

งานวิจัยหลายชิ้นในกลุ่มชาวไอริช อเมริกัน ออสเตรเลียและญี่ปุ่นสรุปว่า ภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 (C4Q0) นั้นเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อภาวะการเกิดโรคเอสแอลอี นอกจากนั้นการศึกษาในกลุ่มคนอเมริกันพบว่า ภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A (C4AQ0) และ C4B (C4BQ0) นั้นจะสามารถพบได้ในกลุ่มประชากรปกติประมาณ 10% และ 16% ตามลำดับ การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ C4AQ0 และ C4BQ0 ในกลุ่มประชากรไทยที่เป็นโรคเอสแอลอีเทียบกับกลุ่มคนปกติ โดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดจากเลือดของผู้ป่วยโรคเอสแอลอีจำนวน 118 ราย และกลุ่มคนปกติ 145 ราย มาศึกษาภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ ผลปรากฏว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเอสแอลอีมีภาวะขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 ถึง 5.93% โดยขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B คือ 2.54% และ 3.39% ตามลำดับ ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้า นอกจากนั้นยังพบว่าในกลุ่มคนไทยปกติไม่พบภาวะ C4Q0 เลย ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยในกลุ่มประชากรอื่น ๆ การศึกษาในลำดับต่อมา ได้ทำการตรวจหาภาวะมิวเตชันของยีนคอมพลีเมนต์ C4 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่และการหาลำดับเบส โดยศึกษาภาวะการมีเบสไทโรซีนและซิสโตซีน (2-bp insertion) แทรกในโคดอน 1213 แอ็กซอน 29 ซึ่งพบมากในภาวะ C4AQ0 และภาวะการขาดเบสซิสโตซีน (1-bp deletion) ในโคดอน 522 ในแอ็กซอน 13 ซึ่งพบมากในภาวะ C4BQ0 ซึ่งภาวะทั้งสองทำให้เกิดรหัสหยุดแอ็กซอนถัดไป มีผลให้เกิดภาวะการขาดโปรตีนคอมพลีเมนต์ดังกล่าวในกระแสเลือด

ผลการวิจัยพบภาวะ 2-bp insertion ในแอ็กซอน 29 ของยีน C4B ในผู้ป่วยหนึ่งรายที่มีภาวะ C4AQ0 ร่วมด้วย และไม่พบภาวะมิวเตชันทั้งสองชนิด ในกลุ่มคนปกติและผู้ป่วยเอสแอลอี ทำให้สรุปได้ว่า ภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 ไม่ว่าจะชนิดเอ หรือชนิดบีเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อภาวะการเกิดโรคเอสแอลอีในกลุ่มประชากรไทย ซึ่งนอกจากปัจจัยทางพันธุกรรมแล้วปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่น สภาวะแวดล้อม ที่อยู่อาศัย อาหารการกิน อาจจะมีผลต่อภาวะการแสดงออกของภาวะการขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4A และ C4B ต่อโรคเอสแอลอีด้วย

นอกจากนั้น ยังได้นำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาช่วยในการปรับแต่ง Bacterial artificial chromosomes ที่มียีนคอมพลีเมนต์ C4 ของคน ทำให้มีภาวะ 2-bp insertion ในแอ็กซอน 29 และนำยีนที่ปรับแต่งแล้วเข้าสู่เซลล์ไฟโบบลาสที่เพาะเลี้ยงได้จากหนูที่ขาดยีนคอมพลีเมนต์ C4 (C4 knockout mice) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนมิวเตชันดังกล่าวเทียบกับยีนปกติ พบว่า ภาวะ 2-bp insertion ในแอ็กซอน 29 ซึ่งส่งผลให้เกิดรหัสหยุดที่แอ็กซอน 30 นั้น ส่งผลในขั้นตอน C4 transcription ทำให้ไม่สามารถผลิตโปรตีนคอมพลีเมนต์นี้ได้ ยืนยันจากผลการทดลองด้วยเทคนิค RT-PCR และ ELISA

Most previous studies have linked the deficiencies in C4 with systemic lupus erythematosus in Anglo- Irish, Americans, Australians and Japanese. Null alleles at either locus are relatively common in Americans occurring at the C4A and C4B loci in approximately 10% and 16% of normal individuals, respectively. In our study, we extensively examined the possible association between homozygous C4Q0 and SLE in a large cohort of Thai populations diagnosed as SLE and further attempted to identify the genetic basis of C4Q0. One hundred eighteen cases of SLE patients and 145 controls were genotyped by touchdown PCR. The results confirmed the previous studies that 5.93% of C4 null genes: 2.54% of C4AQ0 and 3.39% of C4BQ0 were found in SLE patients. In contrast to other studies, we found no cases of C4 null genes in normal control. To further investigate the genetic basis of C4 deficiency, all genomic DNAs were also analyzed for 2-bp (TC) insertion at codon 1213 in exon 29 which is a common mutation in many C4A null genes and a novel 1-bp deletion (C) at codon 522 in exon 13 that is common in most C4B null genes. Both mutation results in a frame- shift mutation and premature stop codon using sequence specific primers PCR and direct sequencing.

The results showed that there was 2-bp insertion in exon 29 of mutant C4B gene in one SLE patient carrying C4AQ0. There was no 2-bp insertion in exon 29 of both isotypes in controls and the rest of SLE patients. Thus, we concluded that both C4AQ0 and C4BQ0 are the strong predisposing factors for SLE in Thais with different racial and genetic backgrounds could alter the thresholds for requirement of C4 protein levels in immune tolerance and regulation.

At present, bacterial artificial chromosomes (BAC) offer many advantages for functional studies of large Eukaryotic genes. Here we constructed a simple and flexible step which permits 2- bp insertion to be introduced into BAC containing human complement C4 (BAC-hC4) without leaving any other residual change in the recombinant product. These BAC-hC4 and mutant type of BAC-hC4 (BAC-mutC4) was transfected into mouse fibroblast from C4 knockout mice (Kc-MFB) to study the human C4 expression in mouse. The results showed that BAC-mutC4 transfected Kc-MFB had a problem during C4A transcription. While C4B transcription and its protein production were still normal by RT-PCR and plate ELISA.