

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS DOCTORAL

**Caracterización funcional y estructural de la proteína Factor
H-related B (FHR-B) del sistema del complemento del ratón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Adrián Martín-Ambrosio Doménech

Director

Santiago Rodríguez de Córdoba

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Caracterización funcional y
estructural de la proteína Factor
H-related B (FHR-B) del sistema
del complemento del ratón.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Adrián Martín-Ambrosio Doménech

DIRECTOR

Santiago Rodríguez de Córdoba

TESIS DOCTORAL

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO DE
BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA (D9BM)

**Caracterización funcional y
estructural de la proteína
Factor H-Related B (FHR-B)
del sistema del complemento
del ratón.**

TRABAJO REALIZADO POR

Adrián Martín-Ambrosio Doménech

DIRIGIDO POR

Santiago Rodríguez de Córdoba

MADRID, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSES DE MADRID

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



*“I cannot forecast to you the action of [it].
It is a riddle, wrapped in a mystery, inside an enigma.
but perhaps there is a key.”*

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	15
2. RESUMEN/ABSTRACT	19
3. INTRODUCCIÓN.....	25
3.1 El sistema del complemento.	27
3.1.1 Vías de activación del sistema del complemento:	27
3.1.2 Vía terminal:	29
3.1.3 Activación del complemento en el ratón:	30
3.2 Reguladores del complemento.	33
3.2.1 Reguladores de la vía clásica, vía de las lectinas y vía terminal:	33
3.2.2 Reguladores de la vía alternativa:.....	33
3.2 El FH del complemento y la familia de FH.	35
3.2.1 Función de FH:	36
3.2.2 Secuestro de FH como mecanismo de evasión:.....	37
3.2.3 Importancia de FH en superficies sin reguladores de membrana:.....	37
3.2.4 Asociación de FH con patologías:	38
3.3 Proteínas relacionadas con FH.....	39
3.3.1 Funciones de las proteínas FHR:	41
3.3.2 Asociación de las proteínas FHR con patología:.....	42
3.3.3 Papel de FHR-1 y los mutantes de FHR-1 en aHUS y C3G:	46
3.3.4 Importancia de las proteínas FHR en superficies sin reguladores de membrana:	48
3.3.5 El papel de las proteínas FHR en la defensa contra infecciones:	49
3.3.6 Las proteínas FHR en el ratón:	50
3.4 Modelos animales.....	53
3.5 Objetivo general	56
4. OBJETIVOS	58
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
5.1 Desarrollo de anticuerpos contra las proteínas de la familia de FH	64
5.1.1 Antisuero policlonal contra FH de ratón:	64
5.1.2 Antisuero policlonal contra FHR-B de ratón:.....	66
5.2 Identificación de FHR en plasma de ratón.....	67
5.3 Diseño y clonaje de las construcciones recombinantes de FHR.....	68

5.3.1 Construcción híbrida con el N-terminal de FHR-1 humano y C-terminal de FH de ratón:	68
5.3.2 Construcciones híbridas con el N-terminal de FHR-1 humano y C-terminal de los CFHR de ratón:	70
5.3.3 Construcción completa del FHR-B de ratón:	71
5.3.4 Mutante monomérico de la construcción híbrida con el N-terminal de FHR-1 humano y el C-terminal de FHR-B de ratón:	73
5.3.5 Construcción híbrida con el N-terminal de FHR-1 humano y el FHR-B de ratón completo:	74
5.3.6 Construcción híbrida con el N-terminal de FHR-1 humano y el N-terminal de FHR-B de ratón:	75
5.3.7 Construcción híbrida con el N-terminal de FHR-B de ratón y el C-terminal de FHR-1 humano:	76
5.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	77
5.4.1 Expresión de las proteínas recombinantes en células de mamífero:	77
5.4.2 Purificación de las proteínas recombinantes:	78
5.5 Purificación de C3 y C3b de ratón	80
5.6 Ensayos hemolíticos.....	80
5.7 Ultracentrifugación analítica (AUC).....	81
5.8 Ensayos de unión y competición por ELISA	81
5.9 Ensayos de inmunofluorescencia	82
5.10 Ensayos de actividad cofactora	84
5.11 Análisis por WB de las proteínas humanas con el anticuerpo anti-FHR-B	85
5.12 Análisis estadístico.....	85
5.13 Análisis filogenético.....	85
6. RESULTADOS	86
6.1 Detección de proteínas FHR presentes circulando en plasma en el ratón. .	88
6.2 Ensayos hemolíticos.....	90
6.2.1 Función de los dominios C-terminal de las proteínas FHR de ratón:...	90
6.2.2 Competición de la función de FH de las proteínas híbridas desreguladoras	93
6.2.3 Efecto de los diferentes dominios de FHR-B de ratón en la función desreguladora:	94

6.2.4 Función desreguladora de la proteína híbrida FHR-B dimérica, monomérica y la proteína completa:.....	95
6.2.5 Comparación funcional entre los dominios C-terminal de FHR-B de ratón y FHR-1:	96
6.3 Análisis estructural mediante Ultracentrifugación Analítica	98
6.3.1 Análisis de la proteína FHR-B de ratón:	98
6.3.2 Análisis del dominio N-terminal de la proteína FHR-B de ratón:	100
6.4 Ensayos de unión por ELISA.....	102
6.4.1 Unión de los dominios C-terminal de las proteínas FHR de ratón a C3/C3b de ratón:.....	102
6.4.2 Unión de los diferentes dominios de FHR-B de ratón a C3/C3b de ratón:.....	103
6.4.3 Unión de los dominios C-terminal de FHR-B de ratón y FHR-1 humano a C3/C3b de ratón:	105
6.5 Ensayos de competición entre FH y FHR-B de ratón por la unión a C3b:	107
6.6 Experimentos de unión por inmunofluorescencia.....	109
6.6.1 Presencia de FHR-B endógeno en superficies con depósito de C3:....	109
6.6.2 Unión de los dominios C-terminal de las proteínas FHR de ratón a depósitos de C3:.....	110
6.6.3 Unión de la proteína FHR-B de ratón y sus distintos dominios a depósitos de C3 en presencia y ausencia de ácidos siálicos:	111
6.6.4 Activación de complemento mediada por FHR-B sobre glomérulos de ratón:	113
6.7 Ensayos de actividad cofactora	116
6.7.1 Actividad cofactora de FH en presencia de FHR-B de ratón:	117
6.8 Análisis por WB de las proteínas humanas con el anticuerpo anti FHR B	119
6.9 Análisis filogenético.....	119
7. DISCUSIÓN	122
7.1 Producción de reactivos específicos contras las proteínas FHR de ratón .	124
7.2 Detección de proteínas FHR presentes en plasma de ratón	125
7.3 Caracterización funcional y estructural de las proteínas FHR de ratón....	126
7.4 Homologías funcionales entre FHR-B de ratón y FHR-1 humano.....	134
7.5 Diferencias entre FHR-B de ratón y FHR-1 humano	135

8. CONCLUSIONES.....	138
9. BIBLIOGRAFÍA.....	140

1. ABREVIATURAS

Para muchos términos, se usan las siglas en inglés dado su uso extendido dentro del campo de la investigación del complemento.

aHUS	<i>Atypical Hemolytic Uremic Syndrome</i>
AKI	<i>Acute Kidney Injury</i>
AMD	<i>Age-Related Macular Degeneration</i>
ANCA	<i>Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody</i>
AUC	<i>Analytical Ultracentrifugation</i>
C1-INH	<i>C1-Inhibitor</i>
C3G	<i>C3 Glomerulopathy</i>
C3GN	<i>C3 Glomerulonephritis</i>
C4BP/C4bp	<i>C4b-Binding Protein</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CR1	<i>Complement Receptor type 1</i>
CR2/Cr2	<i>Complement Receptor type 2</i>
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>
Crry/p65	<i>CR1-Related Y protein</i>
DAA	<i>Decay Accelerating Activity</i>
DAF/Daf	<i>Decay-Accelerating Factor</i>
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DDD	<i>Dense Deposit Disease</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
f/f0	Coeficiente de fricción
FB	<i>Factor B</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FD	<i>Factor D</i>
FH	<i>Factor H</i>
FHL-1	<i>Factor H-like 1</i>
FHR	<i>Factor H-related</i>
FI	<i>Factor I</i>
GAGs	<i>Glycosaminoglycans</i>
GBM	<i>Glomerular Basement Membrane</i>
Gd-IgA1	<i>Galactose-Deficient IgA1</i>
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HBS	<i>HEPES-Buffered Saline</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HisTag	Etiqueta de polihistidina
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HRV3C	<i>Human Rhinovirus 3C protease</i>

HS	Heparán Sulfato
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IgAN	<i>IgA Nephropathy</i>
IL-1 β	Interleucina-1 β
LPS	Lipopolisacárido
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>
MAC-IP	<i>Membrane Attack Complex-Inhibitory Protein</i>
MASP-1/2	<i>Mannan-Binding Lectin Serine Protease-1/2</i>
MBL	<i>Mannan-Binding Lectin</i>
MCP/Mcp	<i>Membrane Cofactor Protein</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDA	Malondialdehido
MW	<i>Molecular Weight</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietilenglicol
PRM	<i>Pattern Recognition Molecules</i>
PTX3	Pentraxina 3
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RCA	<i>Regulators of Complement Activation</i>
RT	<i>Room Temperature</i>
SAMPs	<i>Self-Associated Molecular Patterns</i>
SCR	<i>Short Consensus Repeat</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SLE	<i>Systemic Lupus Erythematosus</i>
TED	<i>Thioester-containing Domain</i>
VA	Vía Alternativa
VBS	<i>Veronal-Buffered Saline</i>
VC	Vía Clásica
VL	Vía de las Lectinas
WB	<i>Western Blot</i>

2. RESUMEN/ABSTRACT

La existencia de proteínas relacionadas con el factor H (FHR) en el ratón se conoce desde hace algún tiempo, pero aún no está claro su equivalencia funcional, si la hay, con las FHR humanas. Este conocimiento es relevante para modelar en ratones enfermedades que implican a las FHR humanas. Combinando cromatografía de afinidad y estrategias proteómicas hemos confirmado la presencia en plasma de ratón de FHR-B, FHR-C y FHR-E. De acuerdo con datos previos, hemos visto que FHR-B compite con la regulación por el FH murino en ensayos de hemólisis con glóbulos rojos de cobaya, y que también lo hace en ensayos de hemólisis con eritrocitos de oveja, mientras que FHR-C y FHR-E no compiten en ambos. FHR-B se une a C3 nativo y a los fragmentos activados C3b, iC3b y C3dg. Análisis de ultracentrifugación analítica sugieren que FHR-B está parcialmente dimerizado. El sitio de unión de C3b en FHR-B está ubicado en la región C-terminal, mientras que el putativo dominio de dimerización de FHR-B probablemente involucra la región N-terminal. El estudio de la secuencia de aminoácidos sugiere que la proteína FHR-B de ratón presenta un dominio de ácido siálico en sus regiones C-terminales. Sin embargo, nuestros análisis indican que este sitio de unión de ácido siálico no es funcional. FHR-B se une fuertemente a los tejidos de ratón opsonizados con fragmentos activados de C3 donde promueve la activación del complemento y una mayor deposición de fragmentos activados de C3. Curiosamente, un anticuerpo policlonal para FHR-B generado en conejo reacciona de forma cruzada con FH, FHL-1 y FHR-1 humanos, pero no con otros FHR humanos. En conjunto, nuestros datos ilustran que la proteína FHR-B de ratón comparte importantes similitudes estructurales y funcionales con la proteína FHR-1 humana. Nuestros datos abren la posibilidad de que mutantes de FHR-B que mimeticen las características de los mutantes de FHR-1 asociados a patología tengan similares consecuencias patológicas en ratón.

The existence of factor H-related proteins (FHRs) in mouse is known for some time, but it is still unclear their functional equivalence, if any, with the human FHRs. This knowledge is relevant to model in mice diseases implicating the human FHRs. By combining affinity chromatography and proteomic strategies we confirm the presence in mouse plasma of FHR-B, FHR-C and FHR-E. In agreement with previous data FHR-B competes mouse FH regulation in guinea pig red cell hemolysis assays, but also in the sheep hemolysis assay, while FHR-C and FHR-E do not compete in both. FHR-B binds native C3 and the activated fragments C3b, iC3b and C3dg and ultracentrifugation analyses suggest that FHR-B circulates partially as a dimer. The C3b-binding site in FHR-B is located in the C-terminal region, whereas the putative FHR-B dimerization domain likely involves the N-terminal region. Amino acid sequence examinations suggest that mouse FHR-B present a sialic acid domain in their C-terminal regions. However, our analyses indicate that this sialic acid binding sites is not functional. Recombinant FHR-B strongly binds to mouse C3-opsonized tissues where promotes complement activation and further deposition of C3 activated fragments. Interestingly, a polyclonal antibody to FHR-B raised in rabbit cross-react with human FH, FHL-1 and FHR-1, but not with other human FHRs. In whole, our data illustrates that mouse FHR-B share important structural and functional similarities with the human FHR-1 protein. Our data open the possibility that FHR-B mutants that mimic the characteristics of disease-associated FHR-1 mutants have similar pathological consequences in mice.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 El sistema del complemento.

El sistema del complemento se identificó por primera vez como la fracción termolábil del plasma humano que “complementaba” a los anticuerpos en el reconocimiento y lisis de bacterias. Aunque inicialmente sólo se le consideraba un elemento de apoyo para la efectividad de las inmunoglobulinas, hoy en día se reconoce ampliamente que el sistema del complemento es un componente crucial de la respuesta inmunitaria innata, jugando un papel decisivo como la primera barrera de defensa contra infecciones, así como participando en otros procesos biológicos como la eliminación de células apoptóticas y necróticas, el procesamiento de inmunocomplejos, la modulación de la inmunidad adaptativa o en los procesos de angiogénesis y poda sináptica durante el desarrollo embrionario (Ricklin, *et al*, 2016; Walport, 2001; Stevens *et al*, 2007). El papel crucial del sistema del complemento se ve reforzado dada la variedad de situaciones patológicas asociadas a la deficiencia o mal funcionamiento de este. Las observaciones clínicas, los resultados de los estudios GWAS y los conocimientos obtenidos de los modelos animales de enfermedad mejorados han renovado el interés por el sistema del complemento. Ahora se asume que el sistema del complemento contribuye a una lista cada vez mayor de enfermedades inmunitarias, inflamatorias y relacionadas con la edad, donde los trastornos renales ocupan un lugar especialmente importante (Harris *et al*, 2012; Goicoechea de Jorge *et al*, 2018; Ricklin & Lambris, 2013; Sánchez-Corral *et al*, 2018). El sistema del complemento está constituido por más de 50 proteínas presentes en el plasma y en las superficies celulares. La mayoría de las proteínas circulantes se producen en el hígado, aunque también hay biosíntesis de proteínas del complemento extrahepática en muchos otros tejidos y células como fibroblastos, linfocitos T y B, adipocitos y células endoteliales (Morgan & Gasque, 1997). Tras la activación del complemento, se producen reordenamientos estructurales, cortes proteolíticos y el ensamblaje de complejos proteolíticos y líticos. De este modo, el complemento puede estar presente de manera ubicua en una forma inactiva pero lista para activarse localmente rápidamente (Bajic *et al*, 2015). Las proteínas del complemento se organizan en tres vías de activación del sistema: la vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa.

3.1.1 Vías de activación del sistema del complemento:

Tanto la vía clásica como la vía de las lectinas se inician cuando moléculas de reconocimiento de patrones (PRM), que forman complejos con zimógenos de serín proteasas, se unen a su ligando. En la vía clásica (VC), que es la primera vía

que se descubrió, la molécula activadora es un complejo antígeno-anticuerpo y las proteínas implicadas son el complejo C1 (formado por C1q, C1s y C1r), C4 y C2. La unión de los dominios globulares de C1q con la porción Fc de las inmunoglobulinas del complejo antígeno-anticuerpo o con CRP, SAP o PTX3 inician una serie de cambios conformacionales y enzimáticos dentro del complejo. Estos cambios van a permitir la activación de C1s, que hidroliza C4 en C4a y C4b, y C2 en C2a y C2b, dando lugar a la formación del complejo C4b2b o convertasa de C3 de la CP sobre la superficie activadora. Este complejo corta C3 a C3a y C3b. Tanto C3a como C4a son anafilotoxinas proinflamatorias que facilitan la llegada de anticuerpos y células inmunitarias al sitio en el que se ha activado el complemento. Por otro lado, la unión del fragmento C3b en la convertasa de C3 origina el complejo C4b2b3b o convertasa de C5. Este complejo genera moléculas de C5b que participan en la vía lítica o terminal del sistema del complemento (Arlaud *et al*, 2002; Arlaud *et al*, 2002).

En la vía de las lectinas (VL) las moléculas activadoras son residuos de manosa presentes en la superficie de algunos microorganismos. El inicio de la vía ocurre por unos complejos homólogos a C1 que contienen lectinas de unión a manosa (MBL) o reconocen PRM de patógenos (ficolinas y colectinas), que activan las serín proteasas MASP-1 y MASP-2, lo que da lugar a la formación de convertasas de C3 y C5 idénticas a las de la CP y que van a desembocar en la vía terminal del complemento (Fujita, Matsushita and Endo, 2004).

En la vía alternativa (VA) la proteína central es C3 y comienza con la activación espontánea de esta molécula. En este proceso C3 sufre un cambio conformacional en el que expone un enlace tioéster capaz de interactuar con una molécula de H₂O dando lugar a C3(H₂O) (Bexborn *et al*, 2008). Este fenómeno, que se conoce como *tick-over*, genera una activación basal constante de esta vía que permanece “al ralenti” hasta que aparece un estímulo activador que empuja el equilibrio del sistema hacia la activación, permitiendo que la respuesta sea más rápida. La proteína C3(H₂O) generada en este proceso es estructuralmente similar a C3b y contiene un sitio de unión a factor B (FB). Cuando FB se une, factor D (FD) corta FB en los fragmentos Ba y Bb. El fragmento Ba se libera al medio mientras que el fragmento Bb permanece unido a C3(H₂O) proporcionando el elemento serín proteasa al complejo y constituyendo así la convertasa de C3 C3(H₂O)bBb. Esta convertasa une C3 generando C3a y C3b, que a su vez va a formar parte de nuevas convertasas de C3 (C3bBb), lo que genera un bucle de amplificación que puede resultar en una activación rápida y abundante si el sistema no es debidamente controlado. De hecho, se considera que este bucle de amplificación supone hasta el 80% de la activación total del complemento (Harboe *et al*, 2004). Estas convertasas de C3 de la VA pueden unirse a superficies de manera covalente donde puede activar más C3, depositando más convertasas sobre esa superficie.

El evento central en el ensamblaje y la regulación de la convertasa de C3 de la VA es la activación de C3 a C3b. Este proceso se caracteriza por un dramático cambio conformacional en el que el dominio que contiene el tioéster (TED) en el C3 se reubica en una posición distante cerca del dominio MG-1, abriendo la estructura del C3 y exponiendo una extensa superficie molecular inaccesible hasta este momento (Janssen *et al*, 2006; Gros *et al*, 2008). Este cambio conformacional, que en el C3 se desencadena o por el *tick-over* o por la escisión proteolítica del dominio α'NT también es compartido por las proteínas homólogas C4 y C5. Al comienzo de la investigación estructural del complemento, quedó claro que era precisamente este reordenamiento en la molécula C3 el responsable de generar una nueva superficie, exponiendo el sitio de unión del FB (Goicoechea de Jorge *et al*, 2017).

El ensamblaje de la convertasa de C3 de la VA, C3bBb, se inicia por la interacción dependiente de Mg²⁺ entre C3b (o la molécula similar a C3b, C3(H₂O)) y FB, que circula como una proenzima inactiva en el plasma. Esta interacción implica tanto el fragmento N-terminal Ba como el C-terminal Bb de FB e induce un cambio conformacional a un estado abierto de FB que puede a su vez ser reconocido por la forma proenzimática inactiva de la proteasa FD. En particular, esta interacción activa el FD a través de la liberación de su bucle auto-inhibitorio y procede entonces a escindir el FB. Tras la proteólisis específica de FB, el fragmento Ba se libera del complejo y se forma C3bBb, la convertasa de C3 activa (Forneris *et al*, 2010). La convertasa C3bBb es un complejo molecular inestable con una vida media corta, medida en aproximadamente 90 segundos (Pangburn & Müller-Eberhard, 1986). La baja afinidad del fragmento Bb por el C3b asegura que el ensamblaje de la convertasa es reversible. Posteriormente, se demostró que la nueva superficie expuesta durante la activación del C3 y la generación de la molécula C3b es también el sitio donde se unen los reguladores del complemento a C3b para controlar el *decay* de la convertasa de C3 y para mediar la inactivación proteolítica del C3b.

La unión de una segunda molécula de C3b a la convertasa de C3 de la VA en un contexto de alto depósito de C3b genera un cambio en la afinidad de la convertasa, pasando C5 a ser su ligando preferente. La convertasa de C5 de la VA (C3bBb3b) participa en la vía terminal del sistema del complemento (Lachman, 2009; Harris *et al*, 2012).

3.1.2 Vía terminal:

Como hemos explicado, la activación por cualquiera de las tres vías va a desembocar en una vía terminal común a través de la formación de la convertasa de C5, ya sea C4b2b3b (CP y VL) o C3bBb3b (VA). Estas convertasas cortan C5

generando C5a y C5b. C5a es una potente anafilatoxina proinflamatoria que se une a los receptores de anafilatoxinas C5aR y C5L2 de gran variedad de células y que participa en procesos como la permeabilidad vascular, liberación de histamina y especies reactivas de oxígeno, adhesión al endotelio y quimioatracción de macrófagos, mastocitos y neutrófilos. Por su parte, C5b se mantiene unido a la convertasa de C5, lo que estabiliza un sitio de unión a C6 que se genera en C5b por la reorganización de sus dominios, comenzando con ello el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana (MAC). Durante la formación del MAC no tienen lugar cortes proteolíticos, sino que los distintos componentes del complemento se van uniendo de forma secuencial. Después de la unión de C6 a C5b se unen C7, C8 y C9. La proteína C9 polimeriza formando un poro en la membrana constituyendo así el MAC C5b-9 completo que, una vez formado, puede producir la lisis celular (Laursen *et al*, 2012).

En la **figura 1** se representa un esquema de las tres vías de activación del sistema del complemento.

3.1.3 Activación del complemento en el ratón:

Aunque lo anteriormente descrito se refiere a la activación del sistema del complemento en humanos, aplica también para el funcionamiento del sistema del complemento en el ratón ya que este sistema está evolutivamente muy conservado entre mamíferos (Mayilian *et al*, 2008). En ratones el complemento también se activa por las tres vías descritas a través de las mismas proteínas homólogas en el ratón. Aunque existen diferencias entre especies, estas se refieren sobre todo a los reguladores del sistema y serán descritas más adelante. Con respecto a las diferencias en la activación, hay que destacar la deficiencia de C5 de algunas líneas de ratón (no en C57BL/6) y una menor activación de la convertasa de C5 de la CP por una unión más débil del C4b a C5; sin embargo, en el ratón la VA también supone un 80% de la activación total del complemento (Banda *et al*, 2010; Pouw *et al*, 2015). En ratón, se observan diferencias entre géneros que no se observan en humanos. Los ratones hembra tienen una funcionalidad normal al nivel de la activación de C3. Sin embargo, todas las vías están altamente disminuidas al nivel de la activación de C5, lo que sugiere una diferencia específica de la vía terminal. Esto concuerda con las cuantificaciones de C6 y C9, que muestran niveles muy reducidos en las hembras (Kotimaa *et al*, 2016).

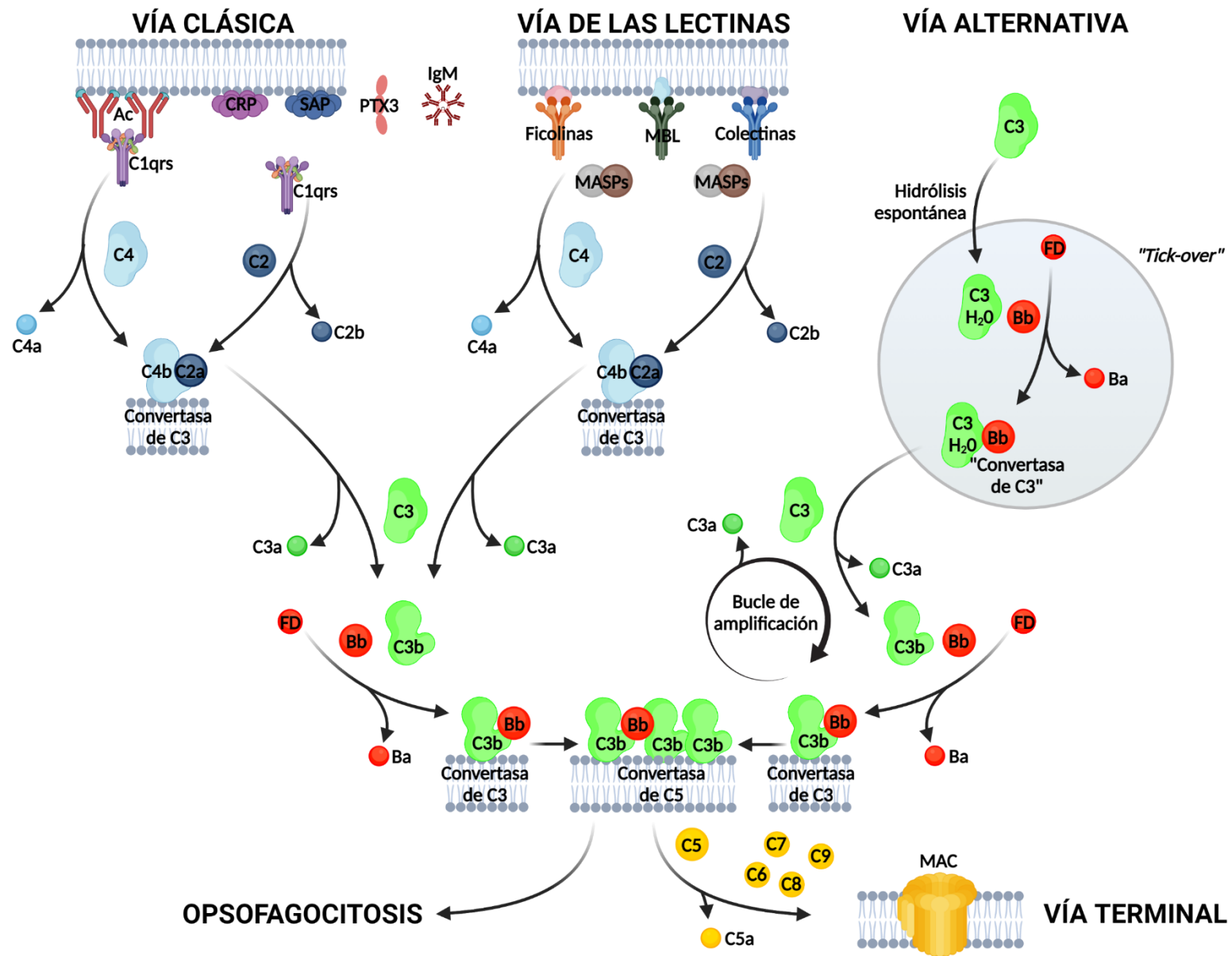


Figura 1. Esquema de la activación del sistema del complemento a través de las tres vías (vía clásica, vía de las lectinas y vía alternativa) y el destino de la activación a opsofagocitosis o lisis por la vía terminal.

3.2 Reguladores del complemento.

Como hemos explicado previamente, la activación del sistema del complemento, al depender en gran medida del bucle de amplificación de la VA, tiene una naturaleza “explosiva” que garantiza una respuesta rápida y abundante. Es por esto que el sistema debe estar debidamente regulado ya que una activación descontrolada del sistema podría resultar peligrosa para los tejidos del organismo, generando situaciones patológicas. Los reguladores de este sistema juegan un papel crucial en la protección de las células del individuo contra el complemento, ya que permiten discriminar las superficies propias de las extrañas, garantizando la efectividad de la activación contra agentes extraños y protegiendo a las células del huésped. Por otro lado, permite el mantenimiento de la homeostasis del sistema, de tal forma que tras una activación se evite el consumo total de sus componentes. En la actualidad, se está prestando mayor atención a comprender la regulación de las diferentes vías, especialmente la VA, que es la principal vía por la que el sistema daña células y tejidos.

3.2.1 Reguladores de la vía clásica, vía de las lectinas y vía terminal:

En el sistema existen gran cantidad de proteínas reguladoras que actúan a distintos niveles sobre las tres vías de activación y que están distribuidas tanto en plasma como en las superficies celulares. Por ejemplo, la proteína inhibidora de C1 (C1-INH) es una proteína plasmática que inhibe al comienzo de la VC y de VL inactivando C1s y C1r, y MASP-1 y MASP-2; otras proteínas plasmáticas como vitronectina, clusterina o la proteína de membrana CD59 (MAC-IP), actúan sobre el paso final de la activación inhibiendo la formación del MAC sobre las superficies celulares. Por otro lado, las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a son controladas por las carboxipeptidasas plasmáticas (Noris & Remuzzi, 2013; Zipfel & Skerka, 2009).

3.2.2 Reguladores de la vía alternativa:

Entre medias, otras proteínas controlan otros pasos de la cascada de activación, aunque sin duda el punto sobre el que se ejerce más control es la formación de la convertasa de C3 y su bucle de amplificación. La regulación de la

convertasa de C3 de la VA está diseñada o bien para proporcionar una mayor estabilidad al complejo C3bBb aumentando así su actividad (reguladores positivos), o bien para acelerar su *decay* y reducir su actividad (reguladores negativos). Dentro de los reguladores positivos fisiológicos de la convertasa de C3, properdina es el único que se ha caracterizado con precisión (Chen *et al*, 2018).

La mayoría de los reguladores negativos se encuentran en el clúster de genes RCA (*Regulators of Complement Activation*) tanto en humanos como en ratón, localizado en el cromosoma 1 en ambas especies. En el ser humano, el RCA está dividido en dos regiones: la primera codifica los genes de factor H (FH) y de las proteínas relacionadas con FH (FHR) y la segunda contiene los genes de la proteína de unión a C4 (C4BP), el factor acelerador del *decay* (DAF), el receptor de complemento 1 (CR1), el receptor de complemento 2 (CR2) y de la proteína cofactora de membrana (MCP).

En el ratón, el RCA está formado por tres regiones: la primera codifica los genes de FH y las proteínas FHR, la segunda contiene los genes de C4bp, Daf1, Daf2, y la última región codifica los genes de la proteína Y relacionada con CR1 (Crry/p65), Cr2 y Mcp (esta última expresada solamente en testículos). Esto nos da una idea de la homología que existe en esta región entre ambas especies (Pouw *et al*, 2015).

En ambas especies, todas las proteínas codificadas en el RCA muestran una estructura similar. Están formadas por unos dominios de estructura globular conservada de unos 60 aminoácidos llamados SCR (*Short Consensus Repeats*) (Krych-Goldber & Atkinson, 2001; Reid & Day, 1989). Distintas funciones, tales como la actividad reguladora o la unión a superficies celulares o a proteínas del complemento, se corresponden a diferentes dominios SCR en cada regulador. Esta organización modular de las proteínas reguladoras del complemento es muy importante a la hora de su estudio, ya que aporta el marco idóneo para el diseño de proteínas recombinantes híbridas usando dominios SCR de distintas proteínas.

Tanto la formación de la convertasa como su amplificación están reguladas por estas proteínas del RCA. El contexto del conjunto de reguladores presentes en el lugar de la activación será lo que determine el progreso de la amplificación de la convertasa. Las proteínas del RCA regulan las convertasas mediante dos mecanismos: bien acelerando el *decay* de la convertasa o mediante la competición con FB por unirse a los mismos residuos de C3b o uniéndose directamente a él (Lambris *et al*, 1996; Oran & Isenman, 1999); o bien actuando como cofactores de la serín proteasa factor I (FI) induciendo un cambio conformacional en el C3b que permite su proteólisis por el FI en distintos sitios (Blom *et al*, 2003).

Los estudios estructurales han demostrado que la actividad de los reguladores negativos FH, DAF, MCP o CR1 implica la interacción con una superficie en el C3b que se solapa con la superficie que media la interacción con FB. En cambio,

la actividad de la properdina, que estabiliza el complejo C3bBb, requiere su interacción con una región diferente de C3b, que implica el dominio C345C (Alcorlo *et al*, 2013; Pedersen *et al*, 2017) . La estructura cristalina del C3b en complejo con los cuatro primeros dominios (SCR1-4) del FH proporcionó la base molecular para comprender los mecanismos reguladores: la actividad cofactora, la actividad aceleradora de *decay* (DAA) y la competición con FB, mediante los cuales los reguladores del complemento reducen la activación del complemento y protegen las células propias (Wu *et al*, 2009).

3.2 El FH del complemento y la familia de FH.

Uno de los reguladores más importantes y mejor caracterizados por su asociación con patología es el FH. Tanto en humanos como en ratón, FH se encuentra circulando libre en plasma, a una concentración de entre 76 y 247 $\mu\text{g/ml}$ en humanos. Mediciones propias de niveles en suero de ratones C57BL/6 *wild-type* arrojan una concentración de $126 \pm 20 \mu\text{g/ml}$. En ambas especies, FH es una glicoproteína soluble de cadena simple con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa sin glicosilaciones. Su función como regulador de la convertasa de C3 está muy conservada entre especies y lo hace de la siguiente manera: actuando como cofactor de FI en la inactivación proteolítica de C3b, compitiendo con factor B por la unión a C3b y acelerando el *decay* de la convertasa (Martin Merinero *et al*, 2017; Pangburn *et al*, 1977; Weiler *et al*, 1976; Whaley y Ruddy, 1976). Como hemos indicado, FH es una proteína glicosilada, aunque esta glicosilación no afecta a la función de la proteína, sino que parece que juega un papel en la solubilidad y en la vida media de la proteína en circulación *in vivo* (Schmidt *et al*, 2008; Schmidt *et al*, 2011).

Tanto en ratones como en humanos, el FH está formado por 20 dominios SCR. Una diferencia entre especies es la existencia en humanos de una variante de *splicing* circulante en plasma, denominada FHL-1 y que consiste en los 7 primeros dominios SCR de FH (Ripoche *et al*, 1988). Las proteínas en ambas especies son homólogas y muestran una identidad de secuencia a nivel de aminoácido elevada, del 63%, mientras que entre dominios individuales la identidad puede alcanzar el 78% (Vik *et al*, 1988).

3.2.1 Función de FH:

La función de FH en ambas especies está conservada ya que se ha demostrado que el FH humano puede regular el complemento en ratón (Ding *et al*, 2015; Fakhouri, 2010). Además, sus regiones reguladoras y de unión a polianiones se han mapeado hasta los mismos dominios (Cheng *et al*, 2006). El extremo N-terminal (SCR1-4) es el único sitio de interacción con C3b con actividad reguladora en la molécula, actuando como cofactor de FI y acelerando la disociación de la convertasa (Sharma and Pangburn, 1996). La región de reconocimiento de superficies en el extremo C-terminal (SCR19-20) de la molécula es de gran importancia. A través del SCR19 FH une C3b unido a superficies, pero es el SCR20 el que confiere especificidad a la proteína al unirse a los azúcares específicos de las células propias (Meri & Pangburn, 1990). Esto se consigue mediante un bolsillo de unión a ácidos siálicos en el SCR20 de la proteína cuyos residuos clave en la interacción con el azúcar están conservados entre ambas especies (Blaum *et al*, 2015). Es principalmente a través de este dominio que FH reconoce residuos polianiónicos que conforman SAMPs (*self-associated molecular patterns*), como glicosaminoglicanos (GAGs), heparán sulfato (HS) y residuos de ácidos siálicos de glucoproteínas. Es de esta manera que FH distingue las células propias de las extrañas, ya que su afinidad por C3b unido a membranas aumenta en presencia de estos ligandos y permite la unión.

Estos SAMPs se encuentran de forma ubicua como parte de las estructuras del glicocálix en los tejidos de los mamíferos. Las variaciones en la composición y distribución de los SAMPs, por los que el FH muestra diferentes afinidades, contribuyen a restringir la activación del complemento a sitios concretos, protegiendo otros lugares del daño por complemento (Langford-Smith *et al*, 2015; Varki, 2011; Clark *et al*, 2013).

En cuanto al mecanismo de unión a C3b, los datos sugieren que FH adopta una conformación tipo bisagra doblándose por el centro de la molécula. Esta forma se ve facilitada por la disposición compacta de los dominios centrales SCR10-15 que acercan las regiones N- y C-terminal y les permiten interactuar con sitios distintos sobre la misma molécula de C3b. La estructura propuesta de flexión de FH también facilitaría la interacción simultánea de FH con glicanos adicionales a través de los SCR6-8, aumentando la capacidad de FH para discriminar entre superficies activadoras del complemento (Makou *et al*, 2013; Kopp *et al*, 2012). La estructura cristalina de los complejos C3d-FH19-20 ha revelado que la interacción del FH19-20 con el C3d implica principalmente al SCR19, mientras que el SCR20 puede contribuir con un punto de anclaje adicional a una molécula secundaria de C3b (Kajander *et al*, 2011). Lo más importante es que el sitio en el dominio TED del C3b reconocido por el FH19-20 es diferente del reconocido por la región

FH1-4, lo que apoya aún más la posibilidad de que tanto la región N-terminal como la C-terminal del FH se unan simultáneamente a la misma molécula de C3b.

Por último, se ha demostrado que *in vivo* el reconocimiento de superficies por FH a través del dominio C-terminal ocurre a través de mecanismos similares en ratón y humanos, ya que mutaciones en estas regiones desencadenan patologías similares (Pickering *et al*, 2007).

3.2.2 Secuestro de FH como mecanismo de evasión:

Los patógenos han desarrollado una amplia gama de mecanismos de evasión para escapar del ataque del complemento, y algunos de estos mecanismos se asemejan a la forma en que los componentes del complemento interactúan en superficies propias. Curiosamente, los imitadores microbianos de los reguladores del complemento como el homólogo del virus de la viruela (SPICE) y el homólogo RCA del herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (Kaposica) se unen en la misma orientación y disposición extendida que los reguladores en la plataforma de unión del C3b (Forneris *et al*, 2016; Gautam *et al*, 2015). Más adelante, se explica con más detalle el secuestro de FH por parte de patógenos como mecanismo de evasión y el papel de las proteínas de la familia de FH en la defensa contra ellos.

3.2.3 Importancia de FH en superficies sin reguladores de membrana:

Como hemos visto, aunque FH es un regulador plasmático, tiene mecanismos en su extremo C-terminal para unirse y regular en superficies. Normalmente este mecanismo refuerza la regulación por los reguladores de membrana, sin embargo, es especialmente relevante en la protección de superficies no celulares que carecen de otros reguladores, como las membranas basales ricas en proteoglicanos en los endotelios fenestrados. La membrana de Bruch que separa el epitelio retinal pigmentario del coriocapilar, o la membrana basal glomerular del riñón son capas de matriz extracelular sin reguladores de complemento que están en contacto directo con la sangre (Langford-Smith *et al*, 2013). Patologías producidas por desregulación del complemento como glomerulopatías de C3 (C3G), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) o degeneración macular asociada a la edad (AMD) generan daños sobre estas superficies y en humanos se

asocian a mutaciones o polimorfismos del gen de FH (Clark *et al*, 2017; Borza, 2017; Geerlings *et al*, 2018).

3.2.4 Asociación de FH con patologías:

En los últimos 20 años, los análisis genéticos en pacientes con aHUS y C3G han demostrado que las mutaciones en FH son la alteración genética más común asociada a estos trastornos. Existe una correlación genotipo-fenotipo que asocia determinadas mutaciones en FH con aHUS o C3G (Rodríguez de Córdoba, 2016). Esta correlación genotipo-fenotipo explica por qué el gen de FH está asociado tanto a aHUS como a C3G.

En aHUS, entre un 50 y un 70% de los paciente presentan anomalías heredadas o adquiridas en el complemento. Las mutaciones en el gen de FH son prototípicas de aHUS (>25% de pacientes), siendo las más frecuentes las mutaciones *missense* que alteran el sitio de unión a C3b y a polianiones en el C-terminal de FH. Estas variantes de FH asociadas a aHUS rara vez dan lugar a una reducción de los niveles plasmáticos de FH y presentan una actividad reguladora normal en plasma, pero una capacidad limitada para proteger superficies celulares de la lisis del complemento (Sánchez-Corral *et al*, 2002). Otras mutaciones en aHUS, como en los genes de MCP, CFI, C3 o FB o los autoanticuerpos también afectan a la protección en superficies manteniendo la homeostasis en plasma, lo que explica la patogénesis de aHUS (Goicoechea de Jorge *et al*, 2018).

En contraste con aHUS, las mutaciones prototípicas asociadas a C3G dan lugar a deficiencias de FH o a sustituciones de aminoácidos que eliminan las actividades reguladoras del complemento localizadas en el N-terminal de FH. Estas mutaciones asociadas a C3G conducen a una activación sin límites del complemento en el plasma, provocando depósito de complemento en la membrana basal glomerular y daños en las células glomerulares (Dragon-Durey *et al*, 2004; Fremeaux-Bacchi & Licht, 2009).

La mayoría de las mutaciones y polimorfismos en genes del complemento que se asocian con patología tienen una penetrancia incompleta. Ser portador de estas mutaciones supone un factor de riesgo que, sumado a determinados factores ambientales como infecciones, embarazo, medicamentos o cirugía, puede resultar en el desencadenamiento de la enfermedad (Ito *et al*, 2016; Recalde *et al*, 2015; Rodríguez de Córdoba, 2016; Heinen *et al*, 2006; Valoti *et al*, 2015). Por ejemplo, la penetrancia de aHUS está relacionada con la edad, y a los 70 años aumenta hasta llegar a ser del 64% (Sansbury *et al*, 2014), una observación que apoya la existencia de factores adicionales en el desencadenamiento de la patología. Un

pequeño porcentaje (3%-5%) de pacientes son portadores de más de una variante genética patogénica, lo que apoya una relación entre la carga de factores de riesgo y la penetrancia (Bresin *et al*, 2013). La aparición de la enfermedad en edades avanzadas es consistente con la necesidad de un desencadenante ambiental (Goodship *et al*, 2017).

3.3 Proteínas relacionadas con FH

A lo largo de la evolución, en la región del clúster RCA han surgido varios genes homólogos a FH a través de eventos de recombinación y duplicación: los genes de las proteínas FHR. Al igual que FH, estas proteínas están formadas por dominios SCR. Cuando se descubrieron, al ser homólogas de FH, se pensaba que eran reguladores débiles del complemento (Zipfel & Skerka, 1994). En humanos se han descrito cinco genes y seis proteínas, que se nombran desde FHR-1 hasta FHR-5 (FHR-4 tiene dos variantes de *splicing*). Su longitud en cuanto a número de SCR varía, desde cuatro hasta nueve. A nivel de aminoácidos, los FHR humanos muestran unos niveles de identidad de secuencia con dominios SCR de FH que van desde el 32% hasta el 100%. Al igual que FH, los FHR también son glicoproteínas que presentan distintos patrones de glicosilación en función de la glicoisofoma. Por ejemplo, FHR-1 aparece como dos bandas de distinto MW en un gel SDS-PAGE de la proteína purificada que corresponden a dos glicoisofomas.

Los FHR conservan los dominios de reconocimiento y unión a ligandos de superficie de FH, pero carecen de dominios homólogos a aquellos con función reguladora en el N-terminal de FH (**Figura 2**). Por ejemplo, los SCR18, 19 y 20 de FH están tan conservados en FHR-1 que solo se diferencian en dos residuos en el último SCR. Esto ha conducido a la hipótesis de que la función de estas proteínas FHR está relacionada con el reconocimiento de superficies, pero no actuando como reguladores, si no como competidores funcionales de FH, ya que unirían ligandos de superficie similares a los de FH. Sin embargo, cómo y dónde se da esta competición se desconoce. Se piensa que, en una situación normal, los FHR representan un conjunto de moléculas con la capacidad de unirse a superficies y que, mediante la competición con FH, aportan una mejor discriminación de las superficies propias y ajenas, jugando una importante labor en la correcta activación de la cascada de complemento (Józsi *et al*, 2015).

Hay que destacar la existencia en FHR-1, FHR-2 y FHR-5 de un dominio de dimerización compartido en la región N-terminal. Estas proteínas circulan siempre en plasma como homo y heterodímeros o tetrámeros. La oligomerización incrementa la avidéz de estas proteínas por sus ligandos. La composición de los oligómeros determina las características de unión de la molécula a sus ligandos.

Esto se observa, por ejemplo, en las características del perfil de elución de una columna de heparina (Goicoechea de Jorge *et al*, 2013; Tortajada *et al*, 2013). La capacidad de formar diferentes oligómeros entre FHR-1, FHR-2 y FHR-5 crea un repertorio combinatorio entre estas proteínas que probablemente proporciona al sistema un reconocimiento más fino de las superficies opsonizadas, según la composición y densidad de carbohidratos y la velocidad de depósito de C3.

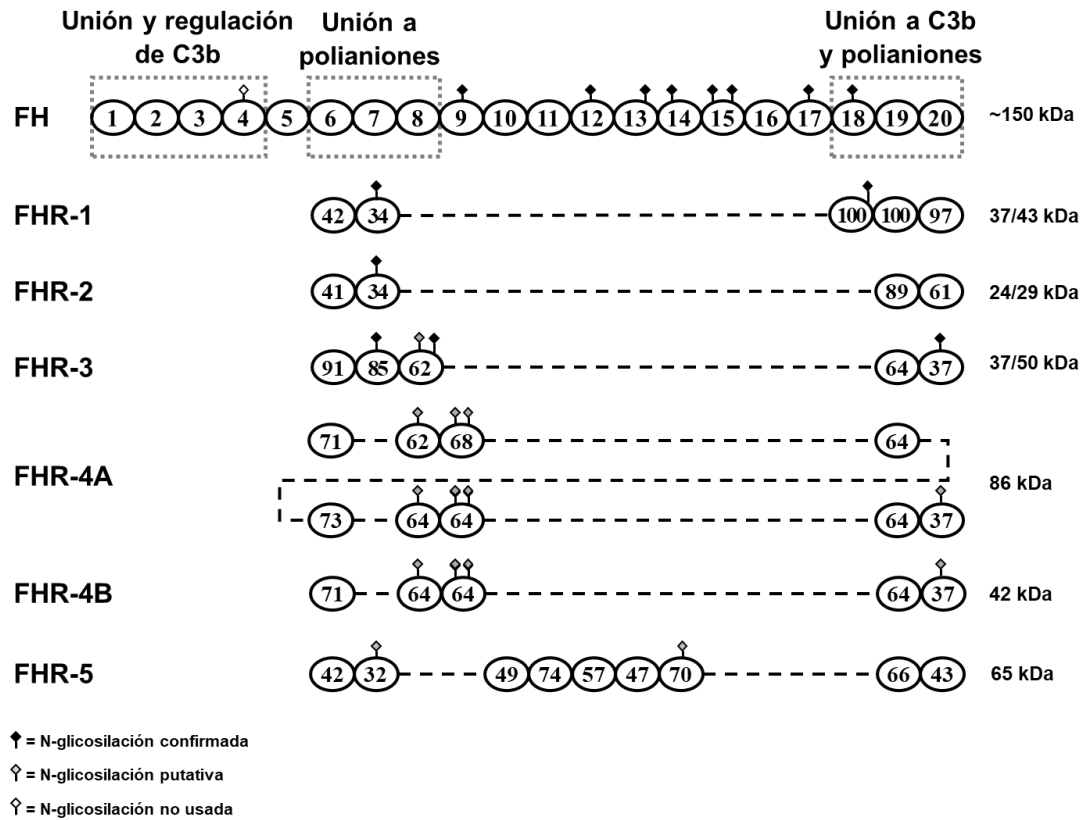


Figura 2. Alineamiento de las proteínas de la familia de FH humanas. Los SCR de FH están numerados. El número dentro de los dominios SCR de los FHR muestra el % de identidad de secuencia con el dominio correspondiente de FH. Sólo los dominios de reconocimiento de superficie de FH se conservan en los FHR. También se indica la localización de los sitios de N-glicosilación confirmados, putativos y no utilizados.

3.3.1 Funciones de las proteínas FHR:

La función de las proteínas FHR del sistema del complemento sigue siendo incierta. A lo largo de los años, se han descrito distintas actividades y funciones para cada uno de los FHR. Incluso a veces, se han descrito funciones a priori contradictorias para una misma proteína FHR. Es por eso por lo que para ellas aún no se ha definido un papel fisiológico concreto.

En cuanto a ligandos descritos de estas proteínas, se ha visto que pueden unirse a C3b y sus fragmentos iC3b y C3dg, así como a polianiones. Las heparinas se han identificado como ligando de FHR-1, FHR-2, FHR-3 y FHR-5. Tanto para FHR-4 como para FHR-5 se ha identificado unión a la proteína C reactiva CRP, siendo reclutados estos FHR a zonas de daño tisular (McRae *et al*, 2005; Mihlan *et al*, 2009).

También se ha visto que FHR-1 se encuentra junto con FHR-2 y FHR-4 en partículas plasmáticas que contienen fosfolípidos, apolipoproteína A1, fibrinógeno y proteína de unión al VLS (Park & Wright, 1996; Park & Wright, 2000).

FHR-3, FHR-4 y FHR-5 muestran una débil actividad cofactora de FI a concentraciones altas fuera del rango fisiológico, pero FHR-3 y FHR-4B aumentan la actividad cofactora de FH con FI en el corte de C3b de manera sinérgica (Hellwage *et al*, 1999; McRae *et al*, 2015; Hebecker & Józsi, 2012). FHR-5 se detecta en depósitos glomerulares de complemento (Medjeral-Thomas *et al*, 2019). En un estudio se mostró actividad inhibidora de la convertasa de C3 por parte de FHR-2 (Eberhardt *et al*, 2013). También se ha descrito que FHR-1 en ensayos *in vitro* puede unirse a la parte C3b de la convertasa de C5 e inhibir el corte de C5 a C5a y C5b, por lo tanto, inhibir el MAC, en ausencia de FH (Heinen *et al*, 2009). Además, una proteína híbrida artificial en la que los dominios reguladores del FH (SCR1-4) estaban unidos a los dominios N-terminal de FHR-1 (SCR1 y SCR2), inhibía la vía terminal, lo que se explicaba por la integración de los dominios de FHR-1 (Michelfelder *et al*, 2018). Asimismo, los experimentos *in vivo* confirman un papel de FHR-1 en la inhibición de la vía terminal: cuando se trasplantan células madre neurales transformadas con CFHR1-lentivirus en el parénquima cerebral de ratones con trastornos del espectro neuromielítico, se bloquea la deposición de C5b-9 y se limita la infiltración inflamatoria. *In vitro*, los experimentos muestran que el FHR-1 de las células madre protege a las propias células madre, así como a los astrocitos endógenos (Shi *et al*, 2016).

Ensayos hemolíticos han mostrado que tanto FHR-1 como FHR-5 contrarrestan la función de FH, lo que se ha atribuido normalmente a una competición por la interacción entre FH y C3b/iC3b (Goicoechea de Jorge *et al*, 2013). También se ha observado que FHR-3 también une C3b y también podría competir con FH por unirse a esta proteína (Fritsche *et al*, 2010). Por otro lado, se han demostrado

actividades como activador del complemento para FHR-1 y FHR-4, uniéndose a C3b y permitiendo el ensamblaje de una convertasa de C3 activa (Hebecker & Józsi, 2012; Csincsi *et al*, 2017). FHR-5 puede competir con FH por unirse a CRP, PTX3 y ECM, resultando en aumento de la activación del complemento (Csincsi *et al*, 2015).

Hay trabajos que describen un papel de FHR-1 independiente del complemento como factor desencadenante de inflamación. FHR-1 puede unirse a células necróticas y apoptóticas por el N-terminal, donde induce el inflammasoma NLRP3 en monocitos humanos, lo que desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias. La unión preferente de FHR-1 a través de su región N-terminal a superficies lipídicas oxidadas, como las que se encuentran en las células necróticas y apoptóticas, modula a FHR-1 para que actúe como inductor del inflammasoma NLRP3 en monocitos. La activación de NLRP3 escinde la pro-IL1 β y libera IL-1 β . Esta activación está mediada por la unión del C-terminal del FHR-1 al receptor acoplado a proteína G ADGRE2:EMR2 (EGF-like module-containing, mucin-like, hormone receptor-like 2) en los monocitos. Las células necróticas y apoptóticas presentan DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) que son reconocidos por FHR-1, pero no por FH, FHR-2 ni FHR-3. En este contexto, FHR-2, a través de la dimerización con FHR-1, puede reducir la unión de FHR-1 a células necróticas y la liberación de IL- β (Irmischer *et al*, 2019).

Hay que destacar que recientemente el estudio por parte de nuestro grupo de los mutantes de FHR-1 asociados con patologías relacionadas con el sistema del complemento nos ha permitido arrojar más luz sobre la función de esta proteína y los mecanismos patológicos en estas enfermedades.

3.3.2 Asociación de las proteínas FHR con patología:

Las proteínas FHR han cobrado especial relevancia en los últimos años, ya que se han descubierto mutaciones en los genes CFHR asociados con enfermedades relacionadas con desregulación del complemento. Estas variantes genéticas en los FHR humanos muestran una correlación genotipo-fenotipo con las enfermedades a las que se asocian. Existen básicamente tres situaciones asociadas a patología que nos proporcionan información valiosa sobre la relación estructura/función de las proteínas FHR:

- 1) Genes híbridos entre CFH, CFHR1 y CFHR3 que afectan al dominio C-terminal. Estas mutaciones se asocian con aHUS. Por ejemplo, las mutaciones que dan lugar a las proteínas híbridas FH(1-19)::FHR-1(5)

o FH(1-19)::FHR-3(1-5) que no pueden regular complemento en superficie (Heinen *et al*, 2006; Román-Ortiz *et al*, 2014; Sánchez-Corral *et al*, 2004; Venables *et al*, 2006). Otro ejemplo son las mutaciones que dan lugar a la proteína híbrida FHR-1(1-4)::FH(20) o que intercambian los residuos del SCR5 de FHR-1 por los del SCR20 de FH, que reducen la regulación del complemento compitiendo la unión de FH al endotelio (Valoti *et al*, 2015; Martin Merinero *et al*, 2021).

Estos reordenamientos no son inusuales ya que la región contiene grandes duplicaciones genómicas, lo que la hace muy propensa a los reordenamientos genómicos mediante eventos de *gene conversión* y de recombinación homóloga no alélica. Estos datos ilustran el papel crítico que desempeña la región C-terminal de FH en la protección de las superficies propias contra el daño del complemento y que esta región en FH no puede ser sustituida por la región C-terminal de FHR-1 o FHR-3. Además, reflejan que FH y FHR-1/FHR-3 tienen diferentes especificidades de unión. La observación de que la proteína híbrida FHR-1::FH altera la regulación del complemento también indica que FHR-1 carece de la actividad reguladora del complemento adecuada para sustituir a FH (Hebecker *et al*, 2013; Herbert *et al*, 2012).

- 2) Deleción de los genes CFHR3-CFHR1 ó CFHR1-CFHR4. La deleción Δ CFHR3-CFHR1 se trata de un polimorfismo común en humanos, con frecuencias alélicas que oscilan entre 0 y 0,55 en diferentes poblaciones (Holmes *et al*, 2013), que se originó a partir de un único evento de recombinación homóloga no alélica que implica una región duplicada de CFH y CFHR1. Llamativamente, la Δ CFHR3-CFHR1 está fuertemente asociada a un menor riesgo de C3G (Márquez-Tirado *et al*, 2022) AMD (Hughes *et al*, 2006; Józsi *et al*, 2015) e IgAN (Kiryluk *et al*, 2013; Bernabéu-Herrero *et al*, 2015), dos condiciones frecuentes que afectan a la retina y al riñón, respectivamente. Por el contrario, la Δ CFHR3-CFHR1 es un factor de riesgo para el SLE (Zhao *et al*, 2011), aHUS (Zipfel *et al*, 2007) y la microangiopatía trombótica relacionada con trasplante de células madre hematopoyéticas asociada a la generación de autoanticuerpos anti-FH (Jodele *et al*, 2013).
- 3) Duplicaciones del dominio de dimerización. Los mutantes de dominios de dimerización muestran penetrancia completa en los portadores y herencia dominante. Además, se asocian con C3G, ya sea DDD o C3GN. Por ejemplo, el mutante que genera una proteína FHR-1(SCR123412345) (Tortajada *et al*, 2013) o FHR-1(SCR1212345) (Márquez-Tirado *et al*, 2022) y el que genera una proteína FHR-5(SCR12123456789) (Goicoechea de Jorge *et al*, 2013;

Gale *et al*, 2010). Otro ejemplo es la mutación que genera un gen híbrido que produce una proteína FHR-5::FHR-2 (Chen *et al*, 2014). Estas duplicaciones en el dominio de dimerización producen una multimerización anormal con oligómeros de mayor orden, lo que aumenta la avidéz de las moléculas por los ligandos, lo que a su vez aumenta la competición con FH (mayor función desreguladora de estas proteínas).

Además de estas variantes determinadas genéticamente, situaciones que afectan a los niveles de estas proteínas también son importantes. Por ejemplo, altos niveles de la proteína FHR-4 se asocian con el desarrollo de AMD (Cipriani *et al*, 2020) o altos niveles de FHR-1 se asocian con peor prognosis en pacientes de C3g (Márquez-Tirado *et al*, 2022), mientras que la concentración de FHR-1 relaciona inversamente con el índice de filtración glomerular en pacientes de ANCA vasculitis y se asocia con los niveles de inflamación y marcadores de progreso de la enfermedad. Datos de investigaciones recientes demuestran que los niveles de FHR-1 también aumentan en IgAN (Medjeral-Thomas *et al*, 2017; Tortajada *et al*, 2017).

Algunos estudios sugieren que los niveles de las proteínas FH/FHR están regulados activamente en caso de infección (Esparza-Gordillo *et al*, 2004; (Närkiö-Mäkelä *et al*, 2001) y existen evidencias de que los niveles de FHR también pueden estar alterados en otras situaciones patológicas como autismo o síndrome de Rett (Artuso *et al*, 2011; Corbett *et al*, 2006). Los cambios en los niveles de FHR pueden explicar la naturaleza episódica de algunas enfermedades asociadas a la desregulación del complemento en las que las recurrencias suelen asociarse a infección (por ejemplo, C3G o IgAN). La posibilidad de que los niveles de FHR se vean afectados por las condiciones fisiológicas y patológicas justifica la realización de más estudios, ya que se podría predecir que un aumento local de la concentración de los FHR permitiría, a través de una mayor competencia de los FHR, un aumento rápido de la activación del complemento.

También es de resaltar que FHR-1 se ha encontrado unido cerca de zonas necróticas glomerulares en pacientes de ANCA vasculitis y cerca de zonas necróticas en placas de pacientes con aterosclerosis (Irmscher *et al*, 2019)

El aHUS es una enfermedad ultra rara caracterizada por AKI, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. Entre un 50 y un 70% de los pacientes con aHUS tienen una deficiencia subyacente del complemento, heredada o adquirida, que conduce a una actividad desregulada de la VA en las superficies de las células endoteliales. Aunque las mutaciones en aHUS probablemente afectan a la unión de FH a la mayoría de las superficies propias, FHR-1 compite la función de FH sólo en un subconjunto de esas superficies, y este subconjunto no incluye la superficie de las células endoteliales. Las pruebas que apoyan esta afirmación

incluyen los ensayos hemolíticos en eritrocitos de carnero en los que la unión de FH no puede ser competida con FHR-1 y la incapacidad de la proteína híbrida FH::FHR-1 asociada a aHUS (en la que el C-terminal de FH ha sido sustituido por el C-terminal de FHR-1) de proteger las superficies celulares de la lisis del complemento (Heinen *et al*, 2006; Tortajada *et al*, 2012). Es por eso por lo que los mutantes con ganancia de función en el C-terminal por intercambio de SCR o aminoácidos con FH ganan la capacidad de competir en estas superficies, como hemos explicado anteriormente.

C3G es un grupo heterogéneo de patologías renales asociadas a desregulación del complemento y clasificadas histológicamente por glomerulonefritis predominantemente de C3. En la C3G del DDD, los depósitos aparecen en la GBM, mientras que, en la C3GN, su localización es predominantemente mesangial y/o subendotelial. También se dan fenotipos intermedios entre la DDD y la C3GN. Estudios anteriores han demostrado que el control de la activación del complemento está alterado en los pacientes con C3G y que la desregulación del sistema del complemento puede ser el resultado de la pérdida de actividad de FH (Licht *et al*, 2006) o de mutaciones ganancia de función en C3 que confieren a la convertasa de C3 de la VA resistencia a la inactivación por FH (Martínez Barricarte *et al*, 2010) o de mutantes ganancia de función en los FHR como hemos explicado anteriormente. La diferencia en la desregulación del complemento entre las dos patologías es que en aHUS la desregulación se da a nivel de las superficies endoteliales, siendo FH incapaz de regular el depósito de C3; mientras que en C3G, la desregulación se da en fase fluida, siendo FH incapaz de regular el consumo completo de C3 en plasma.

La IgAN es una forma común de glomerulonefritis primaria caracterizada por complejos inmunes que contienen IgA1 deficiente en galactosa (Gd-IgA1) y que se depositan en el mesangio glomerular produciendo una enfermedad renal progresiva. La IgAN también está fuertemente asociada a la delección Δ CFHR3-CFHR1. De forma similar a la AMD, la protección contra la IgAN de la que se ha informado conferida por la falta de FHR-3 y FHR-1, también puede estar relacionada con la generación de superficies propias alteradas. La patogénesis de la IgAN se modela actualmente como una secuencia de múltiples acontecimientos, siendo uno de ellos la generación de autoanticuerpos que reconocen los epítomos que contienen GalNAc en el Gd-IgA1. Es posible que los complejos inmunitarios que contienen Gd-IgA1 depositados en el mesangio se asemejen a las superficies de los patógenos, en las que puede producirse una competición entre los FH y los FHR. Se especula que esta competición se vería reforzada por el depósito de los fragmentos activados de C3 generados por la activación de la VL. La ventaja de los individuos portadores de la delección Δ CFHR3-CFHR1 sería tener menos FHR que interfieran en la regulación por parte de FH de la activación del complemento inducida por estos complejos inmunes Gd-IgA1-antiglicanos en el riñón (Józsi *et al*, 2015).

El complemento también desempeña un papel importante en el SLE, una enfermedad autoinmune grave caracterizada por la presencia de autoanticuerpos que provocan lesiones tisulares en múltiples órganos. Aquí, en contraste con la AMD y la IgAN, la delección Δ CFHR3-CFHR1 representa un importante factor de predisposición, lo que sugiere que en este caso la disminución de la competición FH/FHR resulta deletérea. Se han propuesto dos posibilidades para explicar esta asociación. Una se basa en la capacidad del FHR-1 para inhibir la actividad de la convertasa de C5 y la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), un papel del FHR-1 que actualmente resulta controvertido. La segunda explicación está relacionada con la posibilidad de que los portadores de la delección Δ CFHR3-CFHR1 generen autoanticuerpos contra el FH, de forma similar a la situación en el aHUS, donde estos anticuerpos se asocian a la deficiencia en homocigosis del FHR-1. La asociación fenotípica contrastada del SLE con la delección Δ CFHR3-CFHR1, opuesta al efecto protector observado para la IgAN y la AMD, puede sugerir también que una cierta activación de la VA podría ser beneficiosa en el SLE. Por ejemplo, la delección Δ CFHR3-CFHR1 puede dar lugar a una menor opsonización y eliminación por opsofagocitosis de los autoantígenos debido a una mayor regulación del complemento por parte de FH en las células apoptóticas. En ese contexto, el aumento de los niveles de autoantígenos puede promover la producción de autoanticuerpos patogénicos que reconozcan estas dianas (Józsi *et al*, 2015).

3.3.3 Papel de FHR-1 y los mutantes de FHR-1 en aHUS y C3G:

Como ya hemos explicado, los reordenamientos genómicos que implican a FHR-1 que dan lugar a genes híbridos o a duplicaciones internas predisponen a aHUS y a C3G. Entre estos, las mutaciones en el C-terminal de FHR-1 son prototípicas del aHUS, mientras que las mutaciones que conducen a la duplicación de los dominios de dimerización de FHR-1 se encuentran exclusivamente en C3G.

La caracterización funcional de algunas de las variantes asociadas a aHUS sugiere que estos mutantes de FHR-1 son patogénicos porque obtienen la capacidad para competir la unión de FH a C3b. De acuerdo con esta idea, recientemente hemos informado que el FHR-1 *wild-type* carece de la capacidad de unirse a los ácidos siálicos, lo que impide la competición por la unión a C3b entre el FH y el FHR-1 en superficies propias a baja densidad, y que los mutantes del FHR-1 asociados a aHUS son patogénicos porque adquieren la capacidad de unirse a los ácidos siálicos por el dominio C-terminal. Además, también hemos descrito la interacción entre el FHR-1 y el C3 nativo, y hemos postulado que el FHR-1 unido a la superficie promueve la activación del complemento atrayendo el C3 a la superficie

celular. Mediante este mecanismo, FHR-1 puede promover activación del complemento localmente sobre las superficies con depósito de C3 a las que se ha unido, atrayendo más C3 y creando un gradiente de concentraciones más altas de esta proteína en la vecindad de los depósitos que puede ser activado a C3b por las convertasas en esa superficie. (Merinero *et al*, 2021).

Por otro lado, dado que el FHR-1 comparte el dominio de unión a C3b C-terminal con el FH, se ha asumido que el FHR-1 compite la unión del FH al C3b depositado en las superficies. Con respecto a los mutantes por duplicación de los dominios de dimerización asociados a C3G siempre se ha postulado que este sería el mecanismo patogénico de estas proteínas por el aumento de avidéz que provoca la multimerización. Esta suposición se ha apoyado normalmente en ensayos de competición en placa de ELISA recubiertas de C3b cuyo significado fisiológico resulta controvertido. Un trabajo publicado recientemente refuta este mecanismo, concluyendo que la competición por C3b entre FHR-1 y FH está restringida a los mutantes de FHR-1 asociados con el aHUS, y que las proteínas FHR-1 *wild-type* y los mutantes con dominios de dimerización duplicados asociados a C3G no compiten la unión de FH a C3b en superficies fisiológicas. En este trabajo también demuestran que el FHR-1 promueve la formación de la convertasa de C3 al interactuar con el C3b en fase fluida, promoviendo la activación del complemento y la deposición de C3 a través de la VA. Este efecto es contrarrestado por la actividad reguladora de FH, ilustrando que el equilibrio entre los niveles de FHR-1/FH determinan el resultado de la activación/regulación del complemento. El FHR-1 también se une al C3 nativo. Dado que la concentración de C3 en el plasma supera ampliamente la de C3b circulante, es de esperar que el ligando preferente del FHR-1 sea el C3. Este C3 podría entonces activarse aumentando la concentración local de los sustratos para formar la C3 convertasa. Por lo tanto, proponemos que el mecanismo patogénico de las mutaciones de FHR-1 asociadas a C3G se basan en una mayor avidéz por las superficies opsonizadas de C3, lo que aumenta la promoción de la activación del complemento en estos sitios y sobrepasan la regulación de FH (Márquez-Tirado *et al*, 2022).

Los resultados de estos dos trabajos son importantes porque proporcionan una explicación a la relación que se observa entre los mutantes del C-terminal de FHR-1 y el aHUS y entre los mutantes de FHR-1 con dominios de dimerización duplicados y la C3G. Además, ponen de manifiesto que la promoción de la activación de la VA por parte de FHR-1 no implica la competición con el FH por la unión a C3b. En lugar de esto, es la atracción de C3 y C3b en fase fluida por el exceso de FHR-1 unido a la superficie lo que lleva a la formación de la convertasa C3 de la VA, lo que supera la regulación de FH y promueve la desregulación del complemento.

3.3.4 Importancia de las proteínas FHR en superficies sin reguladores de membrana:

Como hemos visto, estas patologías con las que se relaciona a los FHR también se asocian con FH y se dan en muchos casos sobre las superficies de matriz extracelular que carecen de otros reguladores de membrana, como la GBM en los riñones o la membrana de Bruch en la retina.

Parece que en estas superficies es especialmente importante el equilibrio entre FH y los FHR, y por tanto van a ser muy sensible a situaciones que desplacen este equilibrio hacia la activación, como mutaciones de pérdida de función en FH o de ganancia de función de los FHR. En este sentido, no parece casual que los episodios de reagudización de la enfermedad en pacientes con aHUS y con C3G portadores de mutaciones en FHR se produzcan con frecuencia de forma simultánea a episodios de infección y fiebre.

La GBM y la membrana de Bruch son buenas superficies candidatas para la competición entre FH y FHR (Clark *et al*, 2014). Se ha demostrado que FH, FHL-1, FHR-1 y FHR-5 se unen a componentes de la matriz extracelular (ECM), el principal constituyente de la GBM y la membrana de Bruch, y que FHR-5 inhibe la actividad cofactora de FH asociada a superficies al competir su unión a la ECM (Csincsi *et al*, 2015).

Existen moléculas adicionales en células apoptóticas, en depósitos de la retina y en otras estructuras que pueden sostener esta competición FH/FHR. Uno de estos ligandos son los epítomos de malondialdehído (MDA), que se originan por la peroxidación de lípidos de membrana debido al estrés oxidativo. Se cree que los epítomos MDA contribuyen al reclutamiento de FH a la superficie de las células apoptóticas, donde el FH neutraliza sus propiedades proinflamatorias y detiene la activación del complemento (Weismann *et al*, 2011). En AMD esta situación puede ser especialmente relevante, ya que en la retina se generan continuamente células apoptóticas que deben ser eliminadas eficazmente. El FH se une a los epítomos del MDA a través de los SCR 6/7 y 19/20, lo que puede explicar la asociación tanto del polimorfismo 402H con un mayor riesgo, como de la delección Δ CFHR3-CFHR1 con una fuerte protección contra la AMD. En consecuencia, se ha demostrado que la variante de riesgo 402H de FH presenta una menor unión a MDA en comparación con la variante 402Y y se han aportado pruebas que sugieren que FHR-1 podría competir con la unión de FH a MDA (Weismann *et al*, 2011).

3.3.5 El papel de las proteínas FHR en la defensa contra infecciones:

Como hemos explicado anteriormente, existen patógenos que han adquirido la capacidad de unirse a FH desde los fluidos del organismo y apropiarse así de su función protectora. Las evidencias recientes sugieren que las proteínas FHR pueden aumentar la activación del complemento tanto directamente como compitiendo con FH por la unión a ciertos ligandos y superficies, por lo que pueden jugar un papel crucial en la defensa contra patógenos con este mecanismo de evasión (Józsi, 2017).

Los mecanismos inmunitarios innatos y adaptativos trabajan juntos para eliminar eficazmente los microorganismos invasores y desarrollar memoria inmunológica. A su vez, los patógenos han adquirido diversos mecanismos durante su coevolución con sus organismos anfitriones para evadir las respuestas inmunitarias de los mismos (Ricklin *et al*, 2010). La unión de FH a partir de los fluidos corporales supone una ventaja para la supervivencia de los patógenos en el hospedador. Algunos ejemplos destacados de proteínas que secuestran FH son OspE de *Borrelia burgdorferi*, Sbi de *Staphylococcus aureus*, PspC de *Streptococcus pneumoniae* y fHbp de *Neisseria meningitidis*. Por otro lado, la superficie sialilada de *Neisseria gonorrhoeae* une FH y proporciona un ejemplo de mimetismo patogénico de los glicanos del huésped. Aparentemente, numerosas proteínas microbianas, no relacionadas entre ellas, se dirigen a los mismos dominios conservados de FH, que implican a sitios de unión a ligando. Recientemente se determinó y caracterizó un sitio de unión a patógenos en el SCR 20 de FH. De este modo, los patógenos pueden imitar los ligandos de superficie del hospedador. La unión selectiva de FH humano es una de las razones por las que ciertas infecciones están restringidas a humanos. Por ejemplo, infecciones por estreptococos del grupo A, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*. Por el contrario, las bacterias que infectan a varios hospedadores, como *B. burgdorferi*, se unen al FH de varias especies. La importancia de la unión del FH para la supervivencia de las bacterias está bien documentada en el caso de *N. meningitidis*, y la fHbp es una de las dianas de la vacuna contra esta infección.

Estas observaciones sugieren que los FHR pudieron surgir durante la evolución como señuelos que contrarrestan el secuestro de FH de los fluidos corporales del hospedador por parte de los patógenos. En particular, en los FHR los dominios conservados son homólogos a los del FH que median la unión a ligandos y superficies, tanto propios como extraños, por lo que es probable que los FHR compartan la capacidad de unirse a los microorganismos. Los FHR también se han descrito en varias especies como primates, ratones, ratas y peces; estos FHR también carecen de los dominios reguladores. Se ha demostrado la unión del FHR-1 a patógenos y proteínas microbianas que de otro modo se unirían al FH (y en algunos casos también al FHL-1), como en el caso de varias proteínas de

Borrelia sp, *Leptospira interrogans*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *Plasmodium falciparum*, *C. albicans* y *Aspergillus fumigatus*. Hasta ahora, en la mayoría de los estudios, no se ha demostrado ningún papel funcional del FHR-1 cuando se une a los microorganismos. FHR-1, FHR-2 y FHR-5 se unen a *B. burgdorferi* y se demostró que el FHR-1 no influye en la opsonización bacteriana ni en la supervivencia en el caso de este microorganismo. Por otro lado, se demostró que la FHR-1 unida a *C. albicans* facilita la interacción con los neutrófilos humanos y promueve las respuestas antibacterianas de los neutrófilos. Se ha descrito un papel importante en infecciones para FHR-3. Un estudio GWAS relacionó el gen CFHR3 con la infección por *N. meningitidis*. Un estudio funcional posterior descubrió que el FHR-3 se une a este patógeno y compite con el FH para unirse a la fHbp de *N. meningitidis*, por lo que actúa como un inhibidor competitivo del FH y potencia la activación del complemento. El FHR-3 y el FH se unen con afinidades similares a la fHbp, pero las afinidades relativas difieren entre las variantes de la fHbp. En conjunto, los genes tanto del hospedador humano (al determinar los niveles de FH/FHR-3) como del patógeno (al determinar las variantes de fHbp que se unan preferentemente a FH) influyen en la susceptibilidad a la enfermedad (Józsi, 2017).

3.3.6 Las proteínas FHR en el ratón:

En el ratón, al igual que en humanos, se han encontrado cinco genes de FHR en el *cluster* génico RCA, en el locus 1q32 en ambas especies, pero solo existe evidencia a nivel de transcrito de tres de ellos: FHR-B, FHR-C y FHR-E (Vik *et al*, 1990). La nomenclatura más aceptada para los genes y proteínas de los FHR de ratón es de la A, a la E (en humanos del 1 al 5) en función de su posición genómica: telómero/Cfh/Cfhra-Cfhre/centrómero (Hellwage *et al*, 2006) (**Figura 3**).

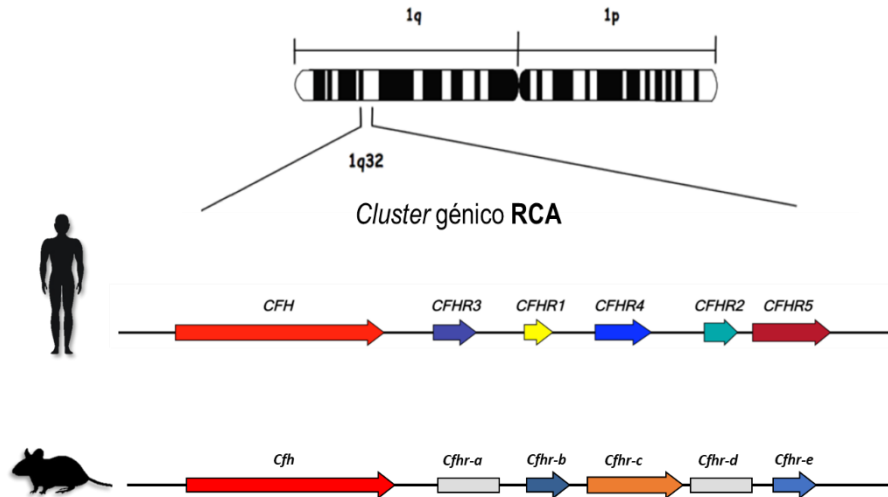


Figura 3. Comparación del *cluster* génico RCA de humanos y de ratón. En ambas especies se localiza en el locus 1q32 del cromosoma 1. En ambas especies, aparecen cinco genes relacionados con FH, aunque en el ratón dos de ellos están señalados como pseudogenes (Cfhr-a y Cfhr-e).

Su longitud en cuanto a número de SCR varía, desde cinco hasta catorce. A nivel de aminoácidos, los FHR murinos muestran una identidad de secuencia mucho mayor con el FH de ratón que los FHR humanos con el FH humano, y va desde el 85 hasta el 100% en algunos SCR. Los FHR de humanos y de ratón son evolutivamente homólogos ortólogos, aunque se desconoce qué funciones están conservadas en el ratón. Al igual que en humanos, los FHR murinos conservan los dominios de reconocimiento y unión a superficies, pero carecen de dominios reguladores (**Figura 4**). Los residuos más importantes que forman el bolsillo de unión a ácido siálico del SCR20 del FH humano (también presente en el SCR5 de FHR-1 humano) están conservados en el SCR20 del FH de ratón y en el último dominio de todos los genes de FHR en el ratón. La proteína FHR-E, de la que no se tiene evidencia a nivel de proteína (Hellwage *et al*, 2006), es la única que conserva los residuos del dominio de dimerización de las proteínas humanas FHR-1, FHR-2 y FHR-5.

Hasta ahora, no hay mucha información con respecto a la función de las proteínas FHR de ratón. Muchos de los trabajos sobre estas proteínas replican experimentos realizados con FHR humanos, utilizando en muchos casos como ligandos proteínas humanas.

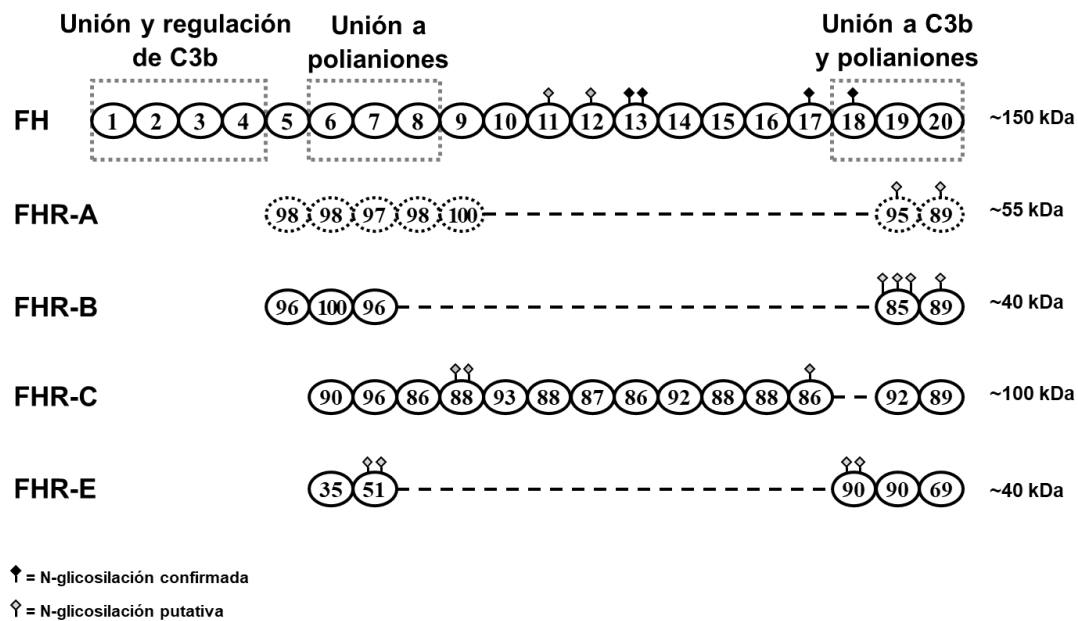


Figura 4. Alineamiento de las proteínas de la familia de FH de ratón. Los SCR de FH están numerados. El número dentro de los dominios SCR de los FHR muestra el % de identidad de secuencia con el dominio correspondiente de FH. Al igual que en los humanos, sólo los dominios de reconocimiento de superficie de FH se conservan en los FHR. También se indica la localización de los sitios de N-glicosilación confirmados y putativos.

Un trabajo (Antonioli *et al*, 2018) describe a FHR-A y FHR-B como potentes antagonistas de FH en eritrocitos de carnero. La lisis de los glóbulos rojos normales de carnero se produce también en presencia del inhibidor recombinante FH19-20, mientras que la activación de la fase fluida del complemento no se ve afectada. Tanto el FH como el inhibidor FH19-20 tienen una afinidad ~ 7 veces mayor por las superficies recubiertas de C3b y altas cantidades de ácido siálico. Curiosamente, tanto FHR-A como FHR-B parecen ser antagonistas más potentes de FH en este ensayo que el inhibidor recombinante FH19-20. La proteína FHR-C no compite la función de FH en estas superficies celulares. Además, se realizaron ensayos de competición utilizando FH para demostrar que la incubación de los glóbulos rojos de carnero con FH antes de la adición de FHR-A o FHR-B evita la hemólisis de las células. Mutantes en el dominio C-terminal de FHR-B pierden la capacidad de desregular en el ensayo hemolítico. Se observó también en este trabajo, que tanto FH como FHR-A y FHR-B de ratón unen C3d. Datos de cromatografía exclusión molecular para analizar la proteína FHR-B nativa sugieren que FHR-B puede ser capaz de formar complejos de orden superior. FHR-A es muy similar a FHR-B (95% de identidad de secuencia entre SCR), pero

tiene dos dominios adicionales correspondientes a los SCRs 8 y 9 de FH, que podrían permitir que esta proteína compitiera más eficientemente a FH por la unión a C3b en superficies celulares. Las afinidades de unión al C3d de los FHR de ratón se correlacionan directamente con su actividad funcional en los ensayos hemolíticos.

En otro trabajo (Cserhalmi *et al*, 2017) observan que FHR-B se une a C3b humano y compite la unión del FH humano. FHR-B es capaz de soportar el ensamblaje de una convertasa C3 funcional a través de su unión a C3b. Además, une PTX3 de ratón, lo que resulta en un aumento del depósito de C3 debido al aumento de la activación del complemento del suero. FHR-B aumenta el depósito de C3 sobre la pentraxina CRP, ECM de Matrigel y ECM de HUVEC cuando son expuestos a suero de ratón. También aumenta el depósito de C3 sobre células necróticas y sobre células de la línea B de ratón. FHR-B aumenta la lisis sobre eritrocitos de carnero. Una de las funciones del sistema del complemento es la limpieza de células muertas por opsofagocitosis. La unión del FH a las superficies de células necróticas y apoptóticas contribuye a la generación de cantidades suficientes de opsoninas sin que haya una activación del complemento excesiva, para evitar la lisis directa de las células y la consiguiente inflamación. Como hemos visto anteriormente, FHR-1 también une células necróticas, activa complemento y aumenta la opsonización sobre las mismas (Csincsi *et al*, 2017; Chen *et al*, 2016). En este trabajo, postulan que FHR-B también uniría células necróticas para activar complemento y aumentar la opsofagocitosis de estas células.

En un trabajo sobre la capacidad del FHR-1 humano por unirse a células necróticas y provocar una activación del sistema inmunitario independiente del complemento (Irmscher *et al*, 2019), utilizan el FHR-B para ver si replica la función de la proteína humana. Observan que FHR-B se une a macrófagos alveolares necróticos de ratón y que FHR-B aumenta la liberación de IL- β por los monocitos de ratón expuestos a suero de ratón.

3.4 Modelos animales

El ratón es la herramienta experimental elegida por la mayoría de los inmunólogos. El estudio de su respuesta inmunitaria ha aportado una enorme información sobre el funcionamiento del sistema inmunitario humano. Los ratones son el pilar de la experimentación inmunológica *in vivo*, y en muchos aspectos, reflejan notablemente la biología humana. Esta homología se refleja en los trabajos de secuenciación de ambos genomas que revelan que sólo 300 genes aproximadamente parecen ser exclusivos de una u otra especie. Sin embargo,

debido a los 65 millones de años de evolución que separan a ambas especies, existen también diferencias significativas.

A pesar de la conservación de genes entre las especies, existen diferencias significativas entre los ratones y los humanos en el desarrollo, la activación y la respuesta del sistema inmunitario, tanto en la rama innata como en la adaptativa. Estas diferencias no deberían sorprender, ya que estas dos especies que divergieron hace millones de años, difieren enormemente en tamaño y esperanza de vida, y han evolucionado en nichos ecológicos muy diferentes en los que hay que hacer frente a retos inmunológicos muy distintos (Mestas & Hughes, 2004).

Sin embargo, debido a que hay tantos paralelismos, ha habido una tendencia a ignorar las diferencias y, en muchos casos, a suponer que lo que es cierto en los ratones *-in vivo veritas-* es necesariamente cierto en los seres humanos. Al hacer tales suposiciones, corremos el riesgo de pasar por alto aspectos de la inmunología humana que no se dan, o no pueden modelarse, en los ratones. En este subconjunto se incluyen diferencias que pueden impedir que un ensayo preclínico exitoso en ratones se convierta en un ensayo clínico exitoso en humanos.

Claramente, con tantas situaciones que se trasladan bien entre ambas especies, y con la relativa facilidad con la que se pueden manipular genéticamente los ratones, los modelos de ratón seguirán proporcionando información importante durante muchos años. A medida que las terapias para las enfermedades humanas se vuelvan cada vez más sofisticadas y específicamente dirigidas, cada vez será más importante comprender las posibles limitaciones de extrapolar los datos de los ratones a los humanos. La literatura está plagada con ejemplos de terapias que funcionan bien en ratones pero que no proporcionan una eficacia similar en humanos.

La mayoría, si no todas, de las diferencias entre la inmunología del ratón y la inmunología humana se han desarrollado porque proporcionan alguna ventaja selectiva. Con toda probabilidad, estas adaptaciones son una respuesta a los nuevos retos patológicos de microorganismos, que tienen tiempos de generación muy cortos y altas tasas de mutación. Así, tanto el sistema inmunitario en su conjunto, como algunos de sus componentes individuales están moldeados por la selección natural. Los ratones evolucionaron en un entorno bastante diferente al de los humanos y han estado expuestos a diferentes antígenos, patógenos, por lo que cabe esperar que sus sistemas inmunitarios hayan evolucionado de forma diferente. Los ratones no sólo viven en nichos ecológicos diferentes, sino que son también mucho más pequeños y tienen una esperanza de vida significativamente menor. Por tanto, muchos de los cambios en humanos pueden ser para ajustarse al mayor tamaño del organismo y para proporcionar mayor controles y equilibrio para combatir la elevada carga de mutaciones somáticas que necesariamente se generan en los animales más longevos.

El primer paso para probar la eficacia de un nuevo medicamento es normalmente testarla en un modelo animal de la enfermedad diana. Si es un medicamento para una enfermedad relacionada con el sistema del complemento, el modelo animal de elección será el ratón. Sin embargo, trasladar los resultados a la situación en humanos requiere de un gran conocimiento de las similitudes y de las diferencias entre el sistema del complemento humano y del ratón, particularmente su regulación (Pouw *et al*, 2015). A continuación, se describen algunos ejemplos de modelos animales que han contribuido a un mejor entendimiento del sistema del complemento en general y del papel de las proteínas de la familia de FH en patología en particular.

El modelo de ratón *knockout Cfh* *-/-*, deficiente en FH, desarrolla DDD espontánea, caracterizada por depósitos de C3 en la GBM, con el consiguiente desarrollo de glomerulonefritis (Pickering *et al*, 2002). Mientras que otro modelo de ratón transgénico *Cfh* Δ SCR16-20 desarrolla síntomas de aHUS, lo que pone de manifiesto la importancia del C-terminal de FH en la regulación y en el desarrollo de esta patología (Goicoechea de Jorge *et al*, 2007). En humanos, la deficiencia de FH se asocia con DDD y enfermedad renal; lo que se traslada al modelo de ratón *Cfh* *-/-*. aHUS se asocia con una regulación en superficies reducida, sobre todo las mutaciones en el C-terminal de FH. El modelo de ratón *Cfh* Δ SCR16-20 desarrolla síntomas asociados a aHUS. Esto demuestra que *in vivo*, el reconocimiento de superficies por FH a través de su C-terminal ocurre mediante mecanismos similares en ratones y humanos; y que alteraciones en esta región desencadenan patologías renales similares (Pouw *et al*, 2015).

Ratones transgénicos *Cfh*(1-5)::*CFH*(6-8)::*Cfh*(9-20) que tienen los SCR del 6 al 8 del FH humano desarrollan síntomas similares a AMD (los ratones no tienen mácula) antes y más pronunciadamente que el *Cfh* *-/-*, presumiblemente porque el primero mantiene niveles de C3 en plasma mientras tiene la regulación en la retina afectada. Sin embargo, en el modelo, tanto el haplotipo 402Y como el 402H producían síntomas de AMD, mientras que en humanos solo el 402H se asocia con AMD. Ninguno de los dos FH quiméricos era igual de efectivo que el FH *wild-type* en reconocer y proteger la membrana de Bruch en el ratón, probablemente porque la composición de polianiones en esta superficies es diferente entre ratones y humanos (Ufret-Vincenty *et al*, 2010). Además de tratar a los ratones *Cfh* *-/-* con FH humano, se generaron ratones que expresan FH humano completo en su totalidad en lugar del FH de ratón, incluyendo tanto el haplotipo 402H como el 402Y, dando como resultado dos cepas humanizadas; *CFH-H:Cfh* *-/-* y *CFH-Y:Cfh* *-/-* (Ding *et al*, 2015). En apoyo de los resultados obtenidos sobre la administración de FH humano, la expresión de FH humano en ratones *Cfh* *-/-* demostró que el FH humano es capaz de regular el complemento de ratón eficientemente. En un modelo de artritis reumatoide, el competidor rFH19-20 empeora la enfermedad (Banda *et al*, 2013). En ratones MLR-*lpr/lpr*, que es un

modelo de SLE, la deficiencia de FH exacerba los síntomas renales (Bao *et al*, 2011).

En cuanto a modelos de ratón que involucren a las proteínas FHR en esta especie, no se tiene mucha información. Existe un modelo animal *Cfhre* *-/-* (Li *et al*, 2020) que en condiciones estándar tiene niveles de C3, C5, C3a y C5a normales, por lo que el FHR-E no parece tener un papel en la activación espontánea de la VA. Tras la estimulación del modelo con LPS aumentan los niveles de C3, C5, C3a y C5a, así como de marcadores de inflamación, coagulación y AKI. Estos resultados parecen indicar que FHR-E tendría un papel protector en infecciones, evitando una inflamación excesiva. FHR-E competiría reguladores positivos como properdina en situaciones de activación de la VA.

Además, se ha descrito ausencia de FHR-C en tres cepas distintas proclives a SLE (MRL-*lpr/lpr*, NZB/NZN, LG/J) y en una cepa proclive a DM (diabetes mellitus) (ratones NOD). Los niveles de expresión a nivel de mRNA de FHR-B es menor en el hígado de los ratones *Cfh* *-/-* con DDD que en ratones wild-type (Mehta *et al*, 2014).

Se ha descrito recientemente un modelo de ratón doble *knockout* *Cfh/Cfhrc* *-/-* que desarrolla C3G espontánea al igual que el modelo ya descrito *Cfh* *-/-*. Por el contrario, el *knockout* *Cfhrc* *-/-* no desarrolla enfermedad renal y presenta regulación normal de C3 en plasma y riñón. Estos resultados parecen indicar que en el contexto de desregulación del complemento extrema (i.e. deficiencia total de FH) la acción de los FHR es irrelevante (Malik *et al*, 2021).

3.5 Objetivo general

Las proteínas FHR humanas representan un grupo de moléculas cuya función o funciones precisas dentro del sistema inmunitario aún no han sido descritas con exactitud. Se les han atribuido funciones heterogéneas e incluso contradictorias entre ellas. En los últimos años, han cobrado especial importancia, debido a que, cada vez con mayor fuerza, se encuentran asociadas con patologías humanas.

Se postula que los FHR podrían estar implicados en una regulación más precisa de la activación del complemento en contextos específicos o sobre determinadas superficies extrañas o propias que hayan sido alteradas durante procesos de inflamación, recambio celular, patología, cambios por la edad, etc. Parece que estas proteínas podrían jugar un papel importante en el delicado equilibrio que existe entre activación del complemento e inhibición para mantener la homeostasis y prevenir una activación exacerbada.

Lo mismo puede decirse de las proteínas FHR de ratón en cuanto a su función concreta dentro del sistema del complemento. Existe un número muy limitado de estudios en relación al papel que estas proteínas tienen en modelos animales de enfermedad.

Nuestro objetivo es extender estos estudios hacia una caracterización funcional y estructural completa de las proteínas FHR de ratón, en la búsqueda de homólogos funcionales entre las dos especies. Este conocimiento es relevante a la hora de generar modelos animales de enfermedades en las que están implicadas las proteínas FHR humanas.

4. OBJETIVOS

1. Determinar qué proteínas relacionadas con factor H están presentes en el plasma de ratón.
2. Caracterizar funcional y estructuralmente las proteínas relacionadas con factor H de ratón.
3. Buscar homólogos funcionales de la proteína FHR-1 humana entre las proteínas FHR de ratón.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Desarrollo de anticuerpos contra las proteínas de la familia de FH

Ante la ausencia de reactivos comerciales que nos permitiesen detectar o purificar las proteínas FHR de ratón, se decidió diseñar un anticuerpo policlonal contra estas proteínas. Teniendo en cuenta que cuando se compara la secuencia aminoacídica de los FHR de ratón con la de FH, los alineamientos muestran altos porcentajes de identidad de secuencia entre dominios SCR individuales (con un valor medio del 88% por SCR), es probable que existan epítomos comunes entre FH y los FHR de ratón.

5.1.1 Antisuero policlonal contra FH de ratón:

Primero, se purificó la proteína FH de ratón a partir de ratones C57BL/6 *wild-type* usando una columna de inmunoafinidad montada en el laboratorio a partir del anticuerpo monoclonal 2A5 (cedido por el laboratorio de Claire Harris, Universidad de Cardiff).

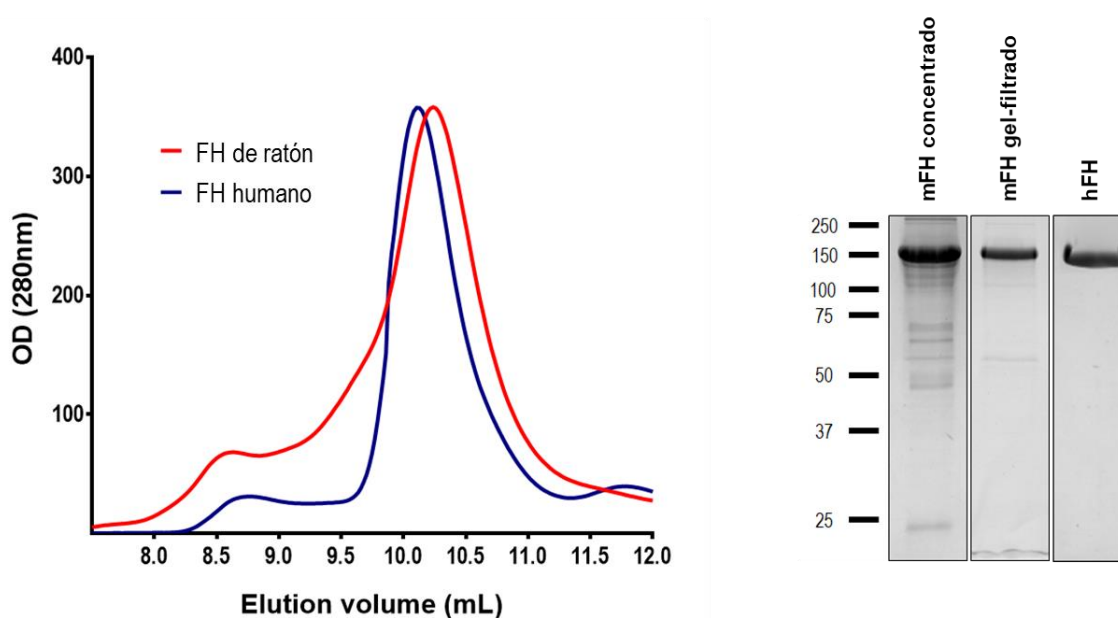


Figura 5. Perfil de elución en una columna de exclusión molecular del FH de ratón, comparado con el FH humano. También se compara la proteína de ratón con la proteína humana en un gel SDS-PAGE.

La proteína purificada de esta manera se concentró utilizando los filtros para centrifugación Amicon® Ultra-4 30K (Merck Millipore, #C7719) y se gel-filtró utilizando la columna de exclusión molecular Superdex® 200 10/300 GL (GE Healthcare, #GE17-5175-01). El perfil de elución y la proteína purificada en SDS-PAGE se compararon con el FH humano para validar la proteína purificada, debido a la alta homología (**Figura 5**).

Seguidamente, tras obtener cantidad suficiente y con la ayuda del laboratorio de Mercedes Domínguez (Instituto de Salud Carlos III), se inoculó la proteína purificada en un conejo en dos eventos de inmunización. El animal fue sacrificado y sangrado, y se obtuvo el antisuero policlonal anti-FH de ratón. Se comprobó que este reactivo detectaba proteínas a la altura teórica de los FHR en un plasma de ratón C57BL/6 *Cfh*^{-/-} mediante *western-blot* (WB) tras electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), mientras que usando un plasma de ratón C57BL/6 *Cfh/Cfhr*^{-/-} no se detectaban estas bandas (**Figura 6**). De modo que el anticuerpo policlonal anti-FH detecta epítomos compartidos en el resto de las proteínas de la familia. La banda inespecífica que aparece debajo del marcador de 75kDa corresponde a albúmina.

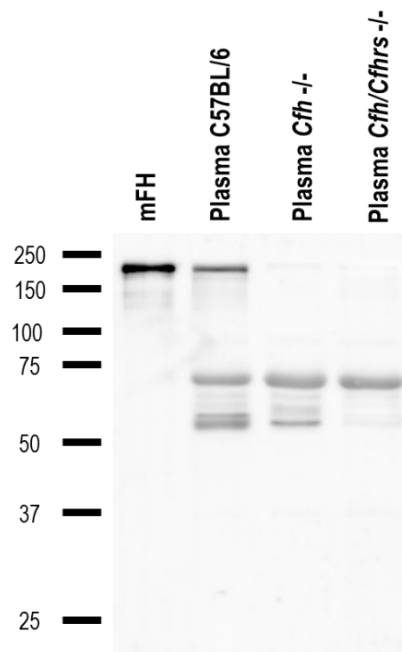


Figura 6. WB con el antisuero de conejo anti-FH de ratón. En el plasma *Cfh/Cfhr*^{-/-} no se detectan bandas que sí aparecen en el *wild-type*.

Las inmunoglobulinas del antisuero se purificaron por inmunoafinidad utilizando una columna montada en el laboratorio de proteína A. Estas inmunoglobulinas purificadas se inmovilizaron en una matriz de sefarosa CNBr-activada 4B (GE Healthcare) y se creó una columna de inmunoafinidad en el laboratorio con el anticuerpo policlonal anti-FH de ratón.

5.1.2 Antisuero policlonal contra FHR-B de ratón:

Mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando la columna de inmunoafinidad con el anticuerpo policlonal anti-FH de ratón se purificó la proteína FHR-B recombinante a partir de sobrenadante de cultivo celular usando la reactividad cruzada del anticuerpo. La proteína purificada de esta manera se concentró utilizando los filtros para centrifugación Amicon® Ultra-4 30K (Merck Millipore, #C7719) y se gel-filtró. Con la ayuda del laboratorio de Mercedes Domínguez (Instituto de Salud Carlos III) se inoculó la proteína purificada en un conejo en dos eventos de inmunización. Seguidamente el animal fue sacrificado y sangrado, y se obtuvo el antisuero policlonal anti-FHR-B de ratón.

El antisuero se validó mediante por WB tras SDS-PAGE. Las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF (Biorad, #1620177) mediante transferencia húmeda en buffer Tris-Gli 1X, metanol 20%, a 100V durante 1 hora en frío. La membrana se aclara en tampón de lavado (Tris 50mM, NaCl 150mM y 0,05% Tween 20) y se bloquea con tampón de lavado con 5% de proteína láctica en polvo. Tras lavar, se incuba con el antisuero 1 hora a RT y agitación en tampón de lavado con 3% de BSA. La incubación con el anticuerpo secundario se da durante 30 minutos a RT y agitación. Las membranas se revelan con el reactivo quimioluminiscente Clarity™ Western ECL (Biorad, #170-5061) y se detectan en el lector de quimioluminiscencia Chemidoc™ (Biorad). Para la validación se usaron plasmas de ratones C57BL/6 *wild-type* y de ratones *knockout Cfh* *-/-* y *Cfh/Cfhr* *-/-*, así como la proteína FHR-B de ratón purificada. El antisuero policlonal anti-FHR-B de ratón detecta bandas a la altura de los FHR tanto en el suero *wild-type* como en el suero del *knockout Cfh* *-/-*, mientras que estas bandas no aparecen en el suero *knockout Cfh/Cfhr* *-/-* (**Figura 7**). La banda inespecífica que aparece debajo del marcador de 75kDa corresponde a albúmina.

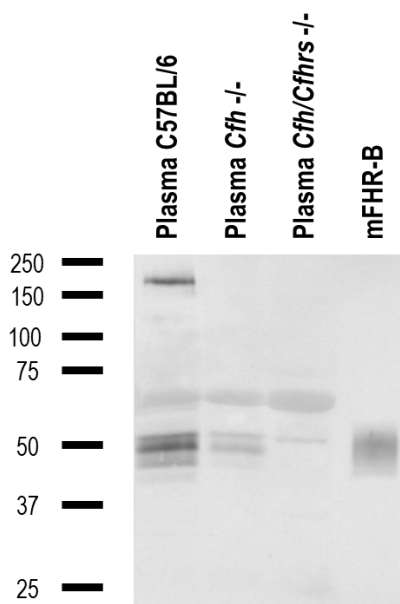


Figura 7. WB con el antisuero de conejo anti-FHR-B de ratón de muestras de plasma de ratón y la proteína FHR-B purificada.

5.2 Identificación de FHR en plasma de ratón

Para los siguientes experimentos se utilizó plasma de ratón C57BL/6 *knockout* del gen *Cfh* *-/-*. Mediante cromatografía por inmunoafinidad con un anticuerpo policlonal de conejo contra factor FH de ratón, purificamos los FHR a partir de ese plasma de ratón. Las proteínas eluidas fueron desnaturalizadas, analizadas por SDS-PAGE y el gel fue teñido con azul Coomassie. Se realizaron pequeñas extracciones de cada banda de detección, y se llevó a cabo un protocolo de digestión de tripsina, nLC-MS/MS y análisis de datos de acuerdo con lo descrito en Cristobo *et al*, 2011. La identificación de proteína mediante nLC-MS/MS se realizó en el Laboratorio de Proteómica y Genómica del CSIC-CIB, miembro de la red ProteoRed-ISCI.

A modo de control, se repitió la metodología anterior utilizando de nuevo plasma de ratones C57BL/6 *knockout* del gen *Cfh* *-/-*, pasándolo esta vez por una columna de inmunoafinidad montada en el laboratorio inmovilizando un anticuerpo control policlonal desarrollado en conejo contra una proteína humana no relacionada con el sistema del complemento. Las proteínas eluidas se analizaron de la manera anteriormente descrita.

5.3 Diseño y clonaje de las construcciones recombinantes de FHR

Para trabajar con proteínas individuales purificadas se optó por producirlas de manera recombinante. Con este fin, a partir de la secuencia del cDNA de distintas proteínas, se diseñaron y se clonaron en distintos vectores una serie de proteínas *wild-type*, así como varias construcciones de proteínas híbridas.

Se obtuvieron los siguientes plásmidos de con las construcciones de diferentes proteínas o fragmentos de los siguientes proveedores: FHR-1 humano (UniProt Q03591) y FH de ratón (Uniprot P06909), procedentes de GeneCopoeia™, insertados en el vector pEZ-M02. Los dominios C-terminal de FHR-B de ratón (UniProt Q4LDF6), factor FHR-C (UniProt Q0KHD3), y los dos últimos dominios C-terminal del factor FHR-E (UniProt Q61406), fueron diseñados con GeneArt™ Gene Synthesis (Thermo Scientific™) e insertados en un vector pMA-T. El factor completo FHR-B de ratón se obtuvo de GenEZ™ ORF (Genscript™) insertados en el vector pcDNA3.1+/C-(K)-DYK.

Las construcciones híbridas con el dominio N-terminal (SCRs 1, 2 y 3) de FHR-1 humano y el dominio C-terminal (últimos dos SCRs) de FH, FHR-B, FHR-C y FHR-E de ratón se diseñaron teniendo en cuenta la literatura previa sobre las proteínas FHR de ratón y la información obtenida previamente en los experimentos de detección de las proteínas nativas en la sangre del ratón. Estas construcciones híbridas se fabricaron usando diversidad de estrategias de clonaje.

5.3.1 Construcción híbrida con el N-terminal de FHR-1 humano y C-terminal de FH de ratón:

La construcción hFHR-1(1-3)::mFH(19-20) se diseñó generando secuencias de restricción AgeI únicas en las secuencias del FHR-1 humano entre el SCR3 y el SCR4 (**Figura 8.A**) y del FH de ratón entre el SCR18 y el SCR19 (**Figura 8.B**), mediante mutagénesis dirigida dando lugar a codones sinónimos, ambas en el vector pEZ-M02. El cribado de los clones positivos se hizo mediante digestión del nuevo sitio de corte AgeI generado.

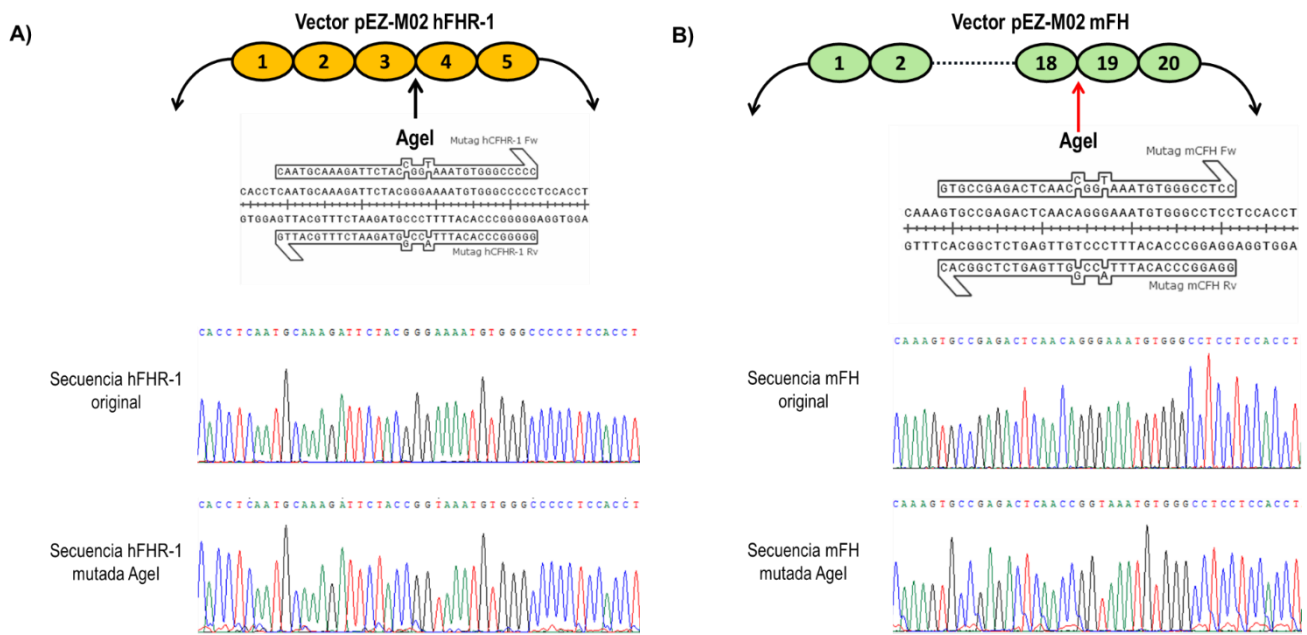


Figura 8. Esquema de mutagénesis dirigida sobre los vectores originales pEZ-M02 hCFHR1 (A) y pEZ-M02 mCFH (B). Se muestra la localización de la mutación entre SCRs en el esquema del vector y el resultado de secuenciación que confirma la mutación.

A continuación, las construcciones pEZ-M02 hFHR-1 AgeI+ y pEZ-M02 mFH AgeI+ se digirieron con las enzimas de restricción SacI y AgeI; Sac I tiene un sitio de corte único antes del ORF. Se purificó el fragmento con los SCR1, 2 y 3 del FHR-1 humano digerido con esta pareja de enzimas de restricción y se insertó dentro del pEZ-M02 mFH SCR19-20 abierto con las mismas enzimas (**Figura 9.A**). La construcción hFHR-1(1-3)::mFH(19-20) se subclonó al vector de expresión pCI-Neo amplificando la construcción por PCR usando *primers* que incorporaban sitios de corte NheI en el extremo 5' y MluI en el extremo 3' de la secuencia. Estas secuencias de restricción se encuentran en la región de clonaje MCS (*Multiple Cloning Site*) del vector pCI-Neo. La construcción también fue subclonada al vector de expresión *in-house* pCMV en la región de clonaje MCS que contiene los sitios de corte únicos NheI y MluI (**Figura 9.B**). El cribado de clones durante todos los pasos del clonaje y de los subsiguientes subclonajes se hizo mediante PCR con *primers* específicos de la construcción a cribar. Tanto los clones positivos como las construcciones finales se secuenciaron íntegramente para confirmar la ausencia de cambios no deseados en la secuencia.

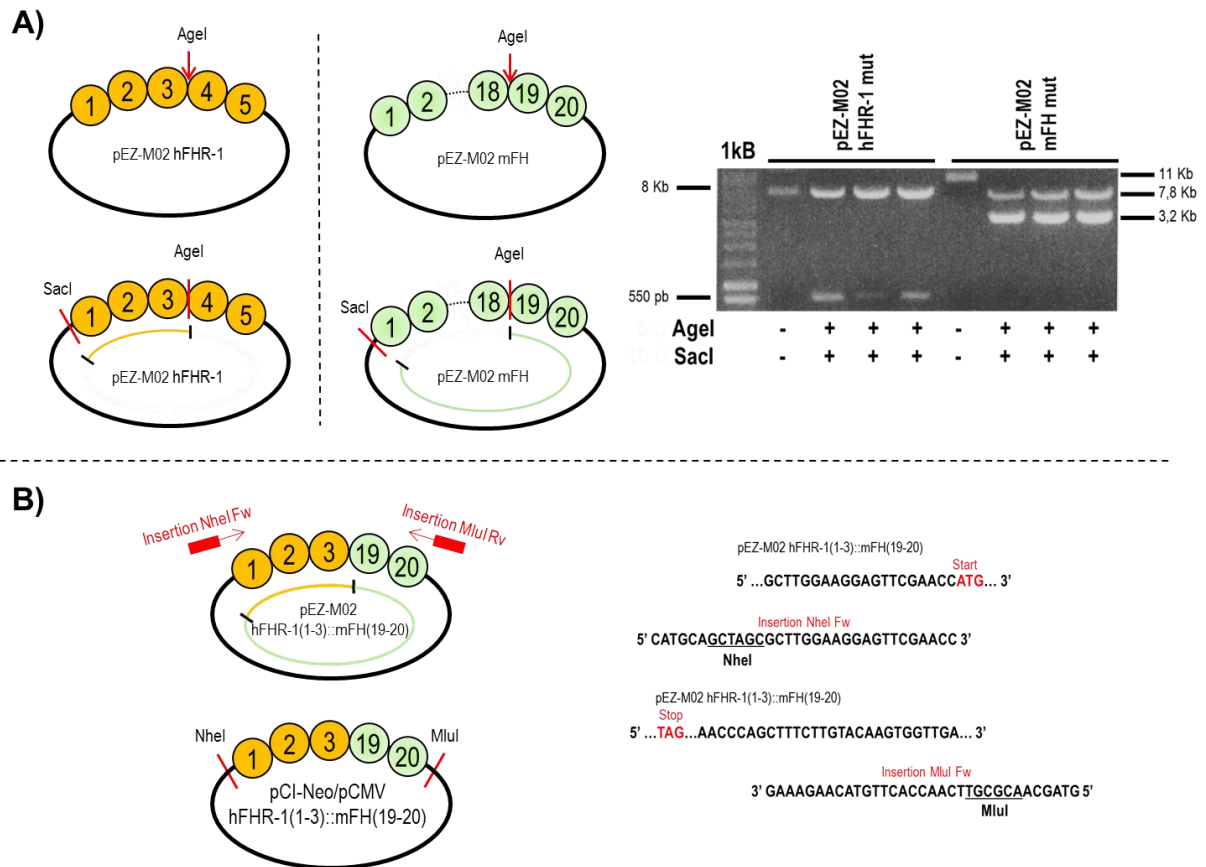


Figura 9. A) Esquema del clonaje de la construcción híbrida hFHR-1(1-3)::mFH(19-20) a partir de los fragmentos generados por digestión de las dianas desde los vectores originales. **B)** Esquema del subclonaje de la construcción híbrida hFHR-1(1-3)::mFH(19-20) a los vectores pCI-Neo y pCMV y esquema del diseño de los primers utilizados.

5.3.2 Construcciones híbridas con el N-terminal de FHR-1 humano y C-terminal de los CFHR de ratón:

Las construcciones con el dominio N-terminal de FHR-1 humano y el C-terminal de los FHR de ratón [*i.e.* hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5), hFHR-1(1-3)::mFHR-C(13-14) y hFHR-1(1-3)::mFHR-E(4-5)] se generaron subclonando la región correspondiente al C-terminal de cada uno de los FHR de ratón desde el vector pMA-T. Las construcciones de los dominios C-terminal de los FHR de ratón se obtuvieron a través del servicio de biología sintética de *Invitrogen* (*Thermo Fisher Scientific*) y se suministraron en el vector de clonaje pMA-T. Se diseñaron para que la secuencia estuviese flanqueada por AgeI y MluI en los

extremos 5' y 3' respectivamente. Los fragmentos a insertar se obtuvieron por digestión con AgeI y MluI y se insertaron en el vector pCI-Neo con la construcción hFHR-1(1-3)::mFH(19-20) digerida con la misma pareja de enzimas. Las construcciones también fueron subclonadas al vector de expresión *in-house* pCMV (**Figura 10**). El cribado de clones durante todos los pasos del clonaje y de los subsiguientes subclonajes se hizo mediante PCR con *primers* específicos de la construcción a cribar. Tanto los clones positivos como las construcciones finales se secuenciaron íntegramente para confirmar la ausencia de cambios no deseados en la secuencia.

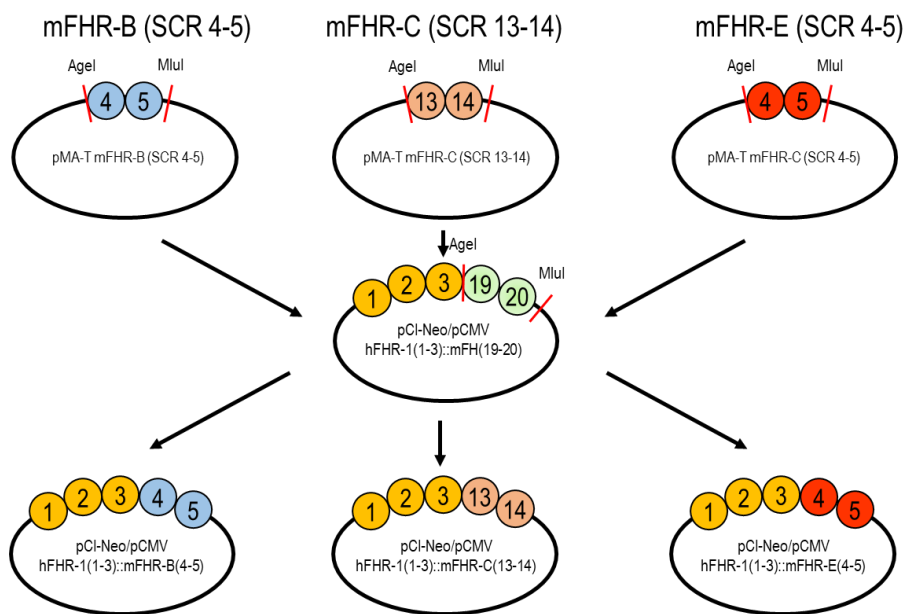


Figura 10. Esquema del clonaje de las construcciones híbridas hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5), hFHR-1(1-3)::mFHR-C(13-14) y hFHR-1(1-3)::mFHR-E(4-5) a partir de las construcciones en el vector pMA-T con el C-terminal de cada uno de los FHR de ratón.

5.3.3 Construcción completa del FHR-B de ratón:

La construcción del cDNA completo de FHR-B de ratón se obtuvo a través de la librería de cDNA de *GeneScript* y se suministró en el vector de pcDNA3.1+/C-(K)-DYK. Ante la falta de reactivos específicos para purificar la proteína de manera eficiente, se decidió insertar una etiqueta de polihistidina (HisTag) seguida de una diana para la proteasa HRV3C. La diana se insertó en

5.3.4 Mutante monomérico de la construcción híbrida con el N-terminal de FHR-1 humano y el C-terminal de FHR-B de ratón:

La construcción híbrida con el dominio N-terminal de FHR-1 humano y el C-terminal de FHR-B de ratón hFHR-1(1-3)::Mfhr-B(4-5) es dimérica al llevar el N-terminal del FHR-1 humano. Para estudiar la importancia de la dimerización en la función de esta proteína, se replicó el mutante monomérico cambiando los residuos descritos en Goicoechea de Jorge *et al* (2013) que son indispensables para la dimerización. Estos cambios son: Tyr34Ser, Ser36Tyr, Tyr39Glu. Se utilizó el kit de mutagénesis dirigida con Q5® (New England Biolabs, #M0493S) + KLD Enzyme Mix (New England Biolabs, #M0554S). Para ello, se diseñaron *primers* solapantes que hibridaban en la región a mutar que amplificaban el vector entero e introducían las mutaciones sobre la construcción hFHR-1(1-3)::Mfhr-B(4-5) en pCI-Neo (**Figura 12**). La construcción se subclonó al vector de expresión pCMV amplificando la construcción por PCR usando *primers* que incorporaban sitios de corte NheI en el extremo 5' y MluI en el extremo 3' de la secuencia. Estas secuencias de restricción se encuentran en la región de clonaje MCS del vector pCMV. Tanto los clones positivos como las construcciones finales se secuenciaron íntegramente para confirmar la ausencia de cambios no deseados en la secuencia.

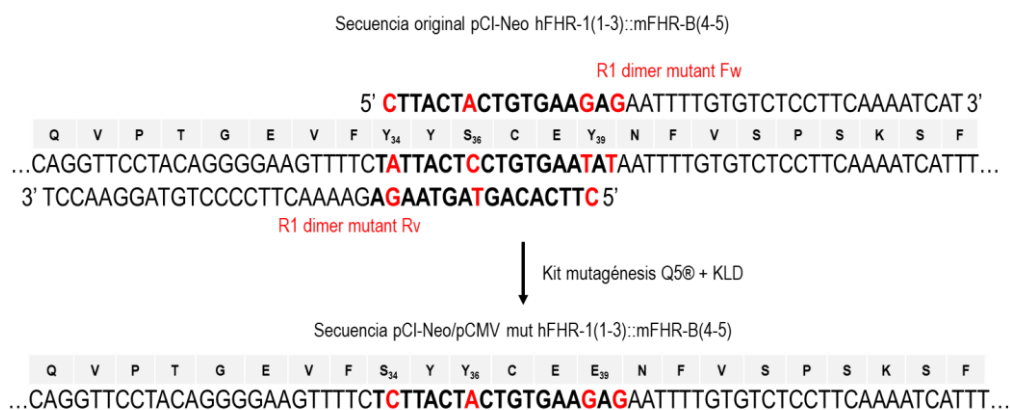


Figura 12. Diseño de los *primers* para introducir las mutaciones Tyr34Ser, Ser36Tyr, Tyr39Glu en los residuos clave para la dimerización en el SCR1 de FHR-1 humano en la construcción hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5) en pCI-Neo.

5.3.5 Construcción híbrida con el N-terminal de FHR-1 humano y el FHR-B de ratón completo:

Se diseñó una construcción híbrida con el dominio N-terminal del FHR-1 seguido del FHR-B de ratón completo, para dar lugar a la construcción hFHR-1(1-2)::mFHR-B. Para el clonaje, se utilizó el sistema In Fusion® HD Cloning (Takara Bio, # 639648). En este sistema el fragmento a insertar se produce mediante PCR y se liga en un vector que previamente ha sido abierto también mediante PCR. Inserto y vector se ligan utilizando el reactivo In-Fusion® del kit. En primer lugar, el fragmento a insertar se amplificó desde la construcción original pEZ-M02 hFHR-1. Los *primers* diseñados amplificaban la secuencia correspondiente al comienzo del FHR-1 humano hasta el final del SCR2, incluyendo el péptido señal de esta proteína. En segundo lugar, el vector a abrir se amplificó desde la construcción original pcDNA3.1+/C-(K)-DYK mFHR-B, dejando fuera la secuencia correspondiente al péptido señal de esta proteína. Ambos fragmentos se purificaron y se ligaron el reactivo In-Fusion® del kit para dar lugar a la construcción pcDNA3.1+/C-(K)-DYK hFHR-1(1-2)::mFHR-B (**Figura 13**). La construcción se subclonó al vector de expresión pCMV amplificando la construcción por PCR usando *primers* que incorporaban sitios de corte NheI en el extremo 5' y MluI en el extremo 3' de la secuencia. Estas secuencias de restricción se encuentran en la región de clonaje MCS del vector pCMV. El cribado de clones durante todos los pasos del clonaje y de los subsiguientes subclonajes se hizo mediante PCR con *primers* específicos de la construcción a cribar. Tanto los clones positivos como las construcciones finales se secuenciaron íntegramente para confirmar la ausencia de cambios no deseados en la secuencia.

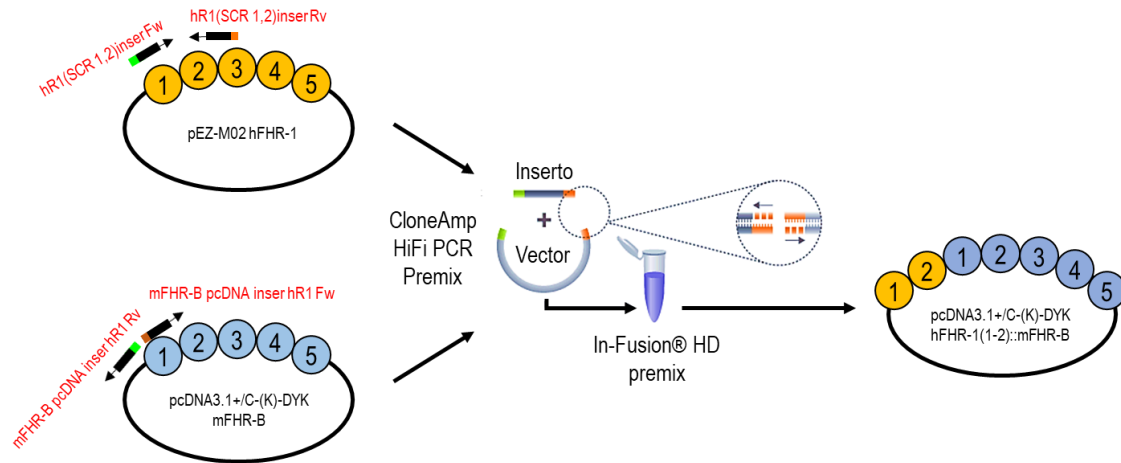


Figura 13. Esquema del clonaje de la construcción hFHR-1(1-2)::mFHR-B utilizando el sistema In-Fusion®. Se muestra el diseño de los *primers* para extraer el inserto de la construcción del FHR-1 humano y el de los *primers* para abrir el vector de destino pcDNA3.1+/C-(K)-DYK mFHR-B.

5.3.6 Construcción híbrida con el N-terminal de FHR-1 humano y el N-terminal de FHR-B de ratón:

Para estudiar el comportamiento del dominio N-terminal de la proteína FHR-B, se diseñó una construcción híbrida con el dominio N-terminal del FHR-1 seguido del dominio N-terminal del FHR-B de ratón para dar lugar a la construcción hFHR-1(1-2)::mFHR-B(1-3). Para su clonaje, se partió de la construcción hFHR-1(1-2)::mFHR-B y se diseñaron *primers* que amplificasen la construcción desde el principio hasta el final del SCR3 del FHR-B. Estos *primers* incorporaban sitios de corte NheI en el extremo 5' y MluI en el extremo 3' de la secuencia, además de un codón STOP en este extremo. Estas secuencias de restricción se encuentran en la región de clonaje MCS del vector de expresión pCMV, de modo que la construcción se insertó directamente en este vector (**Figura 14**). El cribado de clones durante todos los pasos del clonaje y de los subsiguientes subclonajes se hizo mediante PCR con *primers* específicos de la construcción a cribar. Tanto los clones positivos como las construcciones finales se secuenciaron íntegramente para confirmar la ausencia de cambios no deseados en la secuencia.

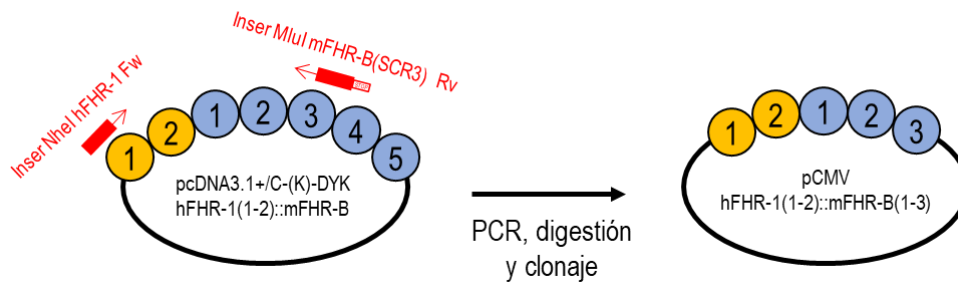


Figura 14. Esquema del clonaje de la construcción hFHR-1(1-2)::mFHR-B(1-3) en el vector de expresión pCMV. Se muestra el diseño de los *primers* para extraer el inserto de la construcción pcDNA3.1+/C-(K)-DYK hFHR-1(1-2)::mFHR-B

5.3.7 Construcción híbrida con el N-terminal de FHR-B de ratón y el C-terminal de FHR-1 humano:

Para estudiar el papel del dominio N-terminal del FHR-B de ratón en la dimerización de la proteína, se diseñó una construcción híbrida en la que el N-terminal del FHR-1 humano se sustituye por el N-terminal del FHR-B de ratón, para generar la construcción mFHR-B(1-3)::hFHR-1(4-5). Para ellos se diseñaron dos parejas de *primers*. La primera abría el vector pcDNA3.1+/C-(K)-DYK HisT/HRV3C mFHR-B, amplificando todo el vector desde el final de la construcción insertando BsiWI hasta el final del SCR3 del FHR-B de ratón insertando AgeI, eliminando los SCR4 y SCR5 de la proteína. La segunda pareja amplificaba el fragmento correspondiente a los SCR 4 y SCR5 del FHR-1 humano desde el vector pEZ-M02 hFHR-1 original e insertaban los sitios de corte AgeI y BsiWI en los extremos 5' y 3' respectivamente. Tras la purificación y digestión con sendas enzimas de restricción, ambos fragmentos se ligaban para dar lugar a la construcción HisT/HRV3C mFHR-B(1-3)::hFHR-1(4-5). El clonaje, insertaba un sitio de corte AgeI (ACCGGT) entre el SCR3 de FHR-B y el SCR4 de FHR-1 que introducía los aminoácidos treonina y glicina a la secuencia puente entre estos dominios. Para deletar esta secuencia se utilizó el kit de mutagénesis dirigida con Q5® (New England Biolabs, #M0493S) + KLD Enzyme Mix (New England Biolabs, #M0554S), diseñando *primers* para hacer una PCR inversa que amplifica el vector entero exceptuando la secuencia a deletar (**Figura 15**). La construcción se subclonó al vector de expresión pCMV amplificando la construcción por PCR usando *primers* que incorporaban sitios de corte NheI en el extremo 5' y MluI en el extremo 3' de la secuencia. Estas secuencias de restricción se encuentran en la región de clonaje MCS del vector pCMV. El cribado de clones

durante todos los pasos del clonaje y de los subsiguientes subclonajes se hizo mediante PCR con *primers* específicos de la construcción a cribar. Tanto los clones positivos como las construcciones finales se secuenciaron íntegramente para confirmar la ausencia de cambios no deseados en la secuencia.

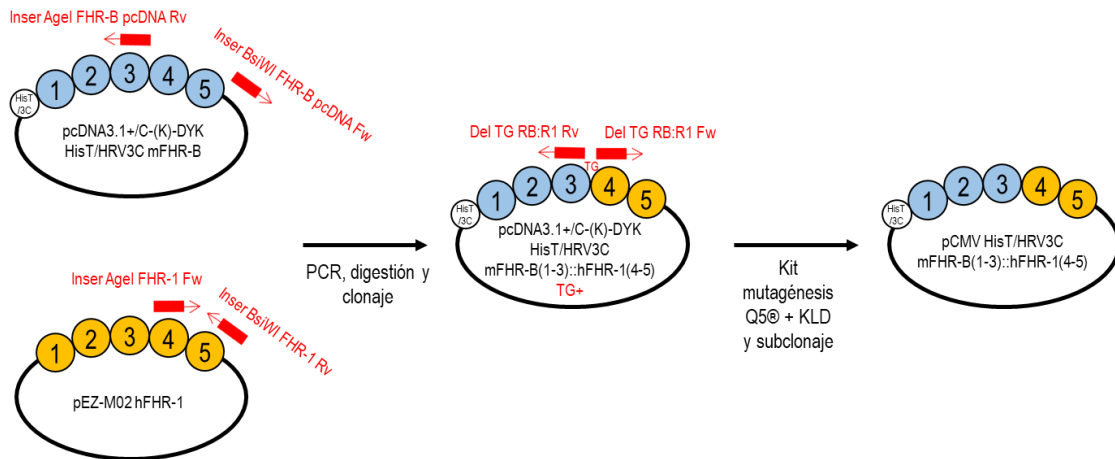


Figura 15. Esquema del clonaje de la construcción HisT/HRV3C mFHR-B(1-3)::hFHR-1(4-5) en el vector de expresión pCMV. Se muestra el diseño de los *primers* para extraer el inserto de la construcción pEZ-M02 hFHR-1 original para insertarlo al final de construcción abierta HisT/HRV3C mFHR-B(1-3) en pcDNA3.1+/C-(K)-DYK. También se muestra el diseño de los *primers* para deletar la secuencia AgeI (ACCGGT) insertada en el anterior paso.

5.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

5.4.1 Expresión de las proteínas recombinantes en células de mamífero:

Las construcciones híbridas diseñadas y clonadas en los vectores de expresión pCI-Neo y pCMV se expresaron en sistemas de expresión heteróloga en células de mamífero, para mantener los patrones de glicosilación. Se probaron los dos vectores en dos sistemas de expresión que utilizan distintas células y distintos reactivos de transfección del DNA plasmídico. En primer lugar, se utilizaron células CHO adherentes del laboratorio transfectadas con el reactivo jetPRIME®

(Polyplus, # PPLU114-07). En segundo lugar, se utilizó el sistema de transfección FreeStyle 293™ (Invitrogen, #K900001), que utiliza células en suspensión HEK293 FreeStyle™ modificadas y el reactivo de transfección 293fectin™. Los resultados de expresión con cada uno de los sistemas para una proteína de referencia se observan en la **Figura 16.A**. El sistema con células HEK293 FreeStyle™ tiene mejor rendimiento utilizando el vector pCMV. Además, es un sistema libre de suero, lo que facilita la purificación a partir del sobrenadante y evita la contaminación con componentes del sistema del complemento presentes en el suero añadido.

5.4.2 Purificación de las proteínas recombinantes:

Usando este sistema de expresión se generó un repertorio de proteínas recombinantes híbridas y completas de los FHR de ratón (**Figura 16.B**), que se utilizaron en los ensayos funcionales y estructurales que se realizaron a lo largo de este trabajo. Las proteínas híbridas humano ratón fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de sefarosa CNBr activada 4B (GE Healthcare, #17-0430-01) con el anticuerpo de ratón monoclonal anti hFHR-1 2C6 desarrollado en el laboratorio inmovilizado. Las proteínas marcadas con una etiqueta de polihistidina se purificaron con columnas HisTrap HP (GE Healthcare, #17524701), aplicando al sobrenadante 45mM de imidazol, tampón de lavado, y eluyendo con 250mM de imidazol. Se realizó la diálisis de la proteína contra PBS, tras lo cual se digirió con proteasa HRV3C durante la noche a 4°C, y se cargó de nuevo en la columna HisTrap HP donde la proteína sin marcar se separó de la proteasa. La diálisis de todas las proteínas se hizo contra PBS en estos experimentos. Todas las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE tiñendo con azul de Coomasie.

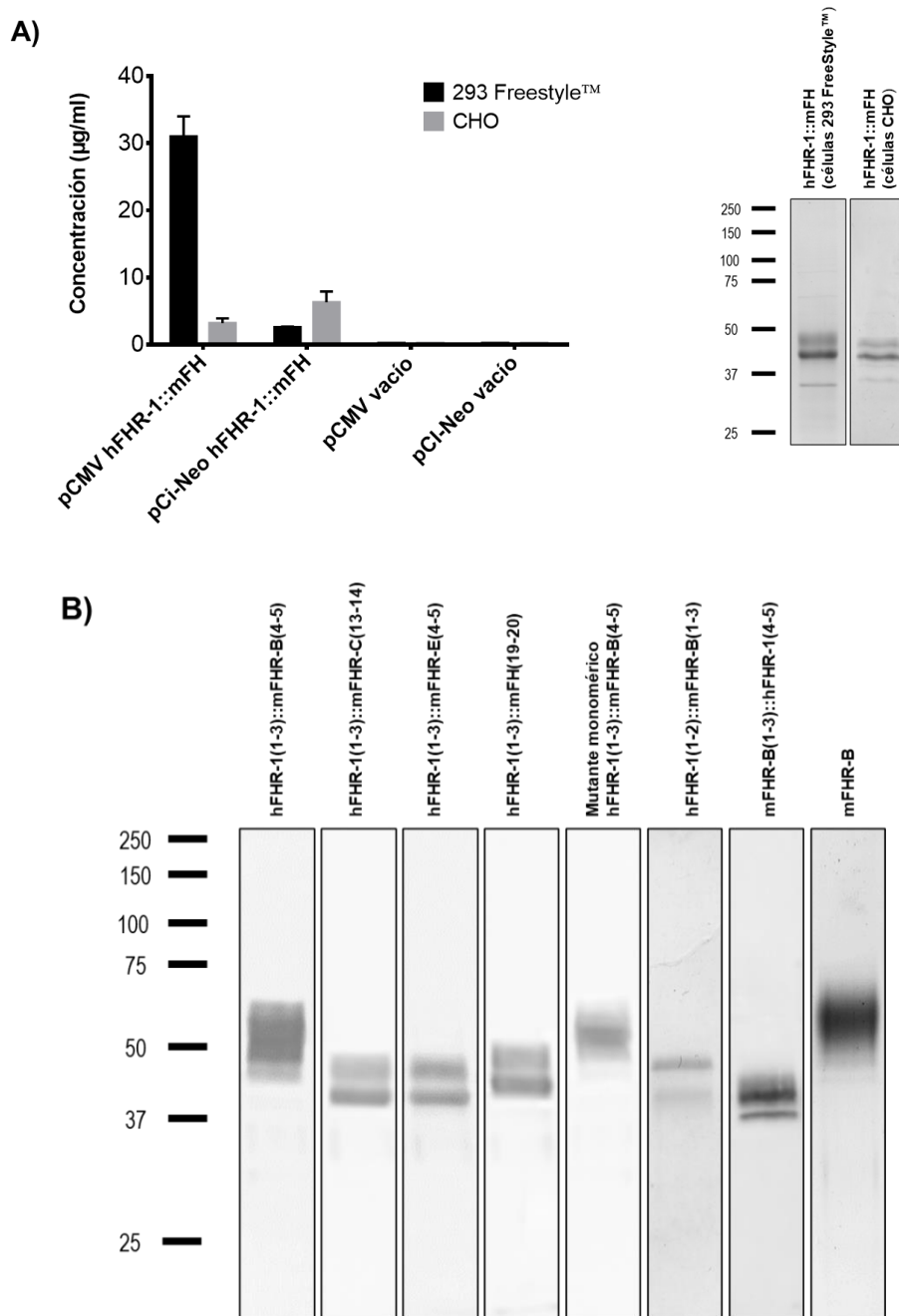


Figura 16. **A)** Resultados de expresión de la proteína de referencia hFHR-1(1-3)::mFH(19-20) en células CHO y en células HEK293 FreeStyle™. Las proteínas purificadas en los sistemas son equivalentes en cuanto a tamaño en un gel SDS-PAGE. **B)** Tinción con azul de Coomassie de todas las proteínas recombinantes producidas y utilizadas en los ensayos funcionales y estructurales.

5.5 Purificación de C3 y C3b de ratón

Se purificó C3 de ratón a partir de plasma-EDTA de ratones C57BL/6 siguiendo el protocolo descrito en Ruseva & Heurich, 2014. En primer lugar, se añade politetilenglicol (PEG) disuelto al 20% en tampón MonoQ-A (KH_2PO_4 10mM, EDTA 5mM, benzamidina 1mM, pH 7,8) al plasma-EDTA hasta una concentración del 4%. Esta disolución se centrifuga 15 minutos a 17000g a 4°C y se descarta el pellet. Se añade más PEG al 20% hasta una concentración final del 15% y la disolución se mezcla durante 1 hora a 4°C. Esta disolución se centrifuga de nuevo y el precipitado se resuspende al volumen original de plasma en tampón MonoQ-A. Se equilibra una columna MonoQ® 5/50GL (GE Healthcare, #GE17-5166-01) con tampón MonoQ-A y se pasa la muestra. Con un gradiente de elución hasta el 50% con tampón MonoQ-B (NaCl 1M, KH_2PO_4 10mM, EDTA 5mM, benzamidina 1mM, pH 7,8) se eluye la muestra y las fracciones que contienen C3 se dializan frente al tampón MonoS-A (fosfato sódico 20mM, pH 6,0). Se equilibra una columna MonoS® 4.6/100PE (GE Healthcare, #GE17-5180-01) con tampón MonoS-A y se pasa la muestra. Con un gradiente de elución hasta el 50% con tampón MonoS-B (NaCl 1M, fosfato sódico 20mM, pH 6,0). El C3 eluido de la columna se gel-filtra utilizando la columna de exclusión molecular Superdex® 200 10/300 GL (GE Healthcare, #GE17-5175-01).

Para producir C3b, parte del C3 purificado se digiere con FH de ratón y FD humano (por cada 1µg de C3, 0,75µg de FB y 0,3ng de FD) en presencia de MgCl_2 5mM durante 1 hora a 37°C. Prácticamente todo el C3 se corta a C3b, lo que es indicador de una presencia mínima residual de C3(H₂O) en la preparación de C3.

Ambas proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE tiñendo con azul de Coomasie.

5.6 Ensayos hemolíticos

La actividad funcional de las proteínas recombinantes fue testada mediante ensayos hemolíticos con eritrocitos de cobaya (TCS Biosciences, #PB029) y eritrocitos de carnero (Durviz, #RSS0001). Las células fueron lavadas varias veces con tampón VBS-EGTA (barbital 2,5mM, barbital sódico 1,5mM, NaCl 145mM, MgCl_2 27mM, y EGTA 10mM, pH 7,4). Se incubó un volumen de eritrocitos durante 1 hora en un baño a 37°C con suero de ratón C57BL/6, con o sin proteínas recombinantes. Los blancos se prepararon en un tampón VBS-EDTA (barbital 2,5mM, barbital sódico 1,5mM, NaCl 145mM, y EDTA 20mM, pH 7,4). Tras la incubación, se paró la reacción con tampón VBS-EDTA. La suspensión de

eritrocitos se centrifugó durante 5 minutos a 3000g a 4°C, y la absorbancia del sobrenadante se midió a 414nm.

5.7 Ultracentrifugación analítica (AUC)

Para estudiar la estructura cuaternaria analizamos la velocidad de sedimentación de diferentes proteínas mediante AUC, como se describe en Val-Calvo *et al*, 2018. Se cargaron las muestras de proteína en PBS (320µl) en cubetas de 12mm. Para los ensayos de desnaturalización, se procedió a la diálisis con glicina 100mM, 100mM, NaCl 150mM, pH 2,5 o NH₄OH 150mM, NaCl 150mM, pH 10,5. Los ensayos se llevaron a cabo a 48.000 rpm en una ultracentrifugadora analítica XL-I (Beckman-Coulter) equipada con sistemas de detección de absorbancia UV-VIS e interferencia Raleigh, y con un rotor An-50Ti. Se registró la interferencia Raleigh y la absorbancia a 230nm y 260nm de los perfiles de sedimentación. Se analizó la distribución de los coeficientes diferenciales de sedimentación aplicando el método de mínimos cuadrados a los datos de velocidad de sedimentación (SV) utilizando el modelo de Lamm c(s) de distribución continua, como se implementó por SEDFIT (Schuck, 2000). La AUC se realizó en el Laboratorio de Interacciones Moleculares (CIB-CSIC), AENOR ER-0286/2009.

5.8 Ensayos de unión y competición por ELISA

Para los ensayos de unión, se sembraron placas de poliestireno de fondo plano 96 pocillos (Corning, #3590) a 4°C durante la noche con 50µl en cada pocillo con los distintos antígenos (i.e. C3 y C3b nativo purificado, tanto de humano como de ratón o FHR-B de ratón) en tampón PBS. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tris 50mM, NaCl 150mM y 0,2% Tween 20) y se bloquearon con tampón de lavado con 1% BSA a RT durante 1 hora. Las placas se lavaron de nuevo antes de añadir las proteínas cuya unión se quiere valorar. Estas proteínas se añaden diluidas en tampón de lavado con 1% BSA y se incuban durante 1 hora a RT. Se lavaron las placas antes de añadir los anticuerpos primarios. Se usaron distintos anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal en ratón anti-FHR-1 2C6 marcado con biotina a una dilución 1/5000, anticuerpo monoclonal en ratón anti-FH de ratón 2A5 marcado con biotina a una dilución 1/500, un anticuerpo policlonal en conejo anti-FHR-B de ratón 1/5000 o un anticuerpo anti-C3 de ratón

marcado con HRP diluido 1/25000 que se revela directamente. Estos anticuerpos se diluyen en tampón de lavado con 1% BSA, y se incuban durante 1 hora a RT. Las placas fueron lavadas e incubadas durante 30 minutos a RT con distintos anticuerpos secundarios o reactivos: estreptavidina conjugada con HRP o un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (DAKO, #P044801-2). Por último, las placas se revelaron durante 3 minutos con una de solución TMB, y se procedió a detener la reacción con de ácido sulfúrico 0,1M. Se determinaron los valores de densidad óptica a longitud de onda 450 nm.

Para los ensayos de competición, se sembraron placas de poliestireno de fondo plano 96 pocillos a 4°C durante la noche con 50µl del antígeno C3b de ratón nativo purificado en tampón PBS. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y se bloquearon con tampón de lavado con 1% BSA a RT durante 1 hora. Las placas se lavaron de nuevo antes de añadir las proteínas utilizadas, siendo estas FH de ratón nativo, FHR-B recombinante o la proteína híbrida con el dominio C-terminal de FHR-B, hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5). Estas proteínas se añaden diluidas en tampón de lavado con 1% BSA y se incuban durante 1 hora a RT. Se lavaron las placas antes de añadir los anticuerpos primarios. Se usaron distintos anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal en ratón anti-FHR-1 2C6 marcado con biotina a una dilución 1/5000, anticuerpo monoclonal en ratón anti-FH de ratón 2A5 marcado con biotina a una dilución 1/500 o un anticuerpo policlonal en conejo anti-FHR-B de ratón 1/5000. Estos anticuerpos se diluyen en tampón de lavado con 1% BSA, y se incuban durante 1 hora a RT. Las placas fueron lavadas e incubadas durante 30 minutos a RT con distintos anticuerpos secundarios o reactivos: estreptavidina conjugada con HRP o un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP. Por último, las placas se revelaron durante 3 minutos con una de solución TMB, y se procedió a detener la reacción con de ácido sulfúrico 0,1M. Se determinaron los valores de densidad óptica a longitud de onda 450 nm.

5.9 Ensayos de inmunofluorescencia

Los riñones de ratones C57BL/6 *Cfh/Cfhr* *-/-* fueron cedidos por el laboratorio de Mathew Pickering (*Imperial College* de Londres). Además, se extrajeron riñones de ratones C57BL/6 *wild-type* y de C57BL/6 *Cfh* *-/-*, que se lavaron con PBS. Posteriormente se sumergieron en Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura, #4583) y los bloques fueron congelados inmediatamente después en un baño de isopentano enfriado con hielo seco. Los bloques se mantuvieron a -80°C hasta realizar cortes de criostato de 5µm a -18°C (Leica CM 1800), que fueron colocados en portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Scientific,

#J1800AMNZ). Los portaobjetos se mantuvieron a -20°C durante no más de dos horas hasta poder continuar el protocolo de inmunofluorescencia ese mismo día. Una vez se retomó el protocolo, se atemperaron las muestras, se lavaron con PBS durante cinco minutos a RT, y se fijaron con acetona a -20°C durante diez minutos. Se marcó el borde de las preparaciones con un rotulador histológico hidrofóbico Immedge™ (Vector Laboratories, #NC9545623) con el objetivo de reducir la superficie de las muestras y los volúmenes utilizados antes de lavarlas con PBS de nuevo. A partir de este punto, se realizaron los diferentes experimentos como se describen a continuación:

Para el experimento de unión de proteínas, los cortes de tejido se trataron con de neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Sigma-Aldrich, #N2876-25UN) diluida 10U/ml en PBS durante 90 minutos a 37°C, después de lo cual se lavaron con PBS. Los controles se incuban en las mismas condiciones con PBS. A continuación. Se añadieron 50µl de diferentes proteínas diluidas en PBS 1% BSA durante 40 minutos a RT. En los experimentos en los que no se estudiaba el efecto de la neuraminidasa, las proteínas se incubaron directamente. Después de lavar con PBS, se procedió al bloqueo con PBS 3% BSA durante veinte minutos a RT. Además, se utilizó el kit de bloqueo para biotina Biotin Blocking System (DAKO, #X0590). Las proteínas híbridas se detectaron con un anticuerpo monoclonal anti-FHR-1 2C6 conjugado con biotina diluido 1/200, y el FHR-B se detectó con el anticuerpo policlonal anti-FHR-B de ratón diluido 1/2000, ambas diluciones en PBS 1% BSA e incubadas durante 40 minutos a RT. Después de aclarar con PBS, se reveló con estreptavidina-Alexa488 diluida 1/1000 o con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Alexa488 diluido 1/2000, ambas diluciones en PBS 1% BSA e incubadas durante 40 minutos a RT. Finalmente, las secciones de tejido se montaron con Mowiol®.

Para detectar el FHR-B endógeno o el depósito de C3 endógeno, bloqueamos los cortes con PBS 3% BSA durante veinte minutos a RT. Después de lavar, se detectó el FHR-B con el anticuerpo policlonal anti-FHR-B de ratón diluido 1/2000 en PBS 1% BSA incubando durante 40 minutos a RT. Después de lavar se incubó con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Alexa488 diluido 1/4000 en PBS 1% BSA durante 40 minutos a RT. El depósito de C3 se detectó con un anti-C3 de ratón conjugado con FITC diluido 1/2000 en PBS 1% BSA incubando durante 40 minutos a RT. Por último, las secciones de tejido se montaron con Mowiol®.

Para el experimento de activación de complemento sobre glomérulos, se preparó una dilución al 10% de suero humano deplecionado completamente de FHR-1, FHR-2 y FHR-5 y deplecionado al 75% de FH en tampón VBS-EGTA (barbital 2,5mM, barbital sódico 1,5mM, NaCl 145mM, MgCl 27mM, y EGTA 10mM, pH 7,4). A esta dilución de suero se le añadió también una cantidad suficiente de FH humano (0,25µg/ml) para evitar una activación inespecífica de complemento. Se

añadió también FHR-B a distintas concentraciones, o un exceso de FH humano (1 μ M) o EDTA (20mM) como controles de la activación de la VA. Estas mezclas se incubaron sobre los cortes 30 minutos a 37°C. Después de lavar con PBS, la biotina endógena se bloquea con el kit Biotin Blocking System (DAKO, #X0590). Tras lavar, se detectó el FHR-B con el anticuerpo policlonal anti-FHR-B de ratón diluido 1/2000 en PBS 1% BSA incubando durante 40 minutos a RT. Después de lavar se incubó con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Alexa488 diluido 1/4000 en PBS 1% BSA durante 40 minutos a RT. El depósito de C3 humano se detectó con el anticuerpo monoclonal anti-C3 humano (que no reconoce C3 de ratón) 12.17 conjugado con biotina diluido 1/200 en PBS 1% BSA incubando 40 minutos a RT. Después de lavar se incubó con estreptavidina-Alexa488 diluida 1/1000 en PBS 1% BSA durante 40 minutos a RT. Por último, las secciones de tejido se montaron con Mowiol®.

Se tomaron fotos de todos los experimentos con un microscopio de fluorescencia. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa ImageJ.

5.10 Ensayos de actividad cofactora

Para testar la actividad cofactora de la proteína FHR-B de ratón, se realizó un ensayo proteolítico de C3b en fase fluida usando proteínas purificadas modificando el experimento descrito en Martínez-Barricarte *et al*, 2010. En este ensayo, se usó C3b humano a 270nM, FI humano a 40nM y FHR-B a distintas concentraciones diluidas en tampón HBS (HEPES 20mM, NaCl 150nM, pH 7,5) e incubadas a 37°C durante 45 minutos.

Para testar la actividad sinérgica de FHR-B sobre la actividad cofactora de FH, se siguió el mismo protocolo descrito, añadiendo a la mezcla distintas cantidades de FH (25nM, 7nM y 3,5nM).

El resultado de la proteólisis de C3b en los distintos ensayos se analizó mediante SDS-PAGE del producto de la digestión, tiñendo con azul de Coomasie. Se analizó la proteólisis de la cadena α' de C3b y la generación del fragmento proteolítico α'_{43} , así como la cantidad de cadena β de C3b mediante densitometría de las bandas usando el programa Image Lab™ asociado al lector de geles Chemidoc™ (Biorad).

5.11 Análisis por WB de las proteínas humanas con el anticuerpo anti-FHR-B

Se analizaron sueros y proteínas recombinantes humanas por WB tras SDS-PAGE con el anticuerpo policlonal anti-FHR-B de ratón desarrollado en el laboratorio siguiendo la metodología ya descrita. En este experimento se utilizó un suero humano normal y un suero homocigoto control para la delección Δ CFHR3-CFHR1, así como las proteínas recombinantes FHR-3 y FHR-1 humano purificadas.

5.12 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con las herramientas estadísticas del programa GraphPad Prism 6. Se llevaron a cabo análisis ANOVA de un factor, eligiendo como límite de la significación un p-valor $\leq 0,05$.

5.13 Análisis filogenético

Para los análisis filogenéticos se obtuvieron las secuencias de las proteínas de la familia de FH humanas y de ratón de la base de datos online Uniprot (accesible a través de <https://www.uniprot.org>). Como control, se incluyeron en el análisis las secuencias de la proteína C4bp humana y de ratón. Las secuencias se alinearon usando el software online MAFFT (accesible a través de <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), lo cual generó un árbol filogenético previo. Los alineamientos generados se analizaron con el software online específico IqTree (accesible a través de <http://www.iqtree.org/>), que infiere árboles filogenéticos a partir de un alineamiento mediante un algoritmo estocástico usando una estimación por máxima verosimilitud con 10000 ciclos de *bootstrapping*. Los datos se representaron utilizando el software FigTree (accesible a través de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), que representa gráficamente árboles filogenéticos.

6. RESULTADOS

6.1 Detección de proteínas FHR presentes circulando en plasma en el ratón.

Existen cinco genes de proteínas FHR en el ratón y hay evidencia de que tres de ellos se expresan: FHR-B, FHR-C y FHR-E. Se ha demostrado que FHR-B y FHR-A compiten la regulación por FH, aunque no existe evidencia de la expresión de FHR-A. Para averiguar qué proteínas FHR de ratón se encuentran circulando en plasma, se diseñó el siguiente experimento para identificarlas.

Usando una columna de inmunoafinidad con el anticuerpo policlonal anti-FH desarrollado en el laboratorio y aprovechando la reactividad cruzada de este anticuerpo con las proteínas FHR, se purificó el conjunto de FHR a partir de un suero de ratón C57BL/6 *Cfh*^{-/-}. Se llevó a cabo una identificación completa de las proteínas eluidas de la columna mediante espectrometría de masas nLC-MS/MS (**Figura 17.A**). De esta manera, se identificaron péptidos de tres proteínas de la familia de FH de ratón: FHR-B, FHR-C y FHR-E. No se detectaron péptidos correspondientes a la proteína FHR-A de ratón. Además, se identificaron otras proteínas en el eluido de la columna. Para investigar más a fondo por qué aparecen estas proteínas inespecíficas diseñamos un experimento control, en el que usamos una columna de inmunoafinidad montada en el laboratorio inmovilizando un anticuerpo control policlonal desarrollado en conejo contra una proteína humana no relacionada con el sistema del complemento. Las proteínas eluidas de esta columna se analizaron de la misma forma (**Figura 17.B**). De ambos experimentos sólo se muestran las trece proteínas con mejor *score* Mascot. Gracias a este experimento podemos discernir las reactividades específicas del anticuerpo anti-FHR-B en el primer experimento de los contaminantes inespecíficos que se unen a la matriz de la columna. Estas proteínas contaminantes son mayoritariamente proteínas abundantes del suero como inmunoglobulinas o albúmina. C1q aparece como contaminante en ambos experimentos, lo que se explica por la propia función de la proteína al unirse a los complejos antígeno-anticuerpo. Hay que destacar que en el primer experimento también se detectan C3, C4b y properdina de manera específica. En la **Figura 17.C** se muestra un esquema de la localización y cobertura de los péptidos identificados de las proteínas FHR-B, FHR-C y FHR-E, así como la cobertura total de la proteína.

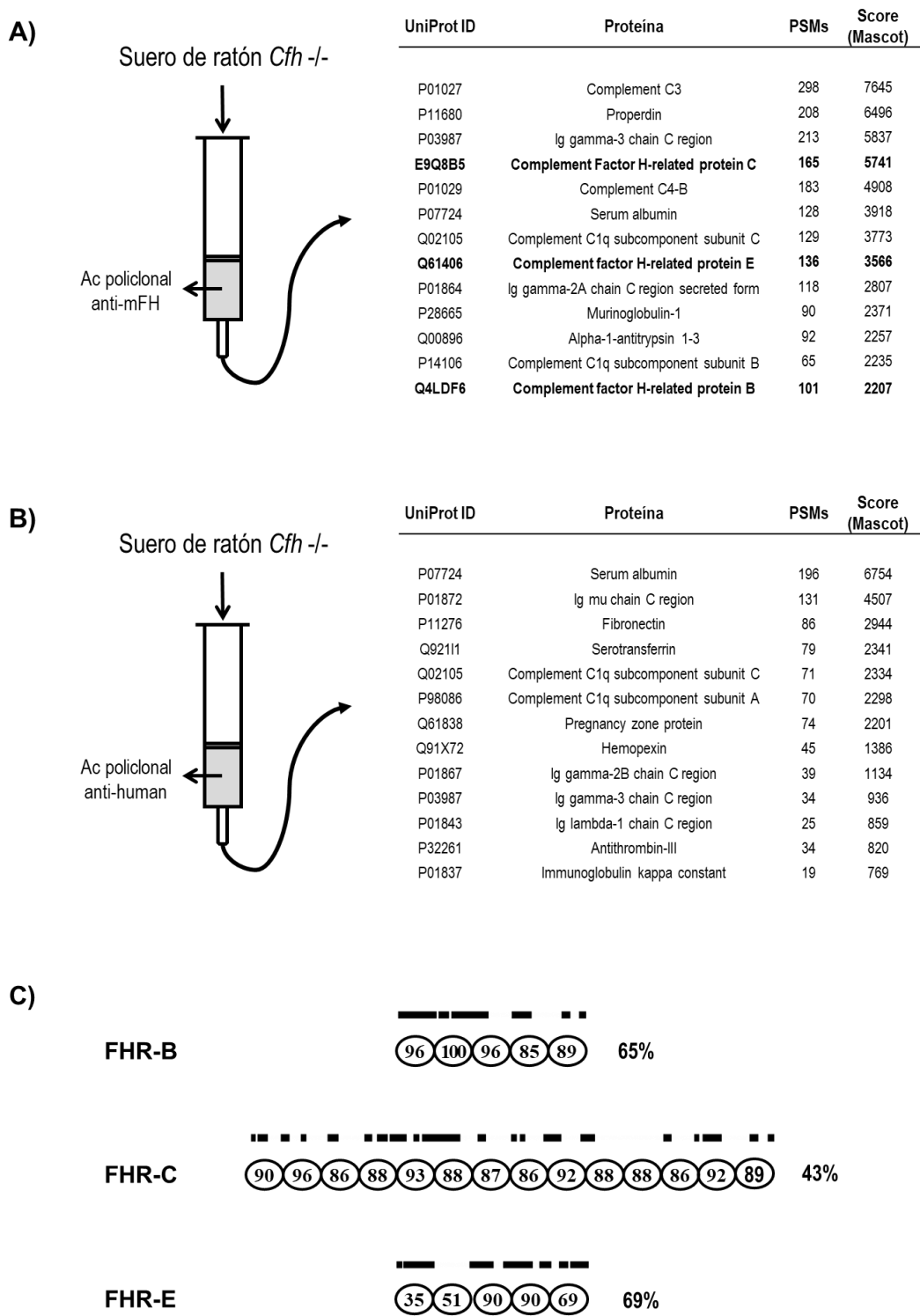


Figura 17. **A)** Identificación por nLC-MS/MS de las proteínas eluidas al pasar un suero de ratón *Cfh*^{-/-} por una columna de inmunoafinidad con un anticuerpo policlonal anti-FH de ratón. Se presentan las proteínas con mayor *Score*. **B)** Identificación por nLC-MS/MS de las proteínas eluidas al pasar un suero de ratón *Cfh*^{-/-} por una columna control. Se presentan las proteínas con mayor *Score*. **B)** esquema de la localización y cobertura de los péptidos identificados de las proteínas FHR-B, FHR-C y FHR-E, así como la cobertura total de la proteína.

En resumen, se identificaron péptidos correspondientes a las proteínas de ratón FHR-B, FHR-C y FHR-E en el plasma de ratón. Los péptidos identificados para cada proteína tienen una cobertura alta de la proteína total. Por primera vez se identifica FHR-E presente en sangre de ratón. A pesar de que FHR-A es el que tiene mayor identidad de secuencia con FH, no se encontraron péptidos correspondientes a esta proteína en ninguno de los experimentos. La presencia de estas proteínas en otros tejidos no se ha estudiado, aunque las proteínas solubles del sistema del complemento son plasmáticas.

6.2 Ensayos hemolíticos

Para testar la capacidad de regular o desregular complemento de las distintas proteínas recombinantes diseñadas, se realizaron diferentes ensayos hemolíticos de la VA sobre distintas células. En estos ensayos se prueba la capacidad que tiene una proteína de modular la actividad hemolítica del complemento inherente en el suero de ratón a través de la VA.

6.2.1 Función de los dominios C-terminal de las proteínas FHR de ratón:

En un primer ensayo, se testaron las proteínas híbridas diseñadas con el dominio N-terminal (SCRs 1, 2 y 3) de FHR-1 humano y el dominio C-terminal (últimos dos SCRs) de FH, FHR-B, FHR-C y FHR-E. Se usó suero lítico obtenido de ratones C57BL/6 *wild-type* y se tituló la lisis que produce sobre eritrocitos de cobaya. El complemento de ratón no reconoce los eritrocitos de cobaya como una superficie propia debido a los marcadores de superficie presentes en estas células y los lisa de una manera dosis-dependiente a la cantidad de suero utilizado. Este contexto es útil para probar la capacidad moduladora del complemento de las proteínas ya que nos permite obtener un punto de partida en el que la lisis de los eritrocitos es parcial, de modo que se pueden observar tanto la regulación como la desregulación de la actividad lítica del complemento. En la **figura 18.A** se presenta esta titulación con el suero y el punto elegido para el siguiente ensayo. Por lo tanto, para los siguientes ensayos se utiliza un 15% de suero de ratón para partir de un punto de lisis de los eritrocitos alrededor del 30%. En la **figura 18.B** se presentan los resultados del ensayo hemolítico probando las proteínas híbridas. Se observa que sólo las proteínas con el dominio C-terminal de FH y de FHR-B de ratón son capaces de desregular el complemento y aumentar la actividad lítica. Con la

proteína con el C-terminal de FH de ratón se alcanza una lisis máxima de aproximadamente el 80% a una concentración de $1\mu\text{M}$, alcanzándose prácticamente la lisis máxima a una concentración de 250nM . Con la proteína con el C-terminal de FHR-B de ratón se alcanza una lisis máxima de aproximadamente el 90% a una concentración de $1\mu\text{M}$, alcanzándose prácticamente la lisis máxima a una concentración de 125nM ; la mitad que para la proteína con el C-terminal de FH de ratón. El dominio C-terminal de FHR-B de ratón tiene un efecto desregulador muy potente; más incluso que el que proporciona el C-terminal de FH.

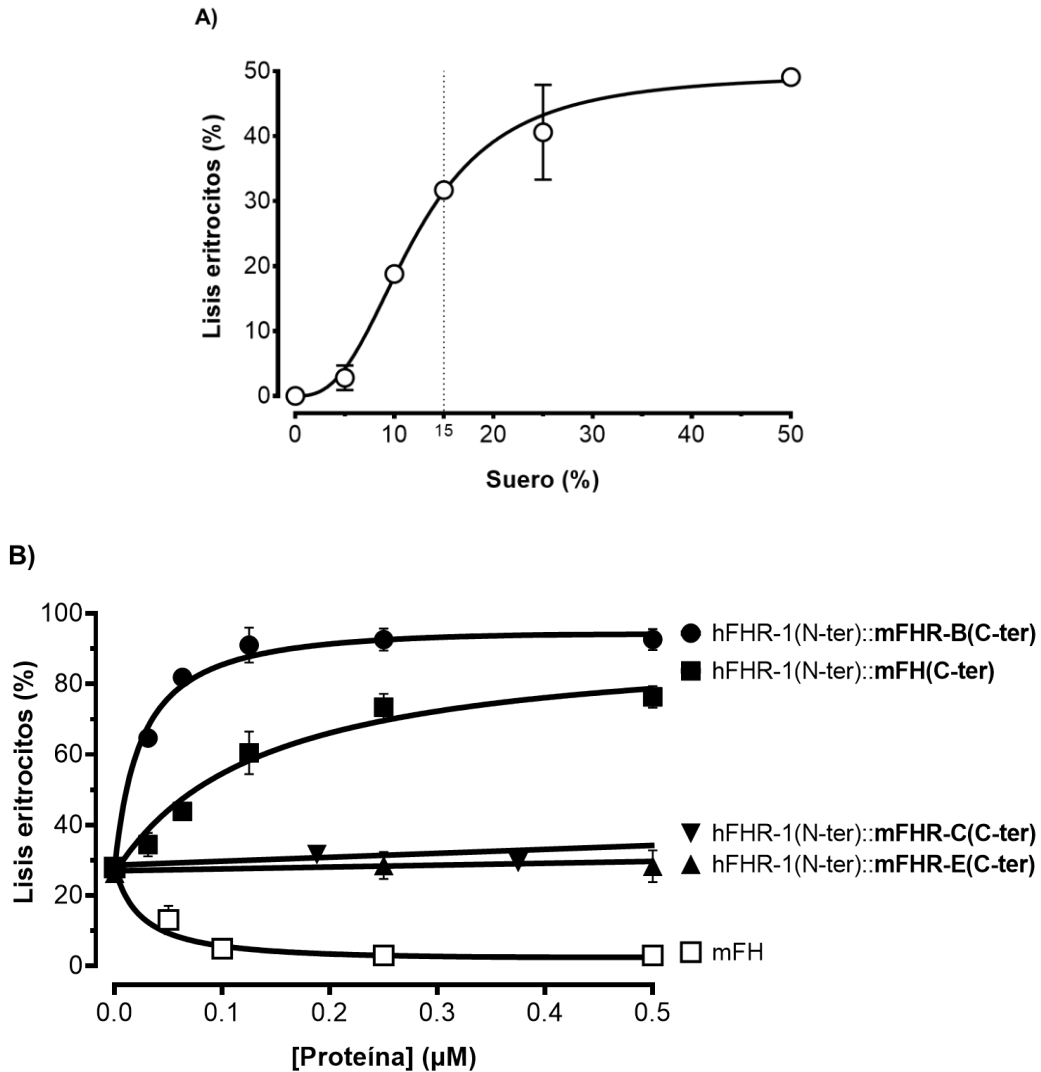


Figura 18. A) Titulación de un suero de ratón C57BL/6 *wild-type* sobre eritrocitos de cobaya en un ensayo de valoración de la VA. B) Efecto desregulador de las proteínas híbridas con el C-terminal de las proteínas de la familia de FH de ratón sobre la hemólisis producida por un 15% de suero de ratón C57BL/6 *wild-type* sobre eritrocitos de cobaya en un ensayo de la VA.

Las proteínas híbridas con el C-terminal de FHR-C y FHR-E no tienen capacidad de modular la actividad del complemento, ya que no se observa ningún efecto sobre la lisis a ninguna concentración. Nótese que para FHR-C se usó un punto de concentración máxima a 1,5 μ M que no se muestra en la figura. Se utilizó también FH y se observa que la actividad lítica sobre estas células está regulada por esta proteína, ya que se reduce la lisis al 0% con tan solo 125nM de FH. Se utilizó tanto FH de ratón como FH humano pero su actividad es equivalente.

En otro ensayo se testaron las mismas proteínas y el mismo suero sobre eritrocitos de carnero. El complemento de ratón reconoce los eritrocitos de carnero como una superficie propia debido a los marcadores de superficie presentes en estas células y no lisa a ningún porcentaje de suero utilizado. En la **figura 19** se presentan los resultados del ensayo hemolítico probando las proteínas híbridas. De nuevo, se observa que sólo las proteínas con el dominio C-terminal de FH y de FHR-B son capaces de desregular el complemento y aumentar la actividad lítica. Con la proteína con el C-terminal de FH de ratón se alcanza una lisis máxima de aproximadamente el 50% a una concentración de 1 μ M. Con la proteína con el C-terminal de FHR-B de ratón se alcanza una lisis máxima de aproximadamente el 80% a una concentración de 1 μ M. Para el punto de concentración de 0,5 μ M, el efecto desregulador del C-terminal de FHR-B de ratón es de más del doble que el del C-terminal de FH (60% de lisis frente al 25%). De nuevo se observa que el dominio C-terminal de FHR-B de ratón tiene un efecto desregulador muy potente; de nuevo este efecto es mayor que el que proporciona el C-terminal de FH. Las proteínas híbridas con el C-terminal de FHR-C y FHR-E no tienen capacidad de modular la actividad del complemento, ya que no se observa ningún efecto sobre la lisis a ninguna concentración.

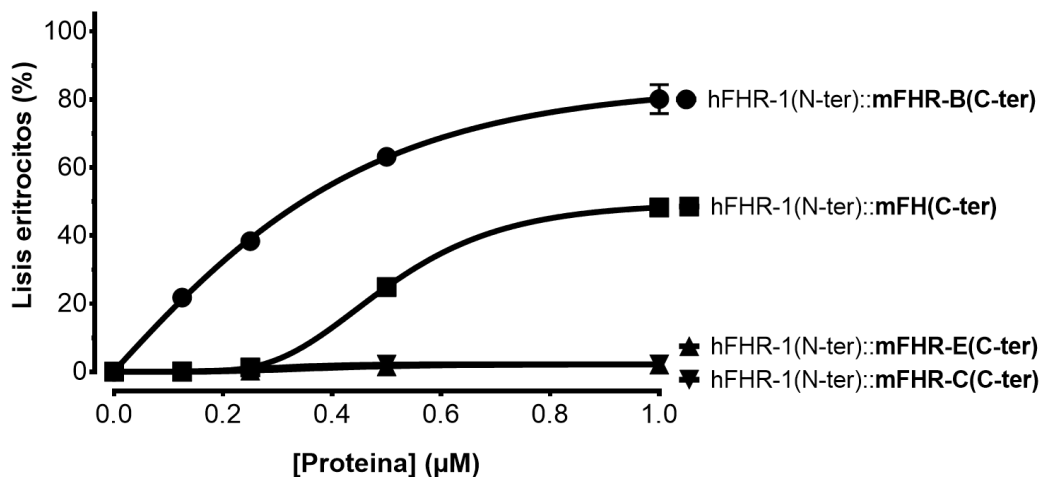


Figura 19. Efecto desregulador de las proteínas híbridas con el C-terminal de las proteínas de la familia de FH de ratón sobre la hemólisis producida por un 15% de suero de ratón C57BL/6 *wild-type* sobre eritrocitos de carnero en un ensayo de la VA.

6.2.2 Competición de la función de FH de las proteínas híbridas desreguladoras

En otra serie de ensayos, se probó la capacidad que tiene FH de competir la desregulación producida por las proteínas híbridas hFHR-1(1-3)::mFH(19-20) y hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5) y revertir a una situación de control de la actividad del complemento sobre eritrocitos tanto de cobaya como de carnero. En la **figura 20.A** se observa de nuevo como sobre eritrocitos de cobaya el FH reduce la lisis inicial producida por un 15% de suero de ratón, mientras que las proteínas híbridas la aumentan. La concentración utilizada de cada una de las proteínas depende de su efecto desregulador, de modo que para la híbrida con el C-terminal del FHR-B de ratón la cantidad necesaria para tener una lisis equivalente de entre el 60% y el 80% es menor (250nM para el C-terminal de FH y 100nM para el C-terminal de FHR-B de ratón). En este escenario de lisis aumentada, FH es capaz de regular el efecto desregulador de complemento de hFHR-1(1-3)::mFH(19-20) y hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5), reduciendo la lisis de un 60-80% a un 20-25% a 100nM.

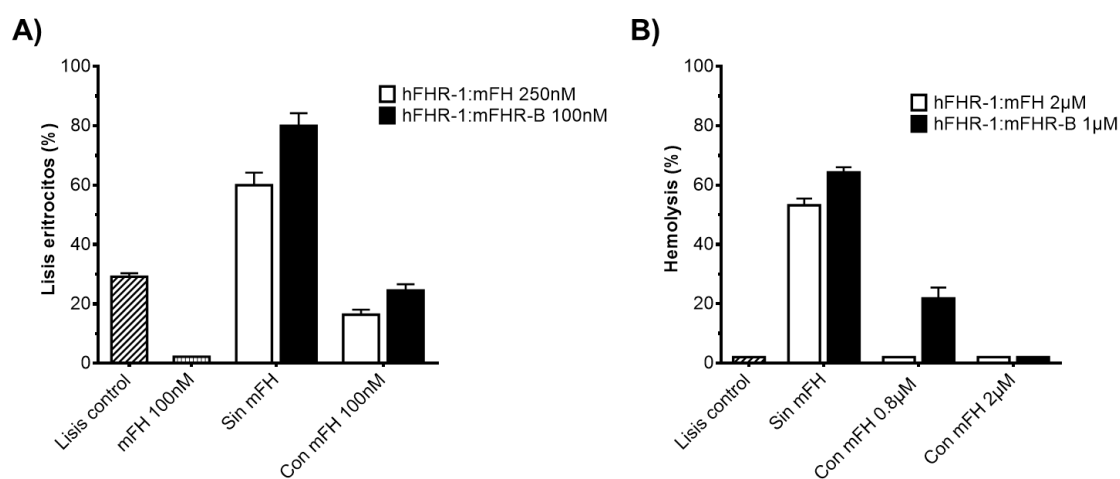


Figura 20. A) Efecto del FH de ratón sobre la desregulación producida por las proteínas híbridas con el C-terminal de las proteínas de la familia de FH de ratón sobre la hemólisis producida por un 15% de suero de ratón C57BL/6 *wild-type* sobre eritrocitos de cobaya en un ensayo de la VA. **B)** Efecto del FH de ratón sobre la desregulación producida por las proteínas híbridas con el C-terminal de las proteínas de la familia de FH de ratón sobre la hemólisis producida por un 15% de suero de ratón C57BL/6 *wild-type* sobre eritrocitos de carnero en un ensayo de la VA.

En la **figura 20.B** se observa de nuevo como sobre eritrocitos de carnero no hay lisis inicial producida por un 15% de suero de ratón, pero sí como las proteínas

híbridas la aumentan. El FH de ratón tiene un efecto regulador mucho más fuerte sobre la desregulación producida por el C-terminal de ella misma que sobre la desregulación producida por el C-terminal del FHR-B de ratón. Con el C-terminal de FH de ratón se pasa de un 55% de lisis producida por 2 μ M de la proteína a un 0% usando 0,8 μ M de FH, mientras que para el C-terminal de FHR-B de ratón se pasa de un 65% de lisis producida por 1 μ M de la proteína a un 20% usando la misma cantidad de FH. Al igual que sobre eritrocitos de cobaya, FH es capaz de regular el efecto desregulador de complemento que tienen estas dos proteínas.

6.2.3 Efecto de los diferentes dominios de FHR-B de ratón en la función desreguladora:

Se diseñó otro ensayo hemolítico sobre eritrocitos de cobaya para comprobar que influencia tienen cada uno de los dominios N-terminal y C-terminal de FHR-B en el efecto desregulador de complemento de la molécula. Utilizando de nuevo la lisis producida por un 15% de suero de ratón como punto inicial, se comprobó el efecto que tenían las proteínas híbridas hFHR-1(1-3)::mFHR-B(1-3) y hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5). En la **figura 21** se observa que, al contrario que con la molécula con el C-terminal de FHR-B, no se detecta efecto desregulador para la molécula con el N-terminal de FHR-B de ratón. Este efecto desregulador de complemento está conferido únicamente por el dominio C-terminal.

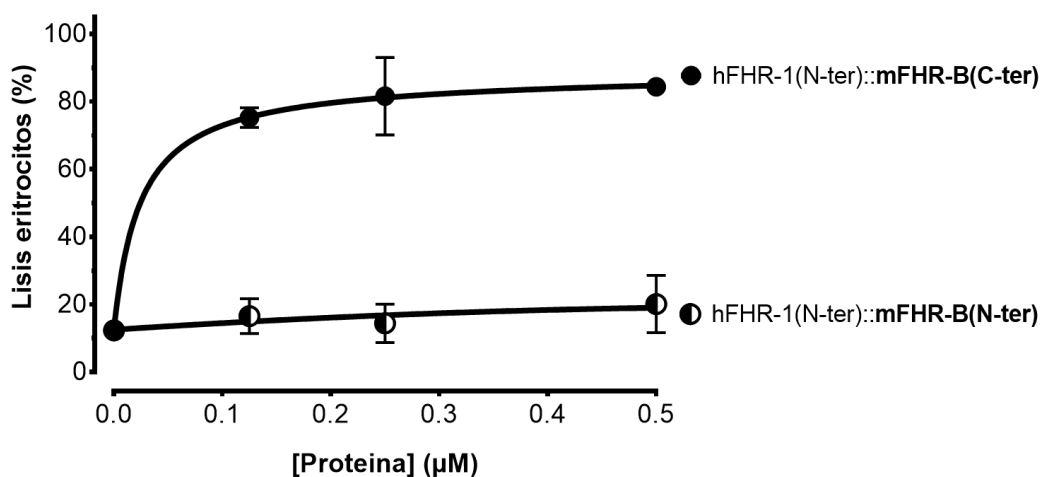


Figura 21. Efecto desregulador de los diferentes dominios de FHR-B de ratón sobre la hemólisis producida por un 15% de suero de ratón C57BL/6 *wild-type* sobre eritrocitos de cobaya en un ensayo de la VA.

6.2.4 Función desreguladora de la proteína híbrida FHR-B dimérica, monomérica y la proteína completa:

Se diseñó otro ensayo hemolítico sobre eritrocitos de cobaya para comprobar el efecto que tiene la molécula completa de FHR-B y compararla con la dos proteínas con el dominio C-terminal desregulador de FHR-B. una siendo dimérica y otra monomérica. De esta manera se puede discernir si la proteína completa tiene un efecto desregulador similar al dímero o al monómero. Utilizando de nuevo la lisis producida por un 15% de suero de ratón como punto inicial, se comprobó el efecto que tenía la proteína FHR-B de ratón y las proteínas híbridas hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5) en su forma dimérica original y en forma monomérica (al llevar mutaciones en los residuos que forman la dimerización en el SCR1 en el dominio N-terminal del FHR-1 humano). En la **figura 22** se observa que la proteína FHR-B completa tiene un efecto desregulador equivalente a la proteína híbrida dimérica, sobre todo a 0,25 μ M, 0,5 μ M y 1 μ M; mientras que a 125nM el efecto desregulador de la proteína completa es aproximadamente la mitad que para la proteína híbrida dimérica. Por el contrario, la proteína monomérica no tiene efecto, lo que demuestra que la estructura dimérica es necesaria para la función desreguladora de estas proteínas. Estos datos sugieren que la proteína FHR-B probablemente tenga una estructura cuaternaria dimérica y que esta sería necesaria para su función.

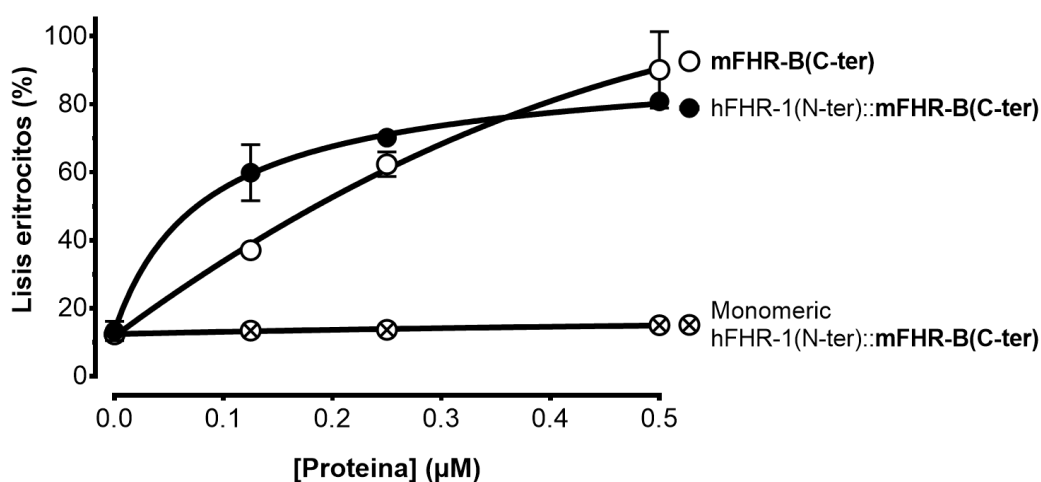


Figura 22. Efecto desregulador de la proteína híbrida FHR-B de ratón dimérica, monomérica y la proteína completa sobre la hemólisis producida por un 15% de suero de ratón C57BL/6 *wild-type* sobre eritrocitos de cobaya en un ensayo de la VA.

6.2.5 Comparación funcional entre los dominios C-terminal de FHR-B de ratón y FHR-1:

A continuación, para la búsqueda de homologías funcionales entre los FHR humanos y de ratón, se diseñaron ensayos hemolíticos sobre nuestras dos superficies de trabajo (i.e. eritrocitos de cobaya y de carnero) para comparar el efecto desregulador de la proteína FHR-B de ratón y el FHR-1 humano. En el primer experimento, representado en la **figura 23** se compara el efecto desregulador de los dominios C-terminal de FHR-1 humano y FHR-B sobre eritrocitos de cobaya; utilizando de nuevo la lisis producida por un 15% de suero de ratón como punto inicial. Se observa de nuevo que el dominio C-terminal del FHR-B de ratón tiene un gran efecto desregulador del complemento, aumentando altamente la lisis, ya que se alcanza una lisis máxima de aproximadamente el 85% a una concentración de 2 μ M, alcanzándose prácticamente la lisis máxima a una concentración de 250nM. Este efecto es mucho mayor que el efecto desregulador del FHR-1 humano sobre esta superficie a través de su C-terminal. En este caso se alcanza una lisis máxima de aproximadamente el 50% a una concentración de 2 μ M, alcanzándose prácticamente la lisis máxima a una concentración de 500nM.

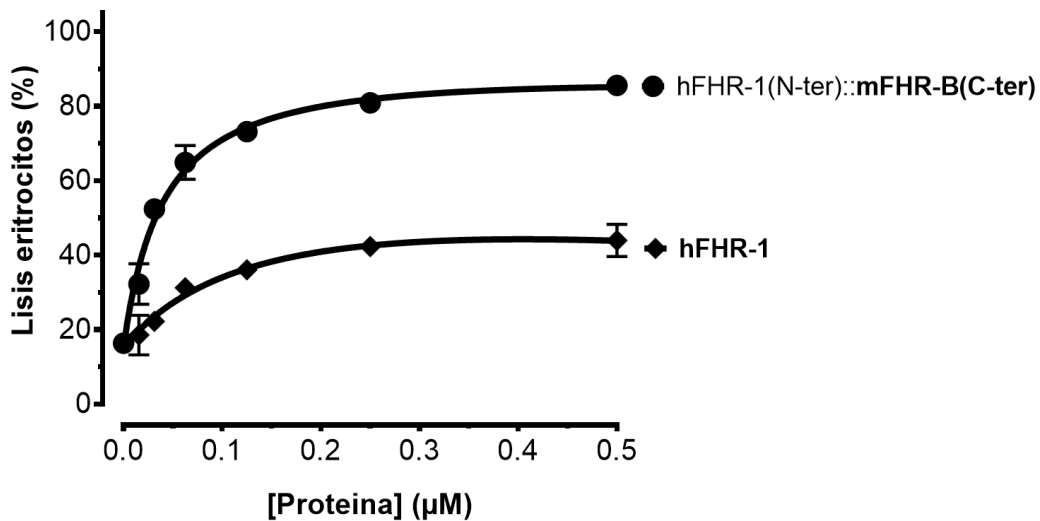


Figura 23. Efecto desregulador comparado de los dominios C-terminal de FHR-B de ratón, FH de ratón y FHR-1 humano sobre la hemólisis producida por un 15% de suero de ratón C57BL/6 *wild-type* sobre eritrocitos de cobaya en un ensayo de la VA.

En un segundo experimento, representado en la **figura 24** se compara el efecto desregulador de los dominios C-terminal de FHR-1 humano y FHR-B de ratón sobre eritrocitos de carnero; utilizando de nuevo la lisis producida por un 15% de suero de ratón como punto inicial (que en este caso es cero). Se observa de nuevo que el dominio C-terminal del FHR-B de ratón tiene un gran efecto desregulador del complemento, aumentando altamente la lisis, ya que se alcanza una lisis máxima de aproximadamente el 70% a una concentración de 2 μ M. Se observa una diferencia muy notable entre el C-terminal del FHR-B de ratón y el FHR-1 humano, ya que esta última proteína no desregula complemento sobre esta superficie a ninguna concentración. Estos datos reflejan que existe una diferencia de afinidad entre el FHR-B de ratón y el FHR-1 humano por los ligandos de superficie de eritrocitos de cobaya.

Hay que destacar que estos experimentos se repitieron en las mismas condiciones utilizando suero humano normal y los resultados obtenidos fueron equivalentes.

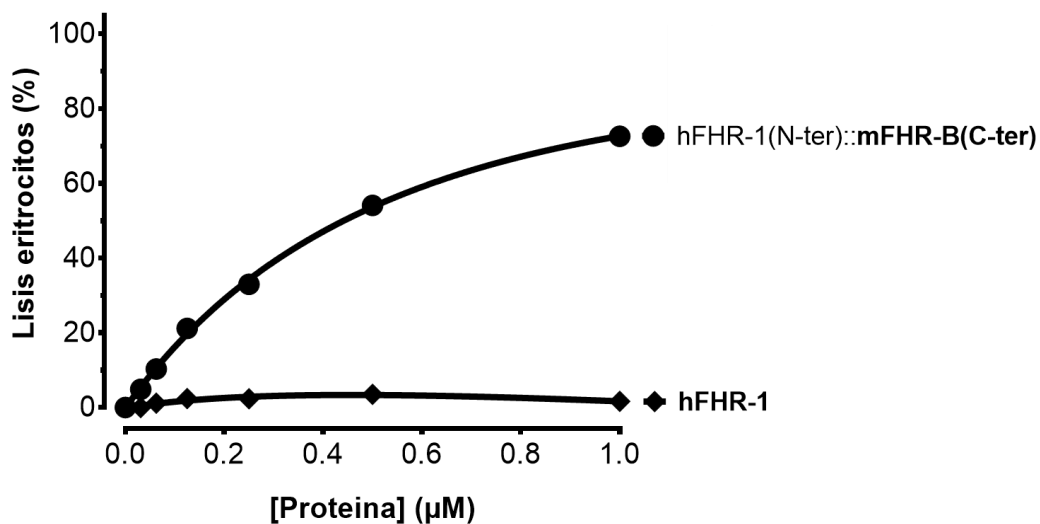


Figura 24. Efecto desregulador comparado de los dominios C-terminal de FHR-B de ratón, FH de ratón y FHR-1 humano sobre la hemólisis producida por un 15% de suero de ratón C57BL/6 *wild-type* sobre eritrocitos de carnero en un ensayo de la VA.

En resumen, estos ensayos ponen de manifiesto que FHR-B es el único FHR de ratón que tiene la capacidad de desregular complemento a través de la VA. Esta desregulación se da por la unión de esta proteína a ligandos de superficie a través del dominio C-terminal. La desregulación por FHR-B compite con la regulación de FH. El dominio N-terminal no participa en el proceso de desregulación.

Además, la dimerización de FHR-B es necesaria para que se dé la competición. Esta capacidad desreguladora de complemento sobre algunas superficies es compartida entre el FHR-B de ratón y el FHR-1 humano, aunque en el caso del FHR-B, el efecto es más fuerte y sobre más superficies que FHR-1.

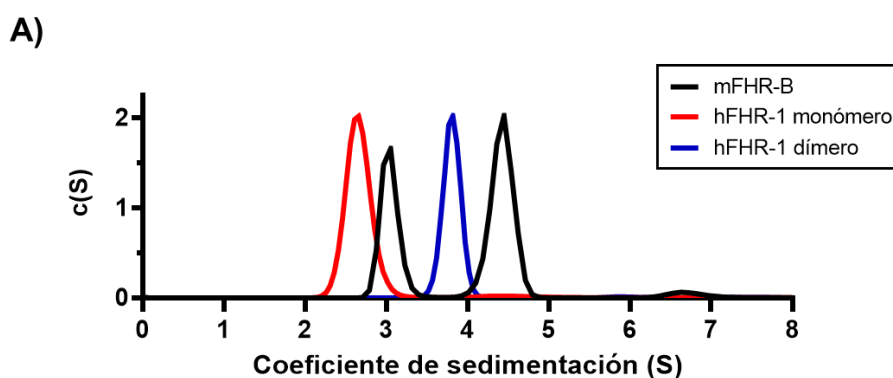
6.3 Análisis estructural mediante Ultracentrifugación Analítica

Los experimentos hemolíticos anteriores sugieren que la proteína FHR-B se encuentra en forma dimérica, pero no hay evidencia directa de este fenómeno. Para comprobar la estructura cuaternaria de la proteína FHR-B completa, se llevaron a cabo experimentos de velocidad de sedimentación mediante Ultracentrifugación Analítica (AUC), en el Servicio de Interacciones Moleculares del CIB Margarita Salas (CSIC). La AUC consiste en un conjunto de métodos que permiten la determinación del tamaño, la forma global aproximada, y el grado de homogeneidad de proteínas y otras macromoléculas biológicas en disolución. Estos métodos están especialmente adaptados para la detección y la caracterización de las interacciones que dan lugar a la formación de complejos macromoleculares (Lebowitz *et al*, 2009). En un experimento de velocidad de sedimentación las macromoléculas se someten a un campo centrífugo elevado tal que la fuerza de centrifugación es mayor que la de difusión, por lo que existe un transporte neto de material hacia el fondo de la celda. Es un método hidrodinámico de transporte que permite fraccionar las macromoléculas en base a las diferencias en coeficiente de sedimentación (una función de la masa, la densidad y la forma macromolecular). Esto nos proporciona información sobre el grado de homogeneidad o heterogeneidad de las especies macromoleculares que sedimentan.

6.3.1 Análisis de la proteína FHR-B de ratón:

En la **figura 25** se presentan los resultados del experimento de velocidad de sedimentación del FHR-B de ratón. También se analizó el FHR-1 humano y un FHR-1 mutante que contiene mutaciones en los residuos que forman la dimerización en el SCR1 en el dominio N-terminal. En la **figura 25.A** se observan dos picos correspondientes al FHR-B. En función de su coeficiente de sedimentación y de su peso molecular se determina que los picos corresponden respectivamente a una forma monomérica y a una dimérica del FHR-B de ratón. De modo que esta proteína circula en un equilibrio 40:60 entre formas

monoméricas y diméricas. También se presentan las formas monoméricas y diméricas del FHR-1 humano. La posición de estas proteínas no coincide con las formas del FHR-B debido a una diferencia de peso molecular, siendo las formas del FHR-B ligeramente más grandes debido a un mayor número de glicosilaciones. En la **figura 25.B** se representa un experimento diseñado para determinar cualitativamente la fuerza de la interacción entre los monómeros. En este experimento las cuatro proteínas utilizadas en el ensayo anterior se dializaron frente a soluciones extremadamente ácidas (pH 2,5) o extremadamente básicas (pH 10,5) para ver si la interacción proteína-proteínas resistía estas condiciones. Ante estas condiciones, las proteínas FHR-B rompen su interacción con ellas mismas y todas las moléculas se desplazan a la forma monomérica. Este fenómeno no se observa para los dímeros de FHR-1, que resisten estas condiciones y mantienen su interacción. Cuando estas mismas proteínas usadas en el experimento anterior se dializan de vuelta a condiciones fisiológicas, se revierte el equilibrio entre formas monoméricas y diméricas del FHR-B. Esto sugiere que la interacción es débil, pero existente, y que en el estado nativo se mantiene un equilibrio, con una fluctuación constante entre las formas monoméricas y diméricas. Adicionalmente, se analizaron los coeficientes de fricción (f/f_0) de las proteínas. Este coeficiente es una medida de la elongación de la partícula, siendo para la mayoría de las proteínas globulares entre 1 y 2, mientras que para partículas más elongadas como los ácidos nucleicos los valores f/f_0 están sobre 4 o por encima. El valor medio de f/f_0 en los distintos experimentos para los dímeros de FHR-B de ratón es igual 1,35; mientras que valor medio de f/f_0 en los distintos experimentos para los dímeros de FHR-1 humano es de 1,65. Esto es indicativo de que los dímeros de FHR-B de ratón tienen una forma más globular que los dímeros de FHR-1 humano.



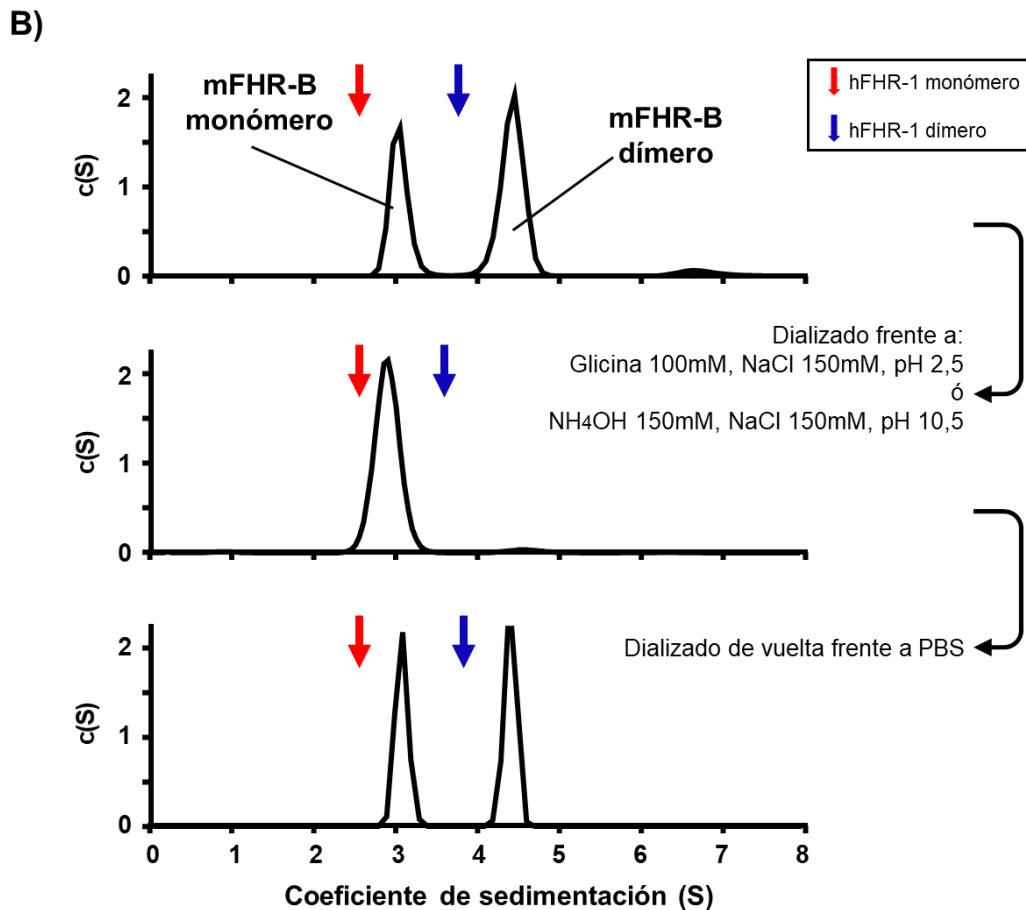


Figura 25. A) Análisis de velocidad de sedimentación por AUC de las proteínas FHR-B de ratón y FHR-1 humano, tanto en forma dimérica como en forma mutante monomérico. B) Análisis cualitativo de la fuerza de interacción por AUC de las proteínas FHR-B de ratón y FHR-1 humano, tanto en forma dimérica como en forma mutante monomérico (representado con las flechas azules y rojas respectivamente). El experimento se llevó a cabo en diferentes condiciones (pH 7,4; pH 2,5 y pH 10,5) para comparar la fuerza de la interacción de los dímeros.

6.3.2 Análisis del dominio N-terminal de la proteína FHR-B de ratón::

En la **figura 26** se presentan los resultados del experimento de velocidad de sedimentación utilizando la proteína híbrida HisT/HRV3C mFHR-B(1-3)::hFHR-1(4-5). Esta proteína se analizó para ver si formaba dímeros similares a los que se dan en la proteína FHR-B de ratón completa. También se analizó la proteína híbrida hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5), tanto en forma dimérica como en forma mutante monomérico. Se observa que la proteína híbrida con el N-terminal de FHR-B de ratón se encuentra en forma monomérica y dimérica en una proporción 40:60, al igual que la proteína FHR-B completa. La interacción

entre moléculas que permite la dimerización en el FHR-B se da a través del dominio N-terminal, entre los SCRs 1, 2 y 3. Los monómeros y dímeros de mFHR-B(1-3)::hFHR-1(4-5) tienen un tamaño similar a los monómeros y dímeros de FHR-1 humano, mientras que no se corresponden al tamaño de los monómeros y dímeros tanto de FHR-B completo como del híbrido hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5). Esta diferencia es debida al peso molecular de las proteínas y sus diferentes glicosilaciones: en el FHR-B de ratón las cuatro glicosilaciones están en el dominio C-terminal.

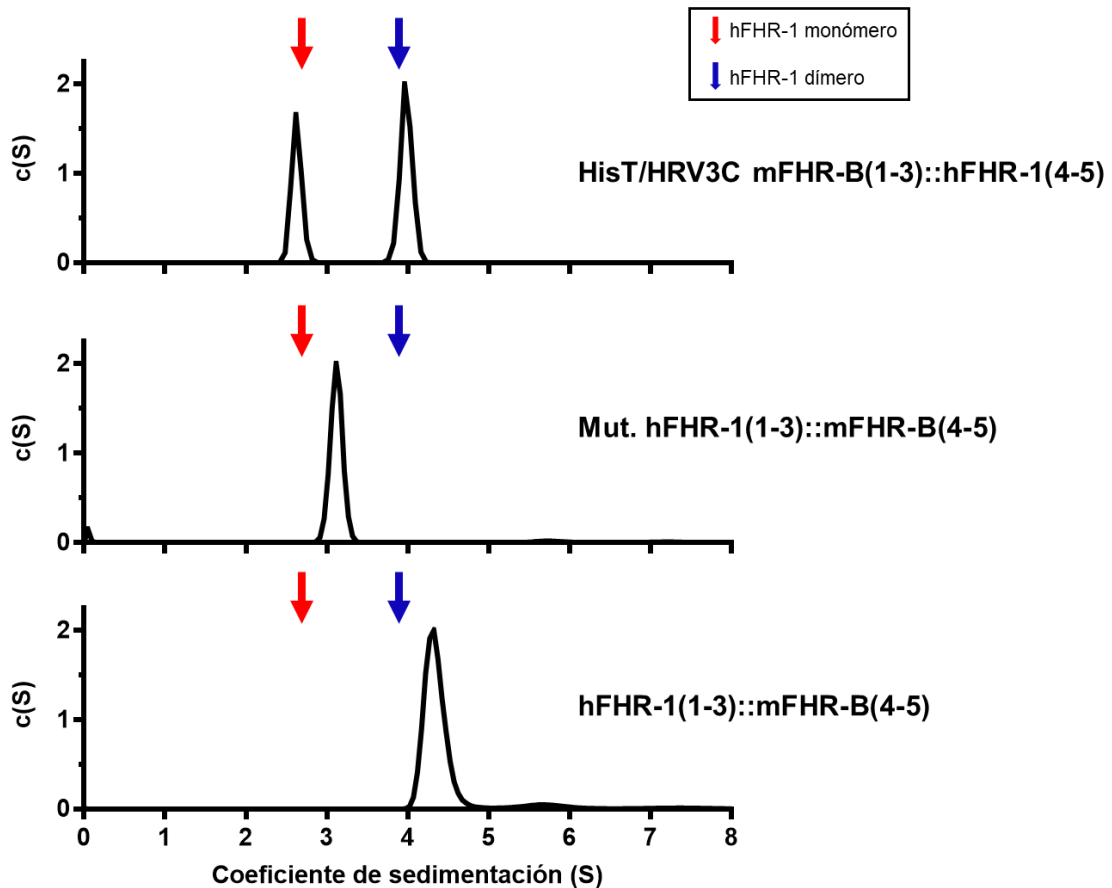


Figura 26. Análisis de velocidad de sedimentación por AUC de las proteínas híbridas HisT/HRV3C mFHR-B(1-3)::hFHR-1(4-5) y hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5), tanto en forma dimérica como en forma mutante monomérico. La posición de la proteína FHR-1 humana, tanto en forma dimérica como en forma mutante monomérica se representan con las flechas azules y rojas respectivamente para comparar.

En resumen, estos ensayos ponen de manifiesto que la estructura del FHR-B no es monomérica, si no que coexisten en equilibrio formas monoméricas y diméricas en proporción 40:60. Esta dimerización se da por un mecanismo diferente al de FHR-1 humano y la interacción entre unidades es mucho más débil en el caso de

los dímero de FHR-B. Al igual que en el FHR-1 humano, el dominio de dimerización de FHR-B está en el dominio N-terminal, entre los SCRs 1, 2 y 3. La diferencia en los coeficientes de fricción entre FHR-B de ratón y FHR-1 humano son indicativos de una diferente conformación en los dímeros de estas proteínas, siendo las moléculas diméricas más globulares en el caso de FHR-B de ratón.

6.4 Ensayos de unión por ELISA

Para analizar la unión que tienen las proteínas FHR de ratón a ligandos se diseñaron una serie de experimentos de unión en placa. Se analizó la unión de las distintas proteínas híbridas de los FHR de ratón a través de sus dominios de unión C-terminal; así como también la unión del fragmento N-terminal de la proteína FHR-B de ratón. También se comparó la unión de FHR-B de ratón y de FHR-1 humano a los distintos ligandos. Los ligandos que se analizaron fueron C3b y C3 de ratón, ya que estos son los principales ligandos de estas proteínas a través del dominio C-terminal.

6.4.1 Unión de los dominios C-terminal de las proteínas FHR de ratón a C3/C3b de ratón:

En el primer ensayo, se analizó la unión de las proteínas híbridas diseñadas con el dominio N-terminal (SCRs 1,2 y 3) de FHR-1 humano y el dominio C-terminal (últimos dos SCRs) de FH, FHR-B, FHR-C y FHR-E tanto a C3b como a C3 de ratón. En **la figura 27.A** se observa la unión de estas proteínas a 5µg/ml de C3b de ratón sembrado en la placa. Solo las proteínas con el C-terminal de FH y de FHR-B de ratón son capaces de unir C3b de ratón a través del dominio C-terminal. Además, el C-terminal de FHR-B se une con una mayor afinidad que el C-terminal de FH. El C-terminal del FHR-B de ratón alcanza la unión máxima a 250nM y la curva representada tiene una Kd (concentración de proteína necesaria para tener un 50% de unión) de 24nM en este experimento. En **la figura 27.B** se observa la unión de estas proteínas a 5µg/ml de C3 de ratón sembrado en la placa. Se observa que solo las proteínas con el C-terminal de FH y de FHR-B de ratón son capaces de unir C3 de ratón a través del dominio C-terminal. De nuevo, el C-terminal de FHR-B se une con una mayor afinidad que el C-terminal de FH a C3, que lo hace de una manera mucho más débil que a C3b. El C-terminal alcanza la unión máxima a 250nM y la curva representada tiene una Kd de 19nM en este

experimento. Las concentraciones de unión máxima al ligando son similares entre C3b y C3, sin embargo, los valores de K_d de FHR-B en la unión a C3 es mayor que para la unión a C3b en este experimento.

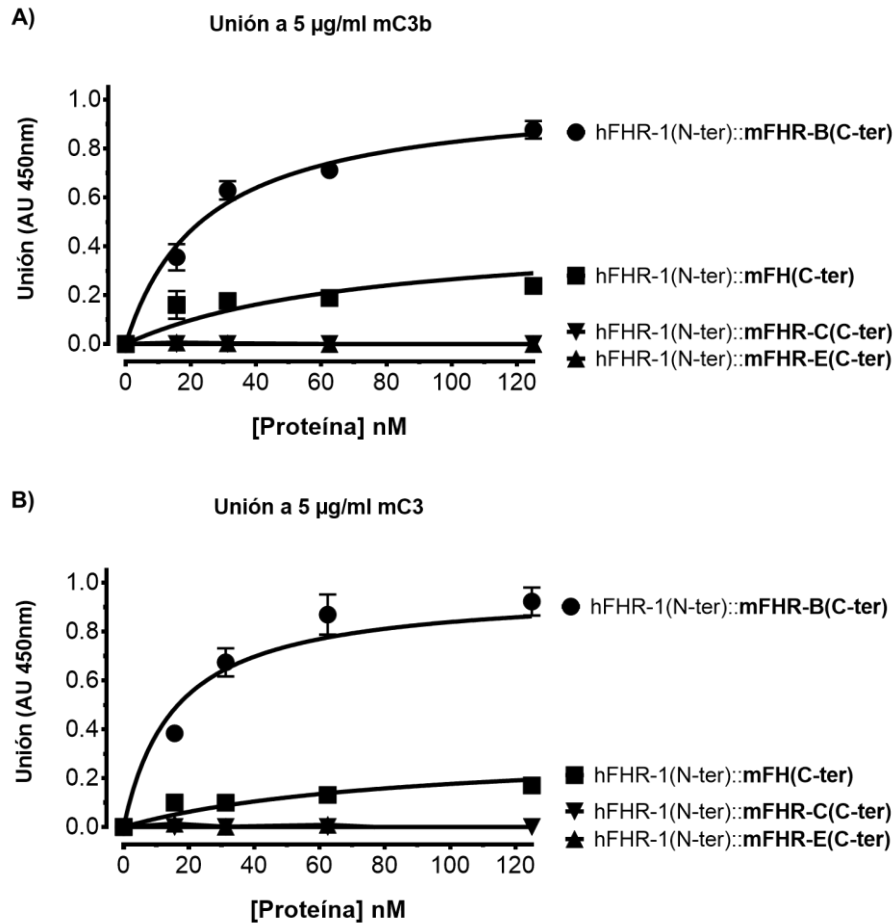


Figura 27. A) Unión de las proteínas híbridas con el dominio C-terminal de las proteínas de la familia de FH de ratón a C3b de ratón sembrado en placa. Valores de absorbancia a 450nm normalizados a 1,0. **B)** Unión de las proteínas híbridas con el dominio C-terminal de las proteínas de la familia de FH de ratón a C3 de ratón sembrado en placa. Valores de absorbancia a 450nm normalizados a 1,0.

6.4.2 Unión de los diferentes dominios de FHR-B de ratón a C3/C3b de ratón::

En otro ensayo se analizó la unión diferencial del FHR-B de ratón a C3b y C3 a través de su dominio C-terminal y N-terminal. Se utilizaron las proteínas híbridas con el dominio N-terminal (SCRs 1, 2 y 3) de FHR-1 humano seguido del

dominio C-terminal (SCRs 4 y 5) o N-terminal (SCRs 1, 2 y 3) de FHR-B de ratón; así como también la forma monomérica de la proteína híbrida con el C-terminal del FHR-B. En la **figura 28.A** se observa la unión de estas proteínas a 5µg/ml de C3b de ratón sembrado en la placa. Aunque el dominio N-terminal presenta algo de unión, esta es mucho menor a la del dominio C-terminal de FHR-B. Además, se observa que la proteína híbrida monomérica con el C-terminal del FHR-B de ratón no tiene unión a este ligando, por lo que la dimerización se antoja indispensable para el aumento de afeidez por los ligandos.

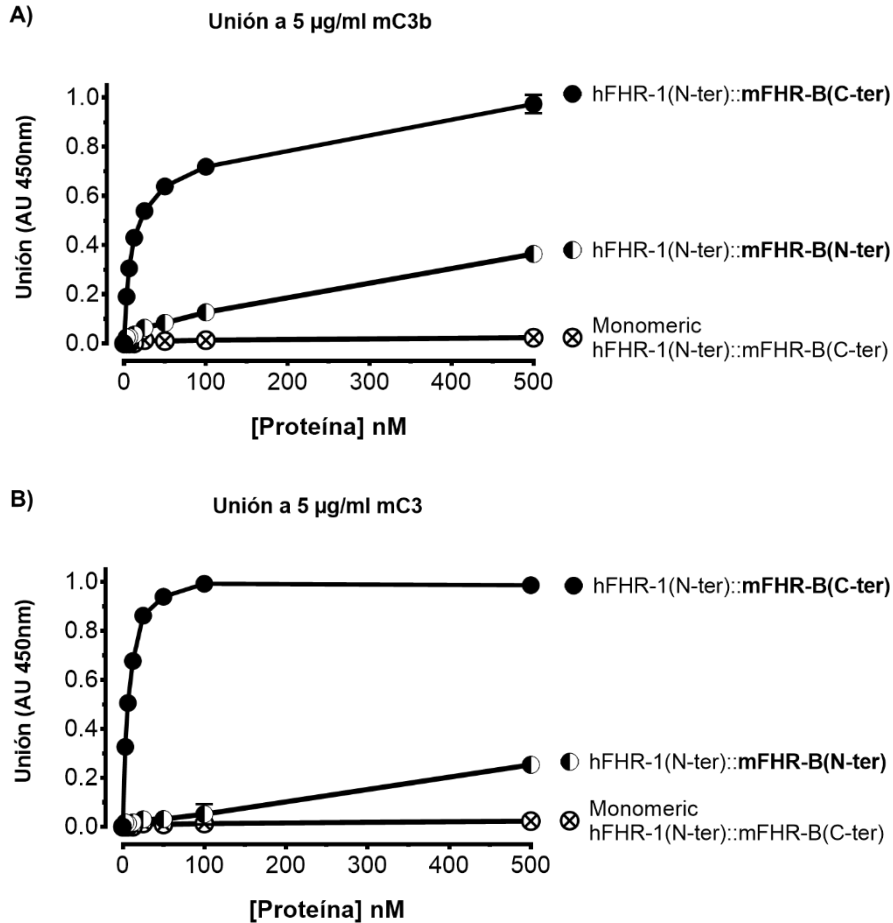


Figura 28. A) Unión de las proteínas híbridas con el dominio N-terminal o C-terminal de FHR-B y del mutante monomérico a C3b de ratón sembrado en placa. Valores de absorbancia a 450nm normalizados a 1,0. **B)** Unión de las proteínas híbridas con el dominio N-terminal o C-terminal de FHR-B y del mutante monomérico a C3 de ratón sembrado en placa. Valores de absorbancia a 450nm normalizados a 1,0.

En la **figura 28.B** se observa la unión de estas proteínas a 5µg/ml de C3 de ratón sembrado en la placa. De nuevo se observa que, aunque el dominio

N-terminal presenta algo de unión, esta es mucho menor a la del dominio C-terminal de FHR-B. De nuevo se observa que la proteína híbrida monomérica con el C-terminal del FHR-B de ratón no tiene unión a este ligando.

Para probar que la unión de FHR-B de ratón a C3 en los experimentos anteriores no es un artefacto, se diseñó un experimento adicional. En el siguiente experimento se sembró la proteína FHR-B de ratón en placa a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. Detectamos la unión de cantidades crecientes de C3 de ratón purificado usando un anticuerpo policlonal contra esta proteína (**Figura 29**). Confirmamos con este resultado que el C3 de ratón en fase fluida se une al FHR-B inmovilizado en placa de manera dosis dependiente.

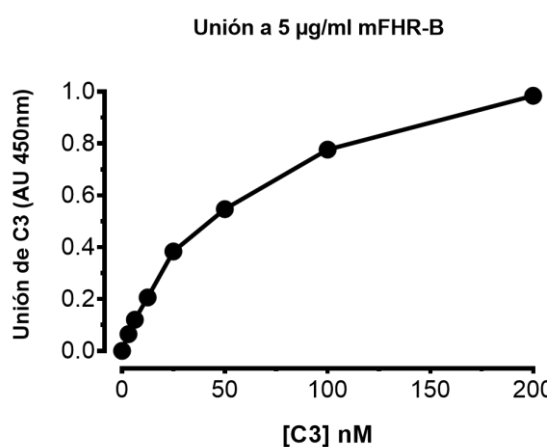


Figura 29. Unión de C3 de ratón en fase fluida a la proteína FHR-B de ratón sembrada en placa. Valores de absorbancia a 450nm normalizados a 1,0.

6.4.3 Unión de los dominios C-terminal de FHR-B de ratón y FHR-1 humano a C3/C3b de ratón:

En un ensayo adicional, se comparó la unión a C3b y C3 del dominio C-terminal del FHR-B de ratón con el mismo dominio del FHR-1 humano. Este ensayo nos proporciona información directa de cómo unen cada uno de estos dominios su ligando preferente, que es C3b/C3. Se utilizaron en este ensayo dos proteínas: el FHR-1 humano completo y la proteína híbrida con el dominio N-terminal (SCRs 1, 2 y 3) de FHR-1 humano seguido del dominio C-terminal (SCRs 4 y 5) de FHR-B de ratón. En la **figura 30.A** se observa la unión de estas proteínas a 5 $\mu\text{g/ml}$ de C3b sembrado en la placa. Los datos de concentración de proteína utilizada se representan en escala logarítmica para visualizar mejor las diferencias. Se han ajustado curvas de unión específicas con pendiente de Hill que

se ajustan con un valor de R^2 del 0,99. Los datos de K_d de los dominios C-terminal de FHR-B de ratón y FHR-1 humano sobre C3b son 5,65nM y 14,02nM respectivamente. La diferencia en las K_d entre ambas proteínas es estadísticamente significativa (p-valor 0,002). Los datos en esta figura están normalizados al valor de unión máxima de cada una de las proteínas a C3. En **la figura 30.B** se observa la unión de estas proteínas a 5 μ g/ml de C3 sembrado en la placa. Los datos de K_d de los dominios C-terminal de FHR-B de ratón y FHR-1 humano sobre C3 son 5,43nM y 12,34nM respectivamente. La diferencia en las K_d entre ambas proteínas es estadísticamente significativa (p-valor 0,012). Por lo tanto, la afinidad del FHR-B de ratón por los ligandos C3/C3b es mucho mayor a la que tiene el FHR-1 humano. Es importante señalar que FHR-B (al igual que FHR-1) une de manera equivalente C3 y C3b. La unión de cada una de las proteínas a los ligandos humanos o de ratón es similar, de modo que en las figuras se representan la media de los valores de unión de las proteínas a C3/C3b humano y de ratón.

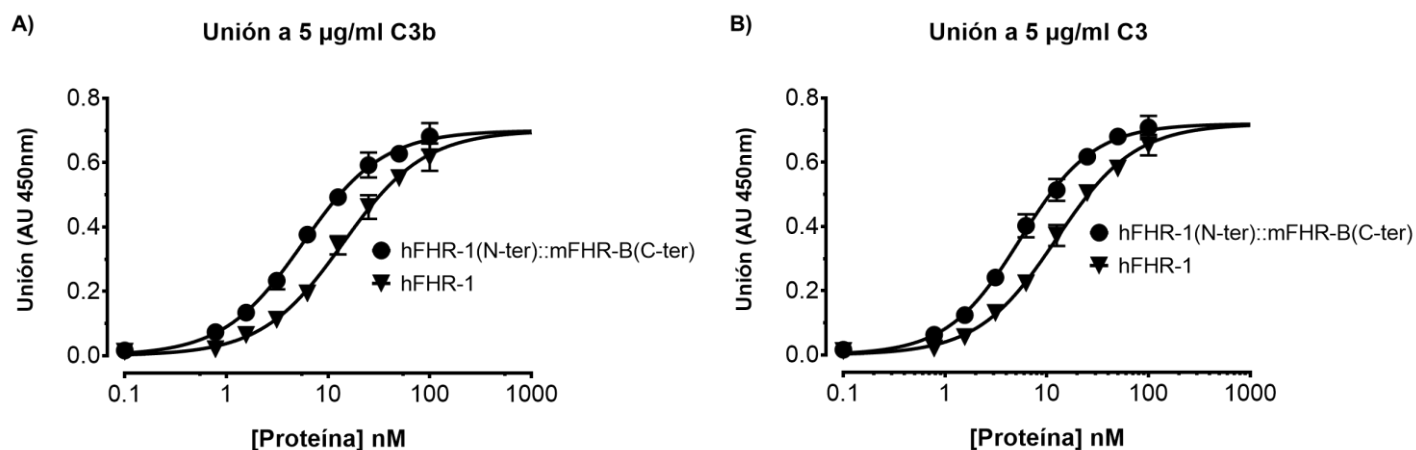


Figura 30. **A)** Unión de FHR-B de ratón y FHR-1 humano a través de sus dominios C-terminal a C3b sembrado en placa. Valores de absorbancia a 450nm normalizados al máximo de unión a C3. **B)** Unión de FHR-B de ratón y FHR-1 humano a través de sus dominios C-terminal a C3 sembrado en placa.

En resumen, estos ensayos ponen de manifiesto que FHR-B es el único FHR de ratón que une C3b o C3. Esta unión se da a través del dominio C-terminal de esta proteína. Además, la dimerización es necesaria para la unión de esta proteína a estos ligandos por el aumento de avidéz de las moléculas diméricas. La afinidad del FHR-B de ratón por C3b y C3 es mucho mayor que la que tienen FH de ratón y FHR-1 humano por estos ligandos.

6.5 Ensayos de competición entre FH y FHR-B de ratón por la unión a C3b:

Con el objetivo de analizar si el FHR-B de ratón es capaz de competir a FH por la unión a C3b en superficie, se diseñaron ensayos de unión/competición en placa de ELISA. En estos ensayos se utilizaron proteínas purificadas: C3b de ratón nativo, FH de ratón nativo, FHR-B recombinante y la proteína híbrida con el dominio C-terminal de FHR-B, hFHR-1(1-3)::mFHR-B(4-5). Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-FH de ratón para detectar la unión de esta proteína al C3b sembrado en la placa.

En un primer ensayo (**Figura 31.A**) se analizó la unión de FH de ratón a C3b sembrado a distintas cantidades a modo de titulación para elegir las condiciones de los siguientes experimentos. Las curvas de unión para ambas condiciones son paralelas; de hecho, al ajustar una curva mediante regresión no lineal, los valores de K_d son similares, lo único que varía es el máximo al que llega la señal de unión.

Eligiendo como condiciones del siguiente experimento 5 μ g/ml ó 2,5 μ g/ml de C3b sembrado, se analizó la unión de 15nM de FH en presencia o ausencia de cantidades crecientes de FHR-B de ratón (**Figura 31.B**). Se observa que con 5 μ g/ml de C3b sembrado, 2 μ M de FHR-B es capaz de competir la unión de 15nM de FH de manera estadísticamente significativa, aunque la pérdida de unión de FH es muy baja (de 0,729 AU a 0,625). De hecho, el p-valor, aun siendo estadísticamente significativo en estas condiciones, está rozando el valor de significación estadística (0,0429 < 0,0500). Utilizando como condiciones de partida 2,5 μ g/ml de C3b sembrado, FHR-B es capaz de competir mejor la unión de 15nM de FH a C3b. Todas las concentraciones de FH muestran significancia estadística (p-valor 0,0090). Aunque de nuevo, la pérdida de unión de FH es muy baja (máxima diferencia de 0,666 AU a 0,582 AU).

En un último experimento, se eligió sembrar 5 μ g/ml de C3b en la placa y analizar la unión de 7,5nM de FH en presencia o ausencia de cantidades crecientes de FHR-B de ratón o de la proteína híbrida con el dominio C-terminal de FHR-B (**Figura 31.C**). La idea de estos experimentos era reducir la cantidad del FH utilizado en el experimento y aumentar la concentración utilizada de las otras dos proteínas para maximizar el efecto de competición. Se observa que tanto FHR-B como la proteína híbrida con el C-terminal son capaces de competir la unión de 7,5nM de FH a C3b. FHR-B lo hace mejor, ya que lo hace de manera estadísticamente significativa (p-valor 0,0070) a las tres concentraciones utilizadas. De nuevo, la pérdida de unión de FH es muy baja (máxima diferencia de 0,687 AU a 0,618 AU), a pesar de usar menos FH y más FHR-B. En el caso de la proteína híbrida, el efecto es estadísticamente menos significativo (p-valor 0,0229). De nuevo, la pérdida de unión de FH es muy baja (máxima diferencia de 0,687 AU a 0,603 AU).

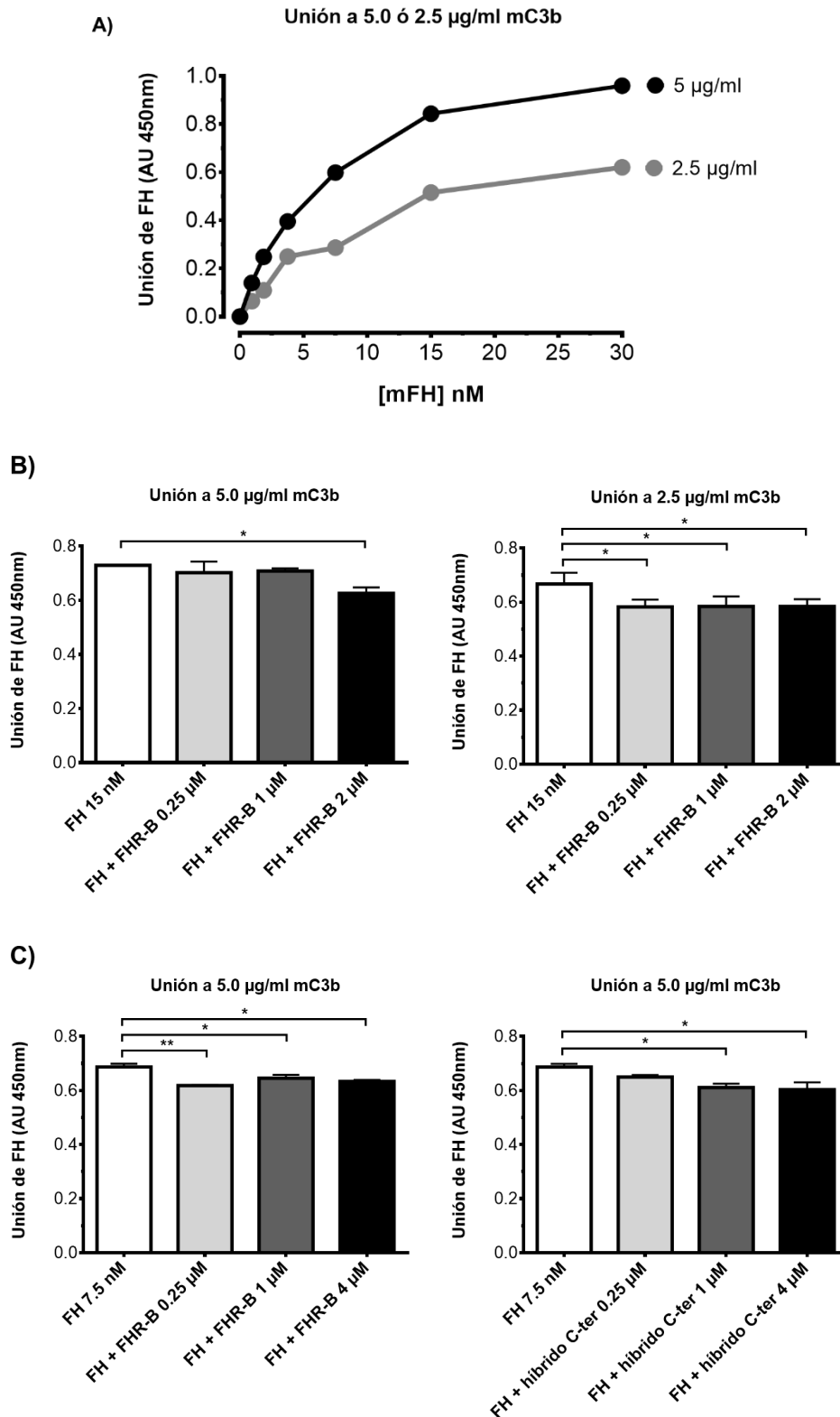


Figura 31. A) Unión de FHR-B de ratón y FHR-1 humano a través de sus dominios C-terminal a C3b humano y de ratón sembrado en placa. Valores de absorbancia a 450nm normalizados al máximo de unión a C3. B/C) Unión de FHR-B de ratón y FHR-1 humano a través de sus dominios C-terminal a C3 humano y de ratón sembrado en placa. El análisis estadístico realizado fue un ANOVA de un factor. (*) representa p-valor $\leq 0,05$. (**) representa p-valor $\leq 0,01$.

En resumen, estos experimentos muestran una pequeña perturbación sobre la unión de FH a C3b por parte de la proteína FHR-B de ratón a altas concentración. Aunque hay reducción de la unión de FH a su ligando C3b, la pérdida de unión es muy baja.

6.6 Experimentos de unión por inmunofluorescencia

Para analizar la función de las proteínas FHR de ratón sobre superficies fisiológicas de este animal, se diseñaron experimentos de unión y detección en secciones de riñón mediante inmunofluorescencia. Estos experimentos proporcionan información muy valiosa sobre los ligandos de unión, la localización de la unión y la posible función de las proteínas en condiciones *ex vivo*. Se utilizaron cortes de secciones de riñón de ratones C57BL/6 *wild-type*, de un modelo *knockout* del gen de FH C57BL/6 *Cfh* *-/-* y de un modelo doble *knockout* de todos los genes de la familia de FH C57BL/6 *Cfh/Cfhr* *-/-* (riñones cedidos por el laboratorio de Mathew Pickering, *Imperial College* de Londres).

6.6.1 Presencia de FHR-B endógeno en superficies con depósito de C3:

En un primer experimento, se analizó la presencia de FHR-B endógeno en cortes de riñón tanto de animales *wild-type* como de animales *knockout Cfh* *-/-*, utilizando el anticuerpo policlonal frente a FHR-B de ratón desarrollado en el laboratorio. Se analizó también la presencia de depósitos de C3 en los riñones de estos animales, utilizando un anticuerpo policlonal que detecta diferentes fragmentos de C3. La **figura 32** muestra dos secciones de los glomérulos analizados que son representativas de los riñones analizados. Se observa que los ratones *wild-type* no presentan depósitos de C3 ni de FHR-B endógeno, mientras que los ratones *knockout Cfh* *-/-* sí lo hacen. Tanto el depósito de C3 como el de FHR-B es específico del glomérulo y no se detecta señal en el parénquima renal.

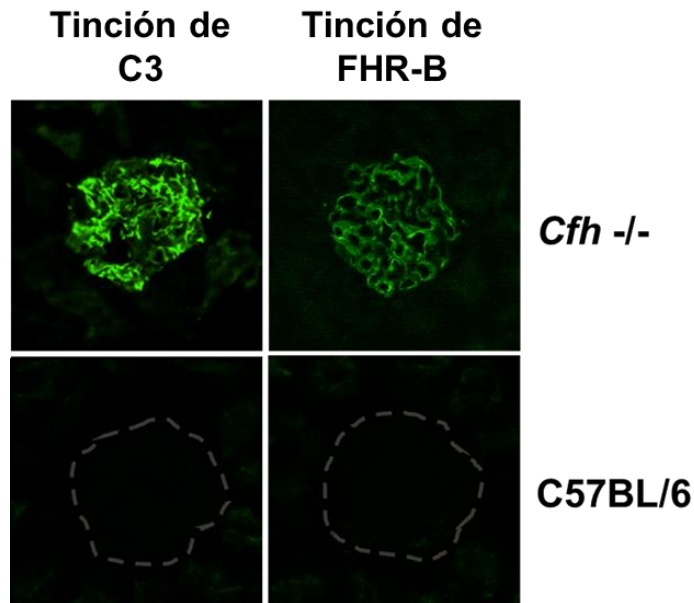


Figura 32. Inmunofluorescencia sobre secciones de riñones de ratones *wild-type* y *knockout Cfh -/-*. Se detectan las proteínas endógenas presentes en los glomérulos de estos animales. Hay depósito endógeno de fragmentos de C3 y de la proteína FHR-B en los ratones *knockout Cfh -/-*. La detección se lleva a cabo utilizando un anticuerpo policlonal contra FHR-B de ratón y un anticuerpo policlonal contra fragmentos de C3 de ratón.

6.6.2 Unión de los dominios C-terminal de las proteínas FHR de ratón a depósitos de C3:

En el siguiente experimento, se analizó la unión de las proteínas híbridas diseñadas con el dominio N-terminal (SCRs 1, 2 y 3) de FHR-1 humano y el dominio C-terminal (últimos dos SCR) de FH, FHR-B, FHR-C y FHR-E en cortes de riñón tanto de animales *wild-type* como de animales *knockout Cfh -/-*. Se detectó la unión usando el anticuerpo monoclonal anti-FHR-1 humano 2C6. Se analizó de nuevo la presencia de depósitos de C3 en los riñones de estos animales. La **figura 33** muestra secciones de los glomérulos analizados que son representativas de los riñones analizados. De nuevo, se observa que los ratones *wild-type* no presentan depósitos de C3 endógeno, mientras que los ratones *knockout Cfh -/-* sí lo hacen. De todas las proteínas híbridas, solo aquellas con el C-terminal de FH o FHR-B de ratón son capaces de unirse a los glomérulos con depósito endógeno de C3 de los ratones *Cfh -/-*. La unión de estas dos proteínas es específica del glomérulo y no se detecta señal en el parénquima renal. La unión del dominio C-terminal del FHR-B de ratón por esta superficie es aproximadamente diez veces mayor a la del dominio C-terminal de FH de ratón.

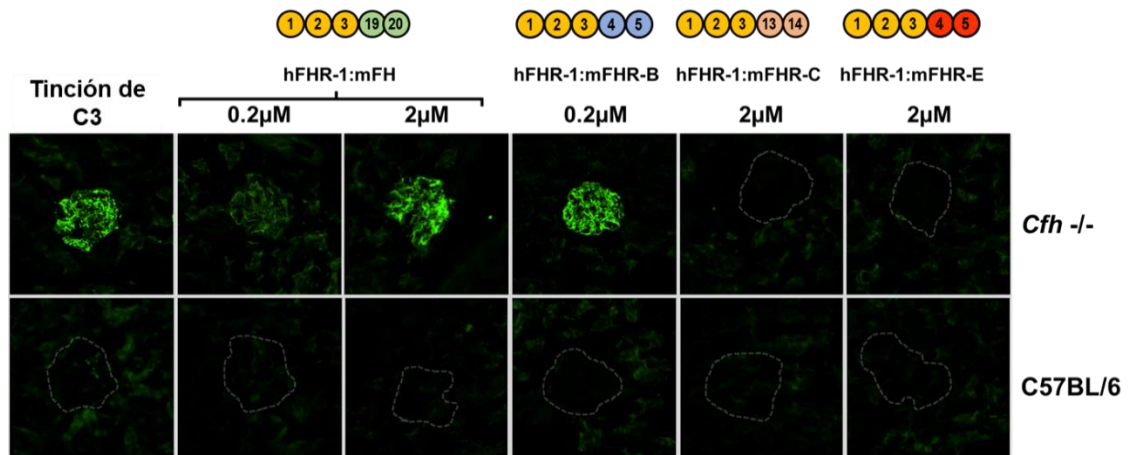


Figura 33. Inmunofluorescencia sobre secciones de riñones de ratones *wild-type* y *knockout Cfh -/-*. Se detecta la unión de las proteínas híbridas con el dominio C-terminal de las proteínas de la familia de FH de ratón. Se observa unión de las proteínas con el C-terminal de FH y FHR-B de ratón sobre los depósitos endógenos de C3. La detección se lleva a cabo usando un anticuerpo monoclonal contra la región N-terminal de FHR-1 humano.

6.6.3 Unión de la proteína FHR-B de ratón y sus distintos dominios a depósitos de C3 en presencia y ausencia de ácidos siálicos:

Seguidamente, se analizó la unión a esta superficie de la proteína FHR-B completa y de sus dominios N-terminal y C-terminal (tanto forma dimérica como la monomérica) por separado, así como también la unión de la construcción del dominio C-terminal de FH de ratón. Se utilizaron las proteínas híbridas con el dominio N-terminal (SCRs 1, 2 y 3) de FHR-1 humano seguido del dominio C-terminal (SCRs 19 y 20) de FH de ratón o del C-terminal (SCRs 4 y 5) o N-terminal (SCRs 1, 2 y 3) de FHR-B de ratón; así como también la forma monomérica de la proteína híbrida con el C-terminal del FHR-B. La unión a esta superficie se analizó en presencia y ausencia de los ácidos siálicos de la superficie celular, tratando o no las secciones de riñones con neuraminidasa (NA). Se analizaron cortes de riñón tanto de ratones *knockout Cfh -/-* como de ratones *knockout Cfh/Cfhr -/-*. La unión de las proteínas híbridas se detectó usando el anticuerpo monoclonal anti-FHR-1 humano 2C6, mientras que la unión de la proteína completa se detectó usando el anticuerpo policlonal frente a FHR-B de ratón desarrollado en el laboratorio. Se analizó de nuevo la presencia de depósitos de C3 en los riñones de estos animales.

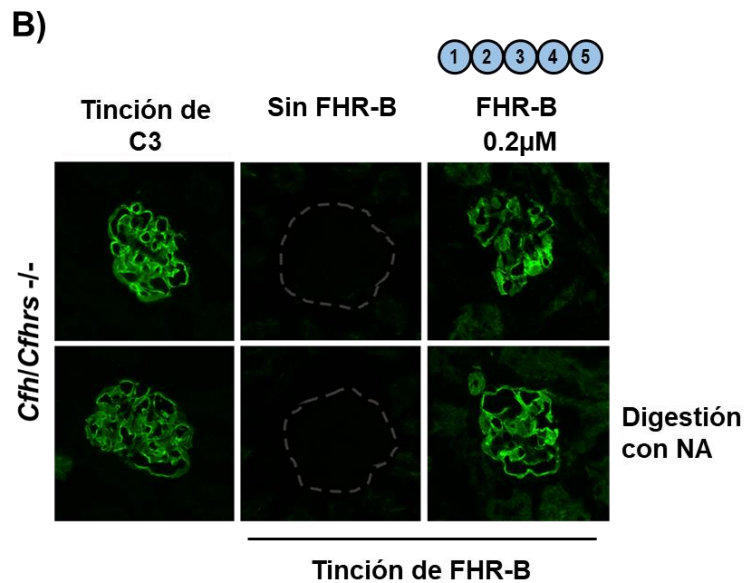
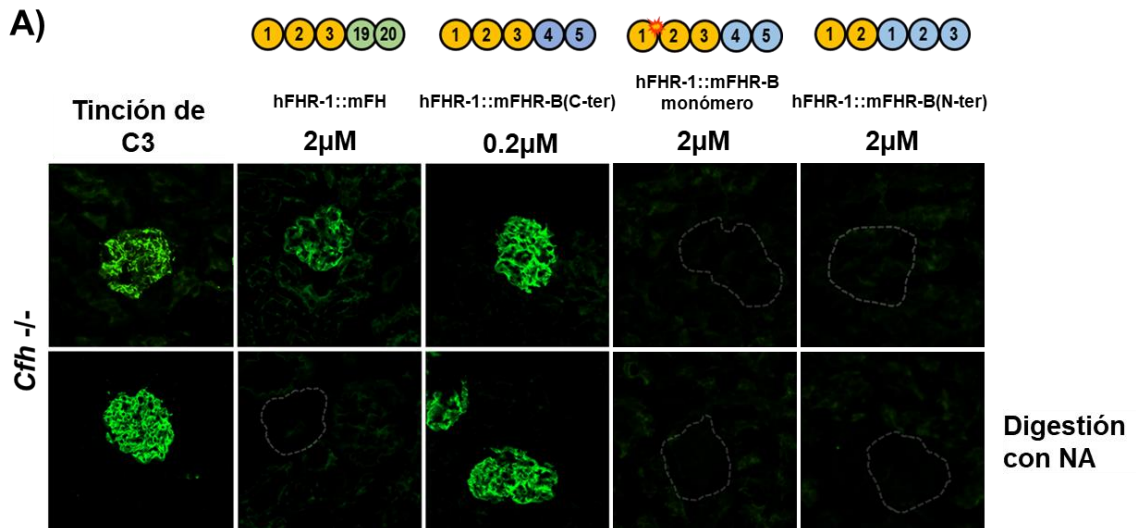


Figura 34. A) Inmunofluorescencia sobre secciones de riñones de ratones *knockout Cfh*^{-/-} tratadas o no con NA. Se observa unión de las proteínas con el C-terminal de FH y FHR-B de ratón sobre los depósitos endógenos de C3, aunque la primera se pierde en glomérulos tratados con NA. La detección se lleva a cabo usando un anticuerpo monoclonal contra la región N-terminal de FHR-1 humano y un anticuerpo policlonal contra fragmentos de C3 de ratón. **B)** Inmunofluorescencia sobre secciones de riñones de ratones *knockout Cfh/Cfhrs*^{-/-} tratadas o no con NA. Se observa unión de la proteína FHR-B de ratón en glomérulos tratados y sin tratar con NA. La detección se lleva a cabo usando un anticuerpo policlonal contra FHR-B de ratón y un anticuerpo policlonal contra fragmentos de C3 de ratón.

La **figura 34** muestra secciones de los glomérulos analizados que son representativas de los riñones analizados. En la **figura 34.A** se muestra el resultado del experimento usando las cuatro proteínas híbridas analizadas. Se observa que solo las proteínas con el C-terminal de FH o FHR-B de ratón son capaces de unirse a los glomérulos con depósito endógeno de C3 de los ratones *Cfh*^{-/-}, pero de nuevo la dimerización del FHR-B se antoja necesaria para la unión de la molécula FHR-B, ya que la proteína con el C-terminal de FHR-B monomérica no se une. También se muestra de nuevo que el dominio N-terminal de FHR-B no participa en la unión a los ligandos de superficie. Se observa una diferencia en la unión a esta superficie entre el C-terminal de FH y de FHR-B de ratón, ya que el primero pierde la capacidad de unión en ausencia de ácidos siálicos mientras que el FHR-B mantiene esta capacidad independientemente de la presencia de estos azúcares.

En la **figura 34.B** se muestra el resultado del experimento usando la proteína FHR-B completa. Se observa que el FHR-B de ratón es capaces de unirse a los glomérulos con depósito endógeno de C3 de los ratones *Cfh/Cfhr*^{-/-}. De nuevo se aprecia que la unión de esta proteína a los depósitos de C3 en esta superficie es independiente a la presencia de ácidos siálicos. La unión de las proteínas es específica del glomérulo y no se detecta señal en el parénquima renal

6.6.4 Activación de complemento mediada por FHR-B sobre glomérulos de ratón:

En el siguiente experimento, se analizó la capacidad del FHR-B de ratón de activar el sistema del complemento a través de la VA y aumentar el depósito de C3 sobre superficies propias. Para ello, se estudió el depósito de C3 que se genera al usar un 10% de suero humano normal (NHS) deplecionado de FH y FHR sobre glomérulos de riñones de ratones *knockout Cfh/Cfhr*^{-/-}; y si la proteína FHR-B de ratón es capaz de aumentar el depósito de C3 humano de una manera dosis-dependiente. La unión del FHR-B de ratón se detectó usando el anticuerpo policlonal frente a FHR-B de ratón desarrollado en el laboratorio. Se analizó también la presencia de depósitos de C3 humano en los riñones de estos usando el anticuerpo monoclonal anti-C3 humano desarrollado en el laboratorio. La **figura 35** muestra secciones de los glomérulos analizados que son representativas de los riñones analizados, así como también muestra los valores de fluorescencia media de todos los campos analizados. En la **figura 35.A** se muestran los controles del experimento. En primer lugar, se aprecia el depósito de C3 humano que provoca un 10% de NHS deplecionado de FH y FHR. Seguidamente, se muestra la unión de 0,25µM de FHR-B de ratón, lo que provoca un aumento del depósito de C3 humano sobre los glomérulos. De nuevo, se aprecia que la unión del FHR-B de ratón es específica del glomérulo y no se detecta señal en el parénquima renal. El

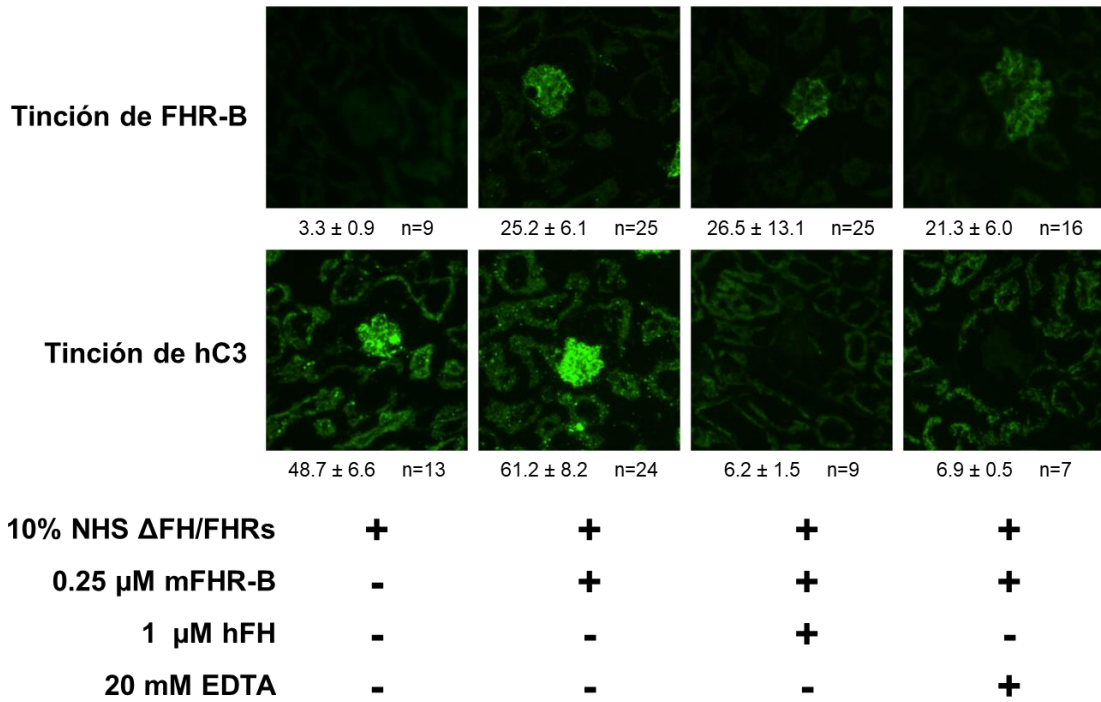
depósito de C3 humano sobre esta superficie se da a través de la VA, ya que añadir EDTA o $1\mu\text{M}$ de FH humano inhiben la activación y el consiguiente depósito. En la **figura 35.B** se muestran los resultados del experimento y el efecto que tienen cantidades crecientes de FHR-B de ratón sobre la activación de la VA. En primer lugar, se muestra que un 10% de NHS deplecionado de FH y FHR no genera depósito de C3 cuando se controla la activación con $0,25\mu\text{g/ml}$ ($1,67\text{nM}$) de FH humano. A partir de estas condiciones iniciales, se analizó el efecto en la activación de cantidades crecientes de FHR-B de ratón. Se observa que $0,25\mu\text{M}$, $0,50\mu\text{M}$ y $1,00\mu\text{M}$ de FHR-B de ratón aumentan proporcionalmente el depósito de C3 humano sobre esta superficie, a partir del punto en el que el FH humano añadido era capaz de controlar la activación y evitar el depósito.

La relación entre la concentración de FHR-B añadida y el depósito de C3 se observa en la **figura 35.C**, así como el análisis de la regresión lineal entre la señal de FHR-B unido y la señal de C3 humano depositado en el glomérulo. El valor de r^2 del ajuste de la regresión lineal es igual a 0,81.

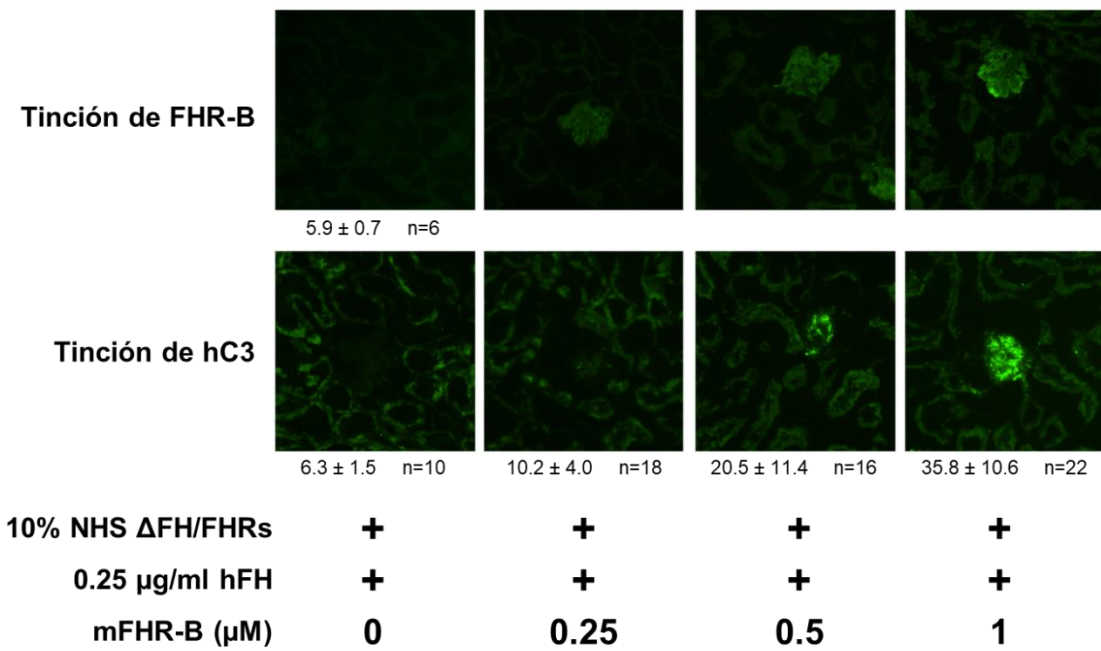
En resumen, estos ensayos ponen de manifiesto que el FHR-B endógeno se encuentra unido a los depósitos de C3 endógenos en modelos animales de enfermedad con depósito de esta proteína en los glomérulos. Esta unión se da a través del dominio C-terminal del FHR-B; y aunque FH también se une a través de este dominio a las superficies opsonizadas con C3, la unión del FHR-B es mucho más fuerte y además es independiente de la composición de ácidos siálicos de esa superficie. La dimerización de FHR-B es necesaria para la unión a los depósitos de C3 por el aumento de avidéz de las moléculas diméricas. Las proteínas FHR-C y FHR-E no tienen la capacidad de unirse a las superficies con depósito de C3 a través de sus dominios C-terminal. FHR-B promueve la activación del complemento a través de la vía terminal y el depósito de C3 sobre las superficies, compitiendo la función reguladora de FH.

A)

Controles



B)



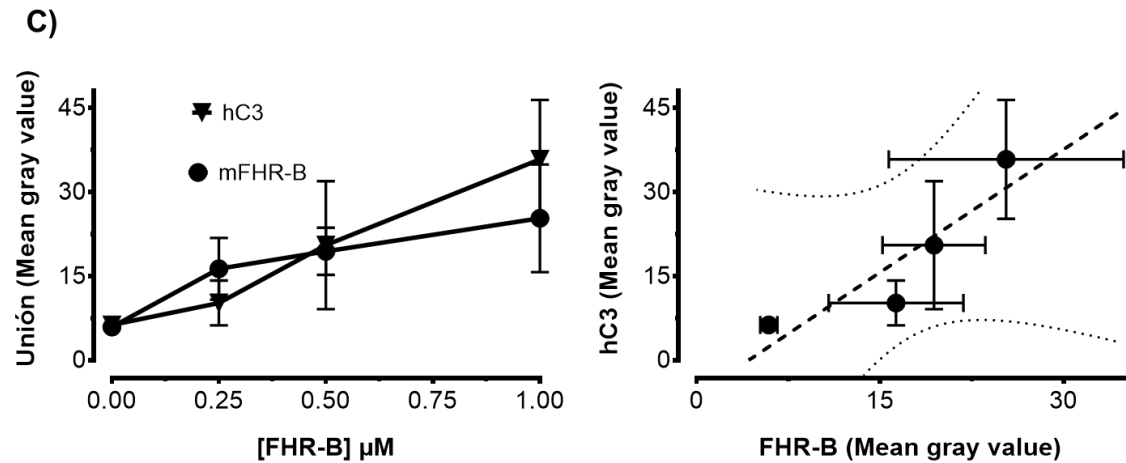


Figura 35. Inmunofluorescencia del experimento de activación de complemento sobre secciones de riñones de ratones *knockout Cfh -/-*. Se midió la señal de fluorescencia de varios riñones para cada condición del experimento analizada. La detección se lleva a cabo usando un anticuerpo policlonal contra FHR-B de ratón y un anticuerpo monoclonal anti-C3 humano. **A)** Resultado de los controles del experimento: 10% de NHS $\Delta\text{FH}/\text{FHR}$ activa complemento sobre esta superficie y deposita fragmentos de C3. FHR-B aumenta la activación y el depósito. La adición tanto de FH humano como de EDTA evita la activación de complemento y el depósito. **B)** Imágenes representativas del efecto de cantidades crecientes de FHR-B sobre el hC3 depositado en los glomérulos. **C)** Representación gráfica del efecto de FHR-B sobre el hC3 depositado. También se representa la relación entre la señal del FHR-B depositado en los glomérulos y el C3 depositado mediante regresión lineal. El valor de r^2 del ajuste de la regresión lineal es igual a 0,81.

6.7 Ensayos de actividad cofactora

Dado que se ha descrito para varias proteínas FHR humanas una débil actividad cofactora de FI (McRae *et al*, 2005; Fritsche *et al*, 2010), se estudió esta actividad en FHR-B de ratón. Para estudiar el posible efecto de FHR-B sobre el corte proteolítico de C3b por FI se realizaron ensayos de actividad cofactora con proteínas purificadas. En estos ensayos se usaron C3b y FI humanos y FHR-B de ratón. En la **figura 36** se presentan los resultados del experimento. FHR-B no presenta actividad cofactora de FI. Tanto la banda α' como la β de C3b se mantienen constantes a lo largo del experimento, independientemente de la cantidad de FHR-B añadida. Aunque FI está presente, carece de cofactor para llevar a cabo el corte proteolítico de la cadena α' de C3b.

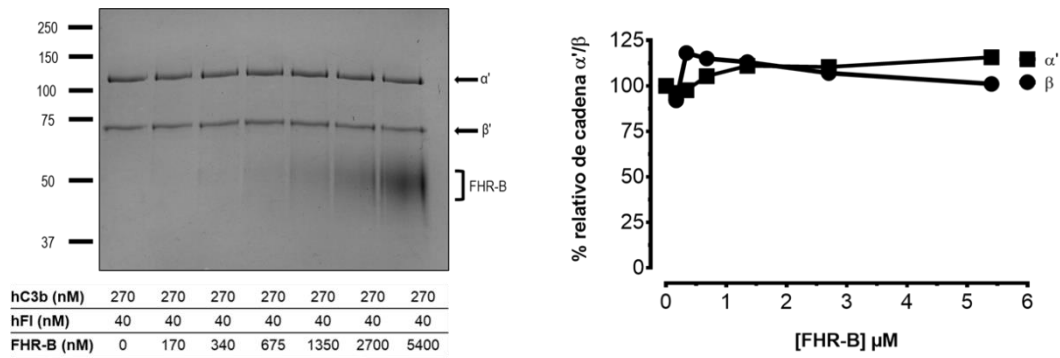


Figura 36. Ensayo de actividad cofactora de FHR-B. Se presentan los resultados del experimento y de las bandas generadas en un gel SDS-PAGE. Las bandas α' como la β de C3b se densitometraron y los valores obtenidos se representaron en la segunda gráfica. Tanto la cadena α' como la β de C3b se mantienen constantes a lo largo del experimento.

6.7.1 Actividad cofactora de FH en presencia de FHR-B de ratón:

También se ha descrito para algunas de las proteínas FHR humanas una potenciación de la actividad cofactora de FH, actuando de manera sinérgica con esta proteína (Hellwage *et al*, 1999; McRae *et al*, 2015; Hebecker & Józsi, 2012). Las proteínas FHR no presentan por sí solas actividad cofactora de FI a concentraciones fisiológicamente relevantes, sin embargo, son capaces de potenciar la actividad cofactora de FH. Para estudiar este posible efecto en FHR-B de ratón se realizaron ensayos de actividad cofactora de FH con proteínas purificadas. En estos ensayos se usaron C3b, FH y FI de humano y FHR-B de ratón. En la **figura 37.A** se observa que la cantidad de cadena α' de C3b en el punto de partida sin FHR-B es del 100% con respecto al punto control sin FH. Se observa una reducción de la cadena α' de C3b y un aumento de la cadena α'_{43} con cantidades crecientes de FHR-B. La cadena β de C3b se mantienen constantes a lo largo del experimento, independientemente de la cantidad de FHR-B añadida. En la **figura 37. B** se vuelve a observar una reducción de la cadena α' de C3b y un aumento de la cadena α'_{43} con cantidades crecientes de FHR-B. En este experimento la cantidad de cadena α' de C3b en el punto de partida sin FHR-B es del 80% con respecto al punto control sin FH; esto es debido a que la cantidad de FH utilizada en el experimento es mayor que en el anterior. En este experimento la reducción de la cadena α' es mucho mayor que en el experimento anterior, incluso habiendo en este una relación molar de FHR-B sobre FH más baja (la mitad). Parece que la cantidad de FH presente es limitante en el corte de α' y generación de α'_{43} final, ya que FHR-B no tiene actividad cofactora por sí sola, si

no que potencia la actividad cofactora de FH, mediante un fenómeno de sinergia. De nuevo, la cadena β de C3b se mantienen constantes a lo largo del experimento, independientemente de la cantidad de FHR-B añadida.

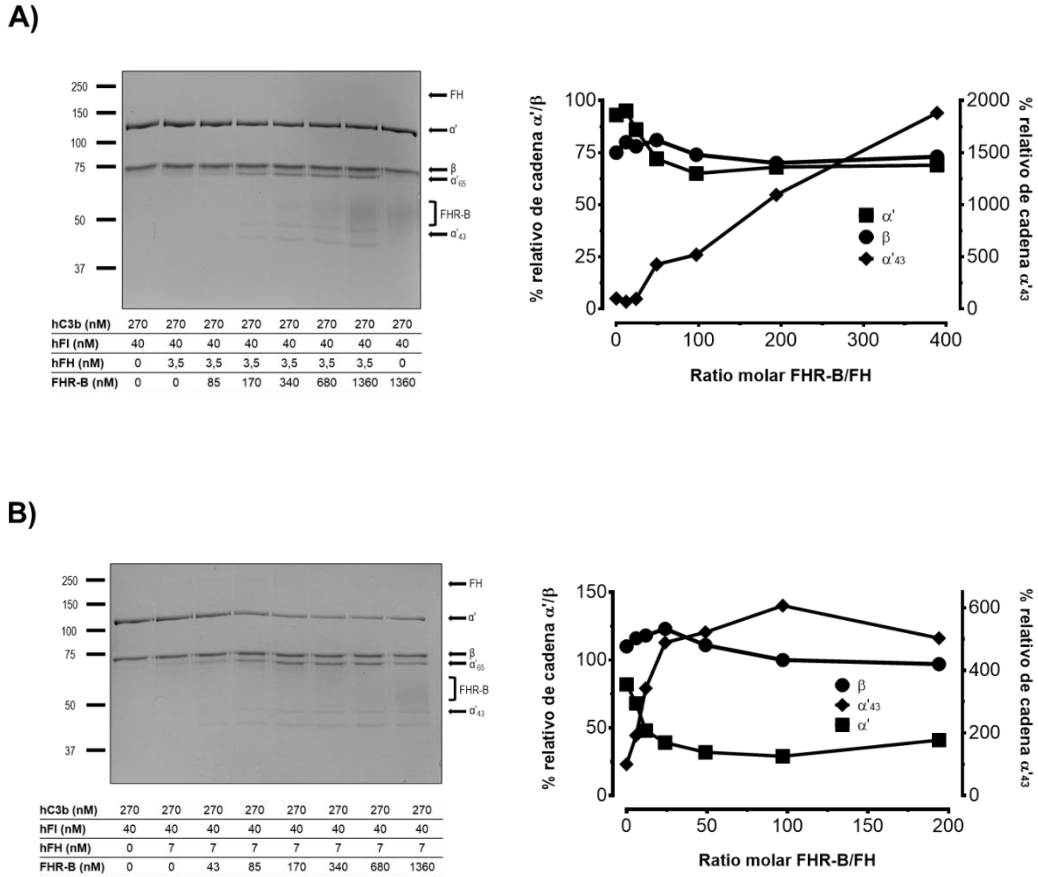


Figura 37. Ensayo de actividad cofactora de FH en presencia de FHR-B de ratón. Se presentan los resultados del experimento y de las bandas generadas en un gel SDS-PAGE. Las bandas α' como la β de C3b se densitometraron y los valores obtenidos se representaron en la gráfica. **A)** Ensayo de actividad cofactora con 3,5nM de FH humano. **B)** Ensayo de actividad cofactora con 7nM de FH humano. La reducción de la cadena α' y generación de la cadena α'_{43} es mucho mayor que en el experimento anterior.

En resumen, la proteína FHR-B de ratón no tiene actividad cofactora de FI en el corte proteolítico de C3b a iC3b. Sin embargo, al igual que lo descrito para varias de las proteínas FHR humanas, FHR-B potencia la actividad cofactora de FH, actuando de manera sinérgica junto a esta en el corte proteolítico de C3b por FI. El corte proteolítico de la cadena α' de C3b está limitado por la cantidad inicial de FH.

6.8 Análisis por WB de las proteínas humanas con el anticuerpo anti FHR B

Con el objetivo de descubrir una posible reactividad cruzada del anticuerpo policlonal desarrollado frente a FHR-B de ratón con las proteínas humanas se analizaron sueros y proteínas recombinantes humanas. De manera llamativa, el anticuerpo policlonal anti-FHR-B de ratón reconoce bandas inespecíficas por WB a la altura de los FHR en muestras de suero humano normal, pero no en muestras de suero humano portador de la delección Δ CFHR3-CFHR1. Utilizando las proteínas purificadas FHR-1 y FHR-3 humanas, se determinó que la reactividad cruzada de este anticuerpo era con FHR-1 (**Figura 38**). Esto parece indicar que existen epítomos compartidos entre FHR-B de ratón y el FHR-1 humano.

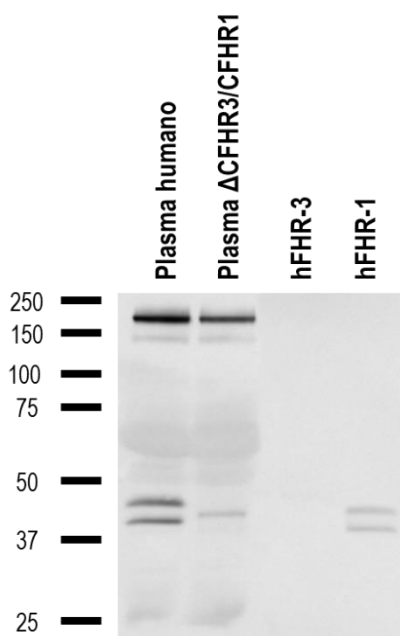


Figura 38. WB con el antisuero de conejo anti-FHR-B de ratón sobre muestras de plasma de humano control y de un portador de la delección Δ CFHR3-CFHR1, así como de la proteínas FHR-1 y FHR-3 purificadas.

6.9 Análisis filogenético

Para estudiar las relaciones evolutivas entre las proteínas de la familia de FH de ambas especies, se alinearon las secuencias de estas proteínas y se estudiaron las relaciones entre ellas con el uso árboles filogenéticos. El objetivo principal de estos análisis era averiguar si existían proteínas FHR en el ancestro

común entre humanos y ratones; y, en el caso de existir, si había relación evolutiva entre FHR-1 y FHR-B a través de esa proteína ancestral. Las secuencias de las proteínas se obtuvieron de Uniprot. Se incluyeron en el análisis las secuencias de la proteína C4bp humana y de ratón como grupo externo para enraizar los árboles. Las secuencias se alinearon con MAFFT y se generó un árbol filogenético previo (**Figura 39.A**). Este alineamiento se analizó con IqTree, lo cual generó un árbol filogenético mucho más preciso sin constricciones por taxonomía (**Figura 39.B**).

Aunque es difícil inferir relaciones evolutivas o de homología mediante estos análisis, los árboles si que ponen de manifiesto que existía al menos una proteína FHR en el ancestro común entre humanos y ratones. Esta proteína ancestral común dio lugar a FHR-1 (o al grupo FHR-1, FHR-2 y FHR-5) en humanos y a FHR-E en el ratón. Esto se aprecia porque en el primer árbol FHR-E aparece aparte del de FH y el resto de FHR de ratón. La distancia es tan grande entre FHR-E y el resto de las proteínas de la familia de FH en el ratón que en el segundo análisis (sin constricciones taxonómicas) FHR-E aparece en el clado con el resto de las proteínas humanas, en un subclado que incluye FHR-E y el grupo FHR-1, FHR-2 y FHR-5.

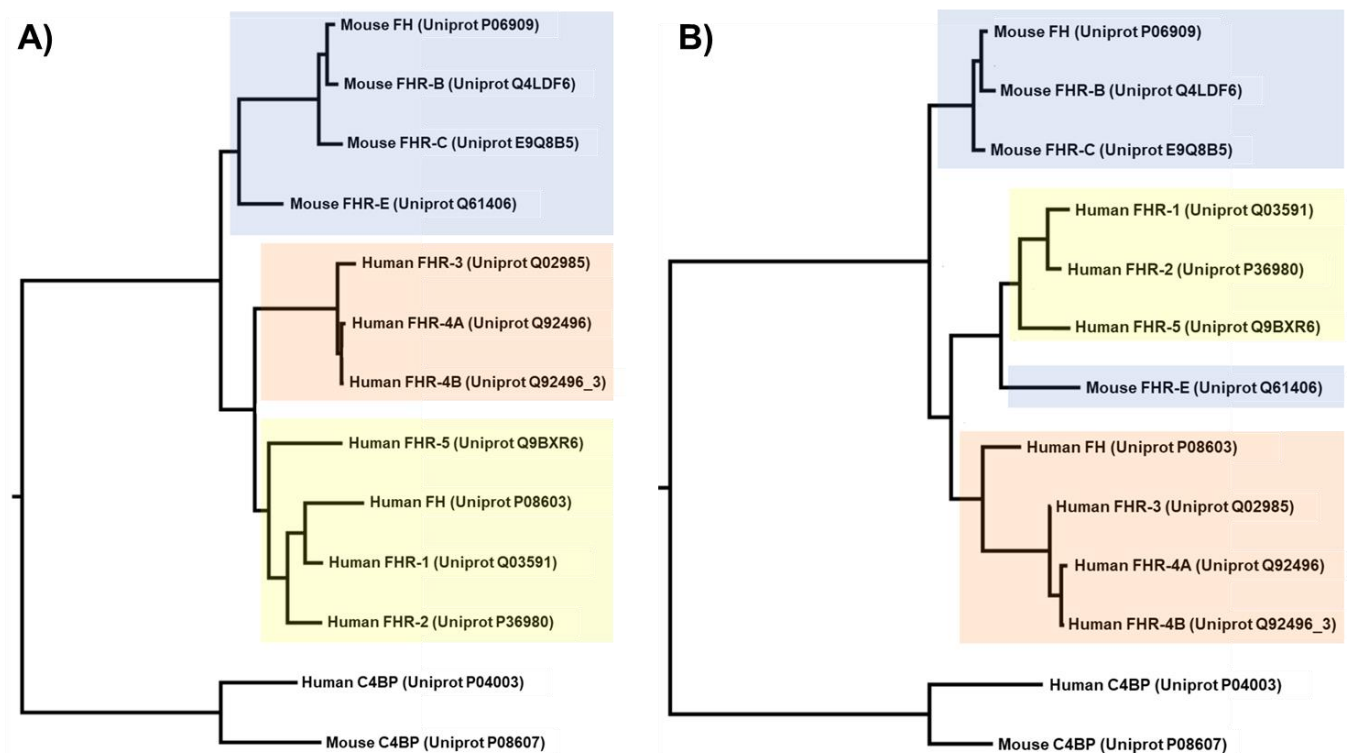


Figura 39. WB con el antisuero de conejo anti-FHR-B de ratón sobre muestras de plasma de humano control y de un portador de la delección Δ CFHR3-CFHR1, así como de la proteínas FHR-1 y FHR-3 purificadas.

7. DISCUSIÓN

Las proteínas FHR son un grupo de moléculas con un repertorio de funciones heterogéneas y que a veces, a simple vista, pueden resultar contradictorias, lo cual dificulta que se les haya asignado un papel concreto dentro de la compleja red que es el sistema inmunitario en general y el sistema del complemento en particular.

Dada su influencia cada vez mejor descrita en patologías, es de vital importancia conocer su función dentro del sistema del complemento en humanos, pero también la función que tienen en la especie modelo en estudios inmunológicos: el ratón.

Es por eso por lo que en este trabajo nos hemos propuesto arrojar algo de luz sobre este grupo de proteínas en esta especie, tratando de encontrar homologías funcionales entre humanos y ratón que nos permitan trazar paralelismos y detectar diferencias a la hora de generar y entender modelos de enfermedad de patologías relacionadas con el sistema del complemento.

7.1 Producción de reactivos específicos contras las proteínas FHR de ratón

El primer obstáculo al que nos enfrentamos a la hora de estudiar las proteínas FHR de ratón es la ausencia de reactivos específicos que reconozcan estas proteínas. Es por este motivo por lo que la primera tarea del trabajo fue producir reactivos específicos para detectar y purificar las proteínas FHR de ratón.

Con este fin, aprovechando la homología y la alta identidad de secuencia entre FH y los FHR, desarrollamos un anticuerpo policlonal anti-FH de ratón que reconoce epítopos compartidos de FH con los FHR y nos permite detectar estas proteínas como bandas inespecíficas en muestras de suero de ratones *wild-type*, *knockout* para el gen de FH y doble *knockout* para los genes de FH y de los FHR por WB. La alta inespecificidad del reactivo suponía que se reconocieran otra serie de proteínas inespecíficas fuera de la familia de FH.

Este reactivo nos permitió purificar mediante cromatografía de inmunoafinidad la proteína FHR-B de ratón recombinante a partir de sobrenadante de cultivo de células humanas. En esta muestra, en la que la cantidad de proteínas total es mucho menor con respecto a la cantidad de proteínas en una muestra de suero de ratón, este reactivo reconocía específicamente la proteína recombinante FHR-B de ratón y lo que nos permitió purificarla en homogeneidad. Utilizando esta proteína FHR-B recombinante purificada se desarrolló un antisuero de conejo policlonal anti-FHR-B de ratón que nos permite identificar esta proteína y el resto de los FHR de ratón en muestras de tejido (tanto sangre como cortes histológicos) de ratones *wild-type*, *knockout* para el gen de FH y doble *knockout* para los genes de FH y de los FHR en experimentos de WB y de inmunofluorescencia. No es llamativo que

este reactivo policlonal reconozca todas la proteínas de la familia de FH, debido a la homología y la alta identidad de secuencia.

7.2 Detección de proteínas FHR presentes en plasma de ratón

La cantidad de información sobre los FHR de ratón al comienzo del trabajo era muy limitada. De hecho, no se tenía ni siquiera la certeza de cuántos de los cinco genes se expresaban a nivel de proteína. Estudios previos por análisis del genoma de las bibliotecas de cDNA sugieren que *Cfhra* y *Cfhrd* podrían ser pseudogenes que no se expresan. Aunque FHR-E se encuentra a nivel de transcrito, la evidencia a nivel de proteína era inexistente en los estudios previos. Es por eso por lo que el primer objetivo del trabajo era determinar qué proteínas FHR se expresan en el ratón y se encuentran circulando en plasma.

Utilizando el anticuerpo policlonal anti-FH desarrollado anteriormente, se purificaron proteínas de un suero de ratón *knockout* para el gen de FH por cromatografía de inmunoafinidad. De esta manera, aunque el anticuerpo tiene reactividad cruzada con otras proteínas no relacionadas con la familia de FH, obtuvimos una preparación que contiene mayoritariamente las proteínas FHR de ratón, ya que como hemos explicado, estas son homólogas a FH y tienen una identidad de secuencia con esta proteína muy elevada. Llevamos a cabo una identificación por espectrometría de masas de las proteínas eluidas de la columna y se identificaron péptidos correspondientes a las proteínas de ratón FHR-B, FHR-C y FHR-E. Los péptidos identificados para cada proteína generan una cobertura alta de la misma, de casi el 60% de la secuencia total. Además, los péptidos identificados tienen una distribución a lo largo de todos los SCR de las proteínas, distribuidos homogéneamente a lo largo de toda la secuencia. Por primera vez, presentamos evidencia de que FHR-E se expresa y lo identificamos circulando en sangre de ratón. A pesar de que FHR-A es el que tiene mayor identidad de secuencia con FH, y por tanto debería tener epítomos conservados con FH en mayor cantidad, no se encontraron péptidos correspondientes a esta proteína en ninguno de los experimentos. La presencia de estas proteínas en otros tejidos no se ha estudiado, aunque las proteínas solubles del sistema del complemento y los FHR humanos son plasmáticas, de modo que, aunque se pueden encontrar unidas a superficies de tejidos específicos, su presencia mayoritaria es en la sangre.

En este ensayo se detectaron otras proteínas inespecíficas al anticuerpo. Algunas de ellas se descartaron como contaminantes tras el experimento control. Sin embargo, hay otras proteínas del complemento que identificamos como específicas en el primer experimento, siendo estas proteínas C3, C4b y properdina. Puede que al menos en el caso de C3 la estemos detectando porque coeluye junto con FHR-B,

ya que nuestros resultados han identificado a esta proteína como uno de los ligandos de FHR-B de ratón.

7.3 Caracterización funcional y estructural de las proteínas FHR de ratón

Los estudios funcionales previos sobre las proteínas FHR de ratón al comienzo del trabajo eran muy limitados, de modo que nuestro segundo objetivo fue caracterizar funcional y estructuralmente las proteínas FHR de ratón que fueran relevantes desde un punto de vista de las homologías funcionales que pudieran existir con las proteínas FHR humanas.

Concretamente, se buscaban homólogos funcionales de la proteínas FHR-1 humana. Estudios recientes informan de distintas funciones moduladoras del complemento del FHR-1 humano, tanto como regulador de la vía terminal (Heinen *et al*, 2009; Michelfelder *et al*, 2018), como activador del complemento al competir la función de FH (Merinero *et al* 2021; Márquez *et al*, 2022). La función antagonista de FH de FHR-1 se ha denominado en trabajos anteriores función desreguladora del complemento. Aunque la relevancia fisiológica de la regulación de la vía terminal está en duda, ambas actividades moduladoras del complemento descritas para FHR-1 sugieren que esta proteína puede actuar junto con FH para regular el complemento en superficies sanas en determinados contextos, pero que cuando la concentración o la actividad de FHR-1 aumentan, también puede actuar como desregulador e inductor de la inflamación. Se han identificado mutantes de FHR-1 asociados a las patologías relacionadas con desregulación del sistema del complemento aHUS y C3G. Estos mutantes tienen una clara asociación genotipo/fenotipo en estas enfermedades y ponen de manifiesto la importancia de dos fenómenos clave en la realización de su actividad desreguladora: el reconocimiento de superficies a través del dominio C-terminal y el aumento de avidéz por los depósitos en superficies por la dimerización. Por lo tanto, es de vital importancia el estudio de estos dos fenómenos en las proteínas FHR de ratón.

Con el fin de estudiar el dominio C-terminal de las proteínas FHR de ratón, se diseñó un repertorio de construcciones híbridas entre el dominio N-terminal del FHR-1 humano y los distintos dominios C-terminal de las proteínas de familia de FH de ratón. Se decidió este diseño modular de las construcciones por varias razones. En primer lugar, estudiar si los dominios C-terminal de los FHR de ratón sustituyen la función del C-terminal del FHR-1 humano. En segundo lugar, potenciar mediante la dimerización a través del N-terminal del FHR-1 humano el posible efecto modulador de complemento que tengan las moléculas con el

C-terminal de los FHR de ratón. Por último, estas proteínas presentan una ventaja experimental a la hora de su purificación y detección en ensayos al poder ser reconocidas por anticuerpos monoclonales contra FHR-1 humano.

Para estudiar en mayor detalle la proteína FHR-B de ratón, también se diseñó una construcción híbrida entre el dominio N-terminal del FHR-1 humano y el dominio N-terminal del FHR-B de ratón para ver qué papel juega este dominio en la unión a ligandos y superficies de esta proteína. Con el objetivo de investigar el papel del dominio N-terminal de FHR-B en la posible dimerización de la molécula se creó una construcción híbrida en la que el dominio N-terminal de FHR-1 se sustituye por el mismo dominio de FHR-B de ratón para ver si este sustituye la capacidad de formar dímeros del N-terminal en la proteína humana. También se diseñó una construcción de la proteína FHR-B completa. Estas dos últimas construcciones, al no tener el dominio N-terminal de FHR-1 humano, se diseñaron con etiquetas de polihistidina en el N-terminal, ya que como hemos explicado los dominios C-terminal de las proteínas FHR son importantes en su función. Estudios previos con proteínas recombinantes de la familia de FH muestran que la presencia de etiquetas de polihistidina en las proteínas no afecta a su función ni a su dimerización (Dunne *et al*, 2021). Aun así, nosotros diseñamos la etiqueta con un sitio de corte para la proteasa HRV3C para eliminar la etiqueta después de la purificación y dejar solamente dos aminoácidos Gly/Pro en el extremo N-terminal.

Todas las proteínas recombinantes se expresaron mediante transfección transitoria en células de mamífero. Se eligió este sistema para producir proteínas que mantuvieran los patrones de glicosilación de las proteínas nativas, lo que puede tener implicaciones para el correcto plegamiento y función de estas. Además, la expresión en células HEK293 FreeStyle™ proporciona un método libre de suero para expresar y purificar las proteínas FHR, evitando al mismo tiempo la reactividad cruzada y/o la contaminación por componentes del complemento y otras proteínas que están presentes en los medios de expresión basados en suero.

Para testar la capacidad de regular o desregular complemento de las distintas proteínas recombinantes diseñadas, se realizaron diferentes ensayos hemolíticos que miden la activación neta de la VA del complemento sobre distintas células, midiendo el porcentaje de lisis total de estas células. En estos ensayos se prueba la capacidad que tiene una determinada proteína de modular la actividad hemolítica del complemento del suero de ratón a través de la VA. Probamos la activación del complemento de ratón sobre dos superficies celulares modelo que se usan en ensayos hemolíticos en estudios sobre el sistema del complemento: eritrocitos de cobaya y de carnero.

Los eritrocitos de cobaya representan una superficie muy interesante para estos ensayos. A pesar de que los eritrocitos de cobaya se lisan con suero humano y de

ratón, la suplementación con FH es suficiente para protegerlos de la lisis mediada por la VA. Esto está en línea con el hecho de que los eritrocitos de cobaya expresan ácido siálico $\alpha 2,3$ (Sun *et al*, 2010), que es un ligando de unión del FH. Por ello, porcentajes de suero creciente lisan estas células de manera dosis-dependiente, ya que, aunque existe cierta regulación, esta no es completa. En otras superficies sin ligandos de FH, como los eritrocitos de conejo, el suero humano y de ratón las lisa a través de la VA independientemente del porcentaje de suero utilizado. Por eso, si se eliminan los ácidos siálicos de los eritrocitos de cobaya, el suero es capaz de lisarlos a cualquier porcentaje utilizado (Brown *et al*, 1983). Además, se ha visto que sobre eritrocitos de cobaya hay desregulación de la VA del complemento por parte de FHR-1 humano, que es capaz de competir la función reguladora de FH sobre esta superficie. Por lo tanto, los eritrocitos de cobaya, a pesar de ser en general activadores de la VA, reclutan FH a su superficie y son susceptibles de ser desregulados por FHR-1. Por ello, estas células suponen un modelo de superficie propia modificada que activa la VA en la que se puede dar la competición de FH con los FHR (Goicoechea de Jorge *et al*, 2013; Dopler *et al*, 2021).

Por otro lado, los eritrocitos de carnero no activan la VA del complemento del suero humano o de ratón. Esto es debido a la unión de FH a los ácidos siálicos presentes en esta superficies y su consiguiente regulación. La eliminación de los ácidos siálicos de esta superficie permite la lisis a través de la VA del complemento (Fearon, 1978). Sin embargo, no se produce desregulación de la VA del complemento en presencia de FHR-1 humano. Esto es debido a que el C-terminal de FHR-1 humano no une ácidos siálicos y depende exclusivamente en su unión al C3b depositado para unirse a la superficie (Martin Merinero *et al*, 2021). Por ello, estas células suponen un modelo de superficie propia.

Esta diferencia entre ambas superficies puede deberse a que la unión simultánea de FH a diferentes regiones de C3b (a través de sus dominios N-terminal y C-terminal), en conjunción con su unión a los ácidos siálicos de la superficies resulta en una interacción muy fuerte de FH con el C3b depositado en superficies a baja densidad. La capacidad de FH para unir C3b se multiplica por 10 en presencia de residuos de ácido siálico (Blaum *et al*, 2015). Un estudio reciente ha propuesto que el FH se une simultáneamente al ácido siálico y al C3b para regular la activación del complemento, a través de dos sitios de unión diferentes en el C-terminal (Hyvärinen *et al*, 2016). En contraste, el FHR-1 se une eficazmente a los fragmentos activados de C3 presentes en los depósitos a alta densidad de las superficies opsonizadas, mientras que FH en este contexto se une peor (Martin Merinero *et al*, 2021). Por esta razón, en eritrocitos de carnero la desregulación de FH por parte de FHR-1 no puede darse, ya que sus ligandos de superficie otorgan a estas células la categoría de superficie propia, de modo que el FH se une fuertemente a los depósitos de C3b que se producen accidentalmente por la activación espontánea de C3. Sin embargo, en los eritrocitos de cobaya, a pesar de tener ácido siálico $\alpha 2,3$, esto no es suficiente para replicar los ligandos de

superficie de una célula propia. En este contexto, FH se va a unir menos y peor a los depósitos de C3 que se producen, aumentando estos en cantidad y densidad, generando una situación en la que el FHR-1 va a poder unirse mejor que el FH y desregular complemento.

En nuestros experimentos con eritrocitos de cobaya, hemos observado que entre todos los FHR de ratón, sólo el C-terminal de FHR-B es capaz de sustituir la función del C-terminal de FHR-1 humano y competir específicamente la función de FH sobre estas superficies, desregulando complemento a través de la vía alternativa. En un ensayo sobre estos eritrocitos comparando la actividad de los dominios C-terminal de FHR-B y FHR-1 humano, se observa que el C-terminal del FHR-B desregula mucho más sobre esta superficie, debido a una afinidad mucho mayor a través del C-terminal.

Sorprendentemente, al comparar la actividad de los dominios C-terminal de las proteínas sobre eritrocitos de carnero, observamos que sobre estas células FHR-B de ratón sí es capaz de competir específicamente la función de FH y desregular complemento, al contrario de lo que hemos explicado que ocurre con el FHR-1 humano. De nuevo, este resultado se puede explicar por una afinidad de FHR-B mucho mayor por los ligandos de superficie o los depósitos de C3. Sobre estas células también se observa que solo el C-terminal de FHR-B desregula complemento de entre todos los FHR de ratón. Además, determinamos que esta actividad se da exclusivamente a través del C-terminal de esta proteína y que el dominio N-terminal no participa en el reconocimiento y desregulación sobre ambas superficies.

La función desreguladora del complemento y consiguiente promoción de la lisis por parte de FHR-B, al igual que la de FHR-1 es una actividad antagonista de FH. Esta función se da por la promoción de la VA y la activación de su convertasa de C3, ya que los ensayos hemolíticos diseñados estudian el efecto de las proteínas sobre esta vía. Además, esta desregulación por parte de FHR-B es dependiente de la cantidad de FH, ya que situaciones de lisis aumentada por efecto de FHR-B se pueden controlar añadiendo FH adicional al suero, recuperando la lisis normal o reduciéndola completamente.

Ensayos hemolíticos con la proteína FHR-B completa revelaron que esta tiene una actividad equivalente a la proteína híbrida dimérica. De manera opuesta, el mutante monomérico era incapaz de desregular complemento sobre estas superficies. Se sabe que la dimerización aumenta significativamente la avidéz de FHR-1, FHR-2 y FHR-5 por sus ligandos *in vivo* y permite que FHR-1 compita la función de FH a concentraciones fisiológicamente relevantes. Esta avidéz impulsada por la dimerización permite a estas proteínas funcionar como

desreguladores del complemento al actuar como antagonistas competitivos de FH (Goicoechea de Jorge *et al*, 2013; Tortajada *et al*, 2013; Márquez *et al*, 2022).

De modo que, para determinar la estructura cuaternaria de la proteína se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación por AUC. Estos ensayos pusieron de manifiesto que la estructura del FHR-B no es monomérica, si no que coexisten en equilibrio formas monoméricas y dimericas en proporción 40:60. Esta dimerización se da por un mecanismo diferente al del FHR-1 humano y la interacción entre unidades es mucho más débil en el caso de los dímeros de FHR-B, ya que condiciones ácidas o básicas extremas eliminaban la interacción entre moléculas, siendo este fenómeno reversible. En el caso de los dímeros de las proteínas FHR-1, FHR-2 y FHR-5, solo se pueden separar en condiciones de SDS-PAGE y no en condiciones de pH extremo. Estos dímeros se dan en orientación cabeza-cola por interacción entre los SCR1 de las dos moléculas, en la cual los residuos Tyr34, Ser46 y Tyr39 juegan un papel vital en la estabilización del complejo (Goicoechea de Jorge *et al*, 2013; Tortajada *et al*, 2013). Al igual que en las proteínas humanas, el dominio de dimerización de FHR-B está en el N-terminal, entre los SCR1, 2 y 3, pero carecen de los residuos de dimerización descritos para los FHR humanos. Los dímeros de FHR-B tienen un f/f_0 de $\sim 1,35$, lo que indica que esta proteína tiene una forma más globular que los dímeros del FHR-1 humano, con un f/f_0 de $\sim 1,65$. La diferencia en los coeficientes de fricción entre FHR-B de ratón y FHR-1 humano son indicativos de una diferente conformación en los dímeros de estas proteínas, siendo las moléculas dimericas más globulares en el caso de FHR-B de ratón, lo que podría sugerir que estos se disponen en orientación cabeza-cabeza, al contrario que los dímeros humanos.

Todas estas diferencias entre los dímeros de FHR-B y los dímeros de los FHR humanos sugieren un mecanismo alternativo de dimerización entre las dos especies. Evolutivamente no es de extrañar que la dimerización haya surgido de manera convergente entre las moléculas de ambas especies. Al fin y al cabo, la dimerización es un mecanismo biológico general para aumentar la avidéz, la especificidad y la diversidad del sitio de unión. De hecho, parece que dentro de la misma especie han aparecido mecanismos de dimerización alternativos dentro de la familia de FH, ya que se han descrito fenómenos de dimerización para la molécula de FH humana, siendo capaz de formar dímeros débiles con un rango estimado de entre 4 y 15% de dímeros presentes en concentraciones de suero normales de FH por un mecanismo alternativo al de FHR-1, FHR-2 y FHR-5 (Dunne *et al*, 2021).

Para determinar los ligandos de la proteína FHR-B, se diseñaron ensayos de unión de la proteína a C3b y C3 en placa. C3b es un ligando conocido de FH y FHR-1. Recientemente, se ha identificado a C3 como otro ligando de FHR-1 por el C-terminal, lo cual tiene una relevancia funcional muy importante en esta

proteína (Martín Merinero *et al*, 2021). Nuestros resultados indican que FHR-B es el único de los FHR de ratón que se une a C3b o a C3 a través del dominio C-terminal. De nuevo, la dimerización aparece como un mecanismo indispensable en la unión por el aumento de avidéz por estos ligandos. De manera homóloga al FHR-1 humano, FHR-B es capaz de unir C3b y C3. Además, lo hace con mayor afinidad que la proteína humana en estos ligandos. Este resultado de la afinidad por C3b y C3 se corresponde con los resultado de los experimento funcionales y explica por qué el FHR-B es un mejor competidor de la función de FH. De hecho, puede ser la razón por la cual FHR-B es capaz de desregular complemento sobre eritrocitos de carnero. La mayor afinidad del FHR-B por el C3b depositado hace que sea capaz de unirse a los depósitos de baja densidad que se generan accidentalmente por la activación espontánea de C3.

Tanto la proteína FHR-1 humana como FHR-B de ratón se han descrito como antagonistas competitivos de FH por la unión a C3b (Cserhalmi *et al*, 2017). Hasta ahora se tenía la idea de que sería bloqueando el sitio de unión entre FH y C3b como estas proteínas desregulan complemento sobre superficies, ya que se ha descrito que la interfaz de unión entre FHR-1 y C3b/C3d es idéntica a la que se produce entre el dominio C-terminal (SCR19-20) de FH y C3b; y que FHR-1 no sólo compite con el C-terminal de FH por la unión a C3b, sino que también bloquea estéricamente la interacción que el N-terminal de FH realiza con C3b, y que es necesaria para la regulación por FH (Hannan *et al*, 2016). La inhibición competitiva de la unión de FH a C3b por parte de FHR-1 es un asunto controvertido.

Para estudiar la competición por la unión a C3b entre FH y FHR-B de ratón se diseñaron ensayos en placa de ELISA para ver si cantidades elevadas de FHR-B eran capaces de desplazar la unión de FH a C3b. Aunque hay reducción de la unión de FH por su ligando, la pérdida de unión es muy baja, incluso con un exceso molar de FHR-B 500:1 sobre FH. Además, la relevancia fisiológica de este ensayo de competición es cuestionable, ya que sabemos que la unión de FH (pero no de FHR-B) al C3b unido a la superficie se ve drásticamente potenciada por la presencia de ácidos siálicos. A pesar de que el ensayo de competición en placa de ELISA, al carecer de ácidos siálicos, confiere una ventaja artificial al FHR-B frente a FH, se observa una inhibición insignificante de la unión de FH a C3b a concentraciones muy altas de FHR-B. La elevada concentración necesaria de FHR-B para producir un pequeño efecto competitivo pone en duda la relevancia fisiológica de este fenómeno. Estos datos apoyan firmemente que el FHR-B no compite con FH por la unión de C3b en superficies fisiológicas (que contienen ácido siálico) a concentraciones normales. La inhibición competitiva no parece ser el fenómeno principal causante de la actividad desreguladora de FHR-B. Tal vez FHR-B se une a la molécula de C3b por un sitio de unión alostérico cercano al sitio

de unión de FH y que por tanto la reducción de la unión de FH que vemos en estos ensayo se deba a un efecto estérico. De este modo, FHR-B podría ser un antagonista alostérico o antagonista no competitivo de FH en la unión a C3b. Además, resultados preliminares (no mostrados en este trabajo) de ensayos de competición sobre superficies fisiológicas parecen indicar que efectivamente el FHR-B es incapaz de competir la unión de FH a depósitos de C3.

Estudios de las proteínas FHR humanas han observado que algunas FHR humanas, aunque no tienen actividad cofactora de FI por sí solas, sí aumentan la actividad cofactora de FH en el corte de C3b de manera sinérgica (Hellwage *et al*, 1999; McRae *et al*, 2015; Hebecker & Józsi, 2012).

Para estudiar esta función en el FHR-B se llevaron a cabo ensayos de actividad cofactora de FI. Estos experimentos muestran que la proteína FHR-B de ratón no tiene por si sola actividad cofactora de FI en el corte proteolítico de C3b a iC3b. Sin embargo, al igual que lo descrito para varias de las proteínas FHR humanas, FHR-B potencia la actividad cofactora de FH, actuando sinérgicamente junto a esta en el corte proteolítico de C3b por FI. El corte proteolítico de la cadena α' de C3b está limitado por la cantidad inicial de FH.

Este experimento entra en conflicto con los anteriores resultados en los que FHR-B aparece como un competidor funcional de FH, con una actividad claramente activadora del complemento. Sin embargo, esos resultados se refieren únicamente a ensayos sobre superficies, mientras que en estos ensayos de actividad cofactora el C3b está en fase fluida. Este tipo de funciones aparentemente contradictorias también existen para la proteína FHR-1 humana. Estudios han observado actividades inhibitorias de FHR-1 sobre las convertasas de C3 y C5, aunque las altas concentraciones requeridas hacen que el impacto fisiológico sea dudoso (Dopler *et al*, 2021). En el experimento de actividad cofactora de FHR-B las concentraciones utilizadas también son altas, de modo que la relevancia fisiológica está por determinar. Como muchos otros procesos en los que están implicadas las proteínas FHR, parece que la concentración de estas proteínas y el contexto fisiológicos son de vital importancia para que el complemento tienda hacia la activación o hacia la regulación.

Dada la relación que existe entre las proteínas FHR humanas y algunas patologías relacionadas con la desregulación del complemento, nos propusimos estudiar la presencia y el efecto de FHR-B sobre superficies fisiológicas en un modelo animal de enfermedad. El modelo de ratón *knockout* para el gen de Cfh está descrito como modelo para C3G ya que desarrolla DDD espontánea, caracterizada por depósitos de C3 en la GBM, con el consiguiente desarrollo de glomerulonefritis (Pickering *et al*, 2002). Estos ratones están disponibles en el

animalario de nuestro laboratorio, y aunque no desarrollan fenotipo enfermo en las condiciones de mantenimiento de nuestras instalaciones, sí que tienen consumo total de C3 en plasma y depósito abundante de C3 en la GBM. También se usaron riñones de ratones *knockout* para los genes de *Cfh* y de todos los *Cfhr* que también presentan depósito de C3 en los glomérulos.

Se utilizaron secciones de riñones de estos animales para estudiar la proteína FHR-B en ensayos de inmunofluorescencia. La razón de hacer estos experimentos es que los glomérulos de estos ratones son superficies fisiológicas opsonizadas con C3 que presentan tanto fragmentos de C3 activado como polianiones fisiológicos. Estudiar la unión de la proteína FHR-B en un contexto fisiológico nos proporciona información muy valiosa. Estos ensayos ponen de manifiesto que el FHR-B de ratón se une a superficies de ratón con depósito de C3. Los ensayos con proteínas híbridas mostraron que esta unión se da a través del dominio C-terminal del FHR-B; y aunque FH también se une a través de este dominio a las superficies opsonizadas con C3, la unión del C-terminal de FHR-B es mucho más fuerte. Además, al igual que lo que ocurre con el FHR-1 humano, la unión del FHR-B es independiente de la composición o de ácidos siálicos de la superficie, lo que podría indicar que, al igual que el FHR-1 humano, FHR-B no une estos ligandos. De nuevo, la dimerización de FHR-B se presenta como un mecanismo necesario para la unión a los depósitos de C3 por el aumento de avidéz de las moléculas dimericas. Las proteínas FHR-C y FHR-E no tienen la capacidad de unirse a las superficies con depósito de C3 a través de sus dominios C-terminal.

Un ensayo de activación con suero sobre esta superficie mostró que, al igual que la proteína FHR-1 humana, el FHR-B de ratón, al unirse a esta superficie, promueve la activación del complemento a través de la VA y el aumento del depósito de C3 sobre esas superficies, compitiendo la función reguladora de FH. Este resultado, en conjunción con el hecho de que encontramos FHR-B endógeno unido a los depósitos de C3 en los modelos animales con depósito de esta proteína en los glomérulos, pone de manifiesto que FHR-B podría jugar un papel en el desarrollo de la enfermedad. De este modo, en los animales *knockout Cfhr* *-/-*, en los que no existe regulación por FH y el C3 se deposita sobre los glomérulos, el FHR-B estaría implicado en el aumento o la aceleración de estos depósitos, promoviendo el desarrollo de la enfermedad.

7.4 Homologías funcionales entre FHR-B de ratón y FHR-1 humano

En este trabajo hemos identificado homologías funcionales entre la proteína FHR-B de ratón y FHR-1 de humanos. Aunque estos dos genes no parecen ser homólogos evolutivos, ya que los estudios filogenéticos que hemos realizado no parecen señalar una relación evolutiva directa entre ambas proteínas, sí que son homólogos funcionales ya que comparten ciertas características. Algunas de estas similitudes parecen haber aparecido por evolución convergente, por ejemplo, el hecho de que las dos proteínas formen dímeros, esenciales para su función, mediante mecanismos diferentes. Ambas proteínas comparten también los ligandos de unión C3b y C3. Además, las dos tienen una actividad desreguladora del complemento siendo antagonistas de FH, compitiendo la función de esta proteína y promoviendo la activación del complemento por unión a depósitos de C3b. En ambas proteínas, esta desregulación no se da por competición directa con FH por la unión al ligando C3b, sino que se da porque tienen una función antagónica a FH, atrayendo C3 a la superficie y promoviendo la formación de C3 convertasas adicionales. En este caso, FHR-B actuaría de una manera similar a los mutantes de FHR-1 con ganancia de función por multimerización, que tienen una avidéz aumentada por los depósitos de C3 sobre superficies opsonizadas. También, al igual que FHR-1, FHR-B se une a los depósitos de C3 en las superficies celulares independientemente de la presencia o ausencia de ácidos siálicos.

Adicionalmente, descubrimos que el anticuerpo policlonal anti-FHR-B de ratón reconoce bandas inespecíficas por WB a la altura de los FHR en muestras de suero humano normal, pero no en muestras de suero humano portador de la delección Δ CFHR3-CFHR1. Utilizando las proteínas purificadas FHR-1 y FHR-3 humanas, se determinó que la reactividad cruzada de este anticuerpo era con FHR-1. Esto indica que existen epítomos compartidos entre la proteína FHR-1 humana y las proteínas FHR de ratón. Esta homología estructural probablemente se dé entre el SCR4 del FHR-1 humano y los SCR4 de FHR-B, SCR13 de FHR-C y SCR4 de FHR-E de ratón, ya que tienen un porcentaje de identidad de secuencia del 75, 74 y 78% respectivamente con la proteína humana, mientras que entre el resto de los dominios el porcentaje de identidad de secuencia ronda de media el 40%. Esta homología no es directa entre las proteínas, sino que se debe a lo altamente conservado que está el dominio SCR19 de FH entre ambas especies, y dentro de cada especie, lo altamente conservado que está este dominio entre FH y los FHR. Aunque los genes de los FHR de ratón y humano parecen ser homólogos, las secuencias han divergido lo suficiente como para establecer homologías directas entre los genes de los FHR humanos y los genes de FHR-B y FHR-C. Sólo FHR-E parece ser homólogo ortólogo a uno de los genes en humanos, siendo este el FHR-1, ya que su porcentaje identidad de secuencia medio entre SCRs individuales es del 70%. Los análisis filogenéticos realizados parecen poner de

manifiesto que existía al menos un gen de FHR en el ancestro común entre ratones y humanos, y que este gen dio lugar a FHR-1 (o al subgrupo formado por FHR-1, FHR-2 y FHR-5) en humanos y al FHR-E en ratón. FHR-B y FHR-C parecen haberse originado después de la especiación a partir del FH, ya que la distancia evolutiva entre estas proteínas es muy pequeña.

La homología estructural entre especies es importante, especialmente al darse en uno de los SCR del dominio C-terminal de FHR-1, un dominio encargado del reconocimiento de ligandos de superficies y por lo tanto esencial en la función de estas moléculas. Otro fenómeno muy interesante que se observa es la convergencia evolutiva que aparece entre FHR-1 y FHR-B con respecto a su estructura dimérica. Como hemos visto, la dimerización es un mecanismo esencial para la función de estas proteínas. De hecho, es tan importante que en ambas especies han aparecido mecanismos de dimerización independientes entre ellos como ya hemos explicado anteriormente.

7.5 Diferencias entre FHR-B de ratón y FHR-1 humano

Existe una diferencia importante entre el FHR-1 humano y el FHR-B de ratón, y es que el segundo tiene mucha más afinidad por los depósitos de C3. Esto se puede observar en los ensayos de unión en placa de ELISA a C3 y C3b, en los que el C-terminal del FHR-B presenta más afinidad por estos ligandos que el C-terminal del FHR-1. También tenemos evidencia de ello en los ensayos de unión a superficies fisiológicas, en los que el dominio C-terminal de FHR-B se une mejor a depósitos de C3 en glomérulos que el C-terminal de FH; mientras que, en humanos, el C-terminal de FHR-1 se une peor a depósitos de C3 en glomérulos que el C-terminal de FH. De hecho, el FHR-B de ratón se une de una manera equivalente a la de los mutantes ganancia de función del FHR-1. Además, esto se evidencia también en los ensayos hemolíticos, donde FHR-B funciona como un desregulador más potente del complemento. De hecho, al contrario que lo que ocurre con el FHR-1 humano, es capaz de desregular en eritrocitos de carnero, que es un modelo de superficie propia. De las proteínas humanas, solo los mutantes de FHR-1 con ganancia de función en el C-terminal (por reconocimiento de ácidos siálicos) y no el FHR-1 *wild-type* ni los mutantes de multimerización son capaces de desregular complemento en esta superficie.

Entonces, ¿por qué no se produce activación del complemento sobre superficies propias y daño en el ratón en condiciones normales? En una situación normal, existe un equilibrio en la modulación del sistema del complemento entre reguladores y activadores. Normalmente la activación basal del complemento a través de la activación espontánea de C3 está regulada, ya que el equilibrio tiende

hacia la regulación para mantener la homeostasis y evitar daño en células propias. Manteniendo el sistema en este estado, se controla siempre la homeostasis procesando inmunocomplejos y células apoptóticas que son opsonizadas inmediatamente y procesadas y se acelera la respuesta en caso de necesitarla, por ejemplo, para luchar contra una infección. En este contexto, aunque las proteínas FHR-1 y FHR-B suponen un factor activador de complemento, esta activación va a estar siempre regulada. Cuando hay un desequilibrio hacia el lado de la activación el sistema se descontrola y puede producir situaciones deletéreas para el organismo. Este desequilibrio hacia la activación promovido por los FHR puede darse de muchas maneras: por un aumento de los niveles de estas proteínas de manera local por situaciones infecciosas/inflamatorias o generalizada por mutaciones; por un aumento de la actividad de estas proteínas mediante mutaciones ganancia de función con reconocimiento adquirido de ácidos siálicos o por exceso de multimerización; o por una modificación de los ligandos de superficie de las células propias en procesos de inflamación, muerte celular u oxidación de epítomos de superficie por la edad. Además de estas situaciones, hay otros factores que afectan al equilibrio entre regulación y activación: 1) la concentración relativa entre FH/FHR en las proximidades de la zona de activación del complemento; 2) la densidad espacial del C3 depositado; 3) la composición de polianiones de la superficie sobre la que se activa el complemento, ya que las afinidades a los polianiones de las diferentes proteínas FHR puede variar; 4) la velocidad del flujo a través del sitio de activación del complemento en las superficies en contacto con la sangre (la mayor avidez de las especies diméricas favorecería su interacción con el ligando en relación con FH en condiciones de flujo elevado), como por ejemplo en el riñón.

Puede que una de las claves sean los niveles de las proteínas. No hemos conseguido cuantificar la concentración de FHR-B en sangre, pero los datos de proteómica parecen indicar que no es la proteína FHR de ratón que más se expresa. Teniendo en cuenta que los niveles de FH en el ratón son de $126 \pm 20 \mu\text{g/ml}$, puede que la relación entre FH y FHR-B sea suficiente para mantener el sistema bajo control. Tal vez, al ratón le conviene biológicamente tener un equilibrio entre regulación y activación del complemento mucho más sensible, que tienda hacia situaciones de activación para protegerse en un nicho biológico con mayor presencia de microorganismos patógenos. En un estudio se analizó la causa de la muerte natural en ratones de distintas cepas (CD1, C57BL6, B6/129 y 129s4/SvJae). Las causas de la muerte más comunes son: neoplasias (23%), complicaciones cardíacas (trombos, cardiomiopatías o arteritis) (18%), obstrucción urinaria (6%), nefropatía (5%), inflamación (3%), abscesos e infección (3%), neumonía (2%), megaesófago (1%) y causa sin determinar (35%) (Snyder *et al*, 2015). Aparte de muerte por causa sin determinar, las principales causas de muerte son neoplasias y afecciones cardíacas; patologías en las que el papel del complemento no es tan evidente.

Los retos evolutivos y biológicos a los que se enfrentan los ratones de laboratorio y los ratones salvajes son distintos. En un estudio sobre la mortalidad en una población de ratones en libertad se determinó que las principales causas de muerte son la depredación y las infecciones. En libertad, el ratio de supervivencia de los ratones de esta población era del 0,64/mes (Collins & Kays, 2014). Parece evidente que biológicamente un ratón no tiene que preocuparse por patologías asociadas a la edad o al deterioro de las superficies celulares. Tal vez, evolutivamente, al ratón le haya supuesto una ventaja adaptativa tener un sistema del complemento muy activo que le ayude a hacer frente a los numerosos retos infecciosos. La molécula FHR-B promovería una rápida activación sobre todas esas superficies extrañas a las que el ratón hace frente y además ayudaría a combatir patógenos que secuestran FH como mecanismo de evasión. De hecho, como ya hemos explicado, una de las hipótesis de origen de las proteínas FHR es por coevolución dirigida por microorganismos, ya que estos servirían originalmente para combatir este tipo de microorganismo que secuestran FH. Puede que, a la larga, una proteína desreguladora tan activa pueda tener un efecto deletéreo sobre algunas superficies propias modificadas por efecto de la edad o sobre superficies en las que se deposite accidentalmente C3 a un ritmo más rápido del que FH es capaz de regular. Pero lo que está claro es el éxito evolutivo de esta estrategia en una especie con una esperanza de vida tan corta.

8. CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se ha logrado una identificación más precisa de las proteínas FHR de ratón circulantes en sangre, gracias al desarrollo de reactivos específicos para estas proteínas. También se ha logrado una caracterización funcional y estructural en mayor detalle de la proteína FHR-B de ratón, identificando en ella funciones homólogas a las descritas para la proteína FHR-1 humana.

Estos resultados muestran que FHR-B es un buen candidato de estudio debido a que tiene funciones y características homólogas al FHR-1 humano. Son necesarios más estudios que expliquen el papel de FHR-B en el desarrollo de fenotipos patológicos en modelos animales y su relación con enfermedad. La caracterización completa del FHR-B y su papel en patología ayudará a un mejor entendimiento y desarrollo de futuros modelos animales y a un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares por los cuales las proteínas FHR participan en un gran abanico de enfermedades y procesos patogénicos.

Todas las conclusiones obtenidas se presentan a continuación:

- De las proteínas FHR de ratón, sólo FHR-B, FHR-C y FHR-E se expresan y circulan en plasma en el ratón.
- La proteína FHR-B de ratón forma dímeros mediante un mecanismo diferente al de los FHR humanos diméricos, lo que resulta imprescindible para su función.
- La proteína FHR-B de ratón tiene función desreguladora de complemento a través de la vía alternativa, promoviendo el depósito de C3 sobre las superficies compitiendo la función reguladora de FH.
- La competición por ligandos de superficie con FH parece ser un mecanismo irrelevante en la actividad desreguladora de FHR-B.
- La unión del FHR-B a superficies fisiológicas con depósito de C3 es independiente de la composición de ácidos siálicos de esa superficie.
- La proteína FHR-B de ratón es homóloga a FHR-1, compartiendo ligandos, estructura cuaternaria y la función desreguladora de complemento.
- La función desreguladora de FHR-B está aumentada con respecto al FHR-1 *wild-type*, comportándose de manera equivalente a los mutantes con ganancia de función de FHR-1.
- La proteína FHR-B de ratón tiene actividad sinérgica de la actividad cofactora de FH con FI en el corte proteolítico de C3b.

9. BIBLIOGRAFÍA

Referencias en orden alfabético:

- Alcorlo M, Tortajada A, Rodriguez de Cordoba S & Llorca O (2013) Structural basis for the stabilization of the complement alternative pathway C3 convertase by properdin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 13504-13509
- Antonioli A, White J, Crawford F, Renner B, Marchbank K, Hannan J, Thurman J, Marrack P & Holers V (2018) Modulation of the Alternative Pathway of Complement by Murine Factor H-Related Proteins. *The Journal of Immunology* 200: 316-326
- Arlaud G (2002) Structural biology of C1. *Biochemical Society Transactions* 30: A98-A98
- Arlaud G, Gaboriaud C, Thielens N, Budayova-Spano M, Rossi V & Fontecilla-Camps J (2002) Structural biology of the C1 complex of complement unveils the mechanisms of its activation and proteolytic activity. *Molecular Immunology* 39: 383-394
- Artuso R, Papa F, Grillo E, Mucciolo M, Yasui D, Dunaway K, Disciglio V, Mencarelli M, Pollazzon M, Zappella M, Hayek G, Mari F, Renieri A, LaSalle J & Ariani F (2011) Investigation of modifier genes within copy number variations in Rett syndrome. *Journal of Human Genetics* 56: 508-515
- Bajic G, Degn S, Thiel S & Andersen G (2015) Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *The EMBO Journal* 34: 2735-2757
- Banda N, Levitt B, Wood A, Takahashi K, Stahl G, Holers V & Arend W (2010) Complement activation pathways in murine immune complex-induced arthritis and in C3a and C5a generation in vitro. *Clinical & Experimental Immunology* 159: 100-108
- Banda N, Mehta G, Ferreira V, Cortes C, Pickering M, Pangburn M, Arend W & Holers V (2013) Essential Role of Surface-Bound Complement Factor H in Controlling Immune Complex-Induced Arthritis. *The Journal of Immunology* 190: 3560-3569
- Bao L, Haas M & Quigg R (2011) Complement Factor H Deficiency Accelerates Development of Lupus Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* 22: 285-295
- Bernabéu-Herrero M, Jiménez-Alcázar M, Anter J, Pinto S, Sánchez Chinchilla D, Garrido S, López-Trascasa M, Rodríguez de Córdoba S & Sánchez-Corral P (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: 276-286

- Bexborn F, Andersson P, Chen H, Nilsson B & Ekdahl K (2008) The tick-over theory revisited: Formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). *Molecular Immunology* 45: 2370-2379
- Blaum B, Hannan J, Herbert A, Kavanagh D, Uhrin D & Stehle T (2014) Structural basis for sialic acid-mediated self-recognition by complement factor H. *Nature Chemical Biology* 11: 77-82
- Blom A, Villoutreix B & Dahlbäck B (2003) Mutations in α -Chain of C4BP That Selectively Affect Its Factor I Cofactor Function. *Journal of Biological Chemistry* 278: 43437-43442
- Borza D (2017) Glomerular basement membrane heparan sulfate in health and disease: A regulator of local complement activation. *Matrix Biology* 57-58: 299-310
- Bresin E, Rurali E, Caprioli J, Sanchez-Corral P, Fremeaux-Bacchi V, Rodriguez de Cordoba S, Pinto S, Goodship T, Alberti M, Ribes D, Valoti E, Remuzzi G & Noris M (2013) Combined Complement Gene Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Influence Clinical Phenotype. *Journal of the American Society of Nephrology* 24: 475-486
- Brown E, Joiner K & Frank M (1983) Interaction of desialated guinea pig erythrocytes with the classical and alternative pathways of guinea pig complement in vivo and in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 71: 1710-1719
- Chen J, Cortes C & Ferreira V (2018) Properdin: A multifaceted molecule involved in inflammation and diseases. *Molecular Immunology* 102: 58-72
- Chen Q, Manzke M, Hartmann A, Büttner M, Amann K, Pauly D, Wiesener M, Skerka C & Zipfel P (2016) Complement Factor H-Related 5-Hybrid Proteins Anchor Properdin and Activate Complement at Self-Surfaces. *Journal of the American Society of Nephrology* 27: 1413-1425
- Chen Q, Wiesener M, Eberhardt H, Hartmann A, Uzonyi B, Kirschfink M, Amann K, Büttner M, Goodship T, Hugo C, Skerka C & Zipfel P (2014) Complement factor H-related hybrid protein deregulates complement in dense deposit disease. *Journal of Clinical Investigation* 124: 145-155
- Cheng Z, Hellwage J, Seeberger H, Zipfel P, Meri S & Jokiranta T (2006) Comparison of surface recognition and C3b binding properties of mouse and human complement factor H. *Molecular Immunology* 43: 972-979
- Cipriani V, Lorés-Motta L, He F, Fathalla D, Tilakaratna V, McHarg S, Bayatti N, Acar İ, Hoyng C, Fauser S, Moore A, Yates J, de Jong E, Morgan B, den Hollander A, Bishop P & Clark S (2020) Increased circulating levels of Factor H-Related Protein 4 are strongly associated with age-related macular degeneration. *Nature Communications* 11

- Clark S, McHarg S, Tilakaratna V, Brace N & Bishop P (2017) Bruch's Membrane Compartmentalizes Complement Regulation in the Eye with Implications for Therapeutic Design in Age-Related Macular Degeneration. *Frontiers in Immunology* 8: 1778
- Clark S, Ridge L, Herbert A, Hakobyan S, Mulloy B, Lennon R, Würzner R, Morgan B, Uhrin D, Bishop P & Day A (2013) Tissue-Specific Host Recognition by Complement Factor H Is Mediated by Differential Activities of Its Glycosaminoglycan-Binding Regions. *The Journal of Immunology* 190: 2049-2057
- Clark S, Schmidt C, White A, Hakobyan S, Morgan B & Bishop P (2014) Identification of Factor H-like Protein 1 as the Predominant Complement Regulator in Bruch's Membrane: Implications for Age-Related Macular Degeneration. *The Journal of Immunology* 193: 4962-4970
- Collins C & Kays R (2014) Patterns of Mortality in a Wild Population of White-Footed Mice. *Northeastern Naturalist* 21: 323-336
- Corbett B, Kantor A, Schulman H, Walker W, Lit L, Ashwood P, Rocke D & Sharp F (2006) A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins. *Molecular Psychiatry* 12: 292-306
- Cristobo I, Larriba M, de los Ríos V, García F, Muñoz A & Casal J (2011) Proteomic analysis of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ action on human colon cancer cells reveals a link to splicing regulation. *Journal of Proteomics* 75: 384-397
- Cserhalmi M, Csincsi Á, Mezei Z, Hebecker M, Uzonyi B & Józsi M (2017) The murine factor H-related protein FHR-B promotes complement activation. *Frontiers in immunology* 89: 142-143
- Csincsi Á, Kopp A, Zöldi M, Bánlaki Z, Uzonyi B, Hebecker M, Caesar J, Pickering M, Daigo K, Hamakubo T, Lea S, Goicoechea de Jorge E & Józsi M (2015) Factor H-Related Protein 5 Interacts with Pentraxin 3 and the Extracellular Matrix and Modulates Complement Activation. *The Journal of Immunology* 194: 4963-4973
- Csincsi Á, Szabó Z, Bánlaki Z, Uzonyi B, Cserhalmi M, Kárpáti É, Tortajada A, Caesar J, Prohászka Z, Jokiranta T, Lea S, Rodríguez de Córdoba S & Józsi M (2017) FHR-1 Binds to C-Reactive Protein and Enhances Rather than Inhibits Complement Activation. *The Journal of Immunology* 199: 292-303
- Ding J, Kelly U, Landowski M, Toomey C, Groelle M, Miller C, Smith S, Klingeborn M, Singhapricha T, Jiang H, Frank M & Bowes Rickman C (2015) Expression of Human Complement Factor H Prevents Age-Related Macular Degeneration-Like Retina Damage and Kidney Abnormalities in Aged Cfh Knockout Mice. *The American Journal of Pathology* 185: 29-42

- Dopler A, Stibitzky S, Hevey R, Mannes M, Guariento M, Höchsmann B, Schrezenmeier H, Ricklin D & Schmidt C (2021) Deregulation of Factor H by Factor H-Related Protein 1 Depends on Sialylation of Host Surfaces. *Frontiers in Immunology* 12:
- Dragon-Durey M, Frémeux-Bacchi V, Loirat C, Blouin J, Niaudet P, Deschenes G, Coppo P, Fridman W & Weiss L (2004) Heterozygous and Homozygous Factor H Deficiencies Associated with Hemolytic Uremic Syndrome or Membranoproliferative Glomerulonephritis: Report and Genetic Analysis of 16 Cases. *Journal of the American Society of Nephrology* 15: 787-795
- Dunne O, Gao X, Nan R, Gor J, Adamson P, Gordon D, Moulin M, Haertlein M, Forsyth V & Perkins S (2021) A Dimerization Site at SCR-17/18 in Factor H Clarifies a New Mechanism for Complement Regulatory Control. *Frontiers in Immunology* 11:
- Eberhardt H, Buhlmann D, Hortschansky P, Chen Q, Böhm S, Kemper M, Wallich R, Hartmann A, Hallström T, Zipfel P & Skerka C (2013) Human Factor H-Related Protein 2 (CFHR2) Regulates Complement Activation. *PLoS ONE* 8: e78617
- Esparza-Gordillo J, Soria J, Buil A, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J & Rodríguez de Córdoba S (2004) Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics* 56: 77-82
- Fakhouri F, Goicoechea de Jorge E, Brune F, Azam P, Cook H & Pickering M (2010) Treatment with human complement factor H rapidly reverses renal complement deposition in factor H-deficient mice. *Kidney International* 78: 279-286
- Fearon D (1978) Regulation by membrane sialic acid of 1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75: 1971-1975
- Forneris F, Ricklin D, Wu J, Tzekou A, Wallace R, Lambris J & Gros P (2010) Structures of C3b in Complex with Factors B and D Give Insight into Complement Convertase Formation. *Science* 330: 1816-1820
- Forneris F, Wu J, Xue X, Ricklin D, Lin Z, Sfyroera G, Tzekou A, Volokhina E, Granneman J, Hauhart R, Bertram P, Liszewski M, Atkinson J, Lambris J & Gros P (2016) Regulators of complement activity mediate inhibitory mechanisms through a common C3b-binding mode. *The EMBO Journal* 35: 1133-1149
- Fremeux-Bacchi V & Licht C (2009) Hereditary and acquired complement dysregulation in membranoproliferative glomerulonephritis. *Thrombosis and Haemostasis* 101: 271-278

- Fritsche L, Lauer N, Hartmann A, Stippa S, Keilhauer C, Oppermann M, Pandey M, Köhl J, Zipfel P, Weber B & Skerka C (2010) An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Human Molecular Genetics* 19: 4694-4704
- Fujita T, Matsushita M & Endo Y (2004) The lectin-complement pathway - its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews* 198: 185-202
- Gale D, Goicoechea de Jorge E, Cook H, Martínez-Barricarte R, Hadjisavvas A, McLean A, Pusey C, Pierides A, Kyriacou K, Athanasiou Y, Voskarides K, Deltas C, Palmer A, Frémeaux-Bacchi V, Rodriguez de Cordoba S, Maxwell P & Pickering M (2010) Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *The Lancet* 376: 794-801
- Gautam A, Panse Y, Ghosh P, Reza M, Mullick J & Sahu A (2015) Mutational analysis of Kaposica reveals that bridging of MG2 and CUB domains of target protein is crucial for the cofactor activity of RCA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 12794-12799
- Geerlings M, Volokhina E, de Jong E, van de Kar N, Pauper M, Hoyng C, van den Heuvel L & den Hollander A (2018) Genotype-phenotype correlations of low-frequency variants in the complement system in renal disease and age-related macular degeneration. *Clinical Genetics* 94: 330-338
- Goicoechea de Jorge E, Caesar J, Malik T, Patel M, Colledge M, Johnson S, Hakobyan S, Morgan B, Harris C, Pickering M & Lea S (2013) Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 4685-4690
- Goicoechea de Jorge E, Harris C, Esparza-Gordillo J, Carreras L, Arranz E, Garrido C, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P, Morgan B & Rodríguez de Córdoba S (2007) Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 240-245
- Goicoechea de Jorge E, López Lera A, Bayarri-Olmos R, Yebenes H, Lopez-Trascasa M & Rodríguez de Córdoba S (2018) Common and rare genetic variants of complement components in human disease. *Molecular Immunology* 102: 42-57
- Goicoechea de Jorge E, Tortajada A, García S, Gastoldi S, Merinero H, García-Fernández J, Arjona E, Cao M, Remuzzi G, Noris M & Rodríguez de Córdoba S (2018) Factor H Competitor Generated by Gene Conversion Events Associates with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* 29: 240-249

- Goicoechea de Jorge E, Yebenes H, Serna M, Tortajada A, Llorca O & Rodríguez de Córdoba S (2017) How novel structures inform understanding of complement function. *Seminars in Immunopathology* 40: 3-14
- Goodship T, Cook H, Fakhouri F, Fervenza F, Frémeaux-Bacchi V, Kavanagh D, Nester C, Noris M, Pickering M, Rodríguez de Córdoba S, Roumenina L, Sethi S, Smith R, Alpers C, Appel G, Ardissino G, Ariceta G, Arici M, Bagga A & Bajema I et al (2017) Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney International* 91: 539-551
- Gros P, Milder F & Janssen B (2008) Complement driven by conformational changes. *Nature Reviews Immunology* 8: 48-58
- Hannan J, Laskowski J, Thurman J, Hageman G & Holers V (2016) Mapping the Complement Factor H-Related Protein 1 (CFHR1):C3b/C3d Interactions. *PLOS ONE* 11: e0166200
- Harboe M, Ulvund G, Vien L, Fung M & Mollnes T (2004) The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clinical and Experimental Immunology* 138: 439-446
- Harris C, Heurich M, Rodriguez de Cordoba S & Morgan B (2012) The complotype: dictating risk for inflammation and infection. *Trends in Immunology* 33: 513-521
- Hebecker M & Józsi M (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: 19528-19536
- Hebecker M, Alba-Domínguez M, Roumenina L, Reuter S, Hyvärinen S, Dragon-Durey M, Jokiranta T, Sánchez-Corral P & Józsi M (2013) An Engineered Construct Combining Complement Regulatory and Surface-Recognition Domains Represents a Minimal-Size Functional Factor H. *The Journal of Immunology* 191: 912-921
- Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse H, Schirmer S, Gropp K, Enghardt T, Wallich R, Hälbig S, Mihlan M, Schlötzer-Schrehardt U, Zipfel P & Skerka C (2009) Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* 114: 2439-2447
- Heinen S, Sanchez-Corral P, Jackson M, Strain L, Goodship J, Kemp E, Skerka C, Jokiranta T, Meyers K, Wagner E, Robitaille P, Esparza-Gordillo J, Rodriguez de Cordoba S, Zipfel P & Goodship T (2006) De novo gene conversion in the RCA gene cluster (1q32) causes mutations in complement

factor H associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Human Mutation* 27: 292-293

- Hellwage J, Eberle F, Babuke T, Seeberger H, Richter H, Kunert A, Härtl A, Zipfel P, Jokiranta T & Józsi M (2006) Two factor H-related proteins from the mouse: expression analysis and functional characterization. *Immunogenetics* 58: 883-893
- Hellwage J, Jokiranta T, Koistinen V, Vaarala O, Meri S & Zipfel P (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: 345-352
- Herbert A, Kavanagh D, Johansson C, Morgan H, Blaum B, Hannan J, Barlow P & Uhrin D (2012) Structural and Functional Characterization of the Product of Disease-Related Factor H Gene Conversion. *Biochemistry* 51: 1874-1884
- Holmes L, Strain L, Staniforth S, Moore I, Marchbank K, Kavanagh D, Goodship J, Cordell H & Goodship T (2013) Determining the Population Frequency of the CFHR3/CFHR1 Deletion at 1q32. *PLoS ONE* 8: 60352
- Hughes A, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T & Chakravarthy U (2006) A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 38: 1173-1177
- Hyvärinen S, Meri S & Jokiranta T (2016) Disturbed sialic acid recognition on endothelial cells and platelets in complement attack causes atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 127: 2701-2710
- Irmischer S, Brix S, Zipfel S, Halder L, Mutlutürk S, Wulf S, Girdauskas E, Reichensperner H, Stahl R, Jungnickel B, Wiech T, Zipfel P & Skerka C (2019) Serum FHR1 binding to necrotic-type cells activates monocytic inflammasome and marks necrotic sites in vasculopathies. *Nature Communications* 10
- Ito N, Hataya H, Saida K, Amano Y, Hidaka Y, Motoyoshi Y, Ohta T, Yoshida Y, Terano C, Iwasa T, Kubota W, Takada H, Hara T, Fujimura Y & Ito S (2016) Efficacy and safety of eculizumab in childhood atypical hemolytic uremic syndrome in Japan. *Clinical and Experimental Nephrology* 20: 265-272
- Janssen B, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris J & Gros P (2006) Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature* 444: 213-216
- Jodele S, Licht C, Goebel J, Dixon B, Zhang K, Sivakumaran T, Davies S, Pluthero F, Lu L & Laskin B (2013) Abnormalities in the alternative pathway of complement in children with hematopoietic stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Blood* 122: 2003-2007

- Józsi M (2017) Factor H Family Proteins in Complement Evasion of Microorganisms. *Frontiers in Immunology* 8: 571
- Józsi M, Tortajada A, Uzonyi B, Goicoechea de Jorge E & Rodríguez de Córdoba S (2015) Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. *Trends in Immunology* 36: 374-384
- Kajander T, Lehtinen M, Hyvarinen S, Bhattacharjee A, Leung E, Isenman D, Meri S, Goldman A & Jokiranta T (2011) Dual interaction of factor H with C3d and glycosaminoglycans in host-nonhost discrimination by complement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 2897-2902
- Kiryluk K, Novak J & Gharavi A (2013) Pathogenesis of Immunoglobulin A Nephropathy: Recent Insight from Genetic Studies. *Annual Review of Medicine* 64: 339-356
- Kopp A, Strobel S, Tortajada A, Rodríguez de Córdoba S, Sánchez-Corral P, Prohászka Z, López-Trascasa M & Józsi M (2012) Atypical Hemolytic Uremic Syndrome-Associated Variants and Autoantibodies Impair Binding of Factor H and Factor H-Related Protein 1 to Pentraxin 3. *The Journal of Immunology* 189: 1858-1867
- Kotimaa J, Klar-Mohammad N, Gueler F, Schilders G, Jansen A, Rutjes H, Daha M & van Kooten C (2016) Sex matters: Systemic complement activity of female C57BL/6J and BALB/cJ mice is limited by serum terminal pathway components. *Molecular Immunology* 76: 13-21
- Krych-Goldberg M & Atkinson J (2001) Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunological Reviews* 180: 112-122
- Lachmann P (2009) The Amplification Loop of the Complement Pathways. *Advances in Immunology*: 115-149
- Lambris J, Lao Z, Oglesby T, Atkinson J, Hack C & Becherer J (1996) Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. *Journal of Immunology* 156: 4821-4832
- Langford-Smith A, Day A, Bishop P & Clark S (2015) Complementing the Sugar Code: Role of GAGs and Sialic Acid in Complement Regulation. *Frontiers in Immunology* 6
- Langford-Smith A, Keenan T, Clark S, Bishop P & Day A (2013) The Role of Complement in Age-Related Macular Degeneration: Heparan Sulphate, a ZIP Code for Complement Factor H?. *Journal of Innate Immunity* 6: 407-416
- Laursen N, Magnani F, Gottfredsen R, Petersen S & Andersen G (2012) Structure, Function and Control of Complement C5 and its Proteolytic Fragments. *Current Molecular Medicine* 12: 1083-1097

- Lebowitz J, Lewis M & Schuck P (2009) Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science* 11: 2067-2079
- Li X, Hao Z, Liu X & Li W (2020) Deficiency of Mouse FHR-1 Homolog, FHR-E, Accelerates Sepsis, and Acute Kidney Injury Through Enhancing the LPS-Induced Alternative Complement Pathway. *Frontiers in Immunology* 11: 1123
- Licht C, Heinen S, Józsi M, Löschmann I, Saunders R, Perkins S, Waldherr R, Skerka C, Kirschfink M, Hoppe B & Zipfel P (2006) Deletion of Lys224 in regulatory domain 4 of Factor H reveals a novel pathomechanism for dense deposit disease (MPGN II). *Kidney International* 70: 42-50
- Makou E, Herbert A & Barlow P (2013) Functional Anatomy of Complement Factor H. *Biochemistry* 52: 3949-3962
- Malik T, Gitterman D, Lavin D, Lomax-Browne H, Hiemeyer E, Moran L, Boroviak K, Cook H, Gilmore A, Mandwie M, Ahmad A, Alexander I, Logan G, Marchbank K, Bradley A & Pickering M (2021) Gain-of-function factor H-related 5 protein impairs glomerular complement regulation resulting in kidney damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.
- Márquez-Tirado B, Gutiérrez-Tenorio J, Tortajada A, Lucientes L, Caravaca-Fontán F, Malik TH, Roldán R, Elías S, Saiz A, Fernández-Juarez G, Sánchez-Corral P, Pickering MC, Praga M, Rodríguez de Córdoba S & Goicoechea de Jorge E (2022) Factor H-related protein 1 drives disease susceptibility and prognosis in C3 glomerulopathy. *JASN Journal of the American Society of Nephrology*. Aceptado para publicación el 1 de marzo de 2022, DOI 10.1681/ASN.2021101318.
- Martín Merinero H, García S, García-Fernández J, Arjona E, Tortajada A & Rodríguez de Córdoba S (2018) Complete functional characterization of disease-associated genetic variants in the complement factor H gene. *Kidney International* 93: 470-481
- Martín Merinero H, Subías M, Pereda A, Gómez-Rubio E, Juana Lopez L, Fernandez C, Goicoechea de Jorge E, Martin-Santamaria S, Cañada F & Rodríguez de Córdoba S (2021) Molecular bases for the association of FHR-1 with atypical hemolytic uremic syndrome and other diseases. *Blood* 137: 3484-3494
- Martínez-Barricarte R, Heurich M, Valdes-Cañedo F, Vazquez-Martul E, Torreira E, Montes T, Tortajada A, Pinto S, Lopez-Trascasa M, Morgan B, Llorca O, Harris C & Rodríguez de Córdoba S (2010) Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *Journal of Clinical Investigation* 120: 3702-3712

- Mayilian K, Kang Y, Dodds A & Sim R (2008) The Complement System in Innate Immunity. In *Innate Immunity of Plants, Animals and Humans: (Nucleic Acids and Molecular Biology)*, Heine H (ed) Springer, Berlin, Heidelberg
- McRae J, Duthy T, Griggs K, Ormsby R, Cowan P, Cromer B, McKinstry W, Parker M, Murphy B & Gordon D (2005) Human Factor H-Related Protein 5 Has Cofactor Activity, Inhibits C3 Convertase Activity, Binds Heparin and C-Reactive Protein, and Associates with Lipoprotein. *The Journal of Immunology* 174: 6250-6256
- Medjeral-Thomas N, Lomax-Browne H, Beckwith H, Willicombe M, McLean A, Brookes P, Pusey C, Falchi M, Cook H & Pickering M (2017) Circulating complement factor H-related proteins 1 and 5 correlate with disease activity in IgA nephropathy. *Kidney International* 92: 942-952
- Medjeral-Thomas N, Moffitt H, Lomax-Browne H, Constantinou N, Cairns T, Cook H & Pickering M (2019) Glomerular Complement Factor H-Related Protein 5 (FHR5) Is Highly Prevalent in C3 Glomerulopathy and Associated With Renal Impairment. *Kidney International Reports* 4: 1387-1400
- Mehta G, Ferreira V, Skerka C, Zipfel P & Banda N (2014) New insights into disease-specific absence of complement factor H related protein C in mouse models of spontaneous autoimmune diseases. *Molecular Immunology* 62: 235-248
- Meri S & Pangburn M (1990) Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 3982-3986
- Mestas J & Hughes C (2004) Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology* 172: 2731-2738
- Michelfelder S, Fischer F, Wäldin A, Hörle K, Pohl M, Parsons J, Reski R, Decker E, Zipfel P, Skerka C & Häffner K (2018) The MFHR1 Fusion Protein Is a Novel Synthetic Multitarget Complement Inhibitor with Therapeutic Potential. *Journal of the American Society of Nephrology* 29: 1141-1153
- Mihlan M, Hebecker M, Dahse H, Hälbig S, Huber-Lang M, Dahse R, Zipfel P & Józsi M (2009) Human complement factor H-related protein 4 binds and recruits native pentameric C-reactive protein to necrotic cells. *Molecular Immunology* 46: 335-344
- Morgan B & Gasque P (1997) Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clinical & Experimental Immunology* 107: 1-7
- Närkiö-Mäkelä M, Hellwage J, Tahkokallio O & Meri S (2001) Complement-Regulator Factor H and Related Proteins in Otitis Media with Effusion. *Clinical Immunology* 100: 118-126

- Noris M & Remuzzi G (2013) Overview of Complement Activation and Regulation. *Seminars in Nephrology* 33: 479-492
- Oran A & Isenman D (1999) Identification of Residues within the 727–767 Segment of Human Complement Component C3 Important for Its Interaction with Factor H and with Complement Receptor 1 (CR1, CD35). *Journal of Biological Chemistry* 274: 5120-5130
- Pangburn M & Müller-Eberhard H (1986) The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. *Biochemical Journal* 235: 723-730
- Pangburn M, Schreiber R & Müller-Eberhard H (1977) Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *Journal of Experimental Medicine* 146: 257-270
- Park C & Wright S (1996) Plasma Lipopolysaccharide-binding Protein Is Found Associated with a Particle Containing Apolipoprotein A-I, Phospholipid, and Factor H-related Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 271: 18054-18060
- Park C & Wright S (2000) Fibrinogen is a component of a novel lipoprotein particle: Factor H-related protein (FHRP)-associated lipoprotein particle (FALP). *Blood* 95: 198-204
- Pedersen D, Roumenina L, Jensen R, Gadeberg T, Marinozzi C, Picard C, Rybkine T, Thiel S, Sørensen U, Stover C, Fremeaux-Bacchi V & Andersen G (2017) Functional and structural insight into properdin control of complement alternative pathway amplification. *The EMBO Journal* 36: 1084-1099
- Pickering M, Cook H, Warren J, Bygrave A, Moss J, Walport M & Botto M (2002) Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nature Genetics* 31: 424-428
- Pickering M, Goicoechea de Jorge E, Martínez-Barricarte R, Recalde S, García-Layana A, Rose K, Moss J, Walport M, Cook H, Rodríguez de Córdoba S & Botto M (2007) Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains. *Journal of Experimental Medicine* 204: 1249-1256
- Pouw R, Vredevoogd D, Kuijpers T & Wouters D (2015) Of mice and men: The factor H protein family and complement regulation. *Molecular Immunology* 67: 12-20
- Recalde S, Tortajada A, Subias M, Anter J, Blasco M, Maranta R, Coco R, Pinto S, Noris M, García-Layana A & Rodríguez de Córdoba S (2015) Molecular Basis of Factor H R1210C Association with Ocular and Renal Diseases. *Journal of the American Society of Nephrology* 27: 1305-1311

- Reid K & Day A (1989) Structure-function relationships of the complement components. *Immunology Today* 10: 177-180
- Ricklin D & Lambris J (2013) Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Pathophysiological Mechanisms. *The Journal of Immunology* 190: 3831-3838
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K & Lambris J (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology* 11: 785-797
- Ricklin D, Reis E & Lambris J (2016) Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nature Reviews Nephrology* 12: 383-401
- Ripoché J, Day A, Harris T & Sim R (1988) The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochemical Journal* 249: 593-602
- Rodríguez de Córdoba S (2016) Complement genetics and susceptibility to inflammatory disease. Lessons from genotype–phenotype correlations. *Immunobiology* 221: 709-714
- Román-Ortiz E, Mendizabal Oteiza S, Pinto S, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P & Rodríguez de Córdoba S (2014) Eculizumab long-term therapy for pediatric renal transplant in aHUS with CFH/CFHR1 hybrid gene. *Pediatric Nephrology* 29: 149-153
- Ruseva M & Heurich M (2014) Purification and Characterization of Human and Mouse Complement C3. *The Complement System*: 75-91
- Sánchez-Corral P, González-Rubio C, Rodríguez de Córdoba S & López-Trascasa M (2004) Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Molecular Immunology* 41: 81-84
- Sánchez-Corral P, Pérez-Caballero D, Huarte O, Simckes A, Goicoechea de Jorge E, López-Trascasa M & Rodríguez de Córdoba S (2002) Structural and Functional Characterization of Factor H Mutations Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 71: 1285-1295
- Sánchez-Corral P, Pouw R, López-Trascasa M & Józsi M (2018) Self-Damage Caused by Dysregulation of the Complement Alternative Pathway: Relevance of the Factor H Protein Family. *Frontiers in Immunology* 9:
- Sansbury F, Cordell H, Bingham C, Bromilow G, Nicholls A, Powell R, Shields B, Smyth L, Warwicker P, Strain L, Wilson V, Goodship J, Goodship T & Turnpenny P (2014) Factors determining penetrance in familial atypical haemolytic uraemic syndrome. *Journal of Medical Genetics* 51: 756-764
- Schmidt C, Herbert A, Kavanagh D, Gandy C, Fenton C, Blaum B, Lyon M, Uhrín D & Barlow P (2008) A New Map of Glycosaminoglycan and C3b Binding Sites on Factor H. *The Journal of Immunology* 181: 2610-2619

- Schmidt C, Slingsby F, Richards A & Barlow P (2011) Production of biologically active complement factor H in therapeutically useful quantities. *Protein Expression and Purification* 76: 254-263
- Schuck P (2000) Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. *Biophysical Journal* 78: 1606-1619
- Sharma A & Pangburn M (1996) Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 10996-11001
- Shi K, Wang Z, Liu Y, Gong Y, Fu Y, Li S, Wood K, Hao J, Zhang G, Shi F & Yan Y (2016) CFHR1-Modified Neural Stem Cells Ameliorated Brain Injury in a Mouse Model of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *The Journal of Immunology* 197: 3471-3480
- Snyder J, Ward J & Treuting P (2015) Cause-of-Death Analysis in Rodent Aging Studies. *Veterinary Pathology* 53: 233-243
- Stevens B, Allen N, Vazquez L, Howell G, Christopherson K, Nouri N, Micheva K, Mehalow A, Huberman A, Stafford B, Sher A, Litke A, Lambris J, Smith S, John S & Barres B (2007) The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 131: 1164-1178
- Sun Y, Bi Y, Pu J, Hu Y, Wang J, Gao H, Liu L, Xu Q, Tan Y, Liu M, Guo X, Yang H & Liu J (2010) Guinea Pig Model for Evaluating the Potential Public Health Risk of Swine and Avian Influenza Viruses. *PLoS ONE* 5: e15537
- Tortajada A, Gutiérrez E, Goicoechea de Jorge E, Anter J, Segarra A, Espinosa M, Blasco M, Roman E, Marco H, Quintana L, Gutiérrez J, Pinto S, Lopez-Trascasa M, Praga M & Rodríguez de Córdoba S (2017) Elevated factor H-related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation in IgA nephropathy. *Kidney International* 92: 953-963
- Tortajada A, Pinto S, Martínez-Ara J, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P & Rodríguez de Córdoba S (2012) Complement factor H variants I890 and L1007 while commonly associated with atypical hemolytic uremic syndrome are polymorphisms with no functional significance. *Kidney International* 81: 56-63
- Tortajada A, Yébenes H, Abarrategui-Garrido C, Anter J, García-Fernández J, Martínez-Barricarte R, Alba-Domínguez M, Malik T, Bedoya R, Pérez R, Trascasa M, Pickering M, Harris C, Sánchez-Corral P, Llorca O & Rodríguez de Córdoba S (2013) C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *Journal of Clinical Investigation* 123: 2434-2446

- Ufret-Vincenty R, Aredo B, Liu X, McMahon A, Chen P, Sun H, Niederkorn J & Kedzierski W (2010) Transgenic Mice Expressing Variants of Complement Factor H Develop AMD-like Retinal Findings. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51: 5878-5887
- Val-Calvo J, Luque-Ortega J, Crespo I, Miguel-Arribas A, Abia D, Sánchez-Hevia D, Serrano E, Gago-Córdoba C, Ares S, Alfonso C, Rojo F, Wu L, Boer D & Meijer W (2018) Novel regulatory mechanism of establishment genes of conjugative plasmids. *Nucleic Acids Research* 46: 11910-11926
- Valoti E, Alberti M, Tortajada A, Garcia-Fernandez J, Gastoldi S, Besso L, Bresin E, Remuzzi G, Rodriguez de Cordoba S & Noris M (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: 209-219
- Varki A (2011) Letter to the Glyco-Forum: Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan "self-associated molecular patterns" dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. *Glycobiology* 21: 1121-1124
- Venables J, Strain L, Routledge D, Bourn D, Powell H, Warwicker P, Diaz-Torres M, Sampson A, Mead P, Webb M, Pirson Y, Jackson M, Hughes A, Wood K, Goodship J & Goodship T (2006) Atypical Haemolytic Uraemic Syndrome Associated with a Hybrid Complement Gene. *PLoS Medicine* 3: 431
- Vik D, Keeney J, Muñoz-Cánoves P, Chaplin D & Tack B (1988) Structure of the murine complement factor H gene. *Journal of Biological Chemistry* 263: 16720-16724
- Vik D, Muñoz-Cánoves P, Kozono H, Martin L, Tack B & Chaplin D (1990) Identification and sequence analysis of four complement factor H-related transcripts in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry* 265: 3193-3201
- Walport M (2001) Complement. *New England Journal of Medicine* 344: 1058-1066
- Weiler J, Daha M, Austen K & Fearon D (1976) Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73: 3268-3272
- Weismann D, Hartvigsen K, Lauer N, Bennett K, Scholl H, Issa P, Cano M, Brandstätter H, Tsimikas S, Skerka C, Superti-Furga G, Handa J, Zipfel P, Witztum J & Binder C (2011) Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* 478: 76-81

- Whaley K & Ruddy S (1976) Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *Journal of Experimental Medicine* 144: 1147-1163
- Wu J, Wu Y, Ricklin D, Janssen B, Lambris J & Gros P (2009) Structure of complement fragment C3b–factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nature Immunology* 10: 728-733
- Zhao J, Wu H, Khosravi M, Cui H, Qian X, Kelly J, Kaufman K, Langefeld C, Williams A, Comeau M, Ziegler J, Marion M, Adler A, Glenn S, Alarcón-Riquelme M, Pons-Estel B, Harley J, Bae S, Bang S & Cho S et al (2011) Association of Genetic Variants in Complement Factor H and Factor H-Related Genes with Systemic Lupus Erythematosus Susceptibility. *PLoS Genetics* 7: 1002079
- Zipfel P & Skerka C (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature Reviews Immunology* 9: 729-740
- Zipfel P & Skerka C (1994) Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins?. *Immunology Today* 15: 121-126
- Zipfel P, Edey M, Heinen S, Józsi M, Richter H, Misselwitz J, Hoppe B, Routledge D, Strain L, Hughes A, Goodship J, Licht C, Goodship T & Skerka C (2007) Deletion of Complement Factor H–Related Genes CFHR1 and CFHR3 Is Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *PLoS Genetics* 3: 41

