUS	SP-HUS	P-aHUS
MCPggaac	N	222 <sup>a</sup>	662	18	44
	Frequency	0.333	0.414	0.111	0.432
CFH(H3)	N	186 <sup>a</sup>	668	26	44
	Frequency	0.242	0.302	0.269	0.455
CFHR3*B	N	194 <sup>b</sup>	634	26	26
	Frequency	0.242	0.355	0.346	0.462
CFHR1*B	N	204 <sup>b</sup>	610	26	44
	Frequency	0.368	0.467	0.615	0.455

Frequency of the aHUS-risk haplotypes MCPggaac, CFH(H3), CFHR3\*B and CFHR1\*B in the Spanish cohorts of aHUS (352 patients), SP-HUS (13 patients), and P-aHUS (22 patients), and in a total of 227 Spanish control individuals. <sup>a</sup>Frequencies of MCPggaac and CFH(H3) were determined in one cohort of 116 control individuals. <sup>b</sup>Frequencies of CFHR3\*B and CFHR1\*B were determined in a cohort of 111 control individuals. N represents the number of chromosomes analyzed.

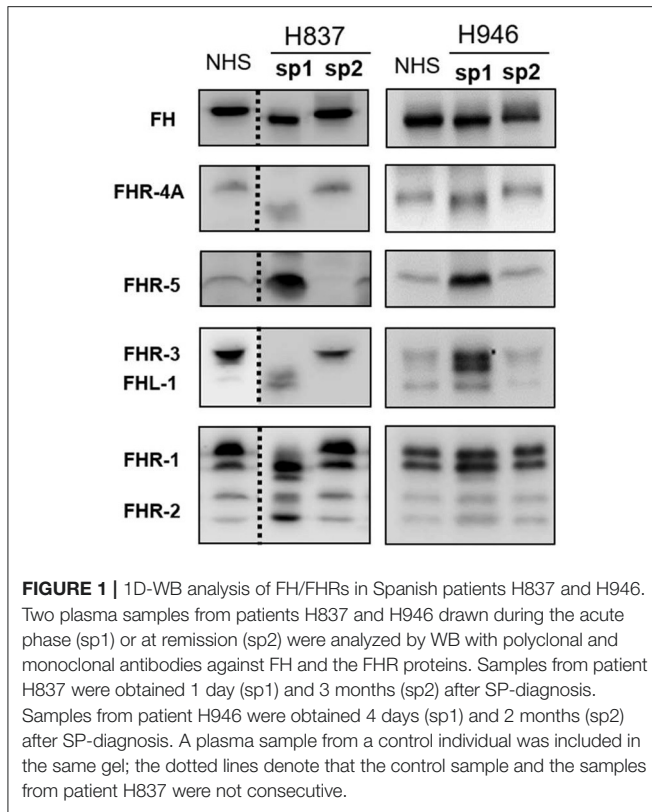
(c.832G>A; p.Gly278Ser) that is a null allele, generating FHR-5 haploinsufficiency in the patient. Finally, patient H859 carries a genetic variant in the C1QB gene (c.223G>A; p.Gly75Arg) that results in an amino acid change at position 75 of the C1qB chain; C1q levels in this patient were normal.

Analysis of the MCPggaac and CFH(H3) aHUS-risk haplotypes, and of the aHUS-risk alleles CFHR3\*B and CFHR1\*B, could be done in most patients. Two out of nine patients (22%) were carriers of the MCPggaac risk haplotype, while the CFH(H3) risk haplotype was found in 7 out of 13 patients (54%), six of whom also carried the CFHR3\*B and CFHR1\*B alleles. We then compared the frequency of these variants in the 13 SP-HUS patients with the frequencies observed in 22 pregnancy-associated HUS patients (P-aHUS) (31), 352 patients from our aHUS cohort (24), and a total of 227 Spanish control individuals. As it is shown in **Table 2**, the MCPggaac risk haplotype is less frequent in the SP-HUS cohort, while the

frequencies of the CFHR1\*B and CFHR3\*B risk alleles are higher than in controls, and comparable to the frequencies observed in the aHUS and P-aHUS cohorts.

## Complement Studies in Plasma Samples From Spanish and Hungarian Patients

We determined the complement profile (i.e., levels of C3, C4, FH, FI, and anti-FH autoantibodies) in plasma samples from all the Spanish SP-HUS patients. Most plasma samples were obtained between 1 month and 3 years after disease onset, and they had normal C3 and C4 levels. Low C3 and C4 levels, revealing complement activation by the classical pathway, were only detected in patient H946, and, to a lesser extent, in patient H837 (**Table 1**). Because these two plasma samples were obtained in the first week after HUS onset, it could not be excluded that complement activation had also happened in the other patients during active infection. Anti-FH autoantibodies were



only detected in patient H171, who does not carry the *CFHR3-CFHR1* deletion.

All plasma samples were also analyzed by Western-blot with different sets of polyclonal and monoclonal antibodies recognizing FH and the FHRs. These analyses revealed that FH and the FHRs proteins in the plasma samples from patients H837 and H946, drawn at disease onset, presented a lower Molecular weight (Mw) than the control sample. We could analyse a second plasma sample from these patients, obtained at disease remission, and we observed that the Mw of FH and FHRs was normal (Figure 1). These findings suggested desialylation of FH/FHRs in patients H837 and H946 by the pneumococcal neuraminidase(s). Because sialic acid removal would also decrease the negative charge of the protein and increase its isoelectric point (pI), we performed 2D-Western blot analysis of plasma samples from patient H837 drawn at onset and at remission, following our reported protocol (25); in this kind of analysis, proteins are first separated according to their pI, and then according to its Mw. As it is shown in Figure 2, the characteristic 2D-pattern of FHR-3 and FHR-1 isoforms is drastically altered in the onset sample: there are fewer isoforms, with lower Mw and higher pI than in a control sample, or than in the remission sample. We interpreted this finding as a confirmation of transient desialylation of plasma glycoproteins by the pneumococcus. We then quantified neuraminidase activity in the two samples from patient H837 and in a control sample with an “*in vitro*” assay; a high neuraminidase activity (8.03 U/L) was detected in the onset sample, while no enzymatic activity was observed in the

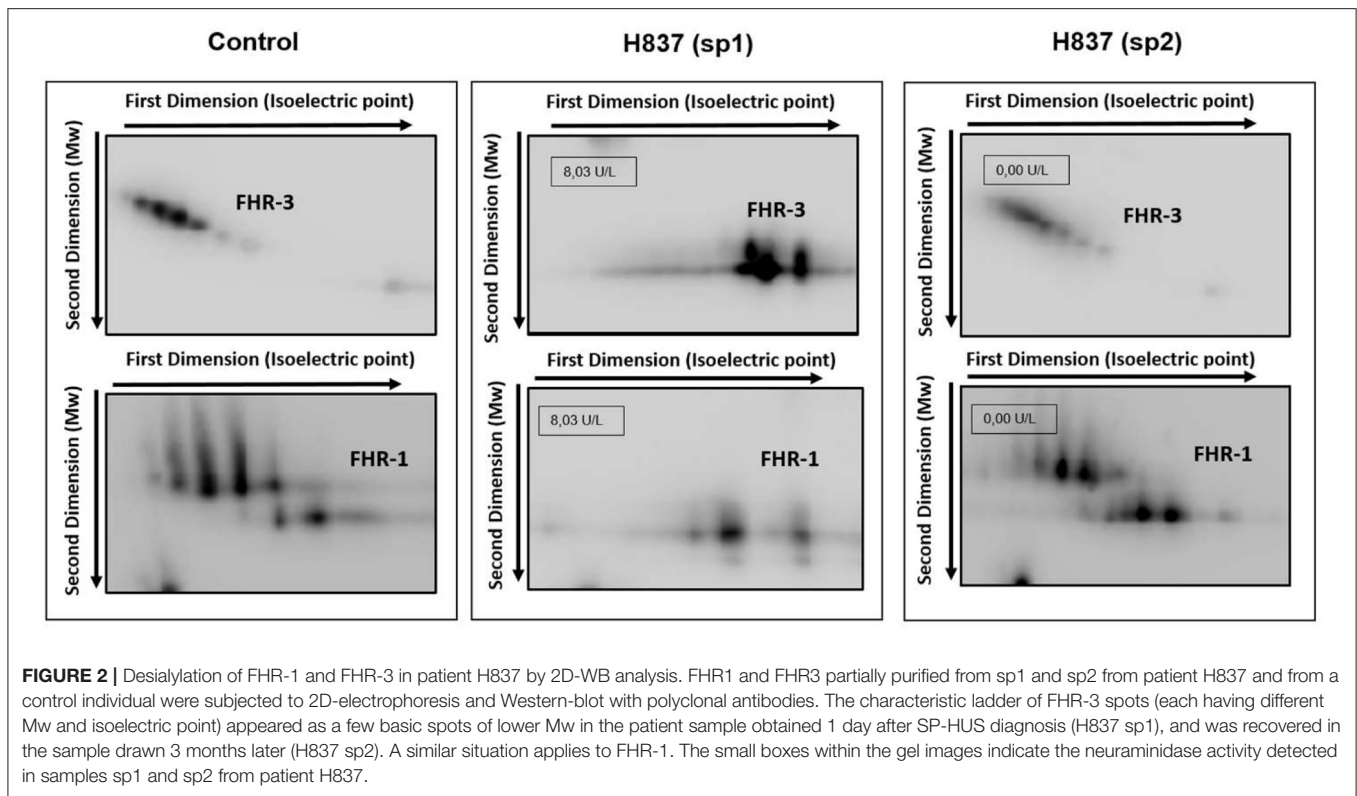
remission sample (0.01 U/L) and in the control sample (0.02 U/L). Neuraminidase activity (0.45 U/L) was also detected in the onset sample from patient H946, but not in the remission sample (0.01 U/L).

To determine whether the desialylation of FH/FHRs that we have observed in patients H837 and H946 was a general phenomenon in SP-HUS, we performed WB analyses in plasma samples drawn during the acute phase from 11 Hungarian SP-HUS patients. Patterns suggestive of desialylation (i.e., a lower Mw of FH and FHRs) were observed in four patients (Figure 3). WB analyses also revealed that the intensity of the FHR-5 band was higher in the samples drawn at disease onset than at remission; this was particularly evident for patient H837 (Figure 1) and patients HUN816 and HUN1869 (Figure 3). These differences were further confirmed by determining FHR-5 levels by ELISA (Table 3). All the samples showing FH/FHRs desialylation were also analyzed by WB with polyclonal antibodies recognizing human transferrin, a 77 kDa plasma glycoprotein; as it could be expected, the Mw of transferrin in those samples was lower than in the control sample (Figure 3), thus suggesting general desialylation of plasma glycoproteins by the pneumococcal neuraminidase.

A summary of demographic data, complement findings and neuraminidase activity in the samples from the six patients (two Spanish and four Hungarian) with transient desialylation is depicted in Table 3. Acute phase samples were drawn between 1 and 23 days after diagnosis, and they showed low C3 and C4 levels but no anti-FH antibodies. Remission samples were drawn between 42 days and 11 months after diagnosis, and presented normal C3 and C4 levels. Neuraminidase activity ranged from 0.17 U/L (remission sample from patient HUN1869) to 8.03 U/L (acute sample from patient H837). Nonetheless, a clear correlation between neuraminidase activity, days after diagnosis and desialylation was not observed in all the patients. Complement genetic variants were observed in three Hungarian patients. Patient HUN156 has a rare variant in *CFI* (c.148C>G, p.Pro50Ala; (11)); patient HUN2638 has a rare variant in *C3* (c.2852G>A, p.Arg951His), and patient HUN1869 presents homozygous FHR-3 and FHR-1 deficiency.

## Functional Relevance of FH Desialylation

We wanted to know whether desialylation altered the functional activity of FH, but we could not purify it from any of the patients’ samples drawn at disease onset because of limited sample volume. Therefore, to approach the potential relevance of FH desialylation, we generated dFH “*in vitro*” from commercially available FH, purified from human plasma. Figure 4A shows that dFH has the same Mw than FH in the onset sample from patient H837. We also checked sialic acid removal from purified FH by analyzing the binding of lectins RCA-I and SNA by Western-blot (Figure 4B). Lectin SNA binds predominantly to  $\alpha(2-6)$ -linked sialic acids (present in FH but absent in dFH), while lectin RCA-I binds predominantly to  $\beta$ -galactose residues, which become fully accessible after desialylation. Thus, the preferential binding of lectin SNA to FH, and of lectin RCA-I to dFH confirmed “*in vitro*” FH desialylation.



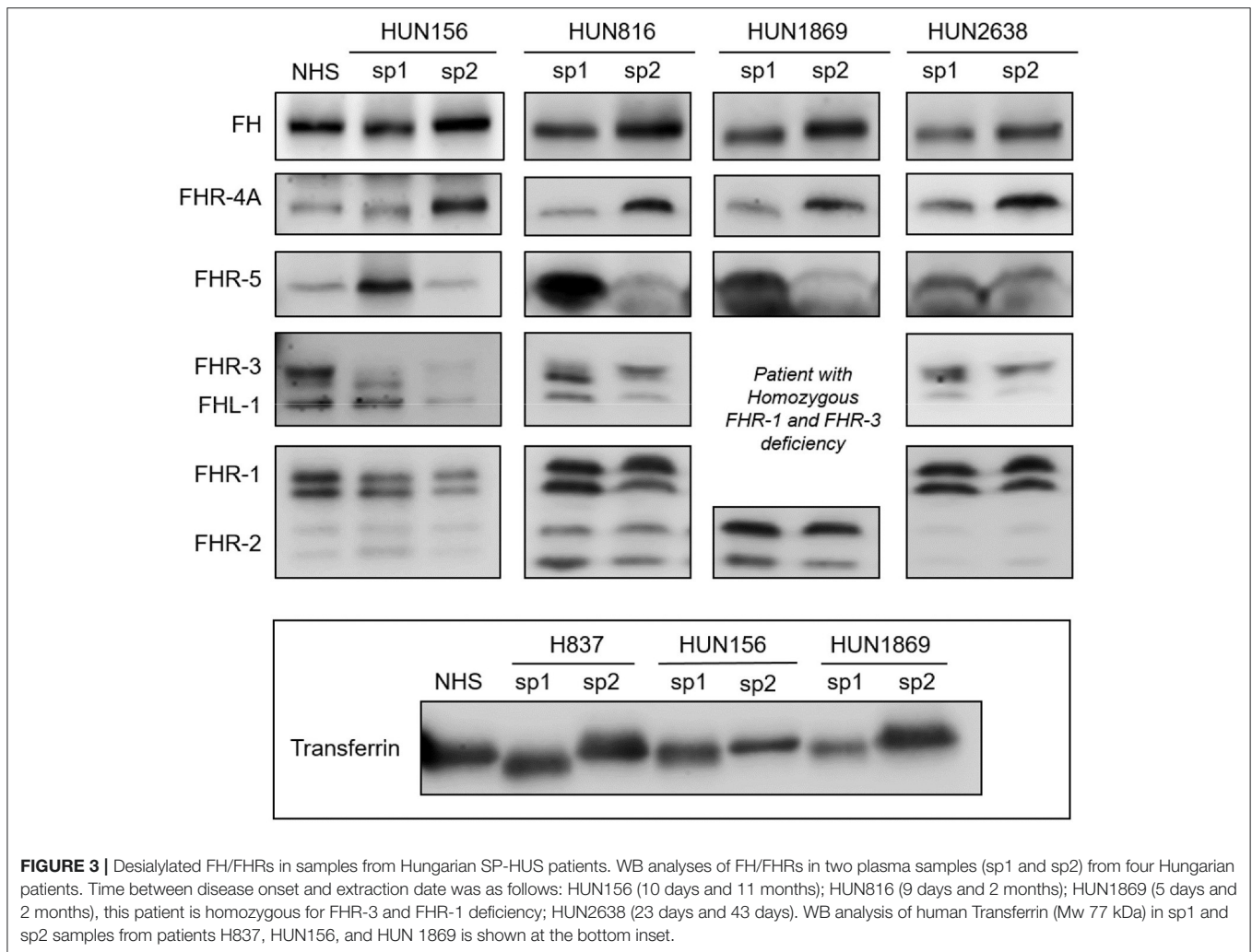
We then compared the functional activity of FH and dFH in different experimental settings. We used an ELISA assay to analyse the binding of FH/dFH to surface-bound C3b, and observed that dFH bound more efficiently than native FH (**Figure 5**), suggesting that sialic acid removal favors the interaction of FH with surface-bound C3b. The higher binding of dFH, nonetheless, did not increase the cofactor activity of FH and dFH, either in the fluid phase or on surfaces. As illustrated in **Figure 6**, the cleavage of soluble or surface-bound C3b by Factor I to generate iC3b was not affected by using FH or dFH as cofactors. In the same way, no differences were observed when comparing the ability to dissociate solid-phase, preformed C3bBb(P) convertase, as similar decay-accelerating activities were observed with FH and with dFH (**Figure 7**).

To analyse the whole effect of FH desialylation on complement regulation on cellular surfaces, we used two different formats of haemolytic assays on sheep erythrocytes. The first format is our original assay of sheep erythrocyte lysis by the serum of an aHUS patient who carries the FH mutation W1183L (29). The second format is a modification of this assay, in which the addition of anti-FH monoclonal antibodies OX24 (targeting FH SCR4) or C18 (targeting FH SCR20) to a NHS renders it capable to lyse sheep erythrocytes (30). In both formats of haemolytic assays, we compared the capacity of exogenous FH/dFH to prevent haemolysis. Interestingly, we observed that FH desialylation clearly decreased its ability to prevent sheep erythrocytes lysis (**Figure 8**), suggesting the contribution of FH's own sialic acids on its regulatory activity on cellular surfaces.

## DISCUSSION

An infrequent complication of *S. Pneumoniae* infections is the Haemolytic Uraemic Syndrome (HUS), a clinical entity characterized by the triad of thrombocytopenia, microangiopathic haemolytic anemia and acute renal failure (33). The contribution of complement pathogenic variants and risk polymorphisms in the atypical forms of HUS is very well-established, and screening of the complement genes *CFH*, *MCP*, *CFI*, *CFB*, *C3*, and *CFHRs* in these patients is mandatory (10). Complement studies in HUS associated to *S. Pneumoniae* (SP-HUS), however, are very limited because it has generally been considered that this is a secondary manifestation of the infection process (34).

We have performed complement genetic screening in 9 Spanish SP-HUS patients, and observed that five of them carry a total of six rare genetic variants. Three variants were null alleles in *CFHR3* (patient H150) or *CFHR5* (patient H619 and patient H731). FHR-3 competes FH binding to *Neisseria meningitidis* (35), thus decreasing bacterial survival. Although it is not known whether FHR-3 can also compete FH binding to *S. pneumoniae*, the lack of FHR-3 could be advantageous for the pneumococcus. This is difficult to determine, because isolated deficiencies of FHR-3 are very rare. Nonetheless, the combined deficiency of FHR-3 and FHR-1 as a consequence of the homozygous *DelCFHR3-CFHR1* deletion is relatively frequent, and there is no evidence that it predisposes to infections. The FHR-5 haploinsufficiency observed in patient H169 could decrease complement activation and increase infection susceptibility,



although the clinical phenotype probably relies on additional, currently unknown risk factors (12).

The pathogenic relevance of the three other variants found in our SP-HUS patients is unknown. The *CFHR5* variant in patient H731 (c.368A>G; p.Asn123Ser), which abolishes one of the potential N-glycosylation sites in FHR-5, was predicted to be likely benign. The *CIQB* variant in patient H859 (c.223G>A; p. Gly75Arg) was reported in one individual with very early onset inflammatory bowel disease, and predictive tools suggested that it may alter the protein function (36). Thus, it is possible that this C1q variant has decreased capacity to activate the classical pathway and eliminate the pathogen, and/or that it binds the pneumococcal protein PepO with higher affinity, increasing bacterial adherence to the host's cells (37). The *CFI* intronic variant in patient H640 (c.1534+5G>T; rs114013791) has been described in an Italian aHUS patient (38), and in several patients from the Newcastle aHUS cohort (39), all of them having normal FI levels; the contribution of this variant, present in 1.55% of European controls, to the genetic predisposition to aHUS is thus uncertain. In conclusion, a significant proportion of the Spanish

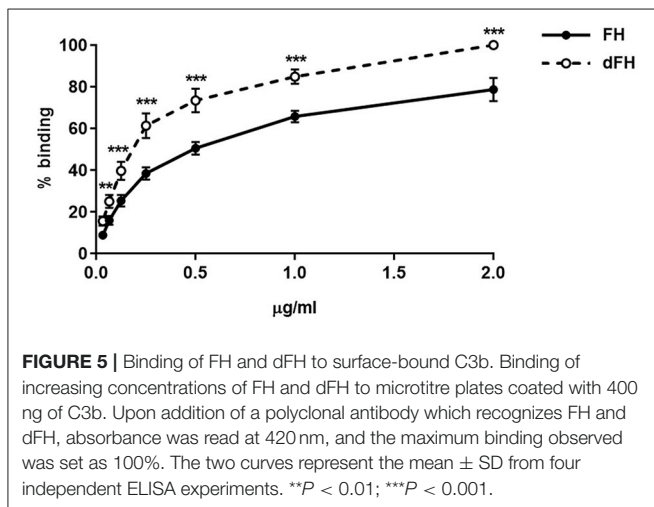
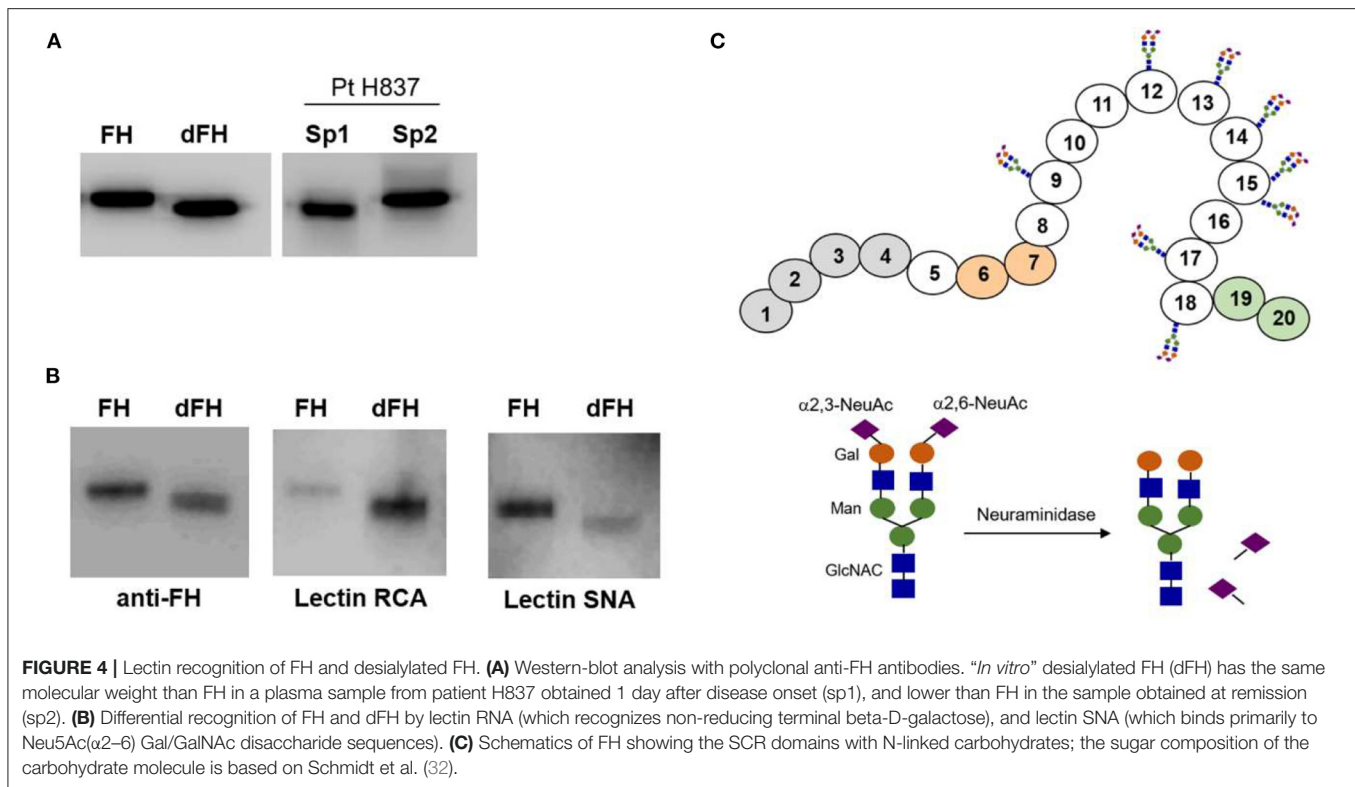
SP-HUS patients (five out of nine) carry rare genetic variants in complement genes, but their relevance to HUS predisposition is unknown.

The small sample size of our SP-HUS cohort (13 patients) does not allow to achieve statistically significant conclusions when comparing the frequency of the common genetic variants *MCPggaac*, *CFH(H3)*, *CFHR3\*B*, and *CFHR1\*B* with control individuals, or with the aHUS cohort (Table 2). Nonetheless, our analyses reveal that the *MCPggaac* haplotype is underrepresented in the SP-HUS patients, where it has a lower frequency than in our cohort of 352 aHUS patients (0.111 vs. 0.414), or that in 22 P-aHUS cases (0.111 vs. 0.432). The relevance of this observation would require analyses in more SP-HUS patients, but it suggests that the membrane regulator MCP is not an important player in SP-HUS pathogenesis. It is also interesting that the frequencies of the aHUS-risk variants *CFHR3\*B* and *CFHR1\*B* in our SP-HUS cohort (0.346 and 0.615, respectively) are higher than in control individuals (0.242 and 0.368), and comparable to the frequencies observed in the aHUS (0.355 and 0.467) and P-aHUS (0.462 and 0.455) cohorts. These findings suggest that

**TABLE 3** | Transient desialylation of FH/FHRs in two Spanish and four Hungarian SP-HUS patients.

Patient code	Gender	Age at onset (mo)	Previous vaccination	Time after onset	Clinical status	Complement profile	FHR-5 Levels <sup>a</sup> (μg/mL)	FH/FHRs desialylation	Neuraminidase Activity (U/L) <sup>b</sup>	Genetic findings <sup>c</sup>
H837	Male	21	No info available	1 days	Onset	Low C4, FH, FI	3.61	YES	8.03	No pathogenic variants
				3 mo	Remission	Normal	0.03	NO	0	
H946	Male	21	Prevenar	4 days	Onset	Low C3, C4	1.97	YES	0.45	Non-available
				2 mo	Remission	Normal	0.80	NO	0	
HUN156 <sup>d</sup>	Female	18	Pneumovax	10 days	Onset	Low C3,C4,FB,FI	1.51	YES	3.94	<i>CFI</i> (c.148C>G, p.Pro50Ala); <i>MCPggaac</i>
				11 mo	Remission	Low FI	0.48	NO	0	
HUN816	Male	36	No info available	9 days	Onset	Low C3, C4, FH	2.81	YES	0.54	Non available
				2 mo	Remission	High C3, FI, FB	0.86	NO	0.47	
HUN1869	Female	30	No info available	5 days	Onset	Low C3, C4, FI	1.19	YES	2.50	<i>DelCFHR3-CFHR1</i> (HOM)
				2 mo	Remission	Normal	0.42	NO	0.17	
HUN2638	Male	32	Prevenar	23 days	Onset	Low C3, C4, FH	1.08	YES	0.42	<i>C3</i> (c.2852G>A, p.Arg951His); <i>C3</i> (c.304C>G;R102G); <i>C3</i> P314L; <i>CFH</i> (c.184G>A; V62I); <i>CFH</i> (H3); <i>MCPggaac</i>
				42 days	Remission	Normal	0.86	NO	0.44	

Complement profile and neuraminidase activity in the two plasma samples drawn during disease onset and at remission. Anti-FH autoantibodies were negative in all samples. <sup>a</sup>Mean levels in controls: 1.98 ± 1.02 μg/mL. <sup>b</sup>Background level in controls: 0.50 U/L. <sup>c</sup>All genetic variants in patients HUN156 and HUN2638 are in heterozygosis. <sup>d</sup>Described in (11).



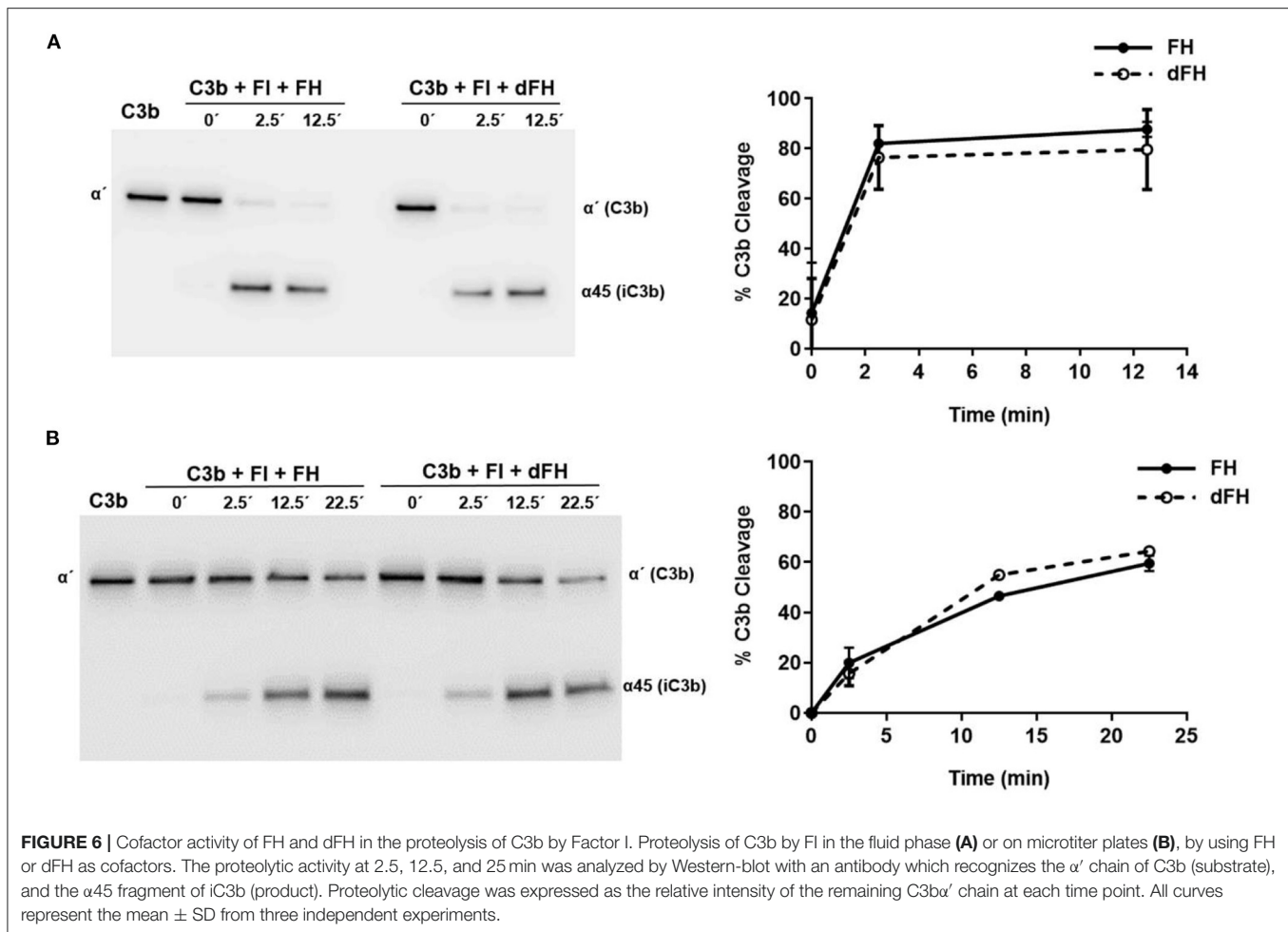
*CFHR3*\**B* and *CFHR1*\**B* are predisposing factors to SP-HUS. These two variants frequently segregate in an extended *CFH*(*H3*)-*CFHR3*\**B*-*CFHR1*\**B* haplotype that associates with reduced FH levels and increased FHR-3 levels (24, 40), but whether a local imbalance of the FH/FHR-3 ratio predisposes to SP-HUS will require further investigation.

The contribution of FH and FHR proteins to the pathogenic mechanism of SP-HUS could also result from the transient removal of their sialic acids by the pneumococcal neuraminidase. It has been observed that the sequential action of pneumococcal neuraminidase, galactosidase, and NAglucosidase reduce

complement deposition on the pathogen surface and its subsequent phagocytosis by human neutrophils, but the complement glycoprotein(s) affected are unknown (41). FH is the complement protein with more N-Glycosylation sites (nine sites), followed by C2 (eight sites), and FI (six sites). FH deglycosylation decreases its Mw by 17.9 kDa, and eight of its nine N-glycosylation sites are occupied by complex, diantennary sialylated, non-fucosylated glycans, although a few triantennary structures are also present (42). Most FH sialic acids are  $\alpha$ 2-6-linked to the carbohydrate chains (32), but the functional consequences of FH desialylation are not fully understood. We here show desialylation of FH and FHRs in plasma samples from 6 SP-HUS patients (two from Spain and four from Hungary), that we attribute to the activity of the pneumococcal neuraminidase on human glycoproteins (Figure 4). Because FH and FHRs desialylation was most evident in a plasma sample drawn only 1 day after disease onset, we believe that this is a general finding that disappears upon infection resolution. We also think that the desialylation process is independent of the presence of rare complement genetic variants; in fact, it was more evident in patient H837, who does not carry any pathogenic variant.

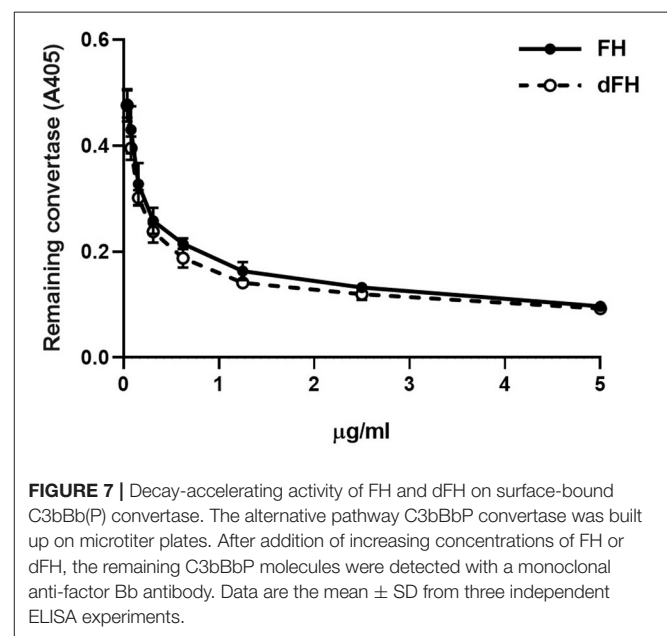
To determine whether sialic acid removal had any consequences on FH function, we compared the regulatory activity of native and “*in vitro*” desialylated FH by using assays in the fluid phase and on surfaces, which we had already used to check FH mutants purified from aHUS patients (27). Sialic acid removal increased FH binding to C3b-coated microtiter plates (Figure 5). This result agrees with the enhanced binding of a partially deglycosylated and desialylated recombinant FH molecule in biosensor experiments (43).

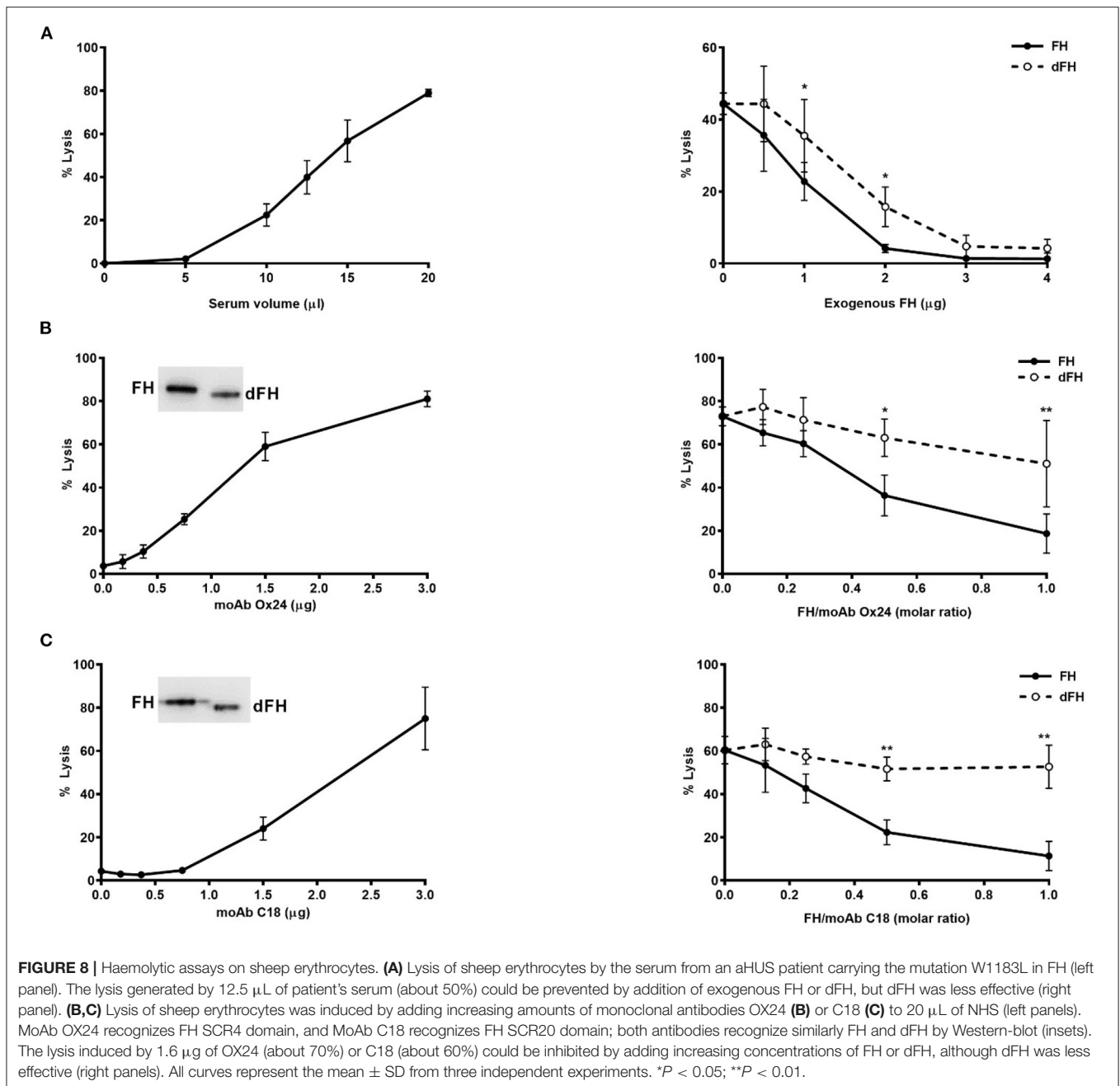




FH desialylation, nonetheless, did not affect its capacity to act as a cofactor of FI in the proteolysis of C3b in the fluid phase or on surfaces, as no differences between native and desialylated FH were appreciated (Figure 6). The same observation was reported by Schmidt et al. (43), who analyzed cofactor activity in the fluid phase, and did not find differences between plasma FH and the partially deglycosylated and desialylated recombinant FH. In line with these results, the partial deglycosylation of FI to remove sialic acids and Galactose residues did not affect the proteolysis of C3(NH<sub>3</sub>) (a structural C3b analogous) in the fluid phase (44). We conclude that in the proteolytic cleavage of C3b to iC3b, the sialic acid molecules of the enzyme (FI) or the cofactor (FH) do not play any relevant role.

We also observed that desialylated FH kept intact its capacity to dissociate preformed C3bBb(P) convertase (Figure 6). This result differs from the increased decay observed with the recombinant FH in biosensor experiments (43), and from the higher capacity of deglycosylated FH to dissociate properdin-stabilized C3bBb convertase preformed on the erythrocyte surface (45). These discrepancies could be due to the deglycosylation treatments of the FH molecules used in





these previous reports, while we have only removed FH sialic acids, leaving the other sugar residues in the native carbohydrate molecules unchanged.

Because our functional assays on microtiter plates did not take into account the relevance of surface polyanions for the FH regulatory activity, we performed two different kind of haemolytic assays with sheep erythrocytes, which have polyanionic molecules on their surface. In the first assay, sheep erythrocytes are “spontaneously” lysed by the serum from an aHUS patient whose mutated FH cannot bind to the sheep erythrocyte surface and protect them from complement attack (29). In the second assay, the addition of specific

anti-FH monoclonal antibodies to a normal human serum abolishes FH binding to the sheep erythrocyte surface, rendering them susceptible to complement-mediated lysis (30). When we compared the capacity of exogenous FH and desialylated FH to prevent sheep erythrocytes lysis, we observed a lower activity of desialylated FH in the two kind of assays (**Figure 8**), suggesting that FH desialylation decreases its capacity to regulate complement activation on the erythrocyte surface. As the other functional assays do not suggest any role for FH sialic acids on C3 convertase dissociation or in the proteolytic cleavage of C3b, we think that FH desialylation could somehow alter its interaction with polyanionic molecules on the cellular

surface, and that this could result in decreased binding of desialylated FH to the cellular surface and decreased complement regulation. Further studies are required to determine the exact mechanism, and whether this transient dysregulation has a relevant role on SP-HUS pathogenesis, as already suggested (9, 46).

In summary, we here show that rare complement genetic variants in SP-HUS patients are more frequent than it could be expected, and that aHUS-risk polymorphisms in the *CFH-CFHR3-CFHR1* region likely contribute to SP-HUS. Based on these findings, we recommend complement genetic screening in patients who develop HUS in the context of *S. pneumoniae* infections, as well as to analyse aHUS-risk variants in these patients. We also show desialylation of human FH and FHR proteins by the pneumococcal neuraminidase at SP-HUS onset, and provide functional evidence suggesting that desialylated FH has a lower capacity to regulate complement activation on cellular surfaces.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The genetic datasets presented in this article are not readily available due to ethical restrictions of research participants. Requests to access experimental datasets should be directed to PS-C, pilar.sanchez-corrall@idipaz.es.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethical Committees from La Paz University Hospital, Madrid, Spain, and from Semmelweis University, Budapest, Hungary. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

IG and FC performed Western-blot and functional studies, analyzed data, and prepared figures. PN was responsible for the analysis of the complement profile in plasma samples

from Spanish patients. EA collected biological samples and was responsible for complement genetic screening from Spanish aHUS patients. AM, MM, and JB gathered clinical data. NV and ZP collected plasma samples and clinical and complement data from Hungarian patients. DC and AS performed genetic screening of Hungarian patients. PS-C designed the study, analyzed data, prepared figures and wrote the first draft of the manuscript. All the authors revised the data and contributed to the final version of the manuscript.

## FUNDING

This study was funded by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and the European Regional Development Fund from the European Union (grants PI16/00723 and PI19/00970 to PS-C). IG and EA are supported by the Spanish Autonomous Region of Madrid (Complement II-CM network; S2017/BMD-3673). IG was also supported by the Spanish Fundación Senefro (<http://www.senefro.org/>). The study was also supported by the Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary, within the framework of the molecular biology thematic programme of the Semmelweis University, by the National Office for Innovation and Research (KH130355 to ZP), and by the MSCA-ITN (Horizon 2020) CORVOS (Grant 860044 to ZP). DC was supported by the Premium Postdoctoral Fellowship Program of the Hungarian Academy of Sciences (PPD2018-016/2018).

## ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate the excellent technical assistance of César Vélez Casanova in the management of biological samples of patients and controls, and the statistical advice of Itsaso Losantos in the interpretation of genetic data. We thank Dr. Mihály Józsi and Dr. Richard Pouw for providing us with polyclonal anti-FH and FHRs antibodies, Dr. Javier Cañada for technical advice on lectin blotting, and Dr. Elena Goicoechea de Jorge for the ELISA protocol for FHR-5. This work was developed under the supervision of the Spanish Registry of atypical Haemolytic Uraemic Syndrome and C3 Glomerulopathy ([www.ahusc3g.es](http://www.ahusc3g.es)).

## REFERENCES

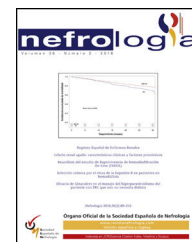
- Copelovitch L, Kaplan BS. *Streptococcus pneumoniae*-associated hemolytic uremic syndrome: classification and the emergence of serotype 19A. *Pediatrics*. (2010) 125:e174–82. doi: 10.1542/peds.2007-2017
- Subramanian K, Henriques-Normark B, Normark S. Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: from nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen. *Cell Microbiol*. (2019) 21:e13077. doi: 10.1111/cmi.13077
- Fitzgerald D, Waterer GW. Invasive Pneumococcal and Meningococcal Disease. *Infect Dis Clin North Am*. (2019) 33:1125–141. doi: 10.1016/j.idc.2019.08.007
- Spinale JM, Ruebner RL, Kaplan BS, Copelovitch L. Update on *Streptococcus pneumoniae* associated hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Pediatr*. (2013) 25:203–8. doi: 10.1097/MOP.0b013e32835d7f2c
- Veesenmeyer AF, Edmonson MB. Trends in US hospital stays for *Streptococcus pneumoniae*-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. (2013) 32:731–5. doi: 10.1097/INF.0b013e32831828b31c8
- Huang DT-N, Chi H, Lee H-C, Chiu N-C, Huang F-Y. T-antigen activation for prediction of pneumococcus-induced hemolytic uremic syndrome and hemolytic anemia. *Pediatr Infect Dis J*. (2006) 25:608–10. doi: 10.1097/01.inf.0000223494.83542.ad
- Coats MT, Murphy T, Paton JC, Gray B, Briles DE. Exposure of Thomsen-Friedenreich antigen in *Streptococcus pneumoniae* infection is dependent on pneumococcal neuraminidase A. *Microb Pathog*. (2011) 50:343–9. doi: 10.1016/j.micpath.2011.02.010
- Johnson S, Waters A. Is complement a culprit in infection-induced forms of haemolytic uraemic syndrome? *Immunobiology*. (2012) 217:235–43. doi: 10.1016/j.imbio.2011.07.022
- Gilbert RD, Nagra A, Haq MR. Does dysregulated complement activation contribute to haemolytic uraemic syndrome secondary

- to *Streptococcus pneumoniae*? *Med Hypotheses*. (2013) 81:400–3. doi: 10.1016/j.mehy.2013.05.030
10. Goodship THJ, Cook HT, Fakhouri F, Fervenza FC, Frémeaux-Bacchi V, Kavanagh D, et al. Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int*. (2017) 91:539–51. doi: 10.1016/j.kint.2016.10.005
  11. Szilágyi A, Kiss N, Bereczki C, Tölösi G, Rácz K, Túri S, et al. The role of complement in *Streptococcus pneumoniae*-associated haemolytic uraemic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. (2013) 28:2237–45. doi: 10.1093/ndt/gft198
  12. Gómez Delgado I, Gutiérrez-Tenorio J, Fraga Rodríguez GM, Cavero T, Arjona E, Sánchez-Corral P. Low factor H-related 5 levels contribute to infection-triggered haemolytic uraemic syndrome and membranoproliferative glomerulonephritis. *Clin Kidney J*. (2021) 14:707–9. doi: 10.1093/ckj/sfaa004
  13. Andre GO, Converso TR, Politano WR, Ferraz LFC, Ribeiro ML, Leite LCC, et al. Role of *Streptococcus pneumoniae* proteins in evasion of complement-mediated immunity. *Front Microbiol*. (2017) 8:224. doi: 10.3389/fmicb.2017.00224
  14. López-Lera A, Corvillo F, Nozal P, Regueiro JR, Sánchez-Corral P, López-Trascasa M. Complement as a diagnostic tool in immunopathology. *Semin Cell Dev Biol*. (2019) 85:86–97. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.12.017
  15. Lu L, Ma Z, Jokiranta TS, Whitney AR, DeLeo FR, Zhang J-R. Species-specific interaction of *Streptococcus pneumoniae* with human complement factor H. *J Immunol*. (2008) 181:7138–46. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7138
  16. Herbert AP, Makou E, Chen ZA, Kerr H, Richards A, Rappsilber J, et al. Complement evasion mediated by enhancement of captured factor h: implications for protection of self-surfaces from complement. *J Immunol*. (2015) 195:4986–98. doi: 10.4049/jimmunol.1501388
  17. Rodríguez de Córdoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sánchez-Corral P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*. (2004) 41:355–67. doi: 10.1016/j.molimm.2004.02.005
  18. Schmidt CQ, Herbert AP, Hocking HG, Uhrin D, Barlow PN. Translational mini-review series on complement factor H: structural and functional correlations for factor H. *Clin Exp Immunol*. (2008) 151:14–24. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03553.x
  19. Makou E, Herbert AP, Barlow PN. Functional anatomy of complement factor H. *Biochemistry*. (2013) 52:3949–62. doi: 10.1021/bi4003452
  20. Pickering MC, Cook HT. Translational mini-review series on complement factor H: renal diseases associated with complement factor H: novel insights from humans and animals. *Clin Exp Immunol*. (2008) 151:210–30. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03574.x
  21. Skerka C, Chen Q, Frémeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol*. (2013) 56:170–80. doi: 10.1016/j.molimm.2013.06.001
  22. Cserhalmi M, Papp A, Brandus B, Uzonyi B, Józsi M. Regulation of regulators: Role of the complement factor H-related proteins. *Semin Immunol*. (2019) 45:101341. doi: 10.1016/j.smim.2019.101341
  23. Cavero T, Arjona E, Soto K, Caravaca-Fontán F, Rabasco C, Bravo L, et al. Severe and malignant hypertension are common in primary atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. (2019) 96:995–04. doi: 10.1016/j.kint.2019.05.014
  24. Bernabéu-Herrero ME, Jiménez-Alcázar M, Anter J, Pinto S, Sánchez Chinchilla D, Garrido S, et al. Complement factor H, FHR-3 and FHR-1 variants associate in an extended haplotype conferring increased risk of atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*. (2015) 67:276–86. doi: 10.1016/j.molimm.2015.06.021
  25. Abarrategui-Garrido C, Martínez-Barricarte R, López-Trascasa M, de Córdoba SR, Sánchez-Corral P. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. (2009) 114:4261–71. doi: 10.1182/blood-2009-05-223834
  26. Geisler C, Jarvis DL. Effective glycoanalysis with Maackia amurensis lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology*. (2011) 21:988–93. doi: 10.1093/glycob/cwr080
  27. Sánchez-Corral P, Pérez-Caballero D, Huarte O, Simckes AM, Goicoechea E, López-Trascasa M, et al. Structural and functional characterization of factor H mutations associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet*. (2002) 71:1285–95. doi: 10.1086/344515
  28. Merinero HM, García SP, García-Fernández J, Arjona E, Tortajada A, Rodríguez de Córdoba S. Complete functional characterization of disease-associated genetic variants in the complement factor H gene. *Kidney Int*. (2018) 93:470–81. doi: 10.1016/j.kint.2017.07.015
  29. Sánchez-Corral P, González-Rubio C, Rodríguez de Córdoba S, López-Trascasa M. Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol Immunol*. (2004) 41:81–4. doi: 10.1016/j.molimm.2004.01.003
  30. Strobel S, Abarrategui-Garrido C, Fariza-Requejo E, Seeberger H, Sánchez-Corral P, Józsi M. Factor H-related protein 1 neutralizes anti-factor H autoantibodies in autoimmune hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. (2011) 80:397–404. doi: 10.1038/ki.2011.152
  31. Huerta A, Arjona E, Portoles J, Lopez-Sanchez P, Rabasco C, Espinosa M, et al. A retrospective study of pregnancy-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. (2018) 93:450–9. doi: 10.1016/j.kint.2017.06.022
  32. Schmidt CQ, Hipgrave Ederveen AL, Harder MJ, Wuhler M, Stehle T, Blaum BS. Biophysical analysis of sialic acid recognition by the complement regulator Factor H. *Glycobiology*. (2018) 28:765–73. doi: 10.1093/glycob/cwy061
  33. Mele C, Remuzzi G, Noris M. Hemolytic uremic syndrome. *Semin Immunopathol*. (2014) 36:399–420. doi: 10.1007/s00281-014-0416-x
  34. Le Clech A, Simon-Tillaux N, Provôt F, Delmas Y, Vieira-Martins P, Limou S, et al. Atypical and secondary hemolytic uremic syndromes have a distinct presentation and no common genetic risk factors. *Kidney Int*. (2019) 95:1443–52. doi: 10.1016/j.kint.2019.01.023
  35. Caesar JJE, Lavender H, Ward PN, Exley RM, Eaton J, Chittock E, et al. Competition between antagonistic complement factors for a single protein on *N. meningitidis* rules disease susceptibility. *Elife*. (2014) 3:e04008. doi: 10.7554/eLife.04008
  36. Kelsen JR, Dawany N, Moran CJ, Petersen B-S, Sarmady M, Sasson A, et al. Exome sequencing analysis reveals variants in primary immunodeficiency genes in patients with very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. (2015) 149:1415–24. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.006
  37. Agarwal V, Sroka M, Fulde M, Bergmann S, Riesbeck K, Blom AM. Binding of *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) to complement component C1q modulates the complement attack and promotes host cell adherence. *J Biol Chem*. (2014) 289:15833–44. doi: 10.1074/jbc.M113.530212
  38. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, et al. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. (2006) 108:1267–79. doi: 10.1182/blood-2005-10-007252
  39. Gleeson PJ, Wilson V, Cox TE, Sharma SD, Smith-Jackson K, Strain L, et al. Chromosomal rearrangement-A rare cause of complement factor I associated atypical haemolytic uraemic syndrome. *Immunobiology*. (2016) 221:1124–30. doi: 10.1016/j.imbio.2016.05.002
  40. Pouw RB, Gómez Delgado I, López Lera A, Rodríguez de Córdoba S, Wouters D, Kuijpers TW, et al. High Complement Factor H-Related (FHR)-3 levels are associated with the atypical hemolytic-uremic syndrome-risk allele CFHR3\*B. *Front Immunol*. (2018) 9:848. doi: 10.3389/fimmu.2018.00848
  41. Dalia AB, Standish AJ, Weiser JN. Three surface exoglycosidases from *Streptococcus pneumoniae*, NanA, BgaA, and StrH, promote resistance to opsonophagocytic killing by human neutrophils. *Infect Immun*. (2010) 78:2108–16. doi: 10.1128/IAI.01125-09
  42. Fenaille F, Le Mignon M, Groseil C, Ramon C, Riandé S, Siret L, et al. Site-specific N-glycan characterization of human complement factor H. *Glycobiology*. (2007) 17:932–44. doi: 10.1093/glycob/cwm060
  43. Schmidt CQ, Slingsby FC, Richards A, Barlow PN. Production of biologically active complement factor H in therapeutically useful quantities. *Protein Expr Purif*. (2011) 76:254–63. doi: 10.1016/j.pep.2010.12.002

44. Tsiftoglou SA, Arnold JN, Roversi P, Crispin MD, Radcliffe C, Lea SM, et al. Human complement factor I glycosylation: structural and functional characterisation of the N-linked oligosaccharides. *Biochim Biophys Acta*. (2006) 1764:1757–66. doi: 10.1016/j.bbapap.2006.09.007
45. Jouvin MH, Kazatchkine MD, Cahour A, Bernard N. Lysine residues, but not carbohydrates, are required for the regulatory function of H on the amplification C3 convertase of complement. *J Immunol*. (1984) 133:3250–4.
46. Bitzan M, AlKandari O, Whittemore B, Yin X-L. Complement depletion and Coombs positivity in pneumococcal hemolytic uremic syndrome (pHUS). Case series and plea to revisit an old pathogenetic concept. *Int J Med Microbiol*. (2018) 308:1096–104. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.08.007

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Gómez Delgado, Corvillo, Nozal, Arjona, Madrid, Melgosa, Bravo, Szilágyi, Csuka, Veszeli, Prohászka and Sánchez-Corral. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## Revisión

# Contribución de variantes funcionales y cuantitativas del Factor H y las proteínas FHRs (Factor H-Related proteins) del Complemento en patología renal

Irene Gómez Delgado<sup>a</sup> y Pilar Sánchez-Corral<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Investigación en Complemento, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, España

<sup>b</sup> Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 27 de mayo de 2021

Aceptado el 12 de julio de 2021

#### Palabras clave:

Complemento

Factor H

SHUa

GC3

NIgA

### R E S U M E N

El sistema del Complemento protege al organismo frente a procesos infecciosos, tumorales y autoinmunes, y requiere una regulación muy estricta para evitar una activación excesiva e inespecífica. Entre los componentes reguladores del Complemento destaca el factor H (FH), que controla su activación en plasma y sobre la superficie de las células y tejidos propios. FH está relacionado evolutiva y estructuralmente con un conjunto de proteínas plasmáticas denominadas FHRs (*FH-Related proteins*), que podrían actuar como antagonistas funcionales de FH. Numerosos estudios realizados en pacientes de Síndrome Hemolítico-Urémico atípico (SHUa), glomerulopatía C3 (GC3), y nefropatía por IgA (NIgA) han identificado variantes genéticas raras que alteran sustancialmente la función del FH y las proteínas FHRs, y contribuyen de forma muy relevante a la predisposición genética a estas patologías. Estos pacientes presentan también una mayor frecuencia de determinados polimorfismos cuya repercusión en el mecanismo patogénico se está empezando a dilucidar. En los últimos años, la disponibilidad de reactivos específicos para cuantificar las proteínas FHRs de forma fiable en controles y pacientes, ha mostrado que algunos de los polimorfismos asociados a SHUa, GC3 o NIgA determinan cambios en los niveles plasmáticos de FH y proteínas FHRs, que podrían repercutir en la correcta regulación de la activación del Complemento y contribuir así al desarrollo de estas patologías.

© 2021 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [pilar.sanchez-corral@idipaz.es](mailto:pilar.sanchez-corral@idipaz.es) (P. Sánchez-Corral).

<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2021.07.003>

0211-6995/© 2021 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Contribution of functional and quantitative genetic variants of Complement Factor H and Factor H-Related (FHR) proteins on renal pathology

### ABSTRACT

#### Keywords:

Complement  
Factor H  
aHUS  
C3G  
IgAN

The complement system is a first line of defence against infectious, tumoral or autoimmune processes, and it is constitutively regulated to avoid excessive or unspecific activation. Factor H (FH), a most relevant complement regulator, controls complement activation in plasma and on the cellular surfaces of autologous tissues. FH shares evolutionary origin and structural features with a group of plasma proteins known as FH-Related Proteins (FHRs), which could act as FH functional antagonists. Studies in patient cohorts of atypical Haemolytic-Uraemic Syndrome (aHUS), C3 Glomerulopathy (C3G), and IgA nephropathy (IgAN), have identified rare genetic variants that give rise to severe FH and FHRs dysfunctions, and are major genetic predisposing factors. These patients also have a higher frequency of a few polymorphisms whose relevance as disease risk factors is incompletely understood. In the last years, the availability of specific reagents has allowed a more precise quantitation of FH and FHRs in plasma samples from patients and controls. These studies have revealed that some aHUS, C3G or IgAN risk polymorphisms determine mild changes in FH or FHRs levels that could somehow perturb complement regulation and favour disease pathogenesis.

© 2021 Sociedad Española de Nefrología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Activación y regulación del Complemento

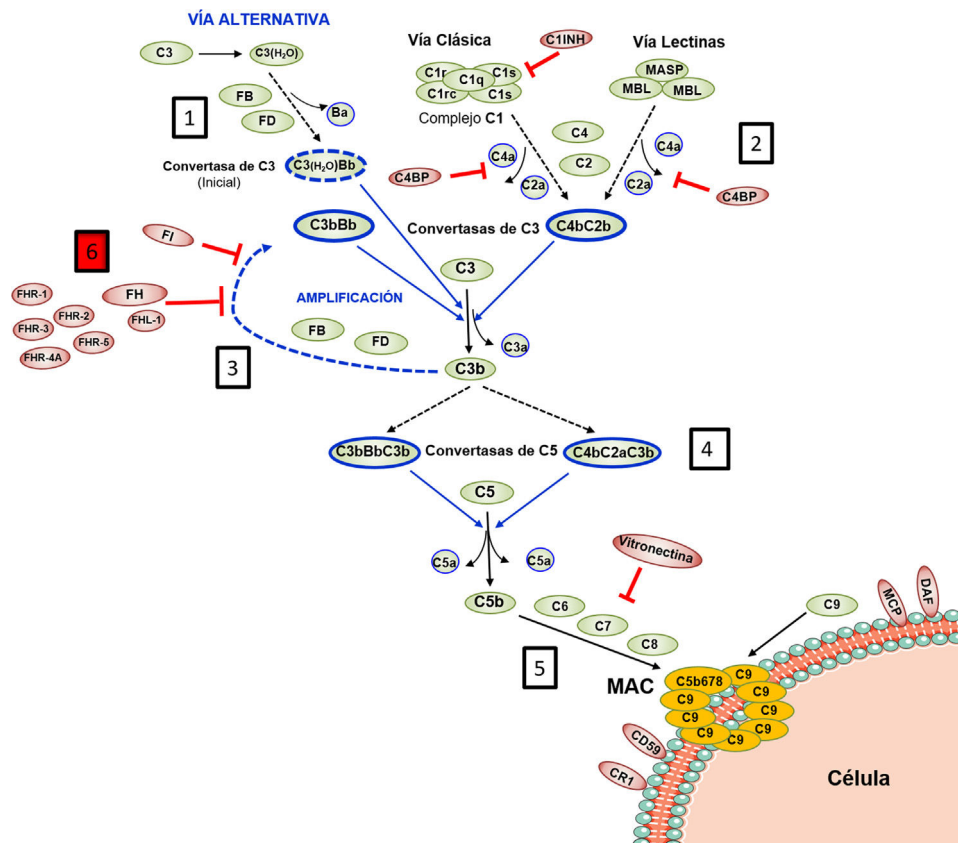
El Sistema del Complemento es esencial para la respuesta inmune innata, y modula también la inmunidad adaptativa porque favorece la generación de anticuerpos y la memoria inmunológica. Además de proteger al organismo de forma inmediata frente a una gran variedad de patógenos, el Complemento juega un papel clave en la eliminación de los inmunocomplejos y células propias dañadas, que podrían provocar daño tisular y favorecer procesos autoinmunes<sup>1</sup>.

El Complemento lo integran más de 30 proteínas plasmáticas o de membrana sintetizadas constitutivamente, que ejercen una función efectora o una función reguladora intrínsecas a la homeostasis del sistema. Todo el funcionamiento del Complemento pivota alrededor del proceso de activación del componente C3, una de las proteínas plasmáticas más abundantes (fig. 1). La activación del C3 es una reacción proteolítica por la que la molécula de C3 se escinde en los fragmentos C3b y C3a, y a la que se puede llegar a través de 3 vías en las que participan distintos componentes: la Vía Clásica (VC), la Vía Alternativa (VA), y la Vía de las Lectinas (VL). La generación de C3b, a su vez, conduce a la etapa final de activación del Complemento, conocida como Vía Lítica<sup>2</sup>.

Las características bioquímicas del proceso de activación del Complemento lo convierten en una herramienta sumamente rápida y eficaz en la defensa frente a patógenos, pero también pueden resultar perjudiciales para el huésped. Así, una activación excesiva puede llevar a un rápido consumo de componentes que facilita una nueva invasión por patógenos, y provocar una respuesta inflamatoria exacerbada. Por otro lado, los productos de activación del Complemento pueden depositarse sobre las células propias y dañarlas. En situaciones

fisiológicas, estas consecuencias adversas se evitan gracias a que todas y cada una de las distintas etapas del proceso de activación del Complemento están controladas por componentes reguladores, algunos presentes en plasma y otros localizados en la superficie de la mayoría de las células y tejidos propios. En consecuencia, para que el Complemento sea eficaz y específico, y no genere daño autólogo, el equilibrio entre su activación y regulación es fundamental<sup>3</sup>.

La regulación de la VA del Complemento es especialmente relevante. Esta vía de activación, evolutivamente la más antigua, está permanentemente activada en el plasma debido a la hidrólisis espontánea de un enlace tioéster interno en algunas moléculas de C3. Normalmente, esta activación basal de la VA no supera un umbral perjudicial, gracias a la existencia de componentes del Complemento que la regulan. Por este motivo, cualquier situación, genética o adquirida, que altera la regulación de la VA puede provocar daño autólogo por el Complemento, siendo el riñón uno de los órganos más vulnerables<sup>4</sup>. Las patologías renales comúnmente asociadas a la desregulación de la VA del Complemento son el Síndrome Hemolítico-Urémico atípico (SHUa), la glomerulopatía C3 (GC3) y la nefropatía por IgA (NigA). Muchos de estos pacientes tienen variantes genéticas patogénicas o autoanticuerpos circulantes que afectan al normal funcionamiento del Factor H (FH), principal regulador de la VA del Complemento, y que es capaz de controlar la activación de C3 tanto en plasma como sobre las superficies celulares propias; no menos relevante es la existencia de variantes genéticas comunes (i.e. polimorfismos) en el gen del FH que también contribuyen al desarrollo y/o expresividad clínica de estas patologías<sup>5</sup>. En la primera parte de esta revisión recapitularemos las variantes patogénicas y los polimorfismos que afectan a la regulación de la VA del Complemento dependiente de FH, para posteriormente centrarnos en la repercusión que los niveles de FH y



**Figura 1 – Activación y Regulación del Complemento**

El Complemento es un sistema autorregulado cuya piedra angular es la activación proteolítica del componente C3. 1) La hidrólisis espontánea de algunas moléculas de C3 conduce a la activación basal de la Vía Alternativa (VA). 2) El Complemento puede activarse de forma más intensa a través de la Vía Clásica (VC) y de la Vía de las Lectinas (VL), cuando los componentes C1q o MBL/Ficolinas reconocen complejos antígeno-anticuerpo solubles, o moléculas de carbohidratos presentes en determinadas superficies (células propias dañadas o microorganismos). Esta activación conduce a la formación de una Convertasa de C3 (C4bC2b), que escinde el C3 en los fragmentos C3b y C3a. 3) La generación de C3b da lugar a otra Convertasa de C3 (C3bBb) y a la amplificación de la activación basal de la VA, que se convierte entonces en el mecanismo más eficaz de activación del Complemento. 4) El siguiente paso es la activación del componente C5, generando los fragmentos C5b y C5a. 5) La última etapa es la denominada Vía Lítica, que da lugar a la formación de un complejo multimolecular (MAC, Membrane Attack Complex) que se inserta en la membrana de la superficie activadora y forma poros que la lisan por desequilibrio osmótico. 6) El proceso de activación del Complemento está regulado en todas sus etapas por múltiples proteínas (representadas en color rojo) que evitan que se active sobre nuestras propias células y tejidos; la regulación de la VA depende en gran medida del regulador Factor H y de su isoforma FHL-1. El rol preciso de las proteínas FHR (homólogas estructurales de FH) en el proceso de activación-regulación del Complemento no se conoce en detalle. Para la nomenclatura del Complemento ver las referencias<sup>49,50</sup>.

de sus proteínas homólogas, Factor H-Related Proteins (FHRs), pueden tener en patología renal.

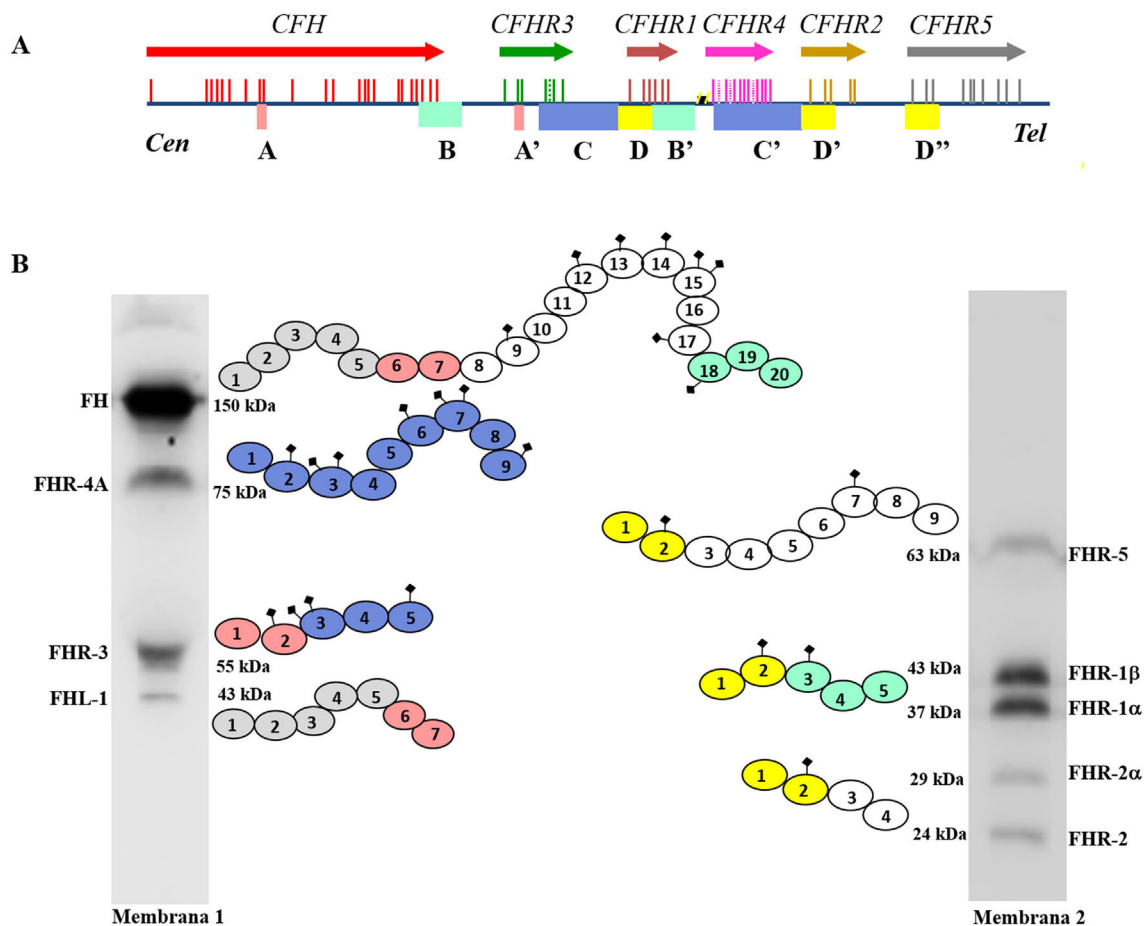
### Familia de proteínas FH y FHRs

FH es una glicoproteína plasmática de 150kDa, formada por 20 dominios estructurales denominados SCRs (Short Consensus Repeats) o CCPs (Complement Control Proteins). En la molécula de FH se distinguen dos regiones funcionalmente muy relevantes: la región N-terminal (SCRs 1-4), donde reside su capacidad para regular la activación del Complemento en plasma, y la

región C-terminal (SCRs 19-20), que permite a FH unirse transitoriamente a las superficies celulares propias y protegerlas del daño indiscriminado por el Complemento<sup>6</sup>.

FH está codificado por el gen *CFH*, que genera también una variante de *splicing* alternativo denominada Factor H-like protein 1 (FHL-1). La proteína FHL-1 contiene únicamente los dominios SCRs 1-7 de FH, seguidos de una cola de 4 aminoácidos; como consecuencia, FHL-1 puede regular el Complemento como FH, pero no puede unirse a las superficies celulares propias<sup>7</sup>. Junto al gen *CFH*, en el agrupamiento génico *Regulators of Complement Activation* (RCA) del cromosoma 1, se encuentran los 5 genes *CFHRs*, que codifican las 5 proteínas homólogas a FH





**Figura 2** – Familia de factor H y proteínas FHRs

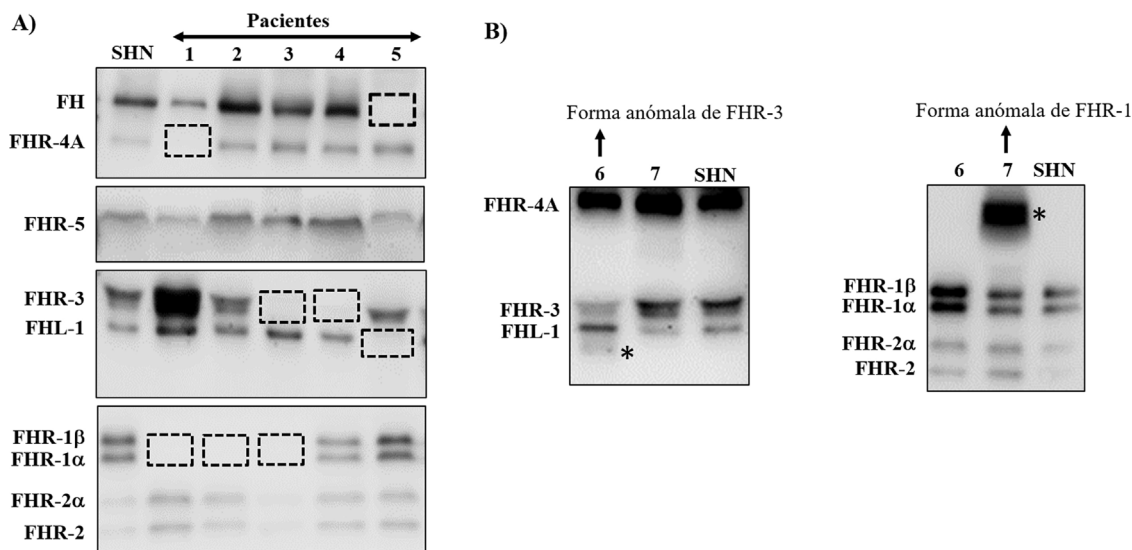
**A)** Región del agrupamiento génico RGA (*Regulator of Complement Activation*, 1q32-33) que contiene el gen *CFH* y los 5 genes *CFHRs*. Todos los genes tienen la misma orientación 5'-3'. Las letras A, B, C y D denotan grupos exón-intrón homólogos entre sí. **B)** Identificación de FH, FHL-1 y las 5 proteínas FHRs de un suero humano normal mediante análisis de *Western-blot* con 2 preparaciones de anticuerpos con distinta especificidad. Todas las proteínas están formadas por 4-20 dominios globulares homólogos; los dominios con el mismo color son los más similares entre sí, y están codificados por las duplicaciones A, B, C o D de los genes respectivos.

denominadas colectivamente FHRs<sup>8</sup>. Los genes *CFH*-*CFHRs* tienen regiones exónicas e intrónicas muy similares, que reflejan una historia evolutiva compartida, y caracterizada por una sucesión de eventos de duplicación génica (fig. 2a). Este origen común explica la elevada similitud estructural de FH y las proteínas FHRs, que también están formadas enteramente por dominios SCRs, algunos de los cuales alcanzan el 100% de identidad de aminoácidos con los dominios homólogos en FH. El distinto tamaño molecular de FH y las proteínas FHRs permite que todas ellas se puedan identificar fácilmente mediante un análisis de *Western-blot* en una muestra de plasma o suero del paciente (fig. 2b).

Las proteínas FHRs pueden interactuar con C3b y unirse a ligandos de FH localizados en la superficie celular. Sin embargo, ninguna proteína FHR tiene dominios SCRs homólogos a la región N-terminal del FH, por lo que no pueden regular la activación del Complemento en plasma de la misma manera, ni proteger a las superficies celulares propias frente

al Complemento autógeno. Estas características llevaron a proponer que las proteínas FHRs actuaban como desreguladores del FH<sup>9</sup>, pero su función precisa no está bien caracterizada y es objeto de controversia<sup>10</sup>. En este sentido, no se puede descartar que algunas proteínas FHRs tengan cierta actividad reguladora del Complemento<sup>11,12</sup>, pero también se ha demostrado que pueden actuar como activadores del mismo. Es el caso de las proteínas FHR-1, FHR-4 y FHR-5, que pueden unirse a C3b, promover la formación de la Convertasa de C3 y activar la VA, y también pueden activar la VC a través de su unión a las pentraxinas PTX3 y Proteína C reactiva<sup>13-17</sup>.

Puesto que las proteínas FHRs desregulan el FH y/o potencian directamente la activación de la VA del Complemento, su función fisiológica es antagónica a la del FH. Por tanto, las variantes genéticas que alteran la función de FH y las proteínas FHRs, o que producen cambios en sus niveles plasmáticos, pueden desregular la VA y predisponer al desarrollo de patología renal.



**Figura 3 – Screening de deficiencias y formas anómalas de FH y proteínas FHRs en pacientes de SHUa y GC3 mediante Western-blot**

**A)** Patrones de FH y FHRs en un individuo sano (SHN) y en 5 pacientes de SHUa y GC3 que tienen deficiencia completa de 1 o 2 proteínas; los cuadrados en línea discontinua señalan la posición de la proteína que falta. Las diferencias en la intensidad de otras bandas reflejan que existe una importante variabilidad interindividual en los niveles de FH y proteínas FHRs, cuya relevancia fisiopatológica no está suficientemente clara.

**B)** Patrones de FH y FHRs en 2 pacientes que presentan bandas anómalas (señaladas con un asterisco), cuyo tamaño no se corresponde con el de ninguna proteína nativa. Análisis de WB adicionales y estudios genéticos identificaron que la banda anómala del paciente 6 corresponde a una isoforma corta de FHR-3, y la del paciente 7 a una forma de FHR-1 parcialmente duplicada.

### Variantes genéticas CFH/CFHRs en SHUa, GC3 y NigA

Como se ha mencionado, el equilibrio funcional entre el FH y las proteínas FHRs contribuye a mantener la homeostasis de la VA del Complemento y evitar el desarrollo de patologías renales como el SHUa, la GC3 o la NigA. Los estudios realizados en distintas cohortes de pacientes de SHUa y GC3 han identificado variantes patogénicas de FH y proteínas FHRs que perturban la regulación de la VA, y que se detallan en revisiones recientes<sup>18,19</sup>. También se han descrito algunas variantes patogénicas en pacientes de NigA<sup>20,21</sup>.

Muchas de estas variantes patogénicas resultan de la existencia de duplicaciones exón-intrón en la región CFH-CFHRs, que la hacen muy propensa a eventos de conversión génica y recombinación homóloga desigual que originan mutaciones, duplicaciones, deleciones o genes híbridos. La mayoría de estos reordenamientos anómalos no pueden detectarse mediante secuenciación estándar del ADN, por lo que se precisan técnicas capaces de determinar el número de copias de la región que se sospecha pueda estar duplicada o ausente, o incluso técnicas mucho más específicas que sólo se realizan en algunos laboratorios de investigación y requieren mucho tiempo. Algunos de estos reordenamientos anómalos provocan la deficiencia total de una o varias proteínas, mientras que otros generan proteínas que tienen un tamaño molecular diferente de las proteínas nativas; estas 2 situaciones se detectan rápidamente mediante un sencillo análisis de Western-blot

(fig. 3) que, además, proporciona una información valiosa para diseñar estrategias genéticas específicas para caracterizar el defecto genético subyacente.

Además de variantes patogénicas raras, la región CFH-CFHRs contiene multitud de polimorfismos (i.e. variantes genéticas con una frecuencia en la población mayor del 1%), algunos de los cuales se asocian a patología renal (tabla 1). Entre estos polimorfismos destaca la deleción de los genes CFHR3 y CFHR1 ( $\Delta$ CFHR3-CFHR1), que cuando se encuentra en homocigosis se asocia con riesgo a SHUa<sup>22</sup> y protección frente a NigA<sup>23</sup>. Un 80% de los pacientes de SHUa que desarrollan autoanticuerpos anti-FH son homocigotos para la variante  $\Delta$ CFHR3-CFHR1 y, por consiguiente, carecen de las proteínas FHR-3 y FHR-1.

El gen CFH contiene varios polimorfismos de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) que se encuentran en desequilibrio de ligamiento y definen diferentes haplotipos, siendo los más frecuentes CFH(H1), CFH(H2), CFH(H3) y CFH(H4). El haplotipo CFH(H1), que contiene la variante FH<sub>His402</sub>, se asocia con riesgo a GC3, mientras que el haplotipo CFH(H2), que incluye la variante FH<sub>Val62</sub>, se considera un factor de protección frente a SHUa y GC3<sup>24</sup>. El haplotipo CFH(H3) se asocia con riesgo a SHUa y con menores niveles de FH<sup>25</sup>. Finalmente, el haplotipo CFH(H4) está en desequilibrio de ligamiento con la deleción  $\Delta$ CFHR3-CFHR1, y es más frecuente en los pacientes de SHUa con autoanticuerpos anti-FH.

Los genes CFHR1 y CFHR3 también tienen varios SNPs en desequilibrio de ligamiento que configuran 2 alelos mayori-

**Tabla 1 – Variantes genéticas comunes en la región CFH-CFHRs y patología renal**

Variante	Consecuencia funcional	Asociación	Referencia
CFH(H1)	Contiene la variante His402, que disminuye la unión de FH a diferentes carbohidratos de membrana	Riesgo GC3	24
CFH(H2)	Contiene la variante Ile62 que incrementa la actividad reguladora de FH.	Protección SHUa y GC3	24
CFH(H3)	Se asocia con niveles más bajos de FH	Riesgo SHUa	25
CFH(H4)	Se asocia con la variante $\Delta$ CFHR3-CFHR1	Riesgo SHUa (HOM)	46
$\Delta$ CFHR3-CFHR1	Niveles de FH más altos		
	Se asocia con autoanticuerpos anti-FH	Riesgo SHUa (HOM)	26
	La deficiencia de FHR-1 favorece la regulación de FH	Protección IgAN	23
CFHR3*B	Se asocia con niveles más elevados de FHR-3	Riesgo SHUa	27
CFHR1*B	Contiene la secuencia Tyr157-Val159-Gln175, que podría aumentar la competencia de FHR-1 con FH.	Riesgo SHUa	26
CFHR4*B	Contiene la variante Pro405, pero se desconoce su repercusión funcional.	Riesgo SHUa	28
CFHR5 <sup>Ser62</sup>	Afecta a la interacción de FHR-5 con C3b y podría influir en la activación del complemento	Riesgo GC3	29

tarios: CFHR1\*A/CFHR1\*B<sup>26</sup> y CFHR3\*A/CFHR3\*B<sup>25</sup>. Los alelos CFHR1\*B y CFHR3\*B se asocian con riesgo a SHUa. El alelo CFHR3\*B determina mayores niveles de la proteína FHR-3<sup>27</sup>, mientras que el alelo CFHR1\*B no parece tener relación con los niveles de la proteína FHR-1; en este caso, su asociación con SHUa se debe probablemente a que presenta una mayor identidad de aminoácidos con FH y por tanto podría competir más eficazmente por la unión a los mismos ligandos.

Es interesante que el haplotipo de riesgo a SHUa CFH(H3) se presente mayoritariamente en el mismo cromosoma que los alelos CFHR3\*B y CFHR1\*B, dando lugar a un haplotipo extendido CFH(H3)-CFHR3\*B-CFHR1\*B que probablemente determina un aumento en los niveles relativos FHR-3/FH que podría favorecer el desarrollo del SHUa. El haplotipo CFH(H1), por su parte, se presenta habitualmente con los alelos CFHR3\*A y CFHR1\*A, formando el haplotipo extendido CFH(H1)-CFHR3\*A-CFHR1\*A, que es mayoritario en la población control sana.

En el gen CFHR4 también se ha descrito un polimorfismo aparentemente asociado con SHUa, y que no parece estar relacionado con los niveles de la proteína FHR-4A<sup>28</sup>, y el gen CFHR5 contiene varios polimorfismos que se asocian con mayor riesgo a GC3<sup>29</sup>.

En los pacientes de NIGa, la región CFH-CFHRs no se ha caracterizado con el mismo detalle que en los pacientes de SHUa y GC3. Por este motivo, no puede descartarse que haya otros polimorfismos asociados a NIGa, aparte de la ya mencionada delección  $\Delta$ CFHR3-CFHR1.

### Niveles de FH y proteínas FHRs en controles y pacientes

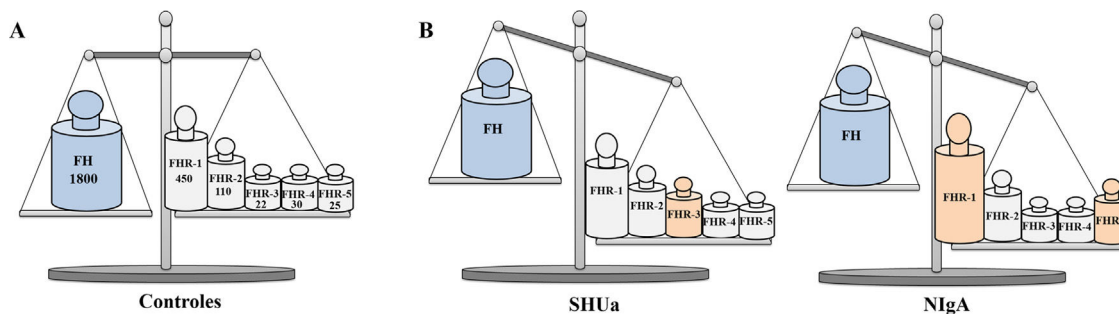
La actividad de la VA del Complemento también puede verse afectada por cambios en los niveles fisiológicos de FH y proteínas FHRs, como demuestran los trabajos que comentaremos en este apartado, en el que analizaremos además los polimorfismos en la región CFH-CFHRs que afectan a los niveles de proteína. Es importante señalar que la mayoría de estos estudios expresan los niveles de proteína en  $\mu$ g/ml; puesto que el tamaño molecular de FH (150 kDa) es mayor que el de cualquiera de las proteínas FHRs (entre 24kDa y 75 kDa),

para poder interpretar correctamente los cambios en los niveles plasmáticos de FH y proteínas FHRs es preciso comparar las concentraciones de todas ellas en base molar (fig. 4).

FH es una proteína relativamente abundante en plasma, con un rango de concentración amplio (116-562  $\mu$ g/ml) que está determinado genéticamente en un 62%, aumenta ligeramente con la edad, y disminuye por el consumo de tabaco<sup>30</sup>. Los valores medios en controles adultos son aproximadamente 250  $\mu$ g/ml<sup>21,31-35</sup>, similares a los observados en controles pediátricos<sup>36</sup> y mayores que en neonatos<sup>37</sup>. Los niveles de FHL-1 (la isoforma corta de FH), por su parte, son entre 3 y 40 veces menores que los de FH, en base molar<sup>7,38</sup>.

La elevada similitud entre FH y las proteínas FHRs ha supuesto un hándicap a la hora de generar anticuerpos específicos para cuantificar cada una de estas proteínas mediante ensayos ELISA. Por este motivo, se han utilizado otras técnicas (Western-blot semicuantitativo, espectrometría de masas) que han proporcionado resultados muy dispares<sup>10</sup>. En los últimos años, varios grupos de investigación han generado anticuerpos específicos para todas las proteínas FHRs, lo que está permitiendo determinar su concentración plasmática de forma más fiable. Actualmente existen anticuerpos comerciales para todas las proteínas FHRs, excepto la proteína FHR-3, de manera que es posible diseñar ensayos ELISA específicos para cuantificarlas. No obstante, el hecho de que no haya un protocolo común, y la falta de reactivos de referencia hace que los niveles obtenidos en estos ensayos sean a veces muy diferentes. Una complicación añadida es la capacidad de FHR-1, FHR-2 y FHR-5 para formar complejos diméricos. Esta peculiaridad se debe a que los dominios SCR1-SCR2 de estas 3 proteínas son muy similares entre sí y contienen aminoácidos que les permiten formar homodímeros y heterodímeros que tienen mayor capacidad para competir con FH<sup>39</sup>; la cuantificación de todas estas formas se ha abordado en un estudio realizado en controles holandeses, según el cual no habría formas monoméricas de estas proteínas circulando en plasma<sup>40</sup>.

Los niveles de las proteínas FHR-1 y FHR-3 están determinados, en primer lugar, por la existencia de la variante genética  $\Delta$ CFHR3-CFHR1, ya que los individuos homocigotos para esta variante no tienen ninguna copia de los genes CFHR1 y CFHR3, y los individuos heterocigotos sólo tienen una. Como



**Figura 4 – Relevancia fisiopatológica de los niveles plasmáticos de FH y proteínas FHRs**

**Representación gráfica de los niveles de FH y proteínas FHRs en Controles, pacientes de SHUa y pacientes de NíG.** A) En controles sanos, los niveles de FH y los de las proteínas FHRs están en equilibrio funcional. Los números debajo del nombre de cada proteína expresan su concentración media en base nanomolar<sup>33,40,43</sup>, por lo que equivalen al número de moléculas que hay de cada una de ellas en un determinado volumen de plasma. B) Pequeños aumentos en la concentración de alguna proteína FHR pueden desequilibrar la regulación de la VA del Complemento por el FH, y favorecer el desarrollo de patologías renales; en algunos pacientes de SHUa aumentan los niveles de FHR-3,<sup>27</sup> mientras que en algunos pacientes de NíG aumentan los niveles de FHR-1 y FHR-5.<sup>21,34</sup>

la frecuencia de la variante genética  $\Delta$ CFHR3-CFHR1 varía mucho entre poblaciones, se trata de un rasgo genético muy relevante cuando se quieren comparar los niveles de FHR-1 y FHR-3 entre distintas cohortes de controles sanos, o entre controles y pacientes de etnias diferentes. Así, un 5% de los individuos europeos caucasoides no tiene ninguna copia de los genes *CFHR1* y *CFHR3*, pero esta frecuencia se eleva al 33% en individuos de Nigeria, mientras que en japoneses y sudamericanos es prácticamente cero<sup>41</sup>. En este apartado nos referiremos a los datos obtenidos en poblaciones caucasoides.

Los niveles de FHR-1 en individuos con una sola copia del gen *CFHR1* (i.e. heterocigotos para la variante  $\Delta$ CFHR3-CFHR1) son aproximadamente la mitad que en los que tienen dos copias del mismo (61  $\mu$ g/ml vs 122  $\mu$ g/ml)<sup>21</sup>. Estos resultados coinciden bastante bien con los niveles de 95  $\mu$ g/ml observados en otra población control europea, en la que no se tuvo en cuenta el número de copias de la variante  $\Delta$ CFHR3-CFHR1<sup>34</sup>. Sin embargo, el estudio en controles holandeses, que además discrimina entre homodímeros FHR-1/1 y heterodímeros FHR-1/2, obtiene unos valores totales de FHR-1 unas 10 veces menores<sup>40</sup>. Los niveles plasmáticos de la proteína FHR-3 son bastante inferiores a los de FH y FHR-1, pero, como cabría esperar, también son aproximadamente el doble en los controles adultos que tienen 2 copias del gen *CFHR3* que en los que sólo tienen una (0.83  $\mu$ g/ml vs 0.38  $\mu$ g/ml)<sup>33</sup>. En la cuantificación de FHR-3, no obstante, hay que tener en cuenta un componente genético adicional, ya que el alelo *CFHR3*\*B da lugar a mayores niveles de proteína que el alelo *CFHR3*\*A<sup>27</sup>; por tanto, los niveles de FHR-3 en plasma van a depender en última instancia del número de copias de los alelos *CFHR3*\*A y *CFHR3*\*B que tenga cada individuo, lo que explica la gran variabilidad de niveles de FHR-3 (entre 0.14 y 1.16  $\mu$ g/ml) observada en una pequeña cohorte control española en la que se caracterizaron las variantes  $\Delta$ CFHR3-CFHR1, *CFHR3*\*A y *CFHR3*\*B<sup>27</sup>. En controles pediátricos, los niveles de FHR-1 son ligeramente inferiores a los de adultos, mientras que en los de FHR-3 no se observan diferencias<sup>36</sup>.

La concentración media de la proteína FHR-2 en el plasma de controles adultos es de unos 6  $\mu$ g/ml, que corresponden mayoritariamente a heterodímeros FHR-1/2 (5.2  $\mu$ g/ml) y en mucha menor proporción (0.8  $\mu$ g/ml) a homodímeros FHR-2/2<sup>40</sup>. Los niveles de FHR-2 en controles pediátricos son muy similares a los observados en adultos<sup>36</sup>. No se han descrito polimorfismos del gen *CFHR2* que afecten a los niveles de expresión de la proteína.

La proteína FHR-4A es la isoforma mayoritaria del gen *CFHR4*, que origina también un producto de *splicing* alternativo denominado FHR-4B, de menor tamaño que la isoforma FHR-4A<sup>42</sup>. Las primeras cuantificaciones no distinguían las isoformas FHR-4A y FHR-4B, y estimaban unos niveles medios de proteína de 25.4  $\mu$ g/ml<sup>14</sup>. El desarrollo de anticuerpos específicos ha permitido cuantificar las 2 isoformas de forma individual<sup>43</sup>; los resultados muestran que los niveles de la isoforma FHR-4A son 2.55  $\mu$ g/ml (10 veces menores de los estimados anteriormente), mientras que la isoforma FHR-4B no se detecta en plasma, lo que suscita dudas razonables sobre si realmente se secreta. Los niveles de FHR-4A no parecen estar asociados con la edad, pero sí son ligeramente menores en controles pediátricos que en adultos<sup>36</sup>. Recientemente se ha descrito un polimorfismo en el intrón 1 del gen *CFHR4* que se asocia con niveles más elevados de la isoforma FHR-4A<sup>35</sup>.

La proteína FHR-5, al igual que FHR-1 y FHR-2, también tiene 2 dominios de dimerización, pero aparentemente sólo circula en plasma en forma de homodímeros FHR-5/5. Los niveles medios de FHR-5 en controles adultos holandeses son 1.66  $\mu$ g/ml<sup>40</sup>, algo inferiores a los reportados anteriormente en otras cohortes, que oscilan entre 2.5 y 5.5  $\mu$ g/ml<sup>34,44,45</sup>. Los niveles de FHR-5 son más bajos en niños menores de 3 años, edad a la que alcanzan prácticamente los mismos valores que en adultos<sup>36</sup>.

¿Cómo varían los niveles de FH y proteínas FHRs en pacientes de SHUa, NíG y GC3? Como mencionamos anteriormente, algunos polimorfismos que inciden directamente en los niveles de proteína tienen frecuencias diferentes en pacientes y

en controles. Es el caso del haplotipo *CFH(H3)*, que se asocia con menores niveles de FH y mayores niveles de FHR-3<sup>25</sup>, del haplotipo *CFH(H4)*, que se asocia con mayores niveles de esta proteína<sup>46</sup>, o de la delección  $\Delta$ *CFHR3-CFHR1*, que genera deficiencia de FHR-1 y FHR-3.

Por otro lado, varios estudios en pacientes de SHUa y NigA sugieren que los niveles de FH y proteínas FHRs cambian también durante el curso de la enfermedad. Así, los niveles de FHR-1 y FHR-5, y las ratios FHR-1/FH y FHR-5/FH, son mayores en pacientes de NigA que en las correspondientes poblaciones control, y hay una correlación directa entre los niveles de FHR-5 y la progresión de la enfermedad<sup>21,34,45</sup>. En el mismo sentido, algunos pacientes de NigA tienen un mayor depósito de FHR-5 en los glomérulos, que correlaciona con el daño histológico y sirve de marcador pronóstico<sup>47</sup>. También se han observado cambios en los niveles de FHR-5 en algunos pacientes de SHUa asociado a infección con *Streptococcus pneumoniae*, que presentan niveles mayores de esta proteína en las muestras de plasma obtenidas en los primeros días del proceso infeccioso que en las muestras en remisión<sup>48</sup>. Esta probable influencia de la evolución clínica en los niveles de FH y proteínas FHRs explicaría también por qué los niveles de FHR-3 en pacientes de la cohorte española de SHUa son mayores que en los individuos sanos que tienen el mismo genotipo de *CFHR3*<sup>27</sup>. Para abordar estos interrogantes, habrá que comparar los niveles de FH y proteínas FHRs en muestras seriadas de los pacientes, obtenidas al debut y en remisión. No hay publicaciones que documenten cambios en los niveles de FH y proteínas FHRs en pacientes de GC3; no obstante, resultados preliminares de nuestro grupo muestran que la mayoría de los pacientes tienen niveles elevados de algunas proteínas FHRs, y probablemente esta situación se da también en otras cohortes de GC3.

Otra cuestión que nos parece relevante es que en la mayoría de los estudios realizados en controles y pacientes se han comparado los niveles absolutos de FH y proteínas FHRs, pero sólo en algunos se han calculado los niveles relativos de las mismas, como las ratios FHR-1/FH o FHR-5/FH. El aumento en los niveles de una determinada proteína FHR puede ser relevante en un individuo con niveles constitutivamente bajos de FH, mientras que en un individuo con una concentración elevada de FH ese mismo aumento puede no ser significativo. En nuestra opinión, los cambios en las concentraciones relativas de FH y proteínas FHRs pueden ser tanto o más informativos que los cambios en los niveles absolutos de las mismas.

En resumen, aunque la cuantificación de las proteínas FHRs no se ha podido llevar a cabo de forma fiable hasta hace unos años, se sabe que los niveles de algunas de ellas, en particular FHR-1 y FHR-3, están determinados en gran medida por polimorfismos en la región *CFH-CFHRs*. Por otro lado, los datos obtenidos en pacientes de SHUa y NigA revelan que los niveles de algunas proteínas FHRs y la ratio FH/FHRs se alteran durante el curso clínico de la enfermedad. Estos datos sugieren una contribución relevante de los niveles de FH y FHRs en la patogenia de enfermedades relacionadas con la desregulación de la VA del Complemento, que se irá perfilando a medida que mejore nuestra comprensión de la actividad funcional de estas proteínas y de los mecanismos que determinan sus niveles de expresión.

### Puntos destacados

- El Factor H (FH) regula la vía alternativa del Complemento y evita que se active inespecíficamente sobre nuestras propias células y tejidos.
- Las proteínas FHRs son muy similares estructuralmente al FH, pero es probable que se comporten como antagonistas funcionales del FH y potencien la activación del Complemento.
- Los niveles de FH y proteínas FHRs están determinados parcialmente por polimorfismos en la región *CFH-CFHRs* cuya frecuencia varía entre poblaciones diferentes.
- Pequeños cambios en los niveles de FH y proteínas FHRs pueden desequilibrar la regulación del Complemento a nivel local o sistémico, y favorecer el desarrollo de patologías renales como el SHUa, las GC3 o la NigA.

### Financiación

IGD tiene un contrato financiado por la Comunidad Autónoma de Madrid (Complement II-CM; S2017/BMD-3673) y por la Fundación Senefro (<http://www.senefro.org/>; Ayudas de Investigación 2018). El trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (proyecto PI19/00970 a PS-C).

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Margarita López Trascasa y al Dr. Fernando Corvillo, miembros del Grupo de Investigación en Complemento del IdiPAZ, la lectura del manuscrito y sus comentarios sobre el mismo.

### REFERENCIAS

1. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010;11:785-97, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1923>.
2. Bajic G, Degn SE, Thiel S, Andersen GR. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J.* 2015;34:2735-57, <http://dx.doi.org/10.15252/embj.201591881>.
3. Schmidt CQ, Lambris JD, Ricklin D. Protection of host cells by complement regulators. *Immunol Rev.* 2016;274:152-71, <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12475>.
4. Vernon KA, Cook HT. Complement in glomerular disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2012;19:84-92, <http://dx.doi.org/10.1053/j.ackd.2012.02.015>.

5. Goicoechea de Jorge E, López Lera A, Bayarri-Olmos R, Yebenes H, Lopez-Trascasa M, Rodríguez de Córdoba S. Common and rare genetic variants of complement components in human disease. *Mol Immunol*. 2018;102:42–57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2018.06.011>.
6. Meri S. Self-nonsel self discrimination by the complement system. *FEBS Lett*. 2016;590:2418–34, <http://dx.doi.org/10.1002/1873-3468.12284>.
7. Dopler A, Guntau L, Harder MJ, Palmer A, Höchsmann B, Schrezenmeier H, et al. Self versus Nonsel self Discrimination by the Soluble Complement Regulators Factor H and FHL-1. *J Immunol*. 2019 Apr 1;202:2082–94, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1801545>.
8. Rodríguez de Córdoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sánchez-Corral P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*. 2004;41:355–67, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2004.02.005>.
9. Józsi M, Tortajada A, Uzonyi B, Goicoechea de Jorge E, Rodríguez de Córdoba S. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. *Trends Immunol*. 2015;36:374–84, <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.04.008>.
10. Poppelaars F, Goicoechea de Jorge E, Jongerius I, Baeumner AJ, Steiner MS, Józsi M, et al. A Family Affair: Addressing the Challenges of Factor H and the Related Proteins. *Front Immunol*. 2021 Mar 30;12:660194, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.660194>.
11. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse HM, Schirmer S, et al. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood*. 2009 Sep 17;114:2439–47, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-02-205641>.
12. Eberhardt HU, Buhlmann D, Hortschansky P, Chen Q, Böhm S, Kemper MJ, et al. Human factor H-related protein 2 (CFHR2) regulates complement activation. *PLoS One*. 2013 Nov 18;8:e78617, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078617>.
13. Mihlan M, Hebecker M, Dahse HM, Hälbig S, Huber-Lang M, Dahse R, et al. Human complement factor H-related protein 4 binds and recruits native pentameric C-reactive protein to necrotic cells. *Mol Immunol*. 2009 Jan;46:335–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.029>.
14. Hebecker M, Józsi M. Factor H-related protein 4 activates complement by serving as a platform for the assembly of alternative pathway C3 convertase via its interaction with C3b protein. *J Biol Chem*. 2012;287:19528–36, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.364471>.
15. Csincsi ÁI, Kopp A, Zöldi M, Bánlaki Z, Uzonyi B, Hebecker M, et al. Factor H-related protein 5 interacts with pentraxin 3 and the extracellular matrix and modulates complement activation. *J Immunol*. 2015 May 15;194:4963–73, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1403121>.
16. Csincsi ÁI, Szabó Z, Bánlaki Z, Uzonyi B, Cserhalmi M, Kárpáti É, et al. FHR-1 Binds to C-Reactive Protein and Enhances Rather than Inhibits Complement Activation. *J Immunol*. 2017 Jul 1;199:292–303, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1600483>.
17. Martín Merinero H, Subías M, Pereda A, Gomez-Rubio E, Juana-Lopez L, Fernandez Rivera C, et al. The molecular bases for the association of FHR-1 with atypical hemolytic uremic syndrome and other diseases. *Blood*. 2021 Mar 2, <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2020010069>, blood.2020010069.
18. Sánchez-Corral P, Pouw RB, López-Trascasa M, Józsi M. Self-Damage Caused by Dysregulation of the Complement Alternative Pathway: Relevance of the Factor H Protein Family. *Front Immunol*. 2018 Jul 12;9:1607, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01607>.
19. Zipfel PF, Wiech T, Stea ED, Skerka C. CFHR Gene Variations Provide Insights in the Pathogenesis of the Kidney Diseases Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and C3 Glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol*. 2020 Feb;31:241–56, <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2019050515>.
20. Zhai YL, Meng SJ, Zhu L, Shi SF, Wang SX, Liu LJ, et al. Rare Variants in the Complement Factor H-Related Protein 5 Gene Contribute to Genetic Susceptibility to IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Sep;27:2894–905, <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2015010012>.
21. Tortajada A, Gutiérrez E, Goicoechea de Jorge E, Anter J, Segarra A, Espinosa M, et al. Elevated factor H-related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2017 Oct;92:953–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2017.03.041>.
22. Zipfel PF, Edey M, Heinen S, Józsi M, Richter H, Misselwitz J, et al. Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet*. 2007 Mar 16;3:e41, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0030041>.
23. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet*. 2011 Mar 13;43:321–7, <http://dx.doi.org/10.1038/ng.787>.
24. de Córdoba SR, de Jorge EG. Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol*. 2008 Jan;151:1–13, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03552.x>.
25. Bernabéu-Herrero ME, Jiménez-Alcázar M, Anter J, Pinto S, Sánchez Chinchilla D, Garrido S, et al. Complement factor H FHR-3 and FHR-1 variants associate in an extended haplotype conferring increased risk of atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*. 2015 Oct;67 2 Pt B:276–86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.06.021>.
26. Abarrategui-Garrido C, Martínez-Barricarte R, López-Trascasa M, de Córdoba SR, Sánchez-Corral P. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2009 Nov 5;114:4261–71, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-05-223834>.
27. Pouw RB, Gómez Delgado I, López Lera A, Rodríguez de Córdoba S, Wouters D, Kuijpers TW, et al. High Complement Factor H-Related (FHR)-3 Levels Are Associated With the Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome-Risk Allele CFHR3\*B. *Front Immunol*. 2018 Apr 24;9:848, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00848>.
28. Gómez I, Vélez C, Sánchez-Corral P. Quantitative Western-blot profiles of factor H and factor H-related proteins in atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathy. *Molecular Immunology*. 2017 Sep 1;89:181 (Abstract).
29. Abrera-Abeleda MA, Nishimura C, Smith JL, Sethi S, McRae JL, Murphy BF, et al. Variations in the complement regulatory genes factor H (CFH) and factor H related 5 (CFHR5) are associated with membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease). *J Med Genet*. 2006 Jul;43:582–9, <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2005.038315>.
30. Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Almsay L, Blangero J, Fontcuberta J, et al. Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics*. 2004 May;56:77–82, <http://dx.doi.org/10.1007/s00251-004-0660-7>.
31. Hakobyan S, Harris CL, Tortajada A, Goicoechea de Jorge E, García-Layana A, Fernández-Robredo P, et al. Measurement of factor H variants in plasma using variant-specific monoclonal antibodies: application to assessing risk of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 May;49:1983–90, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.07-1523>.

32. Ansari M, McKeigue PM, Skerka C, Hayward C, Rudan I, Vitart V, et al. Genetic influences on plasma CFH and CFHR1 concentrations and their role in susceptibility to age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2013 Dec 1;22:4857–69, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddt336>.
33. Pouw RB, Brouwer MC, Geissler J, van Herpen LV, Zeerleder SS, Willemin WA, et al. Complement Factor H-Related Protein 3 Serum Levels Are Low Compared to Factor H and Mainly Determined by Gene Copy Number Variation in CFHR3. *PLoS One.* 2016 Mar 23;11:e0152164, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152164>.
34. Medjeral-Thomas NR, Lomax-Browne HJ, Beckwith H, Willicombe M, McLean AG, Brookes P, et al. Circulating complement factor H-related proteins 1 and 5 correlate with disease activity in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2017 Oct;92:942–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2017.03.043>.
35. Cipriani V, Lorés-Motta L, He F, Fathalla D, Tilakaratna V, McHarg S, et al. Increased circulating levels of Factor H-Related Protein 4 are strongly associated with age-related macular degeneration. *Nat Commun.* 2020 Feb 7;11:778, <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-14499-3>.
36. van Beek AE, Kamp A, Kruihof S, Nieuwenhuys EJ, Wouters D, Jongerius I, et al. Reference Intervals of Factor H and Factor H-Related Proteins in Healthy Children. *Front Immunol.* 2018 Aug 2;9:1727, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01727>.
37. Grumach AS, Ceccon ME, Rutz R, Fertig A, Kirschfink M. Complement profile in neonates of different gestational ages. *Scand J Immunol.* 2014 Apr;79:276–81, <http://dx.doi.org/10.1111/sji.12154>.
38. Friese MA, Hellwage J, Jokiranta TS, Meri S, Müller-Quernheim HJ, Peter HH, et al. Different regulation of factor H and FHL-1/reconectin by inflammatory mediators and expression of the two proteins in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* 2000 Aug;121:406–15, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01285.x>.
39. Goicoechea de Jorge E, Caesar JJ, Malik TH, Patel M, Colledge M, Johnson S, et al. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 19;110:4685–90, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1219260110>.
40. van Beek AE, Pouw RB, Brouwer MC, van Mierlo G, Geissler J, Ooijevaar-de Heer P, et al. Factor H-Related (FHR)-1 and FHR-2 Form Homo- and Heterodimers, while FHR-5 Circulates Only As Homodimer in Human Plasma. *Front Immunol.* 2017 Oct 18;8:1328, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.01328>.
41. Holmes LV, Strain L, Staniforth SJ, Moore I, Marchbank K, Kavanagh D, et al. Determining the population frequency of the CFHR3/CFHR1 deletion at 1q32. *PLoS One.* 2013 Apr 16;8:e60352, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060352>.
42. Józsi M, Richter H, Löschmann I, Skerka C, Buck F, Beisiegel U, et al. FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene. *Eur J Hum Genet.* 2005 Mar;13:321–9, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201324>.
43. Pouw RB, Brouwer MC, van Beek AE, Józsi M, Wouters D, Kuijpers TW. Complement Factor H-Related Protein 4A Is the Dominant Circulating Splice Variant of CFHR4. *Front Immunol.* 2018 Apr 17;9:729, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00729>.
44. Vernon KA, Goicoechea de Jorge E, Hall AE, Fremaux-Bacchi V, Aitman TJ, Cook HT, et al. Acute presentation and persistent glomerulonephritis following streptococcal infection in a patient with heterozygous complement factor H-related protein 5 deficiency. *Am J Kidney Dis.* 2012 Jul;60:121–5, <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.02.329>.
45. Zhu L, Guo WY, Shi SF, Liu LJ, Lv JC, Medjeral-Thomas NR, et al. Circulating complement factor H-related protein 5 levels contribute to development and progression of IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2018 Jul;94:150–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2018.02.023>.
46. Zhu L, Zhai YL, Wang FM, Hou P, Lv JC, Xu DM, et al. Variants in Complement Factor H and Complement Factor H-Related Protein Genes, CFHR3 and CFHR1 Affect Complement Activation in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2015 May;26:1195–204, <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2014010096>.
47. Guo WY, Sun LJ, Dong HR, Wang GQ, Xu XY, Zhao ZR, et al. Glomerular Complement Factor H-Related Protein 5 is Associated with Histologic Injury in Immunoglobulin A Nephropathy. *Kidney Int Rep.* 2020 Nov 21;6:404–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ekir.2020.11.019>.
48. Gómez Delgado I, Corvillo F, Nozal P, Arjona E, Madrid Á, Melgosa M, et al. Complement Genetic Variants and FH Desialylation in *S. pneumoniae*-Haemolytic Uraemic Syndrome. *Front Immunol.* 2021 Mar 11;12:641656, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.641656>.
49. Kemper C, Pangburn MK, Fishelson Z. Complement nomenclature 2014. *Mol Immunol.* 2014 Oct;61:56–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.07.004>.
50. Bohlson SS, Garred P, Kemper C, Tenner AJ. Complement Nomenclature-Deconvoluted. *Front Immunol.* 2019 Jun 7;10:1308, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01308>.