

ORGANIZADO POR:

Evidenze

Nacidos con riesgo: fundamentos genéticos de la C3G

Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba |
Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Madrid



AMPLIANDO EL HORIZONTE
EN EL ABORDAJE DE LAS NEFROPATÍAS RARAS.

Conflictos de interés

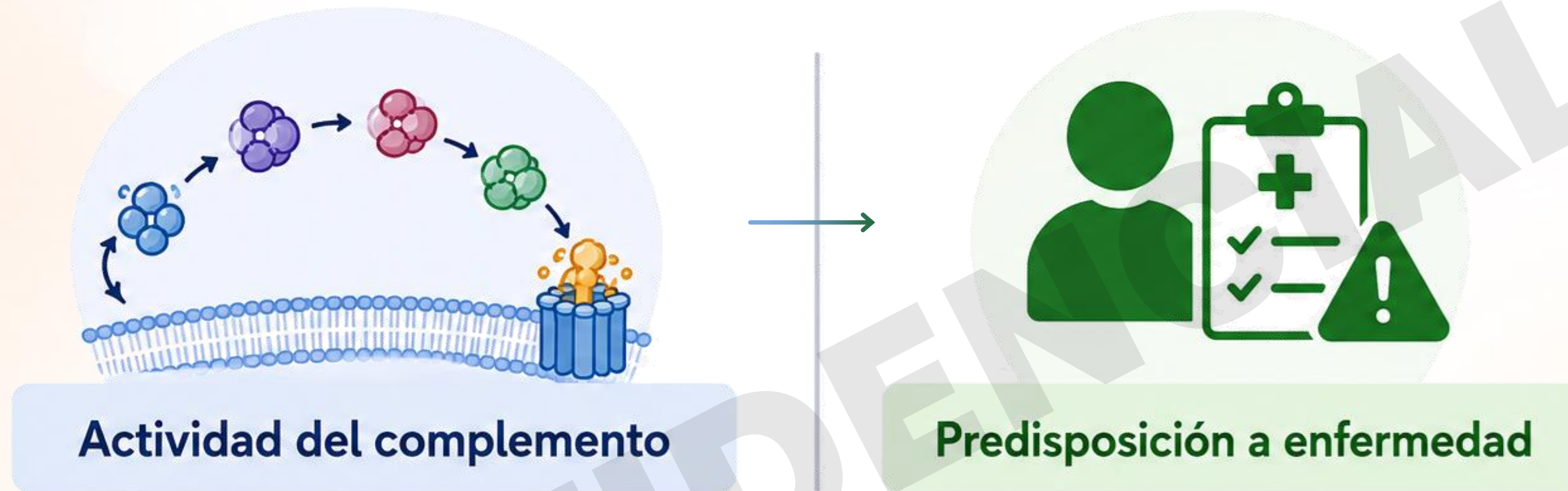
Santiago Rodríguez de Córdoba ha recibido honorarios de Alexion Pharmaceuticals, Swedish Orphan Biovitrum AB, UCB PHARMA, S.A., Novartis Farmacéutica, S.A. y AstraZeneca por su participación en comités asesores, reuniones de expertos y cursos de formación. Asimismo, ha desarrollado proyectos de investigación financiados por Alexion Pharmaceuticals y AstraZeneca. Santiago Rodríguez de Córdoba es miembro fundador y accionista de Secugen S.L. y Abvance Biotech S.L.

CONFIDENCIAL

Aspectos generales de la genética del complemento

Una guía para interpretar la genética del complemento en su contexto clínico

La variabilidad genética explica:



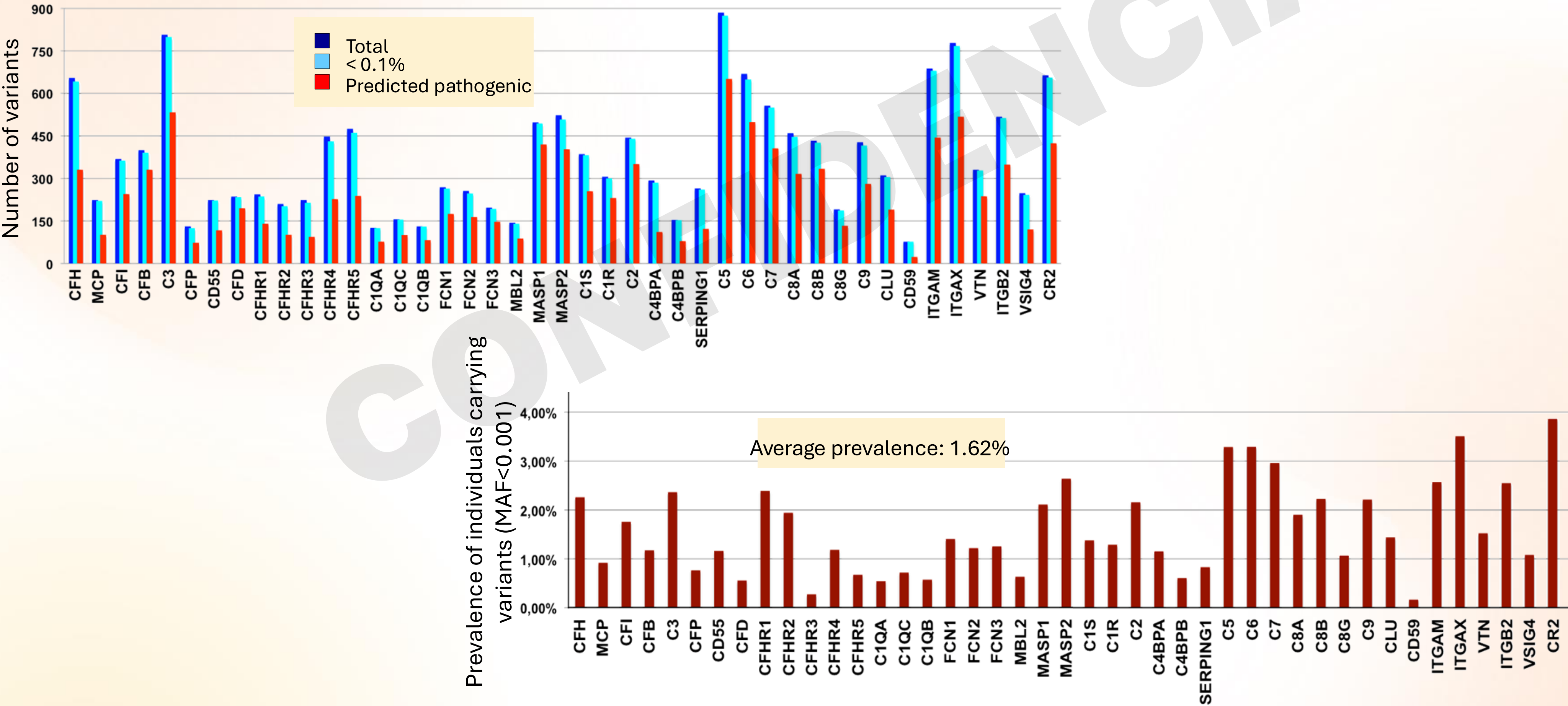
El término “complotipo” se refiere a:



Conjunto de variantes genéticas (comunes y raras) que definen una determinada constitución genética del complemento.

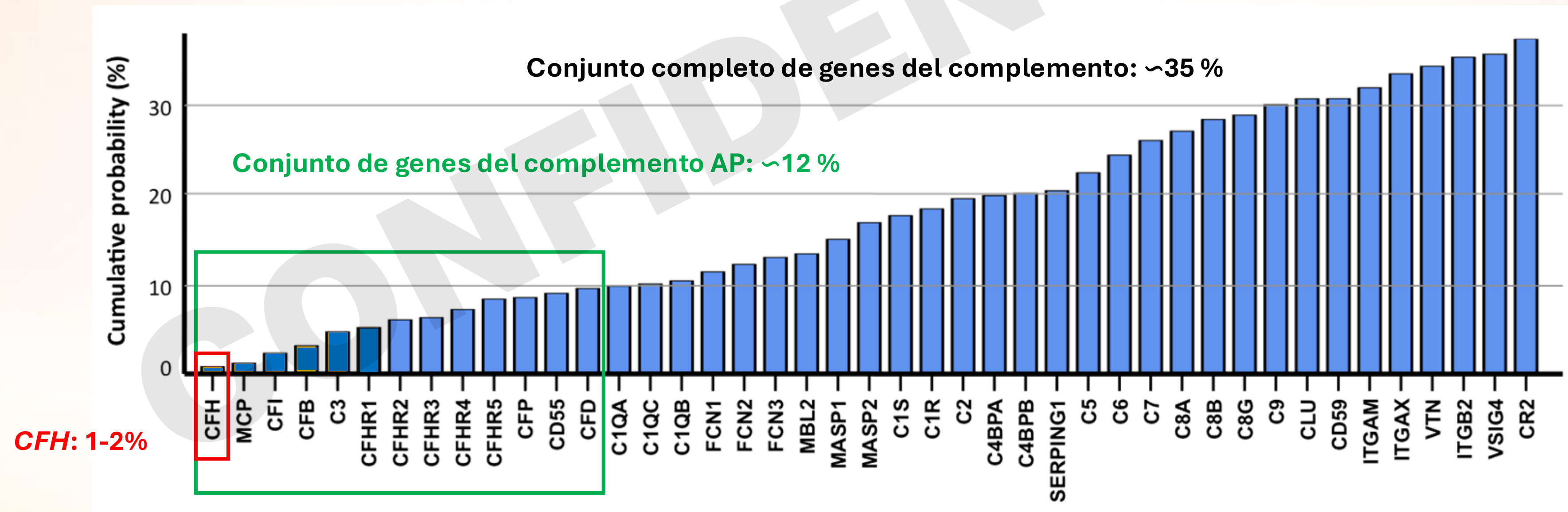
Variabilidad genética en genes del complemento en gnomAD v4.1 (n > 1.500.000)

Solo regiones codificantes. Variantes sinónimas excluidas.



Prevalencia de individuos portadores de al menos una variante patogénica **RARA** del complemento

La secuenciación de nueva generación ha revelado que entre el 1–2 % de los individuos sanos portan variantes raras potencialmente dañinas en *CFH*, y aproximadamente un 12 % en otros genes de la vía alternativa.

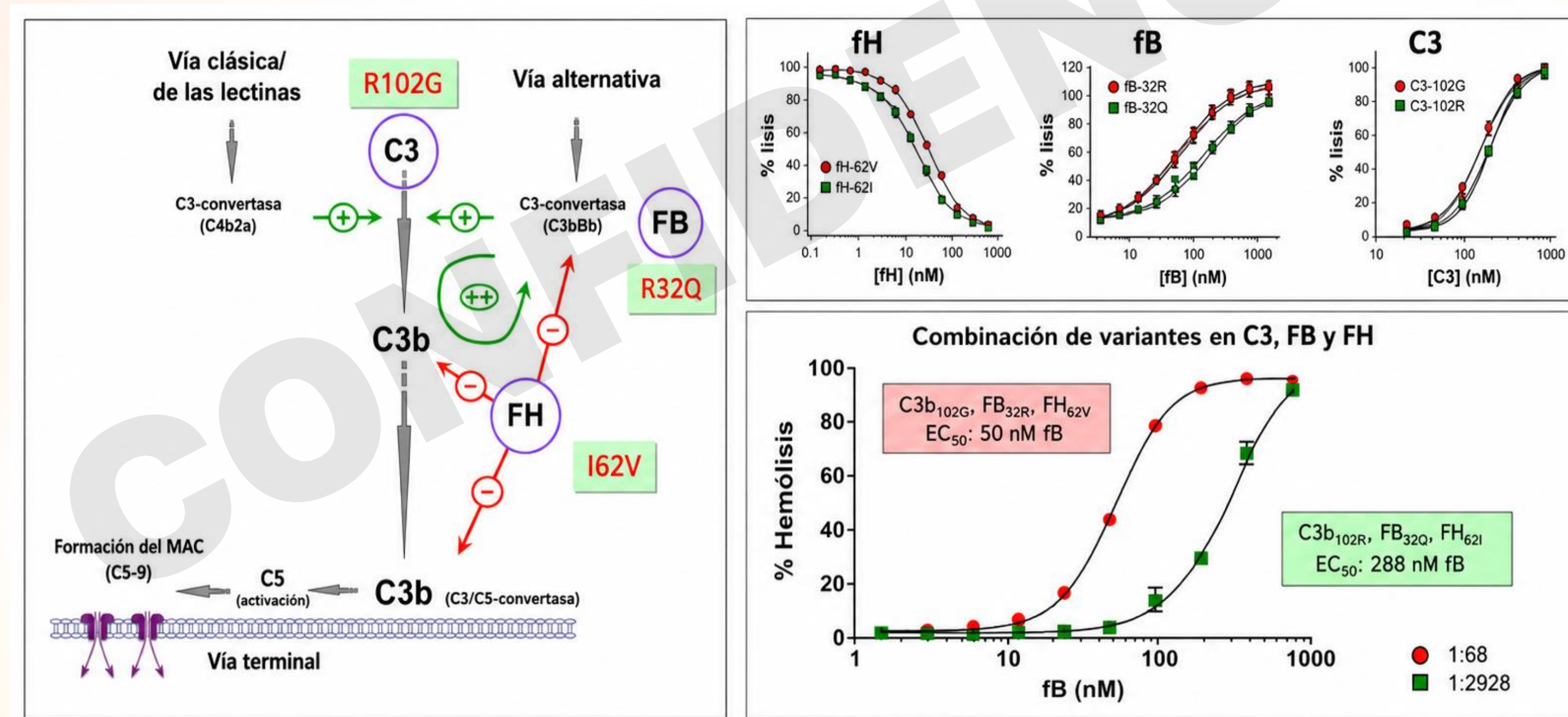


Estos hallazgos contrastan con la rareza de las enfermedades mediadas por el complemento.

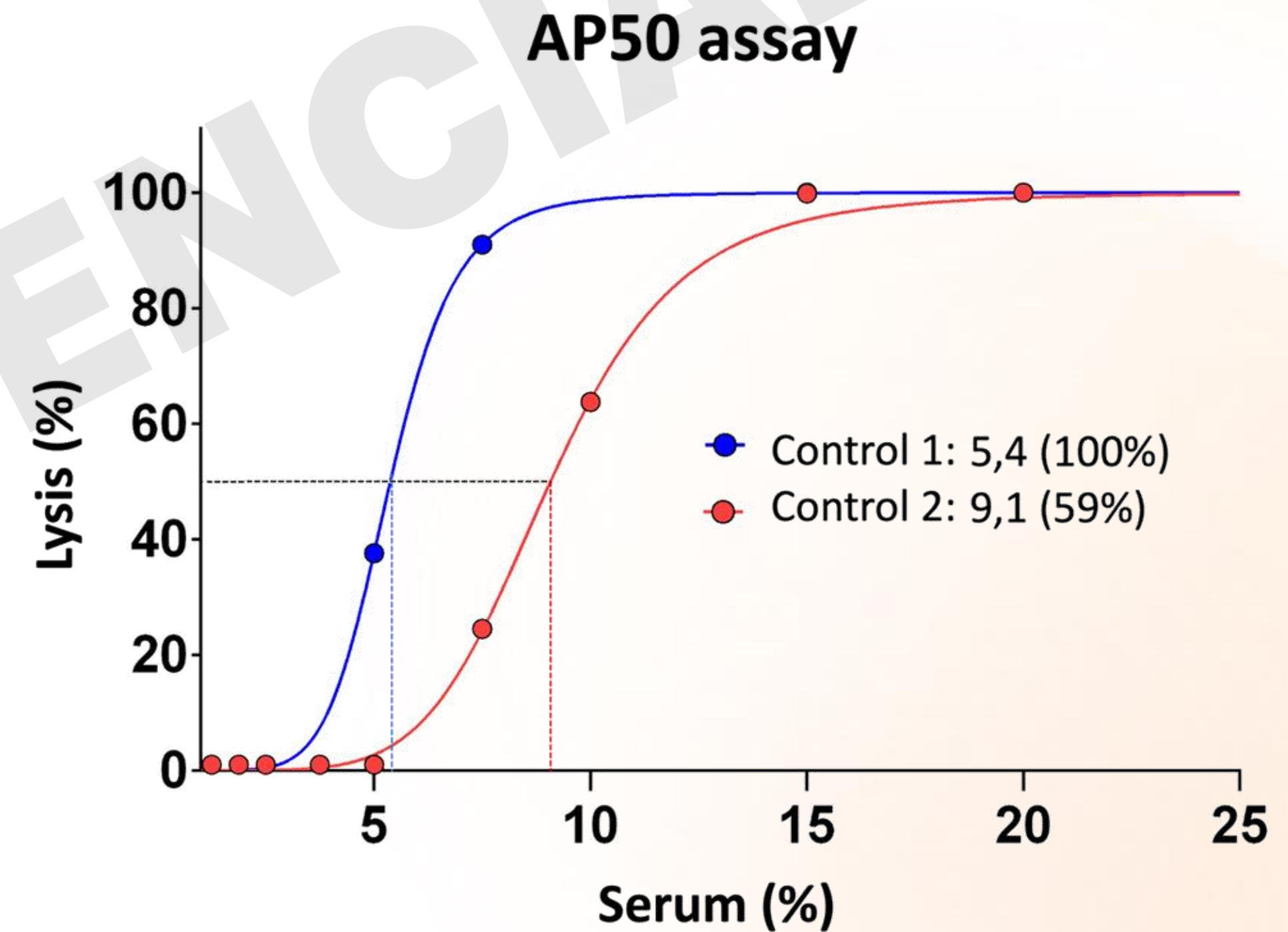
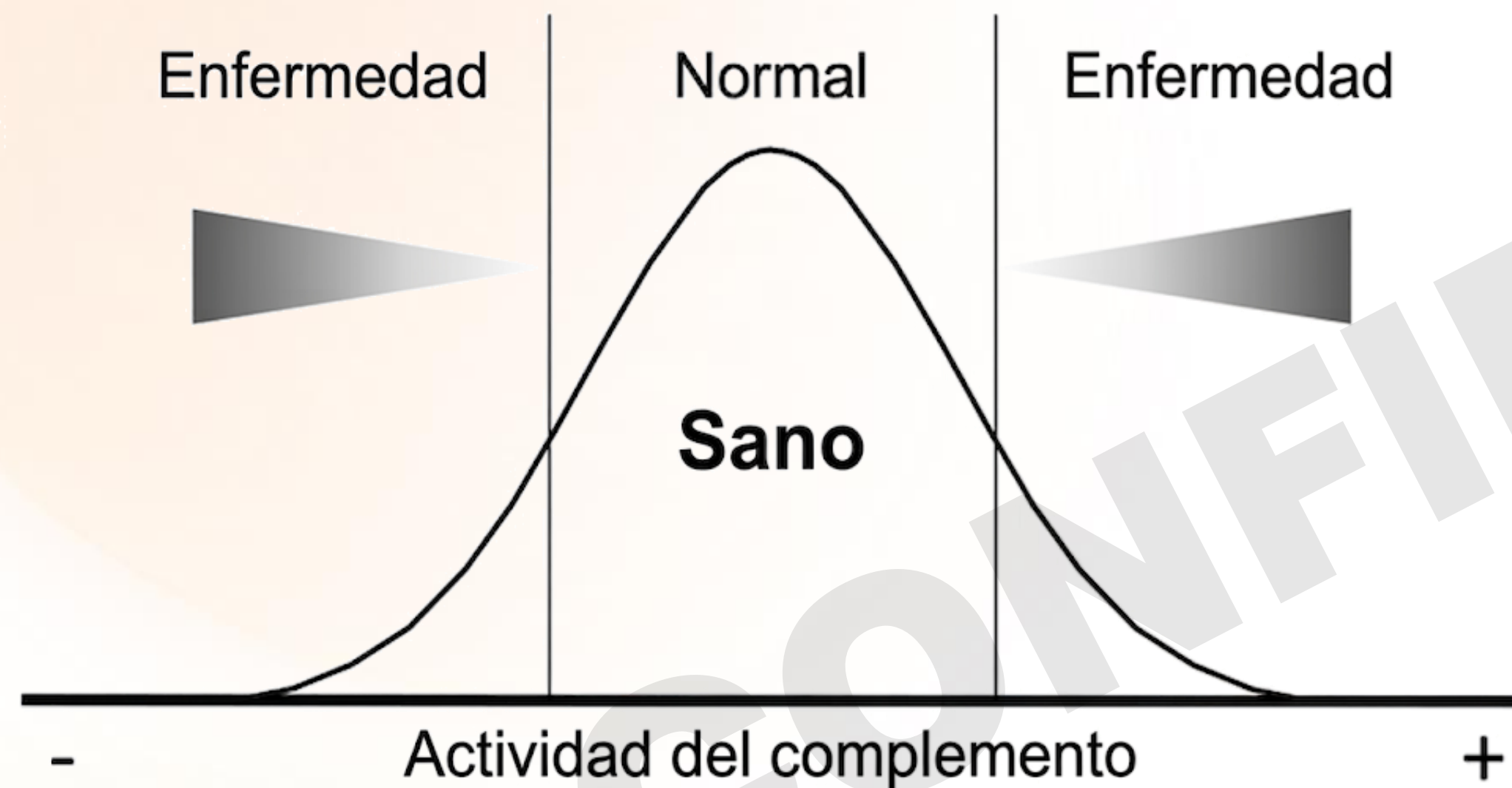
Impacto funcional de variantes comunes del complemento: el complotito

El efecto aditivo de variantes comunes determina la función global del complemento y la predisposición a enfermedad

La combinación de las variantes C3b_{102G}, FB_{32R} y FH_{62V} muestra un aumento de 6 veces en la actividad del complemento en ensayos hemolíticos. El incremento de actividad de la vía alternativa se asocia con predisposición a DMAE.



Variabilidad genética e individualidad del sistema del complemento



Las enfermedades relacionadas con el complemento son complejas, poligénicas y multifactoriales

Asociación de enfermedad con factores de riesgo específicos del complemento:

- Correlaciones características genotipo-fenotipo que asocian una enfermedad con una alteración funcional específica del complemento.

Concurrencia de diferentes factores de riesgo del complemento “complotipos”:

- Las consecuencias funcionales de las variantes genéticas del complemento son aditivas; un conjunto de variantes genéticas define una configuración genética específica del sistema del complemento y el riesgo de enfermedad.

Baja penetrancia – factores adicionales no relacionados con el complemento y desencadenantes:

- Las variantes en los genes del complemento son factores predisponentes para la enfermedad.

Las variantes genéticas del complemento pueden actuar como modificadores de la enfermedad.

- Por ejemplo, exacerbando la gravedad de la enfermedad, incluso cuando el complemento no es el principal impulsor patogénico.

Genética del complemento en C3G / IC-MPGN

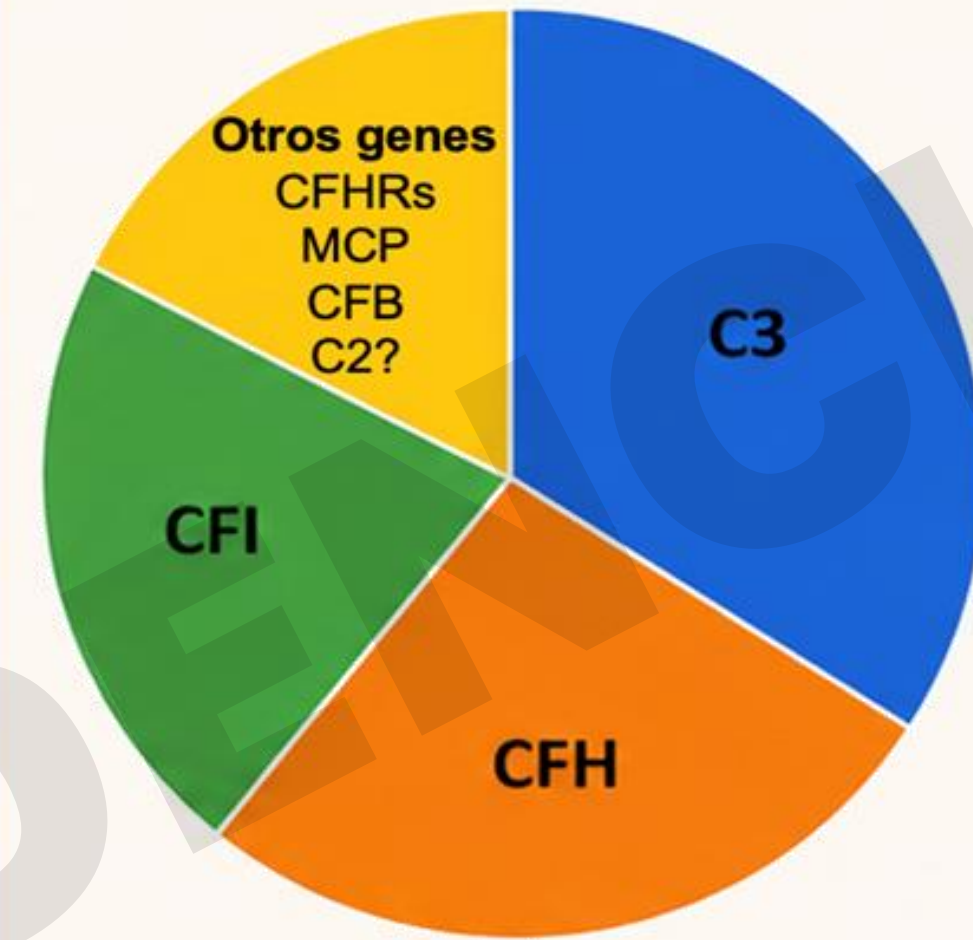
Genes asociados con C3G



En C3G y en la IC-MPGN primaria, las alteraciones en los genes del **complemento** están presentes en aproximadamente el **20%** de los casos.

Estas variantes genéticas en los genes del complemento incluyen:

- **Variantes en reguladores del complemento** (genes *CFH*, *CFI* y *MCP*)
- **Variantes en activadores del complemento** (genes *C3*, *CFB* y *CFHRs*)



- **Pérdida de función**
CFH
CFI
MCP
- **Ganancia de función**
C3
CFHRs
C2?
- **Reordenamientos génicos**
CFHRs

Frecuencia de mutaciones

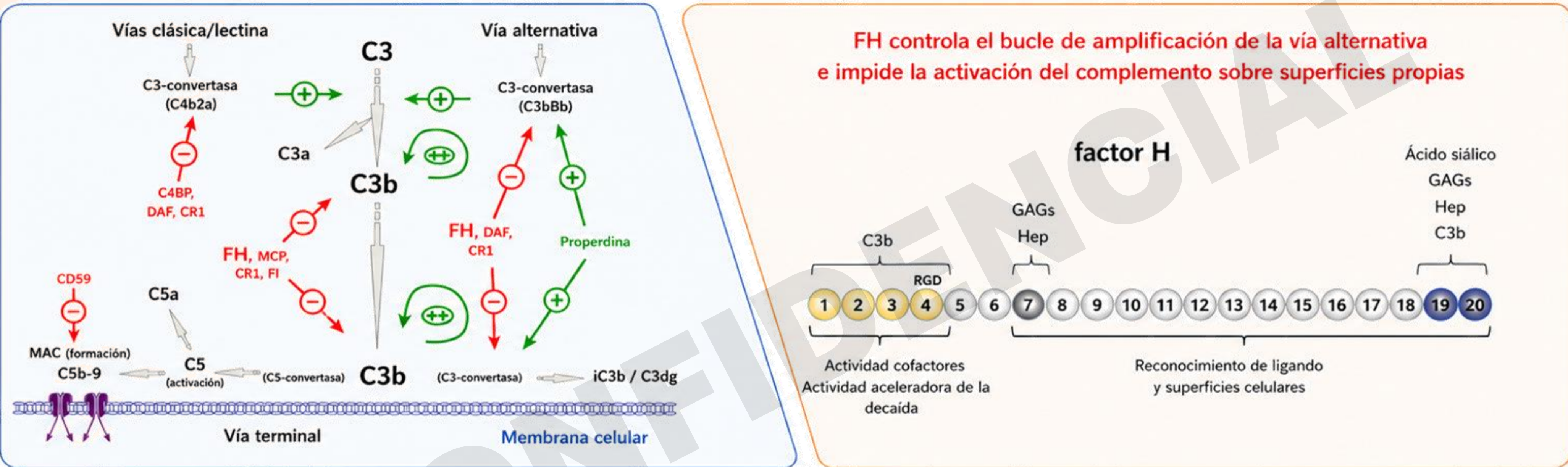
GENES	IC-MPGN	C3G
C3	9	8
CFH	1	5
CFI	/	3
MCP	1	/
CFB	4	/
CFHRs	2	4
Total	17	18

Noris *et al.*, Personal communication

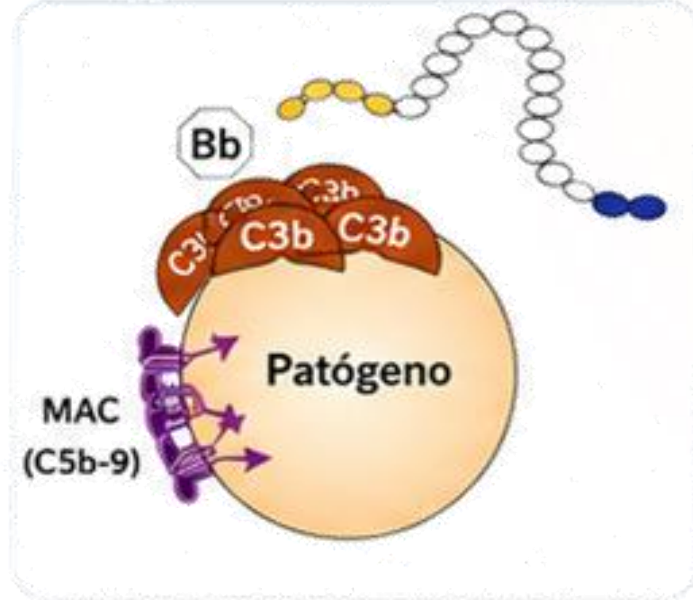
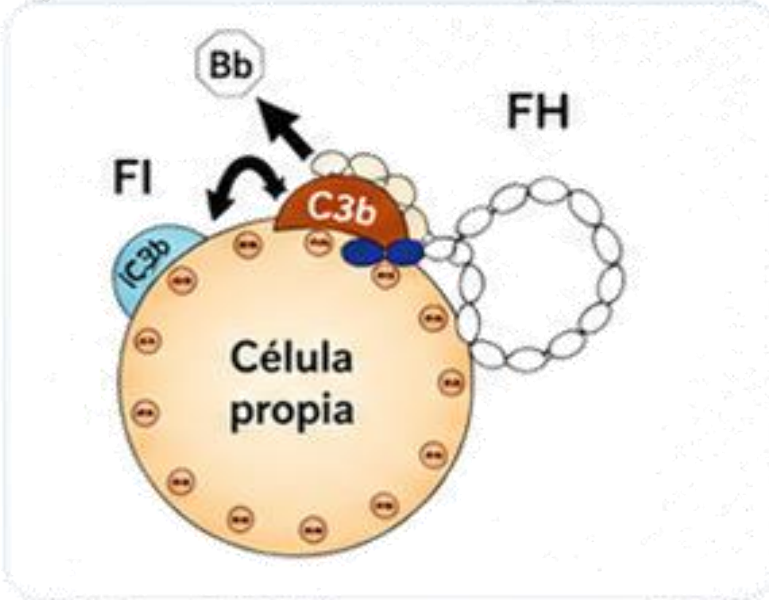
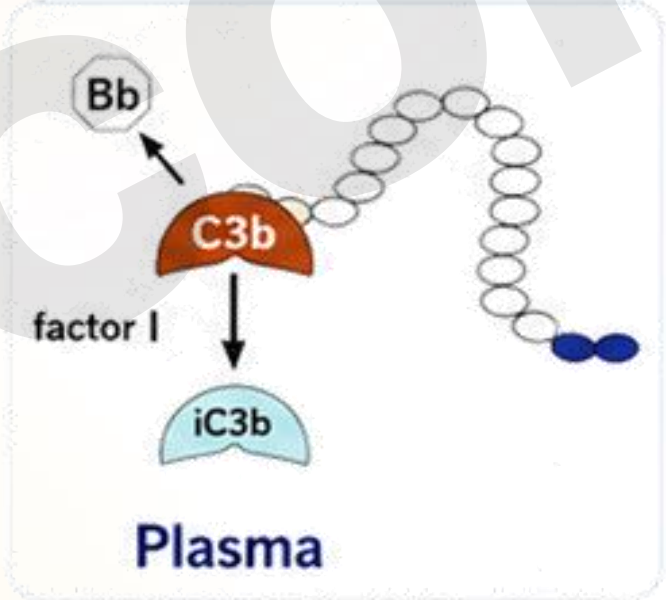


Las pruebas genéticas y los análisis bioquímicos e inmunológicos no son diagnósticos. Su objetivo es mejorar la caracterización del paciente, informar el pronóstico y facilitar la monitorización de las terapias anticomplemento.

Variantes de *FH* y enfermedad



Las deficiencias homocigóticas de FH causan una activación masiva de C3 y se asocian con C3G en humanos y animales.



Las mutaciones en el extremo C-terminal de FH en heterocigosis, asociadas con aHUS, alteran la regulación de superficies, pero no modifican los niveles plasmáticos de FH y C3.

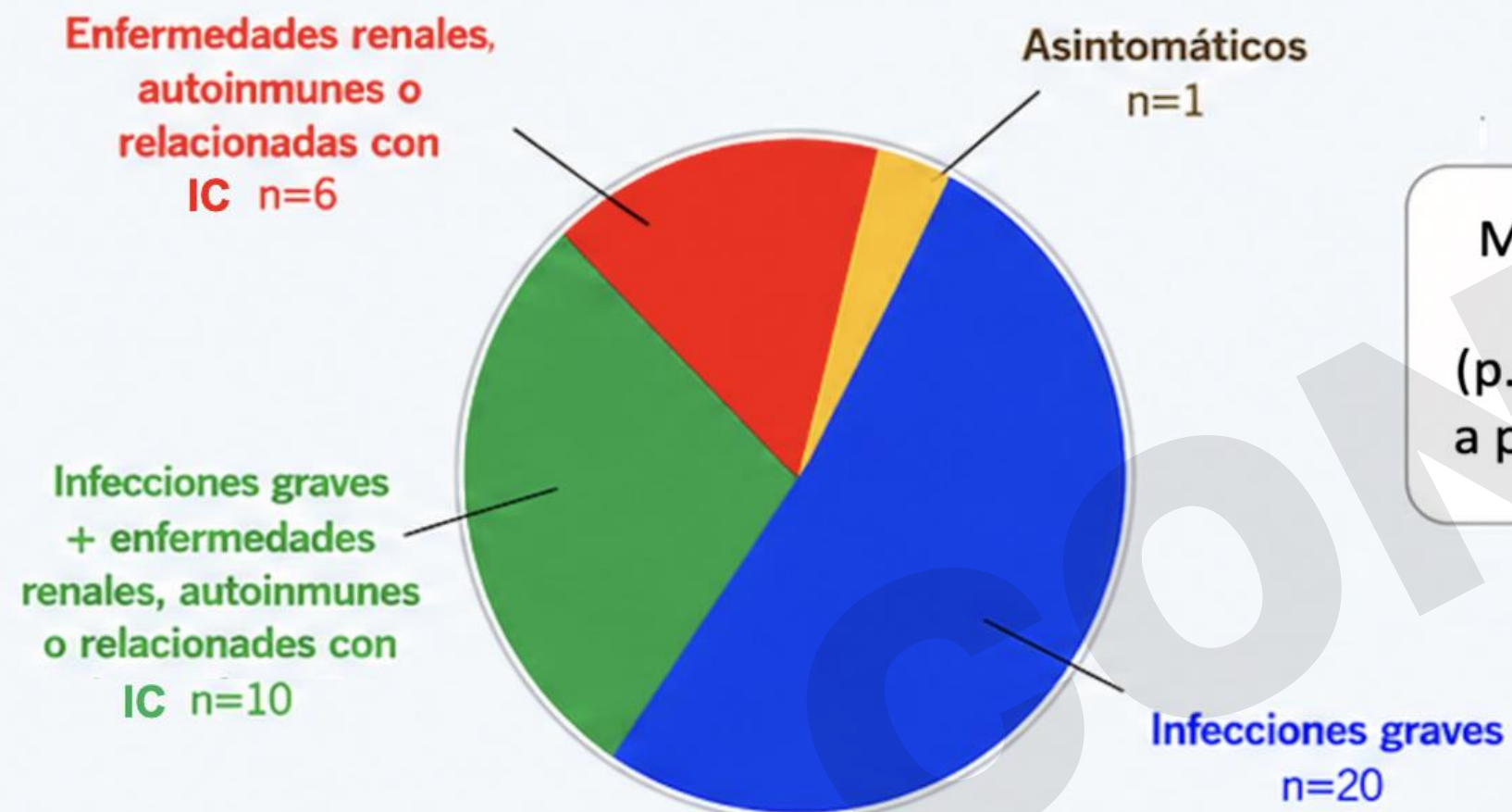
Las deficiencias heterocigóticas de FH se asocian con múltiples patologías según factores concurrentes.

Variantes de C3 y enfermedad

Las variantes con pérdida de función en homocigosis causan deficiencia de C3



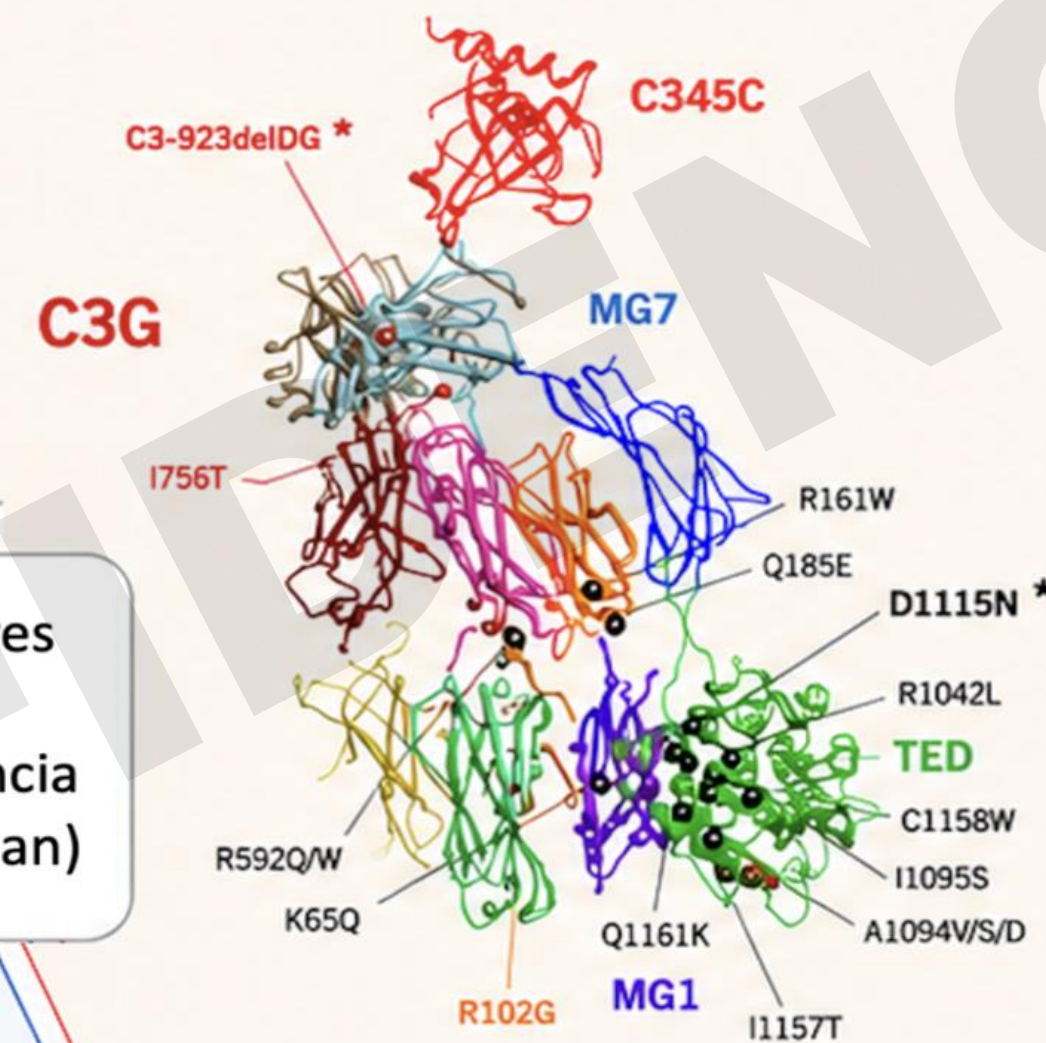
37 casos en 29 familias de diversas razas de diferentes regiones del mundo



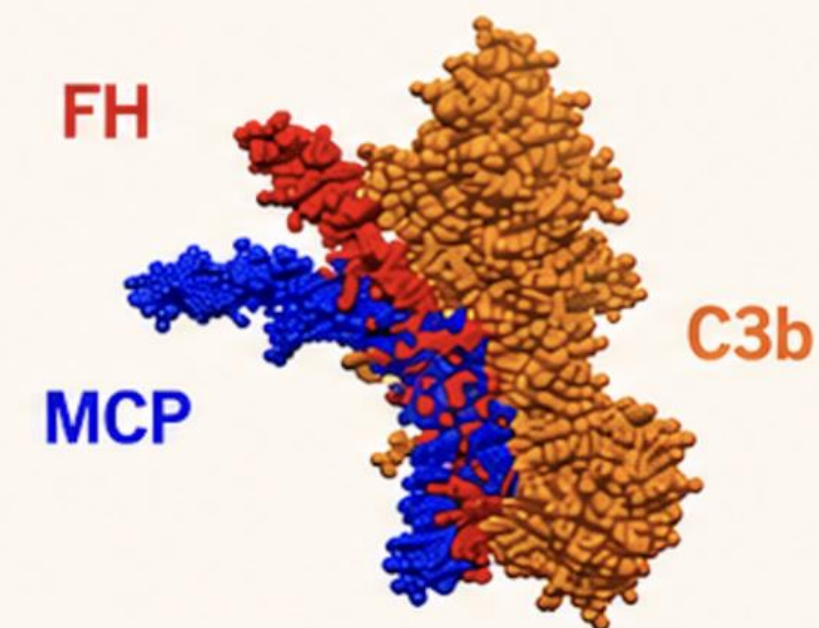
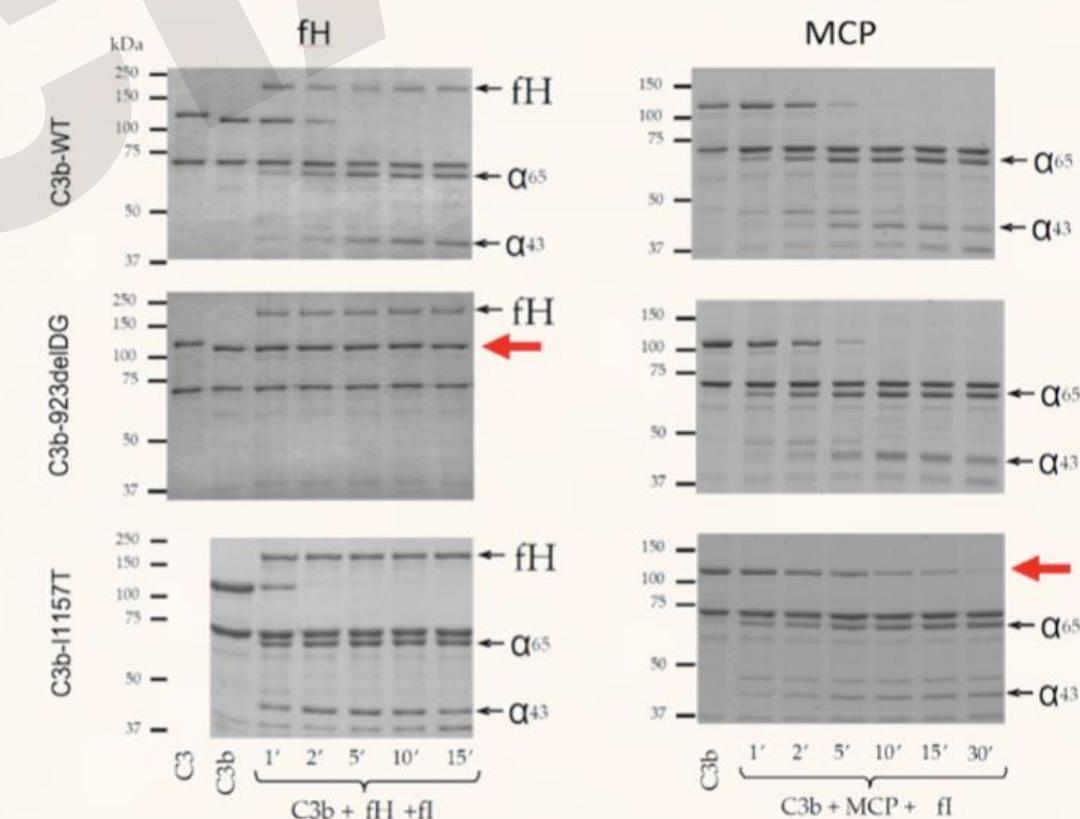
Las variantes con pérdida de función en heterocigosis son asintomáticas

Okura et al. *J Allergy Clin Immunol* 2016

Las variantes con ganancia de función en heterocigosis llevan a desregulación de vías alternativas y consumo de C3



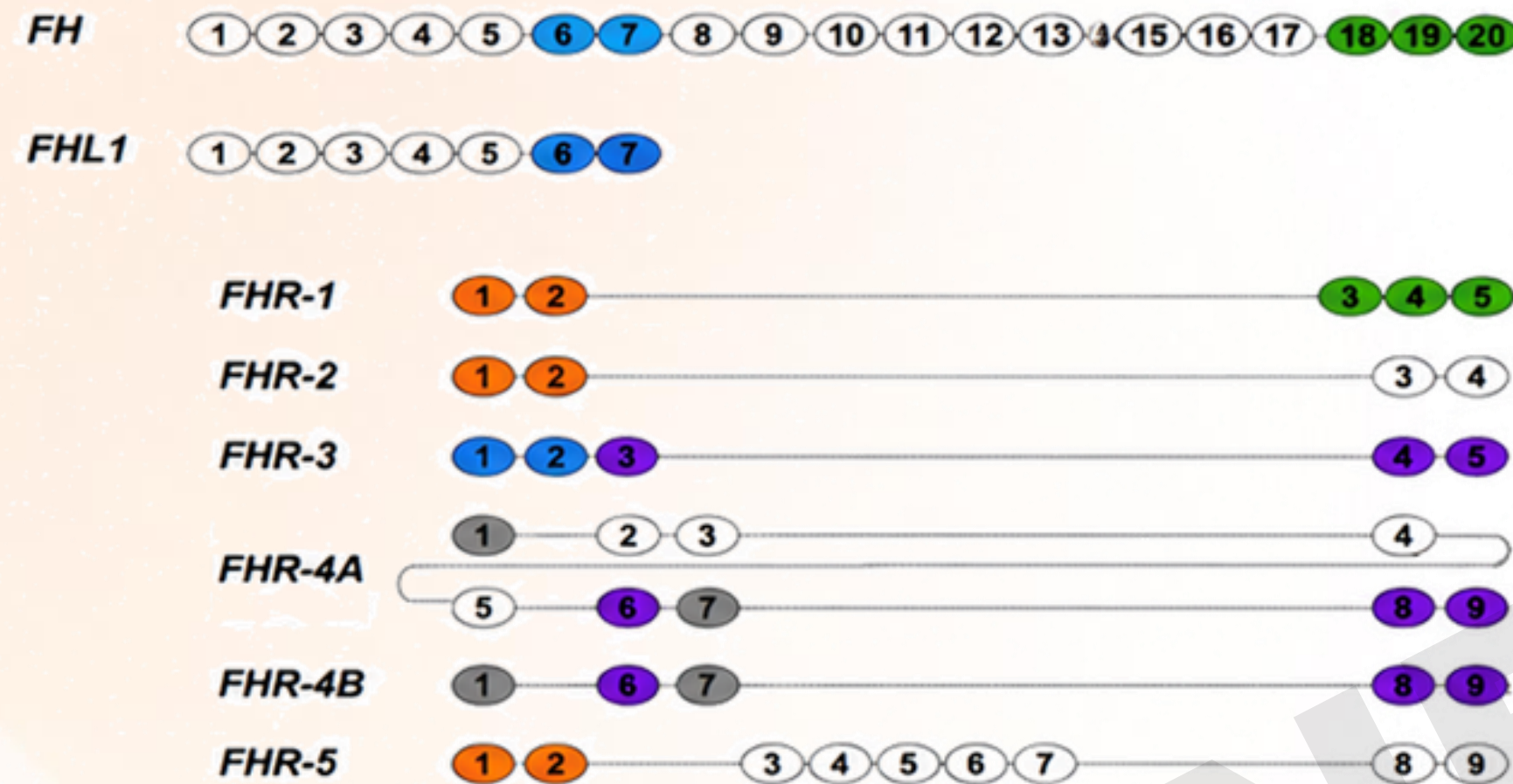
* Replican en modelos animales



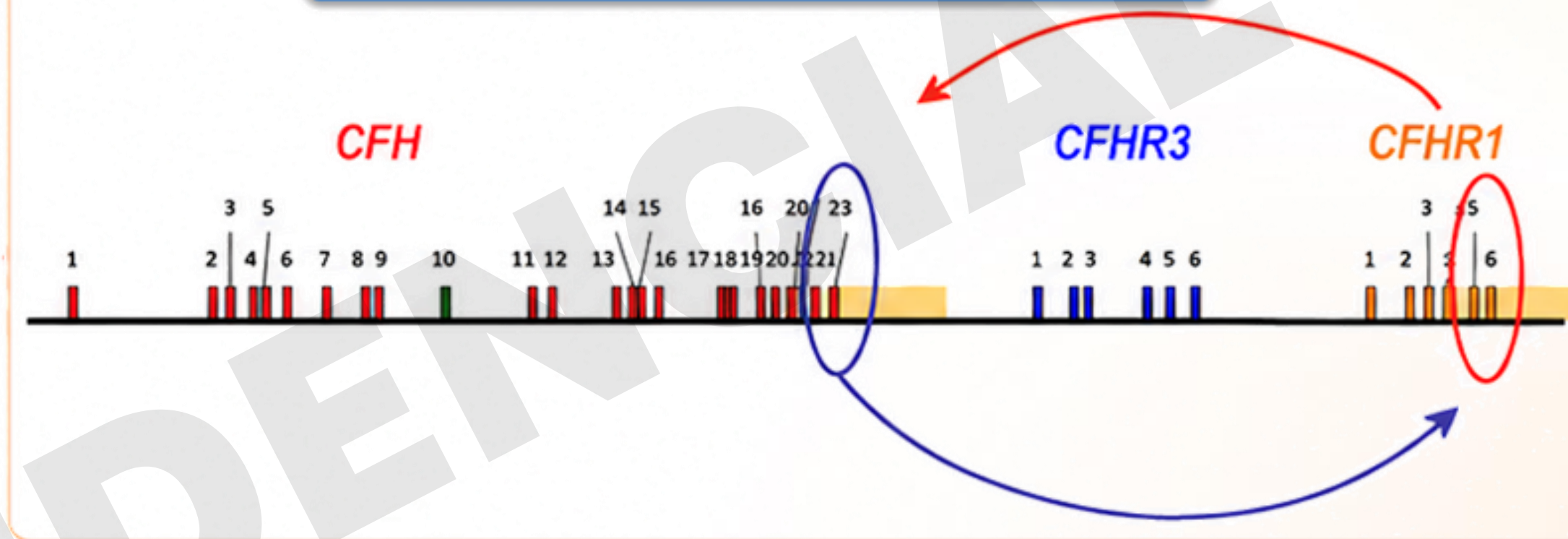
Martínez-Barricarte et al. *Mol. Immunol.* (2015)

Variantes de *FHR1-5* y enfermedad

Organización estructural familia FH/FHRs

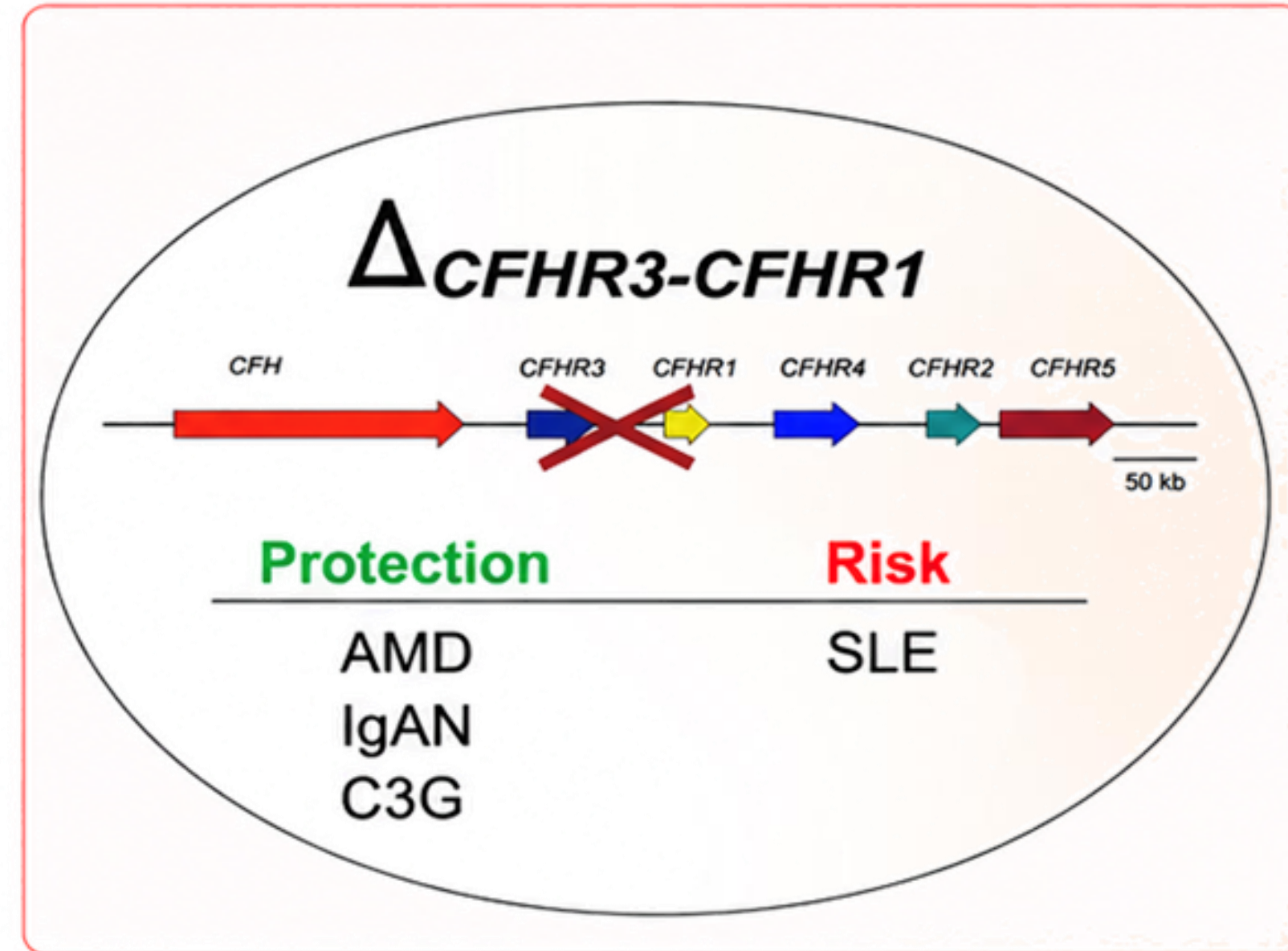


Variantes *CFHR1-5* asociadas con SHUa

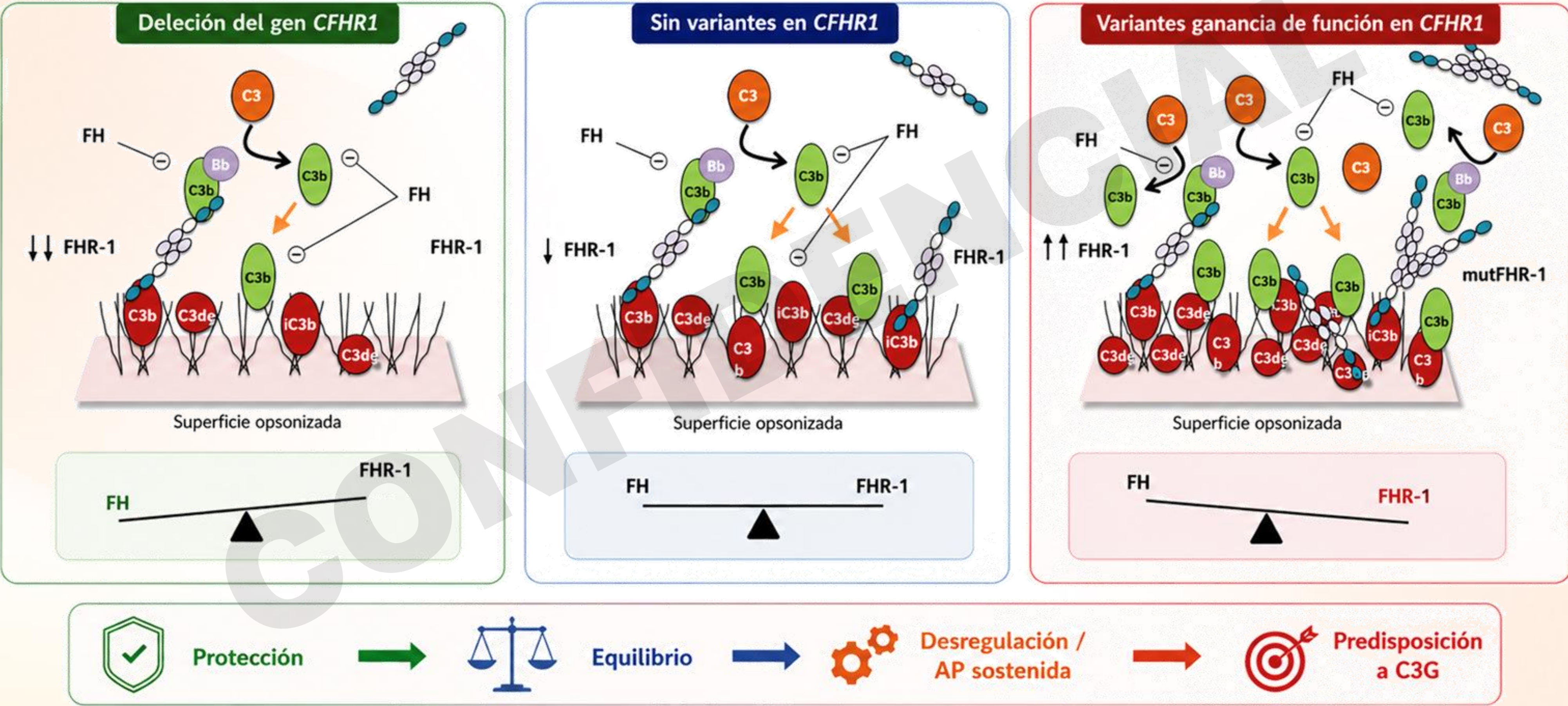


Variantes *CFHR1-5* asociadas con C3G

Haplotype (R1-R5)	Novel oligomers	Multimers	Copies normal FHRs					C3 Levels
			R1	R2	R3	R4	R5	
1 2 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Yes	Yes	2	1	2	2	1	Very low
1 2 3 4 1 2 3 4 5 6	Yes	Yes	1	2	2	2	2	Normal/low
1 2 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Yes	Yes	1	1	2	1	1	Low
1 2 1 2 3 4 5 6	Yes	Yes	1	2	2	2	2	Normal/low
1 2 1 2 3 5 6	Yes	No	2	2	2	2	2	Normal
1 2 1 3 4 4	Yes	Yes	2	2	2	2	2	Normal
1 2 1 2 3 4 5 6 7 8 9	No	Yes	2	2	2	2	1	Normal

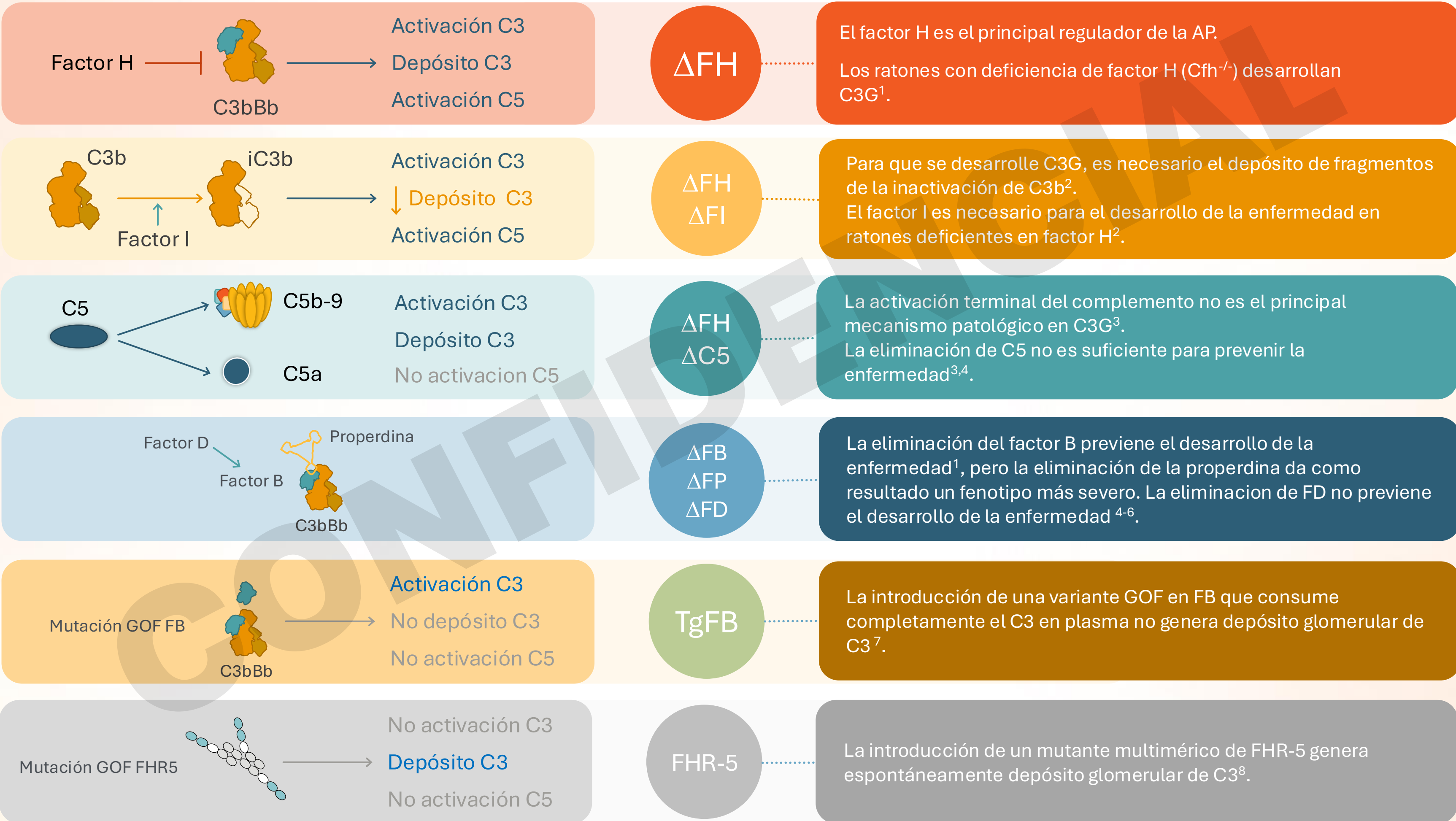


Variantes de *CFHR1* y C3G



Gale, Goicoechea de Jorge et al. *Lancet* 2010; Goicoechea de Jorge et al. *PNAS* 2013; Tortajada et al. *J Clin Invest.* 2013; Józsi, Tortajada et al. *Trends Immunol.* 2015; Martin-Merineró et al. *Blood* 2021; Márquez-Tirado et al. *JASN* 2022

Lecciones aprendidas a partir de modelos animales



1. Pickering et al, Nature Genetics 2002; 2. Rose KL et al. J Clin Invest 2008, 118: 608-618; 3. Pickering MC et al. PNAS 2006; 4. Ruseva MM et al JASN 2016; 5. Zhang Y et al JCI Insight 2020; 6. Leshner AM et al. J Am Soc Nephrol 2013; 24:53-65; 7. Rodriguez de Cordoba, Unpublished data; 8. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2022722118>.
GOF, ganancia de función

Mecanismos patogénicos en C3G: Lecciones que aporta la genética

Déficiencia completa del factor H

- Activación masiva del complemento en fase fluida
- Los fragmentos de C3 se depositan en el glomérulo
- Activación complemento desregulada (ausencia de FH)
- Inflamación y daño glomerular

Mutaciones con ganancia de función en C3 (resistentes a FH, regulación por MCP normal)

- Activación masiva del complemento en fase fluida
- Los fragmentos de C3 se depositan en el glomérulo
- Activación complemento desregulada (resistencia a FH)
- Inflamación y daño glomerular

Duplicaciones en el extremo N de FHRs (ganancia de función)

- Desequilibrio entre la actividad de FH y FHR en las superficies
- Efecto limitado en los niveles de C3 y C5 en fase fluida
- Activación aumentada de la vía alternativa en superficies opsonizadas
- Probablemente amplifican depósitos renales preexistentes de C3 (desencadenados por complejos inmunes, infecciones u otras condiciones activadoras del complemento)
- Inflamación y daño glomerular

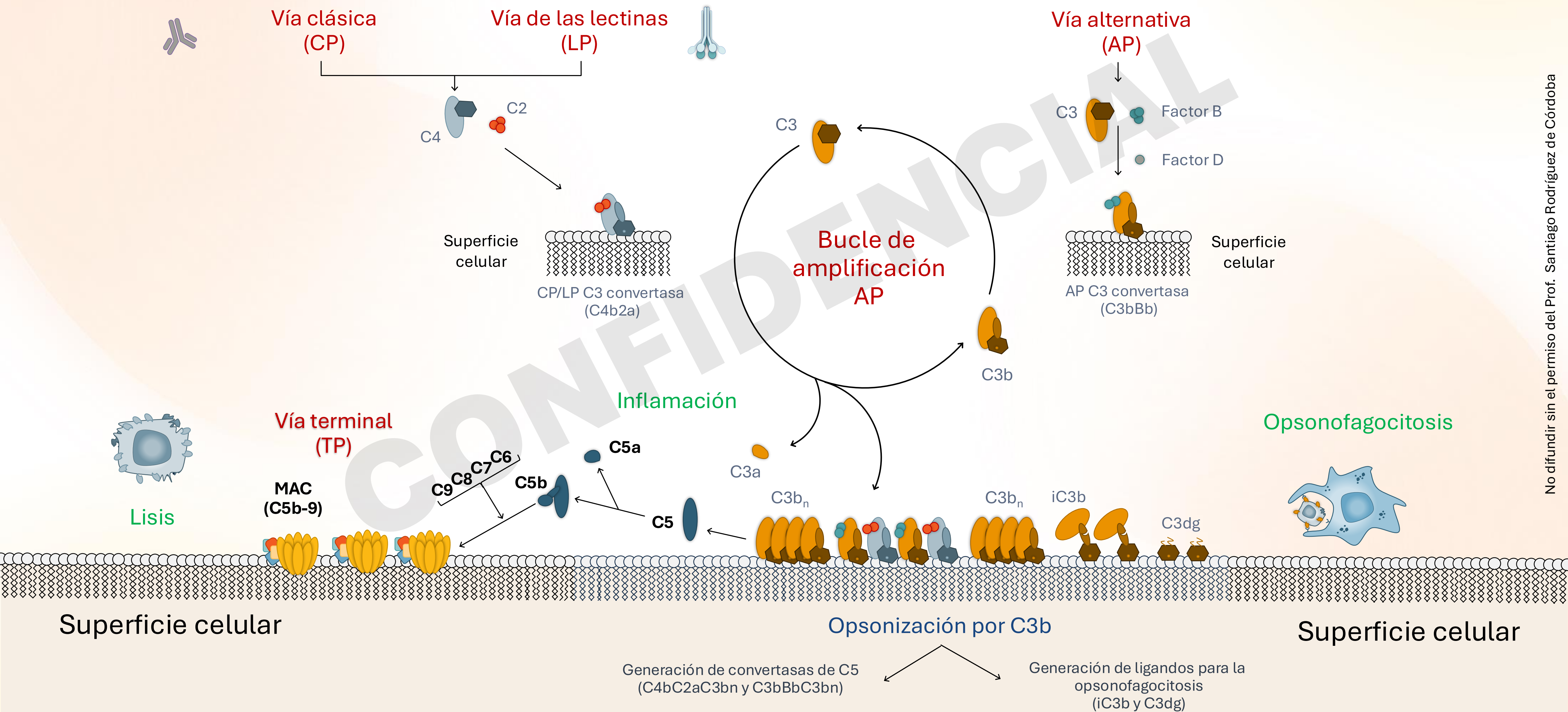
Efecto sistémico de estas mutaciones

Hipocomplementemia grave

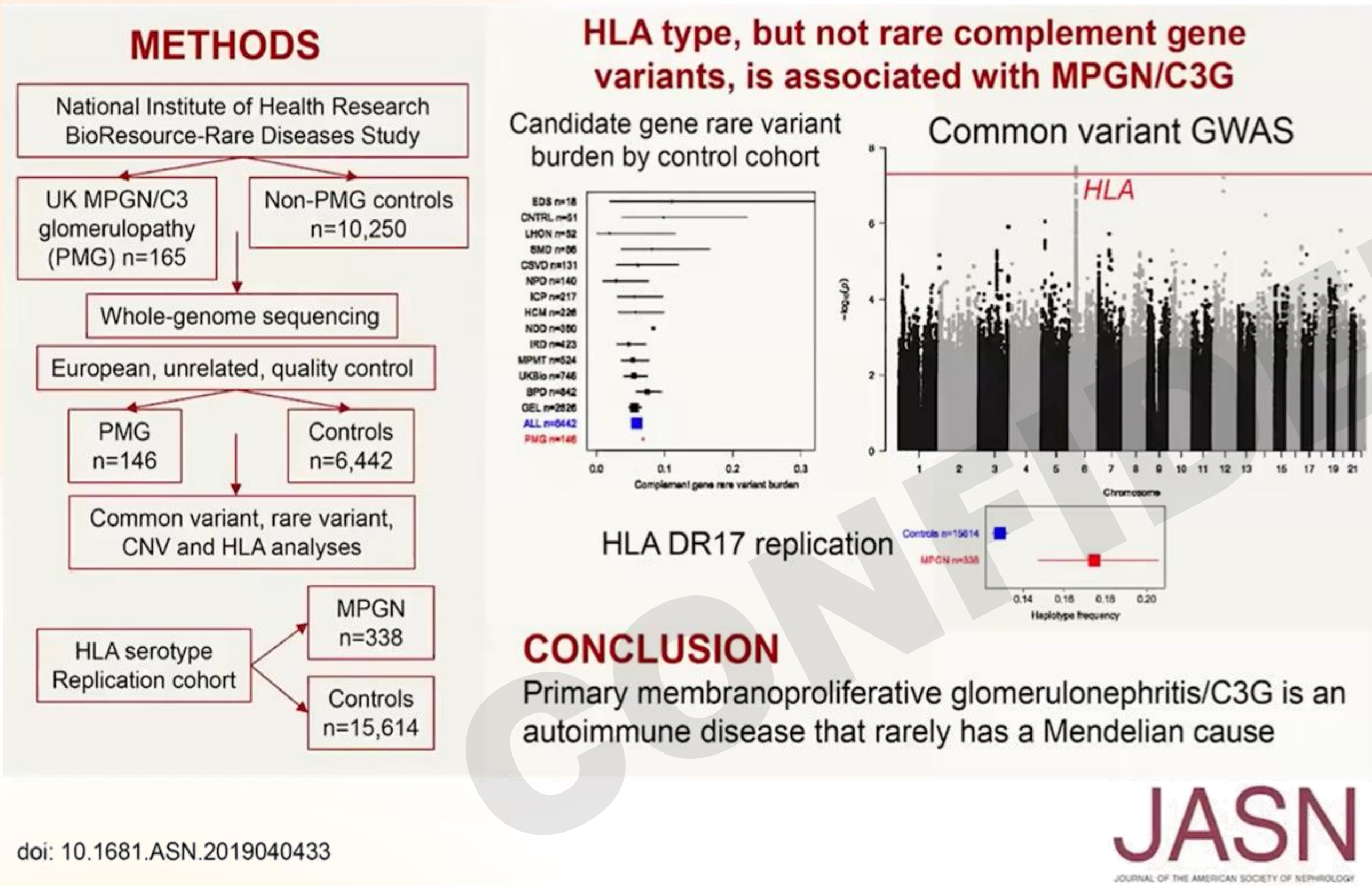
Puede limitar otras enfermedades mediadas por el complemento (p. ej., SHUa)

Deposito de C3 restringido al riñón

Sistema del complemento



La naturaleza autoinmune de la C3G / IC-MPGN



ORIGINAL ARTICLES: GLOMERULAR AND TUBULOINTERSTITIAL DISEASES

Mycophenolate Mofetil in C3 Glomerulopathy and Pathogenic Drivers of the Disease

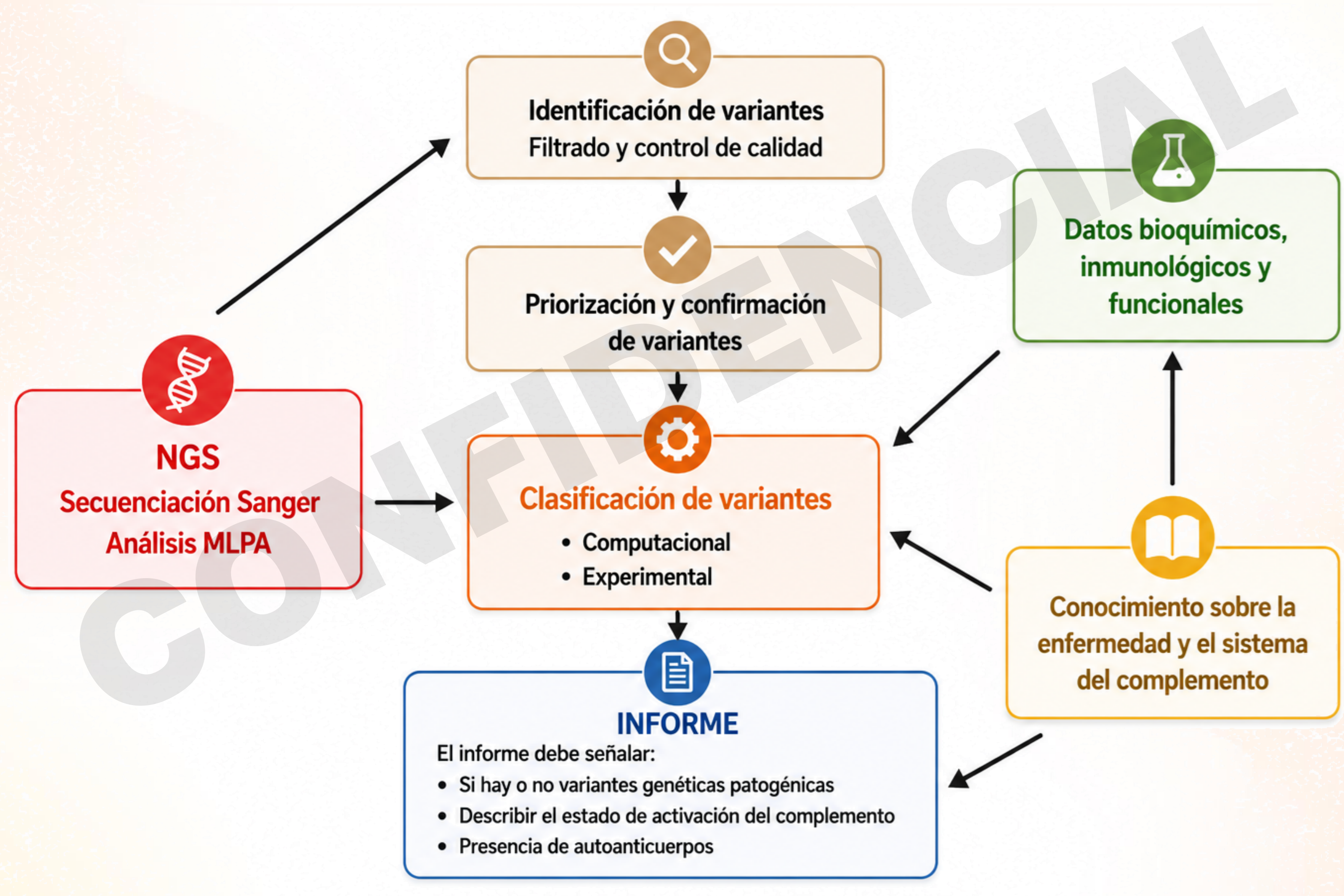
Caravaca-Fontán, Fernando; Díaz-Encarnación, Montserrat M.; Lucientes, Laura; Caverio, Teresa; Cabello, Virginia; Ariceta, Gema; Quintana, Luis F.; Marco, Helena; Barros, Xoana; Ramos, Natalia; Rodríguez-Mendiola, Nuria; Cruz, Sonia; Fernández-Juárez, Gema; Rodríguez, Adela; Pérez de José, Ana; Rabasco, Cristina; Rodado, Raquel; Fernández, Loreto; Pérez Gómez, Vanessa; Ávila, Ana I.; Bravo, Luis; Lumbreras, Javier; Allende, Natalia; Sanchez de la Nieta, Maria Dolores; Rodríguez, Eva; Olea, Teresa; Melgosa, Marta; Huerta, Ana; Miquel, Rosa; Mon, Carmen; Fraga, Gloria; de Lorenzo, Alberto; Draibe, Juliana; Cano-Megías, Marta; González, Fayna; Shabaka, Amir; López-Rubio, Maria Esperanza; Fenollosa, María Ángeles; Martín-Penagos, Luis; Da Silva, Iara; Alonso Titos, Juana; Rodríguez de Córdoba, Santiago; Goicoechea de Jorge, Elena; Praga, Manuel; on behalf of the Spanish Group for the Study of Glomerular Diseases GLOSEN

doi: 10.1681.ASN.2019040433

Gale DP, et al. HLA type, but not rare complement gene variants, is associated with primary membranoproliferative glomerulonephritis/C3 glomerulopathy. J Am Soc Nephrol. 2020;31(4):906-919. doi:10.1681/ASN.2019040433.

Cómo se generan e interpretan los resultados del estudio genético del complemento

Flujo de análisis en el diagnóstico genético molecular del complemento



Uso de tecnologías NGS para fines de diagnóstico clínico

Tamaño de la secuencia diana (Mb) Profundidad de lectura / Cobertura

Enfoque	Tamaño diana	Cobertura típica (media)	Secuenciación requerida (aprox.)
Secuenciación del genoma completo (WGS) 	~ 3,000 Mb	~30-40x	~90-120 Gb
Secuenciación del exoma completo (WES) 	~30-60 Mb (regiones codificantes ~1-2% del genoma)	~50-100x (media)	~6-10 Gb (exomas comerciales p. ej. Centogene)
Paneles de genes 	~0,1-2 Mb (10-500 genes)	~150-500x o mas	~0,05-2 Gb (de cientos de Mb a ~1-2 Gb)



Idea clave: cuanto menor es la región diana, mayor es la profundidad de secuenciación alcanzable con la misma cantidad de secuenciación.

Nuestro panel NGS

Panel aHUS/C3G en casa (49 genes) - Tecnología Illumina - 160 bp - 1500x



Secuenciación

- $\sim 2 \times 10^6$ lecturas por muestra en la región de interés
- 99,9% de las secuencias diana cubiertas
- Tamaño del target (solo exones): ~ 104 kb



Anotación de variantes y CNV

- Realizada con **VarSome** para la anotación e interpretación de variantes.
- Detección de CNVs (p. ej., deleciones/duplicaciones) realizada con **NextGENe**.



Filtrado y control de calidad

- Métricas de calidad centradas en: variantes no sinónimas, *frameshift*, cambios en sitios de *splicing* e indels
- Se marcan variantes comunes con frecuencia alélica menor (MAF) $>1\%$ en cualquier población



Bases de datos para interpretación

- Exome Variant Server, 1000 Genomes, NCBI dbSNP, base de datos de mutaciones aHUS (www.fh-hus.org) y base de datos interna



Predicción de patogenicidad

- Se utilizan puntuaciones de **CADD** y **Ravel** para apoyar la interpretación de variantes.

Genes (49)

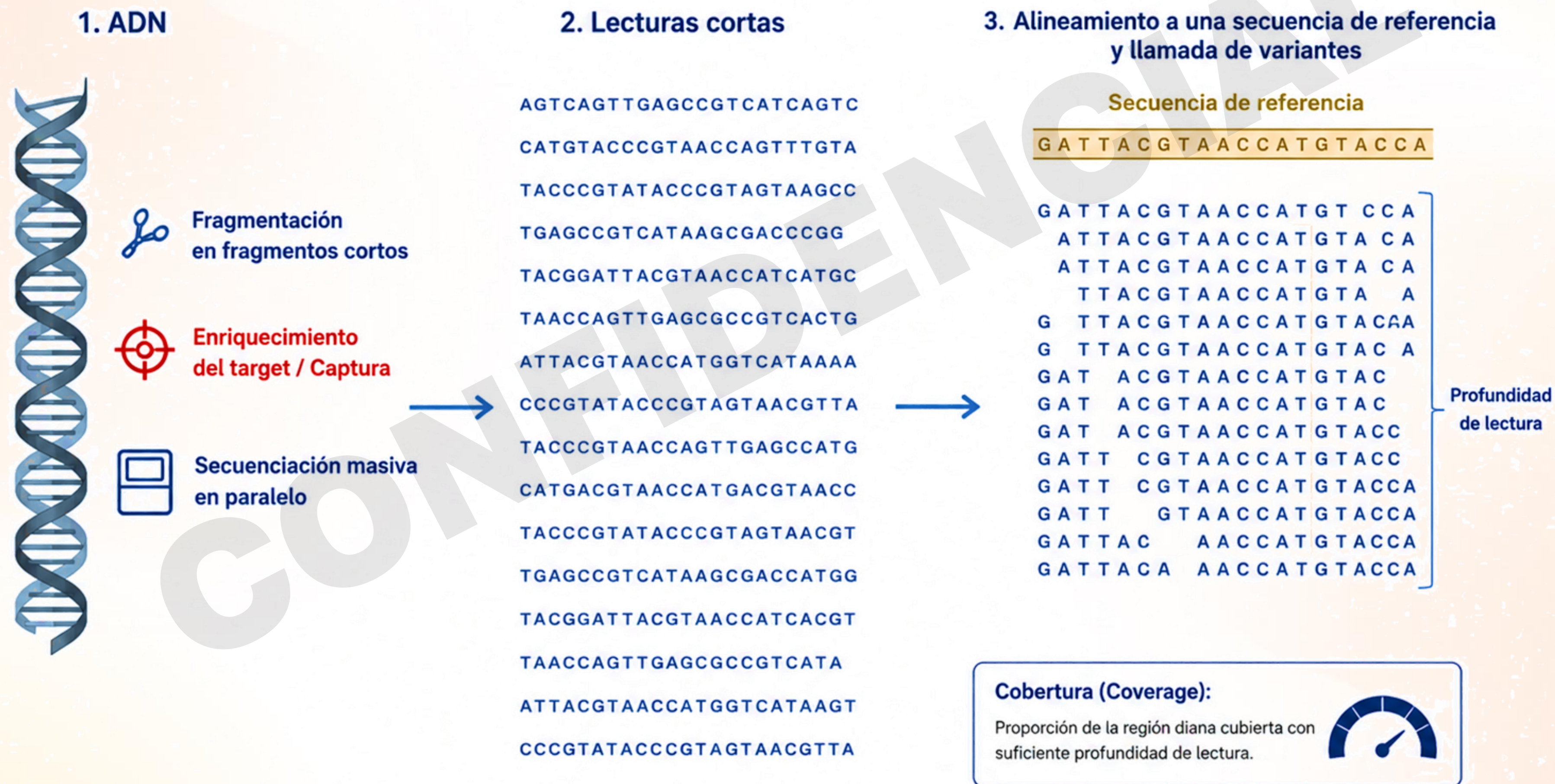
C3, CFB, CFH, CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4, CFHR5, CFI, CFP, MCP, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, C2, C4A, C4B, C4BPA, C4BPB, C5, C6, C7, C8A, C8B, C8G, C9, CD55, CD59, CFD, CLU, CR1, CR2, FCN1, FCN2, FCN3, ITGAM, ITGAX, ITGB2, MASP1, MASP2, MBL2, SERPING1, VSIG4, VTN, C1GALT1C1, INF2, MMACHC.



El panel incluye:

- Exones y regiones flanqueantes
- Regiones promotoras
- Enriquecimiento de regiones intrónicas para facilitar la detección de CNVs (p. ej., usando NextGENe)

Flujo de trabajo de la secuenciación de nueva generación (NGS)



Flujo de análisis de datos



El problema de la clasificación de variantes



La clasificación de variantes no es trivial.

En ausencia de datos funcionales, la clasificación actual **se basa en predicciones**, no en pruebas de patogenicidad.

Se utilizan habitualmente:

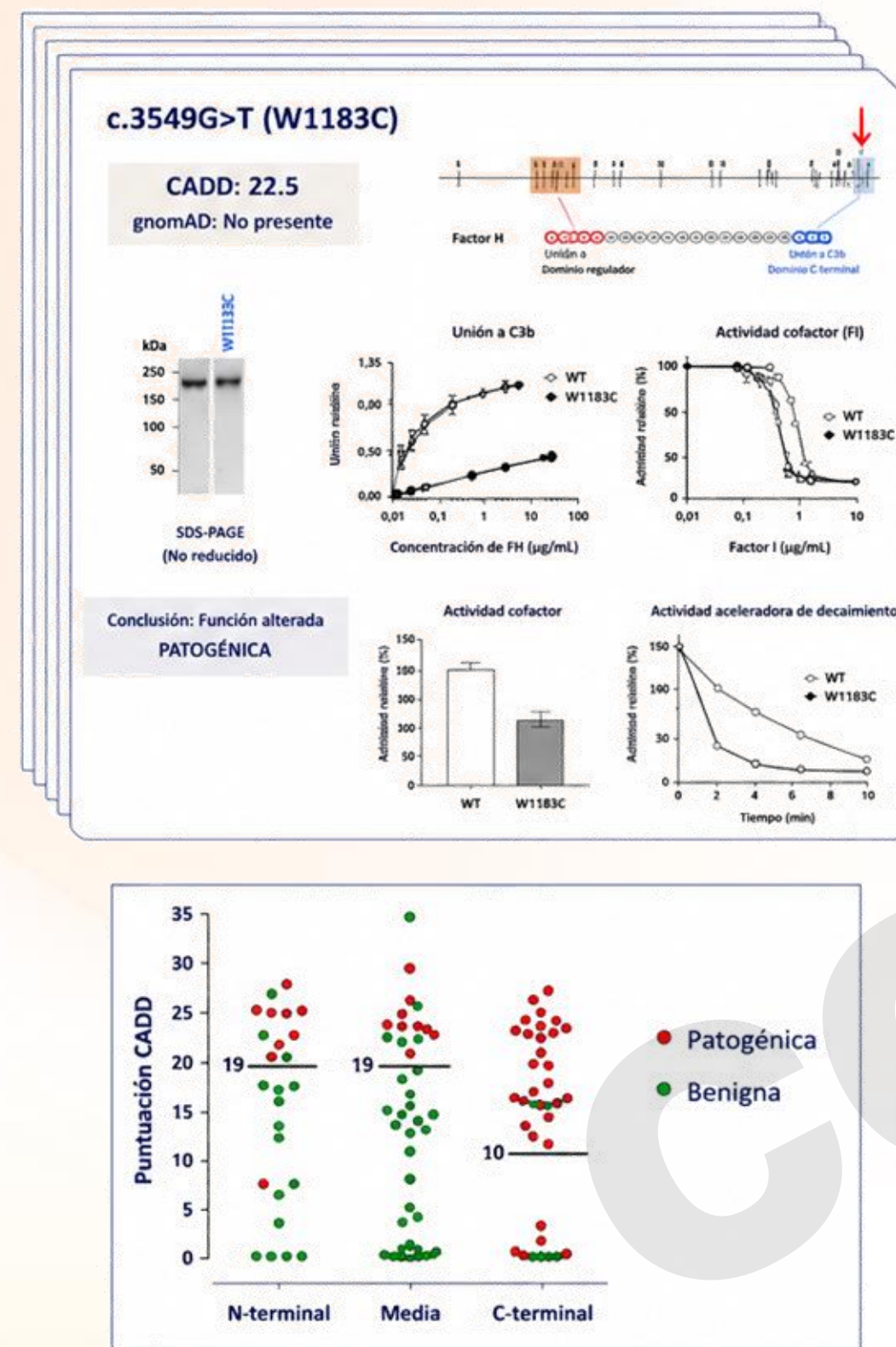
- **Métodos computacionales** (p. ej., CADD, Ravel).
- **Frecuencia alélica** (p. ej., ausente en bases de datos poblacionales).



Sin una **clasificación adecuada**, la información genética no tiene valor clínico.

Una **mala interpretación** de los resultados genéticos puede tener consecuencias importantes para los pacientes y sus familiares.

Caracterización funcional de 105 variantes missense de *FH* asociadas a aHUS



Martin-Merinero et al. Blood 138:2185-2201 (2021).

- Todas las variantes se clasificaron como patogénicas o benignas y, para cada una, se documentó completamente la naturaleza de la patogenicidad. Se incluyeron 26 variantes previamente caracterizadas como controles para confirmar la robustez de los ensayos funcionales.
- La rareza en bases de datos de controles no es informativa para la clasificación de variantes. Aunque las variantes patogénicas son más probablemente ultrararas (MAF<0,01%) que las benignas, el 21,5% de las variantes benignas están ausentes en gnomAD.
- También identificamos limitaciones importantes al aplicar algoritmos de predicción a variantes de *FH*; solo el 74% se clasificaron correctamente. Un ajuste diferencial de los algoritmos de predicción para tener en cuenta las peculiaridades de las distintas regiones de *FH* mejora las predicciones globales hasta el 85%.
- El análisis funcional de las variantes, combinado con las mediciones de niveles, sigue siendo el estándar de oro para proporcionar una clasificación precisa.



Estudios en curso en *FB*, *MCP*, *FI* y *C3*



¡Muchas gracias!

CONFIDENCIAL