



ลักษณะ C4 allotypes ในผู้ป่วยไทย Systemic lupus erythematosus และ
Rheumatoid arthritis

นางสาววาสนา วิรัตน์โยสินทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2533


ISBN 974-574-090-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016295

[10305555

**C4 ALLOTYPES IN THAI SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND
RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS**



MISS WASNA VIRATYOSIN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

INTER-DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY

GRADUATE SCHOOL

CHULALONGKORN UNIVERSITY

1990

ISBN 974-577-090-6



Thesis Title C4 Allotypes in Thai Systemic Lupus Erythematosus
and Rheumatoid Arthritis Patients
By Miss Wasna Viratyosin
Inter-Department Medical Microbiology
Thesis Advisor Associate Professor Reutai Sakulramrung, M.D., Ph.D.
Co-Advisor Associate Professor Tada Sueblinvong, M.D., M.Sc.
Assistant Professor Nuantip Kamolvarin, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University on
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya
..... Dean of the Graduate school
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Dilok Yenbutra
..... Chairman
(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

Reutai Sakulramrung
..... Thesis Advisor
(Associate Professor Reutai Sakulramrung, M.D., Ph.D.)

Tada Sueblinvong
..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Tada Sueblinvong, M.D., M.Sc.)

Prida Malasit
..... Member
(Dr. Prida Malasit, M.D., M.R.C.P.)

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยทางพันธุศาสตร์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเพียงแผ่นเดียว



วาสนา วิรัตน์โยสินทร์ : ลักษณะ C4 allotypes ในผู้ป่วยไทย systemic lupus erythematosus และ rheumatoid arthritis (C4 ALLOTYPES IN THAI SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.พญ. ถัย สกลแรมรุ่ง, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.พญ. ธาดา สืบหลินวงศ์, ผศ.ดร. นวลทิพย์ กมลวารินทร์, 95 หน้า. ISBN 974-574-090-6

ผู้รายงานได้ศึกษาลักษณะ C4 allotypes ในผู้ป่วยไทยที่เป็น systemic lupus erythematosus (SLE) จำนวน 76 ราย, rheumatoid arthritis (RA) จำนวน 34 ราย และในกลุ่มคนปกติจำนวน 100 ราย ด้วยวิธี immunoblotting electrophoresis และ hemolytic function assay โดยใช้เอนไซม์ carboxypeptidase และ neuraminidase ย่อยโมเลกุลของ C4 ทำให้อ่าน band ได้ชัดเจน ใช้ laser densitometer และคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ของ C4A ต่อ C4B ตรวจหา null allele ของ C4A และ C4B ได้ผลดี

ผลการศึกษาลักษณะ C4 Allotypes ที่พบมากในคนไทย คือ C4A3 และ C4B1 เช่นเดียวกับการศึกษาของผู้อื่น ผู้ป่วยไทยที่เป็นโรค SLE 76 รายมีการเพิ่มขึ้นของ C4A*Q0 ($p = 0.0015$) เมื่อเทียบกับคนปกติ โดยพบว่ามี C4A*Q0 จำนวน 27 ราย ในผู้ป่วย SLE 76 ราย (35.5%) เปรียบเทียบกับ 14 ราย ในคนปกติ 100 ราย (14%) คิดเป็นอัตราเสี่ยงในการเกิดโรค (Relative risk (R.R)) ของ C4A*Q0 เท่ากับ 3.38 สำหรับ C4B allotypes ในผู้ป่วยไทย SLE นั้น มีการเพิ่มของ C4B*Q0 เล็กน้อย คือมี C4B*Q0 จำนวน 11 ราย ในผู้ป่วย SLE (14.5%) เปรียบเทียบกับ 7 ราย ในคนปกติ (7%) ($p = 0.17$)

ผลการศึกษาลักษณะ C4 allotypes ในผู้ป่วยไทยที่เป็นโรค RA จำนวน 34 รายนั้น พบว่ามี C4 allotypes ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าคนปกติคือ C4B 21 (RA = 8.8%, คนปกติ = 3%, $p = 0.17$, R.R. = 3.13) และ C4 B4 (RA = 2.9%, คนปกติ 1%, $p = 0.44$, R.R. = 3.00) และพบ C4 B2 ในผู้ป่วยน้อยกว่าคนปกติ (RA=29.4%, คนปกติ= 53%, $P= 0.029$)

จากการที่พบ C4A*Q0 เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยไทย SLE ครั้งนี้สนับสนุนรายงานอื่น ๆ ที่ว่า C4A*Q0 มีความสัมพันธ์กับโรค SLE จริง เช่นเดียวกับที่พบในชนชาติต่าง ๆ

ในการศึกษาผู้ป่วยโรค rheumatoid arthritis ยังไม่พบลักษณะ C4 allotypes ที่เกี่ยวข้องอย่างเด่นชัด จึงสมควรต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยตรวจหาแอนติเจนใน major histocompatibility Complex ใน class อื่น ๆ ร่วมด้วย โดยเฉพาะ MHC II

ภาควิชา ...สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางทหารแพทย์.....
สาขาวิชา ...สาขาจุลชีววิทยาทางทหารแพทย์.....
ปีการศึกษา 2532.....

ลายมือชื่อนิติศ อ.วสท. วิรัตน์โยสินทร์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รศ.พญ. ถัย สกลแรมรุ่ง.....

อ.ดร. นวลทิพย์ กมลวารินทร์



พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเพียงแผ่นเดียว

WASNA VIRATYOSIN : C4 ALLOTYPES IN THAI SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS. THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR REUTAI SUKULRAMRUN , M. D. Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR TADA SUEBLINGVONG ,M.D., M.Sc , ASSITANT PROFESSOR NUANTIP KAMOLVARIN, Ph.D., 95 pp. ISBN 974- 574 -090-6

The present study examined the pattern of C4 allotypes in 76 systemic lupus erythematosus (SLE), 34 rheumatoid arthritis (RA) and 100 healthy persons by immunoblotting electrophoresis and hemolytic function assay. Utilization of carboxypeptidase and neuraminidase treated EDTA-plasma resulting in better resolution of C4 alleles into single major bands has allowed clear distinction between C4 alleles. Assignment of C4 null allele was facilitated by the use of a laser densitometer and the evaluation of relative densities of C4A and C4B bands.

The most common C4A and C4B allotypes in Thai were found to be C4A3 and C4B1 respectively which is in keeping with other findings. The frequency of C4A null allele (C4A*Q0) in SLE patients (35.5%) are significantly increased in comparison with control subjects (14%, $p = 0.0015$), with a relative risk of 3.38. There is a slight increase of C4B null allele (C4B*Q0) in SLE patients (14.5% versus 7%, $p = 0.17$).

In the rheumatoid arthritis group, there is an increase of C4B 21 (8.8% versus 3%, $p = 0.17$, R.R. = 3.13) and C4B4 (2.9% versus 1%, $p = 0.44$, R.R. = 3.00) and significant decrease of C4 B2 (29.4% versus 53%, $P = 0.029$) in RA patients.

The strong association of C4A*Q0 with Thai SLE patients in this study is consistent with others in different ethnic groups implicating the universal feature of this allotype in SLE.

There is no distinct association of C4 allotypes with rheumatoid arthritis observed in this study. Further investigation on other major histocompatibility complex antigens particularly MHC II seems warranted.

ภาควิชา สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์.....

ปีการศึกษา 2532.....

ลายมือชื่อนิสิต ๐๑๗๓ จิราณี ไชยสิทธิ์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ๑๑๖๖/๒๕๓๒.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาอาวุโส ๑๑๖๖/๒๕๓๒.....



ACKNOWLEDGEMENT

This thesis would never have been successful without any generosity, heartfelt supports, valuable advices from the following persons to whom I would like to express my deepest gratitude and sincere appreciation. Their great memorable honors shall be recognized by me and those who find the usefulness of this work.

My deepest appreciations to:

Associate Professor Dr. Reutai Sakulramrung, Division of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, My advisor, and Associate Professor Dr. Tada Sueblinvong and Assistant Professor Dr. Nuantip Kamolvarin, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisors, for their invaluable advices, strong encouragement and constructive criticisms. I thank them and am most grateful.

Associate Professor Dr. Uthit Deesomchoke, and staffs of Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their help in collecting specimens.

Associate Professor Dr. Sommatat Wongsawang, Division of Microbiology, Department of Pathology and Associate Professor Dr. Nicom Chaisiri, Division of Biochemistry, Department of Physiology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, for their valuable help and generous of supply of the electrophoresis instrument and facilities needed.

Dr. Peter H. Kay, Department of Clinical Immunology, Royal Perth Hospital and Queen Elizabeth II Medical Centre, Perth, Western Australia, for his beneficial discussion and guidance in C4 typing.

Dr. Koichi Suzuki, Department of Legal Medicine, Osaka Medical School Japan and Assistant Professor Dr. Preeyachit charoenwong, Division of immunology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their co-operation and providing of the reference and known C4 allotypes sera.

Miss Somrat Charnrit, Department of Preventive and Social Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her recommendation of appropriate statistical analysis.

The China Medical Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for the funding of this study and the committee of the Graduate school, Chulalongkorn University, for the research grant supporting this study. I faithfully acknowledge my indebtedness to them.

The staffs and personels in the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Scientific Division of Red Cross Society for their enthusiastic co-operation and providing of the facilities needed. The staffs and personels in the Division of Medical Illustration for their valuable aid in photographic work. And to all those other persons, too numerous to mention who have given me support and consideration.

Finally, I am deeply indebted to my mother and family for their help, encouragement and understanding.

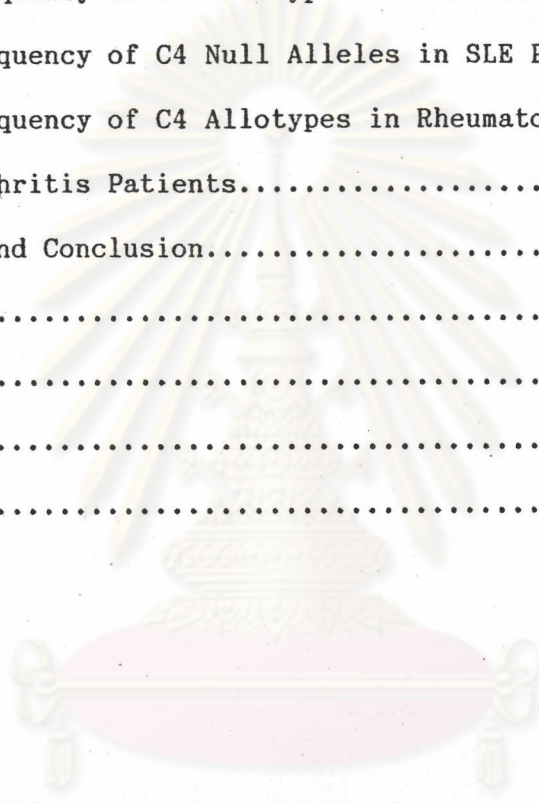


CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xiii
ABBREVIATIONS.....	xv
OBJECTIVE.....	xvii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVIEW OF LITERATURE.....	4
Structure of C4.....	4
The Structural Polymorphism of C4 Protein.....	6
The Two Isotypes of the Fourth Complement Component.....	8
C4 Gene.....	10
The Genetic Polymorphism of C4.....	11
Molecular Basis for C4 Null Allele (C4*Q0).....	14
C4 and Systemic Lupus Erythematosus.....	15
C4 and Rheumatoid Arthritis.....	17
III. MATERIALS AND METHODS.....	28
Materials.....	28
1. Studied Population.....	28
1.1 Patients.....	28
1.2 Control subjects.....	28

	Page
2. Reference C4 Allotypes.....	28
3. Sample Collection and Treatment.....	29
Methods.....	30
1. Immunofixation Electrophoresis.....	30
1.1 Agarose Gel Preparation.....	30
1.2 Sample Application.....	31
1.3 Agarose Gel Electrophoresis.....	31
1.4 Immunofixation Method.....	32
2. Immunoblot.....	32
2.1 Electroblotting.....	33
2.2 Immunostaining.....	34
3. Hemolytic Gel Function Assay.....	35
3.1 Preparation of Antibody - Sensitized Sheep Erythrocyte.....	35
3.2 Preparation of Hydrazine Treated Guinea Pig Serum.....	36
3.3 Hemolytic Gel Assay.....	36
4. C4 Nomenclature.....	37
5. Assignment of C4 Null Alleles.....	37
6. Statistical Analysis.....	38
IV Result.....	46
1. C4 Phenotypes.....	46
2. Detection of C4A and C4B Variants by a Functional Hemolytic Assay.....	47

	Page
3. Frequency of C4 Allotypes.....	47
3.1 Frequency of C4 Allotypes in Thai Populations.....	47
3.2 Frequency of C4 Null Alleles in Thai Populations....	47
3.3 Frequency of C4 Allotypes in SLE Patients.....	48
3.4 Frequency of C4 Null Alleles in SLE Patients.....	48
3.5 Frequency of C4 Allotypes in Rheumatoid Arthritis Patients.....	48
V Discussion and Conclusion.....	59
REFERENCES.....	71
APPENDIX I.....	87
APPENDIX II.....	89
CURRICULUM VITAE.....	95



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Proposed C4 Isotypic and Allotypic Differences.....	26
2	The Association of MHC Antigen in Systemic Lupus Erythematosus.....	27
3	The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus.....	39
4	The 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis.....	40
5	Reference or Known C4 Allotypes in This Study.....	41
6	C4 Phenotype and Genotype Frequencies of 100 Thai Normal Subjects.....	55
7	C4 Phenotype and Genotype Frequencies of 76 SLE Patients.....	56
8	C4 Phenotype and Genotype Frequencies of 34 RA Patients.....	57
9	Frequency of C4 Allotypes in SLE Patients and Controls.....	58
10	Frequency of C4 Allotypes in RA Patients and Controls.....	59
11	Distribution of C4A and C4B Allotypes in Thai and Japanese Populations.....	67
12	Frequency of the C4 "Null" Alleles in Various Populations.....	68

Table		Page
13	Association of C4 Null Allele in SLE in Various Populations.....	69
14	Genetic Marker in Rheumatoid Arthritis.....	70



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figures	Page
1 Structural Feature of Human C4 Protein.....	21
2 Activation Pathway of Complement.....	22
3 The Three Polypeptide Chain Structure showing the Chain Activated by C1S, Inactivated by Factor I and C4 Binding Protein.....	23
4 The Gene Map of Human MHC.....	24
5 A Model Proposed to Explain Deletion of C4 and 21-OH Genes on Some Haplotypes and Duplication on Others.....	25
6 Moulding Chamber For the Thin Gel.....	42
7 Semi-dry Electroblotting.....	43
8 A Diagrammatic Summary that Shown Relative Position of Electrophoretic Human C4 Allotypes.....	44
9 Densitometric Pattern of C4 Allotype without Null Alleles and C4 Allotype with Null Alleles.....	45
10 C4 Electrophoretic Patterns of Neuraminidase-treated EDTA Plasma from Reference C4 Allotypes.....	50
11 C4 Electrophoretic Patterns of Neuraminidase-treated EDTA Plasma that carry C4 Null Alleles at either C4A or C4B Locus.....	51
12 C4 Electrophoretic Patterns of Neuraminidase - Carboxypeptidase treated EDTA plasma.....	52

13 C4 Electrophoretic Pattern of Neuraminidase and
Carboxypeptidase treated EDTA Plasma from Heterozygous
C4 Null Alleles..... 53



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

Bf	=	Properdin factor B
C1	=	the first component of complement
C2	=	the second component of complement
C3	=	the third component of complement
C4	=	the fourth component of complement
C5	=	the fifth component of complement
°C	=	degree celsious
cm	=	centimetre
DNA	=	deoxyribonucleic acid
ed	=	editor
et al	=	et alii
EDTA	=	ethylenediamine tetra acetic acid
HLA	=	Human leukocyte antigen
hr	=	hour
Ig	=	Immunoglobulin
Kb	=	Kilobase
Kd	=	Kilodalton
M	=	molarity
MHC	=	Major histocompatibility complex
ul	=	microlitre
um	=	micrometre
mA	=	milliampere
ml	=	millilitre
mu	=	milliunit
min	=	minutes

QO	=	quantitative zero, null alleles
RA	=	Rheumatoid arthritis
RR	=	Relative risk
rpm	=	revolution per minute
SLE	=	Systemic lupus erythematosus
W/V	=	weight by volume



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OBJECTIVE

To examine the frequency of C4 allotypes in systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA) in Thai patients.



ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย