

PRACE ORYGINALNE

Izabela Korczowska, Dorota Trzybulska, Natalia Pewińska, Paweł Hrycaj

Brak związku polimorfizmu rs7951 genu C3 składowej dopełniacza z rozwojem tocznia rumieniowatego układowego

The lack of association of rs7951 C3 complement polymorphism with systemic lupus erythematosus patients

Z Zakładu Reumatologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

STRESZCZENIE

Wstęp: Toczeń rumieniowaty układowy jest przewlekłą, zapalną chorobą tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym. Celem pracy była ocena częstości występowania polimorfizmu genu C3 rs7951 w grupie kontrolnej (u osób zdrowych) i w grupie badanej (chorych na TRU).

Materiał i metody: Badaniu zostało poddanych 99 osób chorych na TRU, w wieku 20–70 lat. Materiałem biologicznym wykorzystanym w badaniach było DNA, wyizolowane metodą wysalania. Uzyskany materiał amplifikowano przy użyciu metody PCR, a następnie poddano hydrolizie enzymatycznej z użyciem enzymu *HindIII*.

Wyniki: Nie stwierdzono częstszego występowania allelu ryzyka T genu C3 dopełniacza w grupie badanej w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej.

Wnioski: Przeprowadzone badania wykazały, że polimorfizm genu C3 rs7951 nie ma wpływu na częstość wystąpienia TRU

Słowa kluczowe: toczeń rumieniowaty układowy, analiza genetyczna, składowa C3 dopełniacza

ABSTRACT

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex multisystem autoimmune disease. The purpose of the study was to estimate the prevalence of polymorphism in C3 rs7951 gene in the control group (healthy people) and in the study group (people suffering from the SLE).

Materials and methods: Study has been subjected to 99 people suffering from the SLE, between 20-70 years old. Biological material used in the studies was DNA. The method of salting out was used to obtain the DNA, amplified with PCR method and underwent enzymatic hydrolysis with usage of endonuclease *HindIII*.

Results: In comparison the study group to the control one the prevalence of risk allele T in gene C3 did not appear to be higher.

Conclusions: The study revealed that polymorphism of C3 gene (rs7951) does not contribute to prevalence of SLE.

Key words: systemic lupus erythematosus, genetic analysis, C3 complement

Praca finansowana z projektu MNiSzW: N N402 267836

Wstęp

Toczeń rumieniowaty układowy (TRU) jest wieloobjawową chorobą, przebiegającą z zajęciem wielu narządów, z zapaleniem naczyń i zapaleniem okołonaczyniowym małych tętnic i tętniczek. Choroba związana jest z odkładaniem się kompleksów immunologicznych, składających się z: DNA, anty-DNA, dopełniacza i włóknika [1]. Przyczyna choroby nadal nie jest poznana. Prawdopodobnie

Work funded by the project MNiSzW: N N402 267836

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is multisymptomatic disease, characterized by multiple organ involvement, with vasculitis and inflammation of small perivascular arteries and arterioles. The disease is associated with deposition of immune complexes, consisting of: DNA, anti-DNA, complement, and fibrin [1]. The cause of the disease is still not known. Probably genetically predisposed individuals

u osób predysponowanych genetycznie pod wpływem czynników środowiskowych dochodzi do zapoczątkowania procesu zapalnego i reakcji autoimmunologicznych. W jego patogenezie bierze się pod uwagę predyspozycje genetyczne (m.in. związek z niektórymi antygenami zgodności tkankowej, genami dopełniacza i białek protekcyjnych), czynniki środowiskowe, tj. promieniowanie słoneczne, promieniowanie UV, leki – m.in. doustne środki antykoncepcyjne, hydralazyna, substancje chemiczne – narażenie zawodowe na krzemionkę, związki rtęci czy też pestycydy, wirusy – parwovirus B19 oraz Epsteina-Barr [2].

Bardzo ważnym przejawem zaburzeń immunologicznych w TRU jest nieprawidłowa odpowiedź układu dopełniacza. Układ dopełniacza należy do odporności nieswoistej – humoralnej (wrodzonej). Podstawowe funkcje dopełniacza to rozpoznawanie i opsonizacja patogenów, chemotaksja, liza komórki docelowej czy też usuwanie kompleksów immunologicznych [3]. Składowa C3 zajmuje strategiczną pozycję we wszystkich drogach aktywacji układu dopełniacza, dlatego też jej niedobór powoduje zahamowanie mechanizmów odpowiedzi swoistej, jak i nieswoistej. C3 jest białkiem ostrej fazy, syntezowanym głównie w wątrobie podczas reakcji zapalnej. Po raz pierwszy sekwencja kodująca genu składowej C3 układu dopełniacza oraz pochodząca od niej sekwencja aminokwasów została zaprezentowana w 1985 r. przez De Bruijn'a i Fey'a. Gen zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 19, w regionie 1 (19p13.3-p13.2), ma długość 41000 pz. W jego skład wchodzi 41 eksonów [4]. Polimorfizm genowy oznacza występowanie różnorodnych odmian danego genu, co w konsekwencji może prowadzić do różnic w budowie i działaniu białka kodowanego przez ten gen. Wpływ polimorfizmu genu kodującego składową dopełniacza C3 na rozwój oraz przebieg wielu chorób jest od lat przedmiotem badań. Sivaprasada i wsp. (2007) wykazali, że zmiany sekwencji nukleotydowych w obrębie czynnika H (który jest głównym regulatorem aktywacji białka C3) są powiązane z występowaniem starczego zwyrodnienia plamki żółtej [5]. Alper i wsp. (1972) opisali pacjenta z dużą podatnością na ropne infekcje, u którego stężenie C3 było poniżej 1/1000 wartości normy. Również krewni probanta, włączając w to obojga rodziców, posiadali o połowę obniżone stężenie C3 w surowicy [6]. Pacjent ten był homozygotą z niedoborem C3. Opisano również 3 siostry, które były heterozygotami z odziedziczonym allelem *null* od ojca i z dysfunkcyjnym allelem C3 odziedziczonym od matki. U tych pacjentek droga klasyczna była częściowo nieuszkodzona, natomiast alternatywna droga aktywacji dopełniacza była nieaktywna. Jedna z sióstr, probantka, miała zespół toczniopodobny. Gen C3 probantki okazał się wrażliwy na proteolizę trypsyną, częściowo oporny na klasyczną drogę aktywacji układu dopełniacza i całkowicie oporny na alternatywną drogę [7]. Inni badacze

under the influence of environmental factors tend to reveal the initiation of inflammation and autoimmune reactions. In its pathogenesis there are taken into account genetic predisposition (e.g. association with certain histocompatibility antigens, the complement genes and protection proteins), environmental factors, i.e. solar radiation, UV radiation, drugs – among others oral contraceptives, hydralazine, chemical substances – occupational exposure to silica, mercury compounds or pesticides, viruses, parvovirus B19 and Epstein-Barr virus [2].

Another important manifestation of immunological disorders in SLE is incorrect response of the complement system. Complement system belongs to the innate immunity – humoral (congenital). The basic functions of complement is to recognize and opsonization of pathogens, chemotaxis, lysis of target cells or the removal of immune complexes [3].

Component C3 plays a strategic role in all ways of complement activation, which is why its deficiency results in inhibition of specific response mechanisms and nonspecific ones. C3 is an acute phase protein, synthesized primarily in the liver during inflammation. For the first time the gene coding sequence of complement component C3 and the derived amino acid sequence was presented in 1985 by De Bruijn'a and Fey'a. The gene is located on the long arm of chromosome 19 in region 1 (19p13.3-p13.2). Has a length of 41,000 bp. It consists of 41 exons [4]. Gene polymorphism is an occurrence of various varieties of a given gene, which in turn can lead to differences in structure and activity of the protein encoded by this gene. The influence of a gene polymorphism of complement component C3 on the development and course of many diseases has for years been the subject of intense research. Sivaprasada et al., (2007) showed that changes in nucleotide sequences within the factor H (which is the main regulator of C3 protein activation) are associated with the occurrence of senile macular degeneration [5]. Alper et al., (1972) described a patient with a high susceptibility to purulent infection, who revealed the concentration of C3 less than one thousandth the value of the standard. Also described patient's relatives, including both parents, revealed half reduced levels of C3 in serum [6]. This patient was a homozygous with C3 deficiency.

There were also described three sisters who were heterozygous with *null* allele inherited from the father and dysfunctional C3 allele inherited from the mother. In these patients, the classic route was partially intact, while the alternative route of complement activation was inactive. One of the sisters, had lupus-like syndrome. C3 gene has proved to be sensitive to proteolysis by trypsin, partially resistant to the classical route of complement activation and completely resistant to the alternative route [7].

Other researchers have observed that C3-deficient homozygous develop mesangiocapillar

zaobserwowali, że homozygoty z niedoborem C3 rozwijają mezangiokapilarne kłębuszkowe zapalenie nerek. Najprawdopodobniej związek niedoboru składowej C3 z zapaleniem nerek jest powiązany z nieprawidłową aktywnością układu dopełniacza [8, 9]. W 1990 roku Power i wsp. [10] opisali rodzinę, w której 3 członków chorowało na częściową lipodystrofię. U matki i syna stwierdzono błoniasto-rozplamowe kłębuszkowe zapalenie nerek, wykryto u nich także czynnik C3, odpowiadający za zapalenie nerek. Zarówno u matki jak i syna wystąpiła schyłkowa niewydolność nerek. Liczne badania sugerują udział różnych genów w patogenezie TRU [11, 12], żadna z tych prac nie opisuje ryzyka rozwoju TRU obejmującego polimorfizm C3 (rs7951) w populacji kaukaskiej. Celem badania było określenie częstości występowania polimorfizmu genu składowej C3 (rs7951) dopełniacza w polskiej populacji chorych na toczeń rumieniowaty układowy.

Materiał i metody

Badanie uzyskało zgodę Komisji ds. Etyki i Badań Naukowych przy Uniwersytecie im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Wszyscy chorzy zostali poinformowani o założeniach badania oraz jego przebiegu i wyrazili świadomą pisemną zgodę na udział w badaniach. Krew do grupy kontrolnej pozyskano od 101 zdrowych, niespokrewnionych, polskich dawców krwi z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu. Grupę stanowiło 51 kobiet i 50 mężczyzn w wieku 19–51 lat. Kryteriami wykluczającymi z badania były choroby autoimmunologiczne, ostre i przewlekłe stany zapalne i zakażenia, niewydolność układu oddechowego, układu krążenia, nerek lub wątroby oraz nowotwory. Grupę chorych stanowiło 99 pacjentów (88 kobiet i 11 mężczyzn) chorych na toczeń rumieniowaty układowy, w wieku 20–70 lat. Rozpoznanie ustalono na podstawie kryteriów klasyfikacji TRU wg ACR (ang. *American College of Rheumatology*) z 1982 r. (zmodyfikowanych w 1997 r.) [13]. U chorych rozpoznano chorobę, jeśli spełnione były co najmniej 4 spośród 11 kryteriów, przy czym kryteria te mogły być spełnione w chwili badania i/lub w wywiadzie. Stopień aktywności TRU określono na podstawie skali aktywności tocznia rumieniowatego układowego (SLE-DAI – systemic lupus erythrodermatosis activity index) [14]. Prawie połowa z badanej grupy chorych (44,9%) chorowała na TRU od ponad 10 lat, czas trwania choroby 5–10 lat charakteryzował 29,3% pacjentów, natomiast pozostali pacjenci chorowali mniej niż 5 lat. Rozkład aktywności choroby wyglądał następująco: 55,2% osób charakteryzowało się niską, 33,9% średnią, a 12,5% osób wysoką aktywnością choroby.

Materiałem uzyskanym do badania zarówno od grupy badanej, jak i kontrolnej było DNA wyizolowane z leukocytów krwi pełnej pobranej do probówek z 10% EDTA. Izolację DNA wykonano metodą wysalania. Materiałem biologicznym, z którego izolowano DNA były

glomerulonephritis. Most likely, the relationship of the C3 component deficiency with kidney inflammation is associated with abnormal activation of the complement system [8, 9]. In 1990, Power et al., [10] described a family in which 3 members suffered from partial lipodystrophy. Mother and son revealed pellicle-proliferate glomerulonephritis, it has been detected also C3 factor, responsible for the nephritis. Both the mother and son experienced end-stage renal failure. Numerous studies suggest the involvement of the various genes in the pathogenesis of SLE [11, 12], none of these works describe the risk of developing SLE including C3 polymorphism (rs7951) in the Caucasian population. The purpose of this study was to determine the prevalence of the C3 component gene polymorphism (rs7951) of complement in the Polish population of patients with systemic lupus erythematosus.

Materials and methods

The study was approved by the Commission on Ethics and Research at the Karol Marcinkowski' Medical University in Poznan. All patients were informed about the objectives of the study and its course and gave written informed consent to participate in the study. Blood to the control group was obtained from 101 healthy, unrelated, Polish blood donors from the Regional Centre for Blood Donation and Blood Treatment in Poznan. Group of study consisted of 51 women and 50 men aged 19–51 years. Exclusion criteria from studies were autoimmune diseases, acute and chronic inflammation and infection, respiratory failure, cardiovascular, kidney or liver cancer.

Group of patients consisted of 99 patients (88 women and 11 men) with systemic lupus erythematosus, age: 20–70 years. The diagnosis was based on the SLE classification criteria according to ACR (called the *American College of Rheumatology*) from 1982. (modified in 1997) [13]. The patients were diagnosed with the disease, if there were at least 4 out of 11 criteria, those criteria could be met at the time of testing and / or interview. The degree of activity of SLE, was based on the level of activity of systemic lupus erythematosus (SLEDAI – Systemic lupus erythrodermatosis activity index) [14].

Almost half of the studied group of patients (44.9%) suffered from SLE for over 10 years, disease duration 5–10 years was revealed by 29.3% of patients, while the remaining patients suffered for less than 5 years. Distribution of the disease activity was as follows: 55.2% of those characterized by low, average 33.9% and high 12.5% disease activity. The material obtained for the study of both test and control group, was DNA isolated from leukocytes of whole blood collected into tubes with 10% EDTA. The DNA isolation was performed by salting out. Biological material from which the DNA was isolated were peripheral blood leukocytes. A qualitative assessment of isolated DNA was carried out by electrophoretic separation on 1% agarose

leukocyty krwi pełnej obwodowej. Ocenę jakościową wyizolowanego DNA przeprowadzono poprzez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym w obecności markera wielkości w buforze TBE 1x. Analizę spektrofotometryczną wyizolowanego DNA wykonano w celu określenia średniego stężenia wyizolowanego DNA. Wyizolowany DNA poddano reakcji PCR polegającej na szybkiej, cyklicznej amplifikacji w warunkach *in vitro* fragmentów DNA. W naszym przypadku korzystamy z primerów zaprojektowanych w programie Primer3 (v. 0.4.0) (dostępne w trybie on-line pod adresem: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), syntetyzowanych w serwisie *oligo.pl*.

W reakcji PCR użyto następujących starterów forward: 5' CCTAAAAAATGTAACGCCCTCTGTGCT 3' oraz

reverse 5' CTTGTAAAATAAGGGGGTCAACCCAGCA 3'

Mieszanina do reakcji PCR (w przeliczeniu na 1 próbę) miała następujący skład: genomowy DNA – 1 µl, 5x PCR Buffer – 2,5 µl (Bioron), MgCl₂ (100 mM) – 0,32 µl (Bioron), dNTP – 1,25 µl (Fermentas), primery F+R – 0,5 µl (Oligo.pl), polimeraza-SNPaza – 0,2 µl (Bioron) oraz woda.

Na poszczególnych etapach PCR warunki reakcji przedstawiały się następująco: aktywacja enzymu (pre-denaturacja) przez 2 min w temp. 94°C, następnie namnażanie produktu reakcji (35 cykli): 30 s w temp. 94°C, 30 s w temp. 64°C oraz 30 s w temp 72°C (faza elongacji) i faza końcowej syntezy produktu reakcji odbywała się przez 10 min w temp 72°C. Reakcje PCR przeprowadzono na termocyklerze Mastercycler ep firmy Eppendorf. Produkty amplifikacji (10 µl mieszaniny reakcyjnej PCR) poddawano hydrolizie enzymem restrykcyjnym. Hydroliza enzymatyczna została przeprowadzona przy użyciu enzymu *HindIII* (Fermentas), izolowanego ze szczepów *Haemophilus influenzae* (serotyp D). Ocenę fragmentów DNA przeprowadzono poprzez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym w obecności markera *GeneRuler* 100 bp (Fermentas), w buforze TBE 1x i wizualizowano w świetle ultrafioletowym z użyciem bromku etydy. Sekwencjonowanie produktów PCR wykonano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN w Warszawie. Do izolacji DNA z żelu agarozowego użyto zestawu *Novabeads MagneGEL-OUT*, umożliwiającego bardzo wydajną elucję fragmentów DNA (powyżej 100pz) – produktów elektroforezy. System oparty jest o zastosowanie w pełni syntetycznego kompozytowego złoża magnetycznego. Odpowiednio dobrany skład buforów wiążących i płuczających pozwolił uzyskać DNA o bardzo wysokiej jakości i czystości. Izolowany DNA nie ulega fragmentacji w trakcie procesu oczyszczania. Brak inhibitorów reakcji następczych pozwala na bezpośrednie zastosowanie oczyszczonych kwasów nukleinowych w innych technikach biologii molekularnej. Uzyskane

gel in the presence of the marker size, in 1x TBE buffer. Spectrophotometric analysis of the isolated DNA was performed to determine the average concentration of isolated DNA. The isolated DNA was subjected to PCR, a rapid, cyclic amplification *in vitro*. In our case, the primers designed in Primer3 (v. 0.4.0) (available online at: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), synthesized in *oligo.pl* site, were used.

For the PCR reaction we used the following primers: Forward: 5' CCTAAAAAATGTAACGCCCTCTGTGCT 3' and

Reverse 5' CTTGTAAAATAAGGGGGTCAACCCAGCA 3'

Mixture for PCR reaction (per 1 sample) had the following composition: genomic DNA – 1 µl, 5x PCR Buffer – 2.5 µl (Bioron), MgCl₂ (100 mM) – 0.32 µl (Bioron), dNTPs – 1.25 µl (Fermentas), primers F + R – 0.5 µl (Oligo.pl) polymerase-SNPase – 0.2 µl (Bioron) and water. At various stages of the PCR reaction conditions were as follows: activation of the enzyme (pre-denaturation) for 2 min at 94°C, then multiplication of the product of reaction (35 cycles): 30 s at 94°C, 30 s at 64°C and 30s at temperature 72°C (elongation phase) and the final phase of reaction product synthesis was held at temperature 72°C for 10 minutes. PCR reactions were performed on a thermocycler Mastercycler Eppendorf ep.

The amplification products (10 µl of PCR reaction mixture) was subjected to restriction enzyme hydrolysis. Enzymatic hydrolysis was carried out using the enzyme *HindIII* (Fermentas), isolated from strains of *Haemophilus influenzae* (serotype D). Assessment of DNA fragments was performed by electrophoretic separation on 1% agarose gel in the presence of marker *GeneRuler* 100 bp (Fermentas) in 1x TBE buffer and visualized under ultraviolet light using ethidium bromide. Sequencing of PCR products was performed in the Laboratory of DNA Sequencing and Oligonucleotide Synthesis, IBB PAN in Warsaw. DNA isolation from agarose gel was performed by using *Novabeads MagneGEL-OUT*, enabling highly efficient elution of DNA fragments (above 100pz) - electrophoresis products. The system is based on the use of fully synthetic composite magnetic deposits. Suitable composition of binding and washing buffers allowed to obtain DNA of very high quality and purity. Isolated DNA does not fragment during the purification process. Lack of follow-up response inhibitors allows the direct application of purified nucleic acids in other techniques of molecular biology. The results of sequencing confirmed the reliability of our products.

Statistical analysis

Analysis of the frequency distribution of genotypes was performed using the statistical package Statistica 7.1., using the Pearson χ^2 test, and analysis of the distribution of allele frequencies – using a Fisher's exact probability test. For analysis was taken as statistically significant

wyniki sekwencjonowania potwierdziły wiarygodność uzyskanych przez nas produktów.

Analiza statystyczna

Analizę rozkładu częstości genotypów, przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego Statistica 7.1., stosując test χ^2 Pearsona, a analizę rozkładu częstości alleli – z wykorzystaniem testu dokładnego prawdopodobieństwa Fishera. Dla analiz przyjęto jako istotny statystycznie poziom istotności $p < 0,05$. W przypadku grup o liczebności mniejszej niż 5, zastosowano test dokładnego prawdopodobieństwa Fishera-Freemana-Haltona. Ilorazy szans (OR, ang. *odds ratio*) oraz ich przedziały ufności (C.I., ang. *confidential interval*) dla tabel 2x2 przy obliczaniu alleli wyznaczono przy użyciu programu GraphPad InStat3 dostępnego pod adresem <http://www.graphpad.com>. Zgodność rozkładu genotypów z prawem Hardy'ego-Weinberga analizowano na podstawie strony www.oege.org/software/hwe-mr-calc.html. Za rozkład genotypów zgodny z prawem równowagi Hardy'ego-Weinberga przyjęto wartość $p < 0,05$.

Wyniki

W wyniku przeprowadzenia analizy restrykcyjnej produktu PCR otrzymano 3 warianty polimorficzne genu C3: homozygotę CC, heterozygotę CT, homozygotę TT. Średnie stężenie DNA w próbach kontrolnych oraz badanych wynosiło 167,74 $\mu\text{g/ml}$. Analizując polimorfizm genu C3 w grupie kontrolnej stwierdzono występowanie 2 wariantów: homozygota CC u 91 osób i heterozygota CT u 10 osób, genotypu TT nie stwierdzono. Natomiast w grupie chorych na TRU występowały wszystkie 3 typy polimorficzne genu – homozygota CC u 86 pacjentów, TT u 2 pacjentów i heterozygota CT u 11 osób (tabela 1).

Analizując występowanie pojedynczych alleli, stwierdzono, że w grupie kontrolnej allel C występował w 95% przypadków, a w grupie chorych na TRU u 92% pacjentów. Zależność tę przedstawia tabela 2.

W przeprowadzonych badaniach nie znaleziono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu C3 składowej dopełniacza rs 7951 między grupą pacjentów chorych na TRU a grupą kontrolną ($p > 0,05$). Wyniki analizy statystycznej przedstawia tabela 3.

Dyskusja

Toczeń rumieniowaty układowy jest chorobą wieloczynnikową, w patogenezie której biorą udział m.in. predyspozycje genetyczne. Ogromny rozwój genetyki ostatnich lat pozwolił na dokonanie kolejnych odkryć sugerujących zaangażowanie różnych genów w patogenezę choroby. Najnowsze i stosunkowo tanie badania genetyczne opierają się na analizie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), które pozwalają na zidentyfikowanie loci powiązanych z ryzykiem wystąpienia badanych chorób i określenia siły asocjacji. W literaturze dostępne są

level of significance $p < 0.05$. For groups of size less than 5, the exact probability test was used Fisher-Freeman-Halton. Odds ratios (OR, odds ratio called) and their confidence intervals (CI, confidential interval called) for 2x2 tables when calculating the allele was determined using GraphPad InStat3 available at <http://www.graphpad.com>. Compliance with the law of distribution of genotypes, Hardy-Weinberg equilibrium was analyzed on the basis of the [www.oege.org / software / HWE-mr-calc.html](http://www.oege.org/software/HWE-mr-calc.html). The distribution of genotypes consistent with the law of Hardy-Weinberg equilibrium assumed value of $p < 0.05$.

Results

As a result of restriction analysis of PCR product, there were obtained three polymorphic variants of the gene C3: CC homozygotes, heterozygotes CT, homozygous TT. The average concentration of DNA in samples of control and tested was 167.74 $\mu\text{g/ml}$. Analyzing the C3 gene polymorphism in the control group were found to have two variants: homozygous CC in 91 people and heterozygous CT in 10 people, the TT genotype was not found. But in the group of tested patients with SLE there were all three types of polymorphic genes – homozygous CC in 86 patients, 2 patients TT and heterozygous CT in 11 patients (Table 1).

Analyzing the occurrence of individual alleles, it was found that in the control group allele C occurred in 95% of cases, and in the group of patients with SLE in 92% of patients. This relationship is shown in Table 2. In our studies, there have not been found statistically significant differences in genotype distribution of polymorphisms of C3 component of complement rs 7951 between a group of patients with SLE and the control group ($p > 0.05$). Introduces The statistical analysis results are shown in Table 3.

Discussion

Systemic lupus erythematosus is a multifactorial disease, the pathogenesis involves, among others genetic predisposition. The enormous development of genetics in recent years helped to make the following findings suggesting the involvement of different genes in the pathogenesis of the disease. Recent and relatively inexpensive genetic tests based on analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs), which allow us to identify loci associated with the risk of diseases studied and determine the strength of association. In the literature there are publications suggesting participation of different genes in the pathogenesis of SLE [15, 16], one of which concerns the C3 gene polymorphism rs7951.

It is noteworthy that none of these works concerned the Caucasian population. Miyagawa and colleagues [17] analyzed the effect of 53 genes in the total group of 1473 people (509 SLE patients and 964 healthy) coming from Japan. They studied, among others C3 gene polymorphism

Tabela 1. Częstość występowania genotypów: CC, CT i TT w grupie kontrolnej i w grupie chorych na TRU

Genotyp/Genotype	Kontrola/Control group (n=101)		Pacjenci/ Patients (n=99)	
CC	91	90,10%	86	86,90%
CT	10	9,90%	11	11,10%
TT	0	0%	2	2,00%

Table 1. Genotype CC, CT and TT frequencies estimated in the control group and in the group of patients with SLE

Tabela 2. Częstość występowania allelu C i T w grupie kontrolnej i w grupie chorych na TRU

Allel	Kontrola/Control group (n=202)		Pacjenci/Patients (n=198)	
C	192	95%	183	92%
T	10	5%	18	8%

Table 2. Allele C and T frequencies estimated in the control group and in the group of patients with SLE

Tabela 3. Analiza asocjacji genotypów

	Iloraz szans (OR)/ Allelic OR	C.I.	χ^2	p	Istotność statystyczna/ Statistical significance
Allel ryzyka T	1,574	[0,689-3,593]	1,18	0,28	Brak/ no
CC vs. CT	1,164	[0,471-2,879]	0,11	0,74	Brak/ no
CC vs. TT	5,289	[0,250-111,742]	0,5403*	0,46	Brak/ no
CT vs. TT	4,565	[0,196-106,56]		0,49**	Brak/ no

Table 3. Association study for genotypes

*z poprawką Yates'a,

**dokładny test Fishera

* the amendment Yates'a

** Fisher's exact test

publikacje sugerujące udział różnych genów w patogenezie TRU [15, 16], jedna z nich dotyczy polimorfizmu genu C3 rs7951. Jednocześnie należy podkreślić, że żadna z tych prac nie dotyczyła populacji kaukaskiej. Miyagawa i wsp. [17] przeanalizowali wpływ 53 genów na łącznej grupie 1473 osób (509 chorych na TRU i 964 zdrowych) pochodzących z Japonii. Badali oni m.in. polimorfizm genu C3 rs7951 i określali jego wpływ na występowanie i manifestację kliniczną tocznia. W przypadku 316 zbadanych polimorfizmów, w obrębie różnych regionów poszczególnych genów, tylko polimorfizmy trzech genów wykazały istotną statystycznie korelację z występowaniem tocznia rumieniowatego układowego. Były to gen C3 składowej dopełniacza (rs7951), dla którego iloraz szans wynosił 2.17, polimorfizm rs2230201, gdzie iloraz szans wynosił 1.44 oraz polimorfizm rs2230205 – iloraz szans wynosi 1.39. Kolejnym genem był CD28 (rs3181098), dla którego iloraz szans wynosił 1.43, natomiast trzeci gen to TNFRSF1A (dla polimorfizmu rs4149569 – iloraz szans wynosił 1.50; dla rs4149570 – iloraz szans wynosi 1.43, natomiast dla polimorfizmu rs767455 – iloraz szans wynosi 1.48).

Nasze badania przeprowadzone na zdrowej grupie kontrolnej liczącej 101 osób oraz badanej liczącej 99 osób nie wykazały statystycznie istotnych zależności wskazujących na powiązanie polimorfizmu składowej

rs7951 and determined its impact on the incidence and clinical manifestation of lupus. In the examined cases of 316 polymorphisms, in different regions of individual genes, only three gene polymorphisms showed a statistically significant correlation with the occurrence of systemic lupus erythematosus. These were the complement component C3 gene (rs7951), for which the odds ratio was 2.17, polymorphism rs2230201, where the odds ratio was 1.44 and the polymorphism rs2230205 – odds ratio is 1.39. Another was the CD28 gene (rs3181098), for which the odds ratio was 1.43, while the third is TNFRSF1A gene (polymorphism rs4149569 for which the odds ratio was 1.50; for rs4149570 – odds ratio was 1.43, while for the rs767455 polymorphism – the odds ratio was 1.48).

Our studies performed on healthy control group of 101 people, and the test group of 99 people, did not show statistically significant relationships of the correlation of component C3 rs7951 polymorphism with the occurrence of systemic lupus erythematosus. It is possible that the cause of the difference between the results of Miyagawa et al., (who conducted research on the Japanese population), and ours are because of population varieties, and perhaps because of the number of groups. The next stage of Miyagawa et al., study was to determine serum concentrations of complement component C3

C3 rs7951 z występowaniem tocznia rumieniowatego układowego. Możliwe, że przyczyną różnicy między wynikami Miyagawy (który badania przeprowadził na populacji japońskiej) a naszymi są różnice populacyjne, być może wynikają one z liczebności grup.

Kolejnym etapem badań Miyagawa i wsp. było określenie stężenia w surowicy składowej dopełniacza C3 u 87 pacjentów z TRU. U badanych pacjentów w okresie sześciu miesięcy poprzedzających badanie nie występowały objawy zaostrzenia choroby. Przeanalizowano zależność między surowiczym stężeniem C3 a występowaniem polimorfizmu: C/C (obecne było u 54 pacjentów), C/T (u 30 pacjentów), a T/T (u 3 pacjentów). Stwierdzono, że średnie stężenie w surowicy C3 u nosicieli C/C było znacznie wyższe niż w przypadku dwóch pozostałych genotypów, natomiast nie zauważono istotnych różnic między genotypami C/T i T/T. W naszych badaniach nie przeprowadziliśmy podobnych analiz ze względu na trudności w uzyskaniu statystycznie dużej grupy pacjentów, których stan byłby w miarę stabilny.

Wnioski

Nie stwierdzono częstszego występowania allelu ryzyka T genu C3 dopełniacza w grupie badanej w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Przeprowadzone badania wykazały, że polimorfizm genu C3 rs7951 nie ma wpływu na częstość wystąpienia TRU.

Brak pozytywnej korelacji między obecnością polimorfizmu składowej C3 rs7951 a rozwojem choroby w badanej grupie pacjentów z toczniem rumieniowatym układowym w populacji kaukaskiej, mimo pozytywnych zależności obserwowanych w populacji japońskiej, może świadczyć o odmienności genetycznej badanej populacji, a także o dużej różnorodności czynników genetycznych zaangażowanych w patogenezę choroby.

in 87 patients with SLE. In the examined patients six months before the survey there were no disease symptoms exacerbation. We analyzed the relationship between the serous levels and the occurrence of C3 polymorphism: C/C (was present in 54 patients), C/T (30 patients), and T/T (3 patients). It was found that the average concentration of serum C3 in C/C carriers was significantly higher than in the other two genotypes, whereas no significant differences were observed between genotypes C/T and T/T. In our studies, we have not carried out a similar analysis because of the difficulty in obtaining a statistically large group in which the state would be as stable.

Conclusion

There was no a higher frequency of risk allele T of complement C3 gene in the study group compared to the healthy control group. The study showed that the rs7951 polymorphism of C3 gene has no effect on the incidence of SLE.

There has been no observed any positive correlation between the presence of the component C3 polymorphism rs7951 and the development of disease in this group of patients with systemic lupus erythematosus in Caucasian population, despite the positive dependence observed in the Japanese population. It may be because of genetic diversity in studied population, as well as a wide variety of genetic factors involved in the pathogenesis of the disease.

Piśmiennictwo / References

1. Smith PP, Gordon C. *Systemic lupus erythematosus: clinical presentations*. Autoimmun Rev 2010;10(1):43–5.
2. Chwalińska-Sadowska H, Olesińska M. *Toczeń rumieniowaty układowy*. W: Zimmermann-Górska I. [red.]. *Reumatologia kliniczna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2008;553–579.
3. Jakóbisiak M. *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2000;169–179.
4. Fong KY, Botto M, Walport MJ, So AK. *Genomic organization of human complement component C3*. Genomics 1990; 7:579–586.
5. Sivaprasad S, Adewoyin T, Bailey TA, Dandekar SS, Jenkins S, Webster AR et al. *Estimation of systemic complement C3 activity in age-related macular degeneration*. Arch Ophthalmol 2007;125(4):515–9.
6. Alper CA, Colten HR, Rosen SF, Rabson AR, MacNab GM, Gear JSS. *Homozygous deficiency of C3 in a patient with repeated infections*. Lancet 1972;300:1179–1181.
7. Nilsson UR, Nilsson B, Storm KE, Sjolín-Forsberg G, Hallgren R. *Hereditary dysfunction of the third component of complement associated with a systemic lupus erythematosus-like syndrome and meningococcal meningitis*. Arthritis Rheum 1992;35(5):580–6.
8. Berger M, Balow JE, Wilson CB, Frank MM. *Circulating immune complexes and glomerulonephritis in a patient with congenital absence of the third component of complement*. New Eng J Med 1983;28:308(17):1009–12.
9. Borzy MS, Gewurz A, Wolff L, Houghton D, Lovrien E. *Inherited C3 deficiency with recurrent infections and glomerulonephritis*. Am J Dis Child 1988;142(1):79–83.
10. Power DA, Ng YC, Simpson JG. *Familial incidence of C3 nephritic factor, partial lipodystrophy and membranoproliferative glomerulonephritis*. Quart J Med 1990;75(276):387–98.
11. Birmingham DJ, Irshaid F, Nagaraja HN, Zou X, Tsao BP, Wu H et al. *The complex nature of serum C3 and C4 as biomarkers of lupus renal flare*. Lupus 2010;19(11):1272–1280.

12. Bao L, Quigg RJ. *Complement in lupus nephritis: the good, the bad, and the unknown*. Semin Nephrol 2007;27(1):69–80.
13. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 1982; 25(11):1271–1277.
14. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The committee on prognosis studies in SLE*. Arthritis Rheum 1992;35(6):630–40.
15. Wu H, Boackle SA, Hanvivadhanakul P, Ulgiati D, Grossman JM, Lee Y et al. *Association of a common complement receptor 2 haplotype with increased risk of systemic lupus erythematosus*. Proc Natl Acad Sci USA 2007;6:104(10):3961–6.
16. Yang Y, Chung EK, Wu YL, Savelli SL, Nagaraja HN, Zhou B et al. *Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans*. Am J Hum Genet 2007;80(6):1037–54.
17. Miyagawa H, Mamai M, Sakaguchi D, Kiyohara C, Tsukamoto H, Kimoto Y et al. *Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford) 2008;47(2):158–64.

Adres do korespondencji / Mailing address:

Izabela Korcowska
Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej,
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
ul. Przybyszewskiego 39, Poznań 60-356,
POLAND
Tel +48618547210, fax +48618547212
e-mail: ikorcz@post.pl