

A C4-ES KOMPLEMENT KOMPONENS GENETIKAI VARIABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA REAL-TIME PCR-REL

Szilágyi Ágnes¹, Blaskó Bernadett², Szilassy Dénes³, Füst György², Sasvári-Székely Mária¹ és Rónai Zsolt¹

¹Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest

²Semmelweis Egyetem, III. sz. Belgyógyászati Klinika, Szentágotthai János Tudásközpont, Budapest

³Applera Magyarország Kft. Budapest

Érkezett: 2007. márc. 02. Elfogadva: 2007. márc. 14.

ÖSSZEFOGLALÁS

Legújabb kutatások szerint a több gént magában foglaló, hosszú DNS-szakaszok változó számú ismétlődése (CNV – kópiaszám polimorfizmus) nem ritka jelenség a humán genomban. Az ilyen variációk egy régóta ismert példája az RCCX-modul, amely 4 fehérje – az Rp, a 21-hidroxiláz, a C4-es komplement komponens, valamint a tenascin-X – génjének haplotípus blokkban történő tandem ismétlődését jelenti. A C4 gén (szemben a modul másik 3 tagjával) mindegyik elemében aktív, ráadásul különböző izoformái (C4A, C4B; hosszú, rövid allotípus) lehetnek jelen az egyes modulokban. A változó génszám így funkcionális következményekkel jár: bizonyos kombinációk jelenléte autoimmun betegségek és más immunológiai kórképek rizikófaktora.

Új, real-time PCR-en alapuló módszert dolgoztunk ki a C4A- illetve C4B-génszám meghatározására. A technika szekvencia specifikus TaqMan próbák alkalmazásán alapul, így kombinálja a mennyiségi mérés (génszámlálás) és az SNP-genotipizálás (C4A és C4B izoformák elkülönítése) alapelemeit. Hazai egészséges populációt (N=118) vizsgáltunk a kidolgozott technika alkalmazásával: meghatároztuk a különböző C4A- és C4B-ismétlődések előfordulási gyakoriságát. A real-time PCR módszerrel kapott eredményeket más módszerrel kapott értékekkel hasonlítottuk össze. Eredményeink szerint a kidolgozott eljárás nemcsak megbízható, de a korábban rutinszerűen alkalmazott módszereknél egyszerűbben kivitelezhető és gyorsabb is, így alkalmas nagyobb populációk vizsgálatára.

KULCSSZAVAK: C4-es komplement komponens, real-time PCR, kópiaszám polimorfizmus, SNP, immunrendszer

ANALYSIS OF THE GENETIC VARIABILITY OF COMPLEMENT COMPONENT C4 BY REAL-TIME PCR

Recent findings revealed that the repetitions of long DNA sequences comprising the sequence of different genes (CNV – copy-number variations) are very common in the human genome. A well-known example for this type of variations is the “RCCX-module” that implies the tandem duplication of four genes – RP, 21-hydroxylase, complement component C4 and tenascin X – in a haplotype block. Only the C4 gene is active in each module, besides, each module may contain C4A or C4B gene encoding the two isoforms of complement C4. Copy number variation of C4 genes has functional relevance; specific combinations could be risk factors for autoimmune or other immunological diseases. We developed a new, real-time PCR based method for the quantification of C4A and C4B genes. This assay applies specific TaqMan probes, therefore combines the advantages of quantitative measurement (copy number determination) and SNP genotyping (for distinguishing the C4A and C4B isoforms) techniques. The developed real-time PCR methodology was used to determine C4A and C4B gene dosages in a healthy Hungarian population (N=118). The obtained data were compared to the results of an earlier study of the same population analyzed by different tech-

niques. The novel method was demonstrated to be a simple, fast and reliable choice for studies of the complement C4 system, especially in large-scale populations screening.

KEYWORDS: complement component C4, real-time PCR, copy number variations, SNP, immune system

Bevezetés

A humán genomban található variációk, az ún. genetikai polimorfizmusok alapvető szerepet játszanak örökletes tulajdonságaink, pl. személyiségjegyek vagy egyes betegségekre való hajlam kialakításában. Ezen genetikai variabilitások mérete széles tartományban változhat, egyes formái a teljes humán genomot alkotó 3 milliárd bázispárnyi szekvenciából csupán egyetlen nukleotidot érintenek, mások viszont akár több gént is magukban foglalnak, és több százezer bázispár kiterjedésűek (Check, 2005). Ezen utóbbi – nemrégiben felfedezett – genetikai variációkat génszám polimorfizmusnak vagy röviden CNV-nek (az angol copy number variation elnevezés alapján) hívjuk. A CNV-k a humán genom csaknem teljes egészére kiterjednek, biológiai hatásokról, funkciójukról azonban még keveset tudunk (Redon, 2006). Feltételezik azonban, hogy – hasonlóan más genetikai variációkhoz – ezen polimorfizmusok is szerepet játszhatnak bizonyos örökletes tulajdonságok, komplex jellegek ill. betegségek kialakításában, irodalmi adatok számolnak be például a CCL3L1 gén dózis és az AIDS összefüggéséről (Gonzalez, 2005).

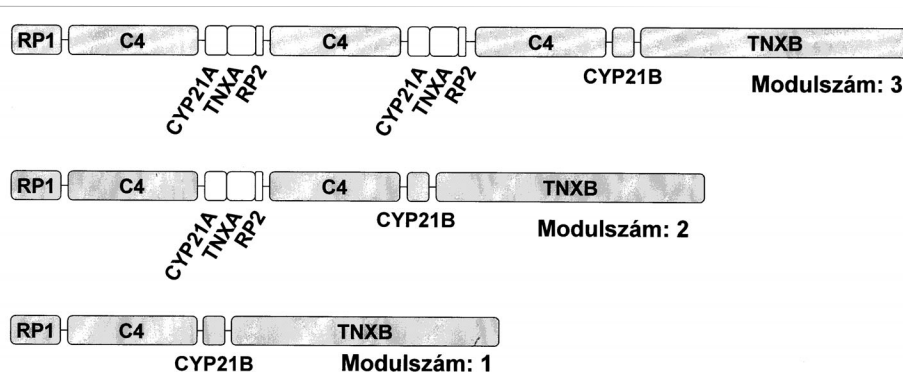
A CNV-k egy régebb óta ismert és vizsgált példája a 6. kromoszóma rövid karján az MHC III. osztály részeként elhelyezkedő ún. RCCX modul, amely 4 gén, az RP (szerin/treonin protein kináz), a C4 (C4-es komplement komponens), a CYP21 (szteroid 21-hidroxiláz) és a tenascin-X (extracelluláris mátrix fehérje) géneket foglalja magában. A régió a 6. kromoszóma mindkét példányán minden emberben 1, 2 vagy 3 kópiában lehet jelen, mono-, bi- vagy trimoduláris struktúrát alkotva (Yang, 1999). Funkcionális szempontból jelentős, hogy míg az RP gén csak az első (RP1), a CYP21 és a TNX (CYP21B, TNXB, l. 1. ábra) pedig csak az utolsó egységben tartalmaz aktív gént, addig a C4 gén mindegyik elemében működik, s róla fehérje szintetizálódik. A képet ráadásul tovább bonyolítja, hogy a C4 gének mindegyike két funkcionálisan is eltérő változatként, C4A ill. C4B géneként lehet jelen, ezen eltérésért elsősorban a fehérje 1101–1106. aminosavainak különbözősége

felelős. A C4A fehérje az 1106. pozícióban aszparaginsavat tartalmaz, s ez a változat az immunfolyamatokban hatékonyabban reagál szabad amino-csoportokkal, míg a C4B ugyanezen a helyen hisztidint tartalmaz, és hidroxil-csoportokkal aktívabb (Law, 1984). A C4A és -B gének száma – ennek megfelelően a két fehérjeváltozat mennyisége – a legtöbb emberben megegyezik, ugyanakkor elméletileg mindkét gén száma 0 és 6 között változhat. A C4A és C4B kiegyenlítetlen mennyisége számos betegség etiológiájában merült fel. A C4A teljes hiányát szisztémás lupus erythematosus (Candore, 2002), inzulin-függő diabétesz mellitusz (Degli-Esposti, 1992) és más autoimmun betegségek rizikófaktoraként azonosították (Candore, 2002), a C4B hiánya pedig miokardiális infarktus (Kramer, 1994), stroke (Kramer, 2000) és autizmus (Odell, 2005) kialakulásában játszhat szerepet. Bár a C4 génszám variációjának klinikai jelentősége már régóta ismert, mégis mindezidáig csupán igen idő-, munkaigényes ill. nagy mennyiségű DNS-templáttal működő technikák álltak rendelkezésre a géndózis meghatározására.

A DNS kvantitatív mérésére alkalmas modern eljárás a real-time PCR-technika, ami folyamatos („valós idejű”) detektálással nyomon követi a PCR-c termék mennyiségének növekedését a termociklus során. Ebből pedig – megfelelő körülmények között – a kiindulási DNS-mennyiségre következtethetünk, mivel a reakció kezdeti, hatékony szakaszában az amplifikáció exponenciális, optimális esetben a PCR-termék mennyisége minden ciklusban megkétszereződik. A kiindulási DNS-mennyiség (a mi esetünkben a génszám) meghatározása ennek megfelelően oly módon valószínűsíthető meg, hogy azt vizsgáljuk, hány ciklus szükséges ahhoz, hogy a PCR-termék mennyisége (azaz a mérhető fluoreszcencia) egy adott értéket elérjen. Ez az érték a „küszöb” (threshold), a hozzá tartozó ciklusszám pedig a „küszöbciklus”, azaz a C_T -érték (Bubner, 2004; Kutya, 2000). A fluoreszcens jel képzésének két elterjedt módja van. Egyik az interkalátor festékek, pl. SYBR Green felhasználása, amelyek minden kettős szálú DNS-molekula kimutatására alkalmasak. Ennél

1. ábra. Az „RCCX-modul”

A 6. kromoszóma rövid karján az MHC III. osztály részeként 4 gén, az RP (magi Ser/Thr-kináz), a C4-es komplement komponens (C4), a 21-hidroxiláz (CYP21) és a tenascin X (TNX) génje moduláris ismétlődést mutat. Az ismétlődési szám 1 és 3 között változhat. A C4 gén két funkcionálisan is különböző formában (C4A és C4B) lehet jelen, s – szemben a másik 3 génnel – mindegyik ismétlődő egységben aktív, funkcionáló génként van jelen. Az aktív géneket szürke, a pszeudogéneket fehér síkidomok jelölik.



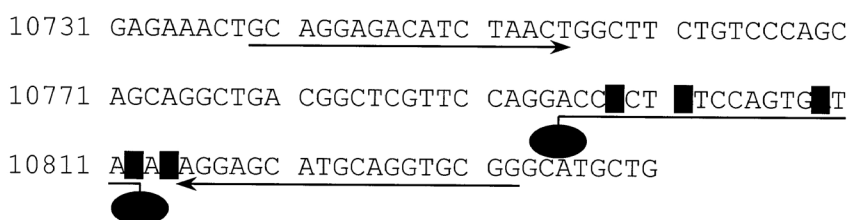
specifikusabb eljárás az ún. TaqMan próbák alkalmazása. A TaqMan próbák olyan rövid, a PCR-amplikonhoz tervezett oligonukleotidok, amelyek 5' végén egy riporter, 3' végén pedig egy csillapító (quencher) fluoreszcens festék ill. molekula található. Az intakt próba ennek megfelelően nem ad jelet, a PCR-termék képzése során viszont a DNS-polimeráz 5' nukleáz aktivitásával a próbát elhasítja, a riporter festék a quencherrel térben eltávolodik, és fluoreszcens jel keletkezik. A PCR-amplikonok mennyiségének növekedésével tehát a képződő fluoreszcens jel intenzitása arányos, s belőle megfelelő eljárásokkal a kiindulási DNS abszolút vagy relatív mennyisége megállapítható. Ezt a technikát használtuk fel, hogy a C4A és C4B géndózis meghatározására alkalmas gyors és hatékony vizsgálómódszert dolgozzunk ki, amely hozzájárulhat a C4 génszám klinikai jelentőségének megismeréséhez.

Módszerek

173 egészséges, rendszeres orvosi ellenőrzésen megjelenő, magyar személy perifériás vérmintáját elemeztük, a résztvevők írásos beleegyező nyilatkozatot töltöttek ki. A genomiális DNS izolálása a Flexigen DNS-izoláló kit segítségével történt. A PCR amplifikációhoz alkalmazott primereket és a TaqMan próbákat a Primer Express software segítségével terveztük úgy, hogy a két primer közrefogja a C4A és C4B izotípusokat megkülönböztető szekvencia-szakaszt (5 bázis eltérés) (2. ábra), a próbák pedig ezen régióhoz tapadva specifikusan csak a C4A vagy a C4B génhez tudnak bekötődni, így azok mennyisége külön-külön mérhető. A C4A és C4B gének szekvenciáját az NCBI adatbázisból töltöttük le (www.ncbi.nlm.nih.gov, C4A: M59815, C4B: U24578). A géndózis meghatározása két külön reakcióelegyben történt, minden mennyiségi mérést három párhuzamos reakcióban végeztünk el. Relatív kvantifikálást hajtottunk

2. ábra

A real-time PCR-alapú génszámláló módszer. Az ábrán a C4B gén rövid szakasza látható (Génbank hivatkozási szám: U24578). Nyilak: PCR-primerek, aláhúzott szakasz: TaqMan próba. FAM: fluoreszcens riporter festék, MGB: kisárok kötő quencher. Sötét háttéren fehér betűk azokat a nukleotidokat jelzik, melyek a C4A és C4B gének szekvenciáját megkülönböztetik egymástól.



vége a ΔC_T -módszer alkalmazásával, referencia-ként RNase P gént kimutató TaqMan rendszert alkalmaztunk (ABI katalógus szám: 4316831). Az első reakció tartalmazta a C4 gént amplifikáló primerpárt (6 μ M szensz primer: 5' GCA GGA GAC ATC TAA CTG GCT TCT 3', 6 μ M antiszensz primer: 5' CCG CAC CTG CAT GCT CCT 3'), a C4A gén specifikus próbát (4 μ M 5' FAM-ACC CCT GTC CAG TGT TAG-MGB 3', az aláhúzott betűk a C4A-specifikus helyeket jelölik), 1x RNase P TaqMan rendszert (primerek + VIC-kel jelölt próba), kb. 4–10 ng genomiális DNS-mintát valamint a PCR „master mixet” 1x végkoncentrációban, ami az AmpliTaq Gold DNS-polimerázt, dNTP-t és a reakcióhoz szükséges puffert tartalmazta. A második reakció teljesen azonos összetételű volt, kivéve, hogy ebben az esetben a C4B-specifikus TaqMan próbát alkalmaztuk (4 μ M 5' FAM-ACC TCT CTC CAG TGA TAC-MGB-3', az aláhúzott betűk itt is a kizárólag a C4B-ben előforduló nukleotidokat jelölik). A reakcióelegy térfogata 25 μ l volt. A termociklust ill. a képződő PCR-termékek detektálását ABI 7300 Real Time PCR-berendezéssel végeztük el. A termociklus egy 95°C-os 10 perces elődenaturálással kezdődött, melynek során aktiválódott a DNS-polimeráz, valamint denaturálódott a genomiális DNS. Ezt követte 40 PCR-ciklus, ezek első lépése egy 15 másodperces 95 °C-os denaturálás, második lépése pedig az 1 percig tartó közös anneálás, extenzió volt 60 °C-on. Ezen utóbbi lépés alatt történt a képződő fluoreszcens jel detektálása is.

Eredmények

Real-time PCR-en alapuló hatékony és megbízható módszert dolgoztunk ki a C4A és C4B génszám meghatározására. A géndózis analízis relatív kvantifikáláson alapult, referencia-ként az RNase P gént specifikus TaqMan rendszert alkalmaztunk. A reakcióelegyek összeállítása a *Módszerek* fejezetben olvasható. A legmegbízhatóbb rendszer kialakítása érdekében a real-time PCR kísérletek kiértékelése során automatikus alapvonal beállítást és állandó, 0,04-es küszöbértéket alkalmaztunk. A C4A és C4B génszámokat az (1) és (2) egyenletek segítségével határoztuk meg.

$$(1) \quad n_{C4A} = \frac{2^{C_{T(RA)} - C_{T(C4A)} + 1}}{q_{C4A:RA}}$$

$$(2) \quad n_{C4B} = \frac{2^{C_{T(RB)} - C_{T(C4B)} + 1}}{q_{C4B:RB}}$$

A C4A és C4B gének tényleges száma az nC4A ill. nC4B értékek kerekítésével határozható meg, $C_{T(C4A)}$ és $C_{T(C4B)}$ a C_{4A} - ill. C_{4B} -specifikus reakcióhoz tartozó C_T -értékek, $C_{T(RA)}$ és $C_{T(RB)}$ pedig a C_{4A} - és C_{4B} -elegyben referenciaként mért RNase P küszöb ciklus érték. Az egyenletek nevezőjében lévő q értékek az egy elegyben végbemenő reakciók ún. hatékonysági hányadosai, melyek az egyes TaqMan rendszerek eltérő jelintenzitásának korrigálására szolgálnak.

A hatékonysági hányadosok meghatározása a génszámláló rendszer beállításának egyik fontos lépése volt. A q -értékek optimalizálása 7 kísérlet eredményei alapján történt, melyben 65 minta elemzését végeztük el az alábbi szempontok figyelembevételével:

- (1) ha egy adott kísérletben a C4A- ill. C4B-specifikus reakció szignifikáns jelet ad, akkor a számított génszám nem lehet 0 – ennek alapján a túl magas hatékonysági hányados értékek kizárhatók.
- (2) Másrészt túl magas q -értékek alkalmazása esetén az összes C4 génszám meghaladja a 6-ot, ami – irodalmi adatok alapján – szinte soha nem fordul elő kaukázusi populációban.
- (3) A hatékonysági hányados meghatározásánál emellett felhasználtuk azt a tényt, hogy a C4A és a C4B gének száma csak egész szám lehet. A génszámokat és a q -értékeket a fentiek figyelembevételével határoztuk meg a 7 kísérletben külön-külön ill. a teljes mintára is. Az értékek 0,9 és 1,1 között váltakoztak, és némi eltérést mutattak az egyes kísérletek között is, a kifejlesztett Excel munkalap segítségével azonban az adott kísérletben alkalmazandó érték meghatározható.

A relatív kvantifikáláson alapuló real-time PCR rendszerek megbízható alkalmazhatóságának egyik alapvető feltétele, hogy az összehasonlított reakciók hatékonysága közel azonos legyen. Ennek vizsgálatára negyedelő hígítási sort készítettünk: 0,3–300 ng genomi DNS-t alkalmazva elemeztük az alkalmazott TaqMan rendszereket. A C_T -értékeket a kiindulási DNS-koncentráció logaritmusának függvényében ábrázolva egy egyenest kapunk, optimális esetben ezen egyenesek meredeksége $-1/\lg 2 = -3,32$, ill. – ami ennél fontosabb – az egyes egyenesek meredeksége nem tér el jelentősen egymástól. A mi esetünkben a C4A-specifikus reakció meredeksége $-3,53$, a C4B-specifikus reakcióé $-3,57$, az RNase P reakcióhoz tartozó érték pedig $-3,52$ volt, ami igazolja, hogy a

módszer megbízhatóan alkalmazható a 0,3–300 ng kiindulási DNS-mennyiség tartományban. Az R^2 (determinációs együttható) érték mindhárom esetben 0,999 volt, ami azt mutatja, hogy a pontok megfelelően illeszkednek az egyenesre.

A kifejlesztett real-time PCR módszer alkalmazásával 118 egészséges magyar személy C4A és C4B génszámát határoztuk meg, és kiszámoltuk az egyes géndózisok előfordulásának gyakorisági értékét (1. táblázat). A vizsgált személyek közül 33 elemzését egy független – munkacsoportunk által kifejlesztett, kapilláris elektroforézis alapú (Szilagyi, 2006) – módszerrel is meghatároztuk. Az első vizsgálat után az eredmények 3 esetben voltak ellentmondóak, ezen ellentmondások azonban a vizsgálatok megismétlése után mindegyik esetben feloldhatóak voltak.

1. táblázat. A C4A és C4B géndózisok gyakoriságának eloszlása magyar egészséges populációban (N = 118).

C4A génszám	Esetszám (%)	C4A génszám	Esetszám (%)
0	2 (1,7)	0	1 (0,8)
1	18 (15,3)	1	24 (20,3)
2	65 (55,1)	2	75 (63,6)
3	30 (25,4)	3	18 (15,3)
4	3 (2,5)	4	0 (0,0)
Összesen	118 (100)	Összesen	118 (100)

Az eredmények könnyebb kiértékelése céljából egy DOS-alapú software-t (mhc.exe) és egy Excel munkalapot (mhc.xls) készítettünk. Az exe program segítségével a real-time PCR berendezés által exportált adatokat (.csv file) az Excel munkalapba beilleszthető formátumúvá alakíthatjuk, ill. segítségével egy automatizált eljárás felhasználásával a génszám eredményeket egyből meg is határozhatjuk. Az Excel munkalap alkalmas a q -értékek optimalizálására, és a géndózis értékek, valamint az eredmények megbízhatóságának meghatározására.

Megbeszélés

Bár a CNV (kópiaszám) polimorfizmusok vizsgálata az elmúlt években a genetikai kutatások egyik legfőbb célpontjává vált, jelenleg nem áll még rendelkezésre olyan vizsgálómódszer, mellyel nagy hatékonysággal és szenzitivitással ezen újfajta genetikai variációk azonosíthatók ill. vizs-

gálhatók lennének. Egyik megközelítés a genom szintű vizsgálat, melynek során hibridizációs chip alapú eljárásokat alkalmaznak (Affymetrix 500K SNP chip, Whole Genome Tile Path Array), ezen technikák esetében az ál-pozitív eredmények gyakorisága 8%, az ál-negatívaké pedig akár 37% is lehet (Redon, 2006). Egy vagy néhány konkrét target vizsgálata esetén a real-time PCR-technika megfelelő eszköznek bizonyult. Melo és munkatársai a glukokortikoid receptor alfa izoformájának mennyiségi detektálására dolgoztak ki ezen az elven alapuló eljárást, és megállapították, hogy – a mi eredményeinkhez hasonlóan – a rendszer igen széles kiindulási DNS-mennyiség mellett alkalmazható (Melo, 2004). Emellett az is elmondható, hogy ezzel a technikával igen kismértékű (akár 2-szeres) eltérések is megfelelően kimutathatók (Bubner, 2004; Kutuyavin, 2000), ami a géndózis analízis során elengedhetetlenül szükséges. A módszer előnye emellett, hogy – más megközelítésekkel ellentétben – gyors, egy lépéses technika, mely nem teszi szükségessé nagy mennyiségű minta-DNS ill. veszélyes vegyszerek (pl. radioaktív anyagok) alkalmazását. A komplex jellegek genetikai hátterének vizsgálata során csak nagy számú minta elemzése hozhat megbízható eredményt, ilyen munkák során azonban az eredmények feldolgozása is megfelelő eljárást igényel. A hatékony real-time PCR-alapú mérési módszert ezért egy automatizált számítógépes kiértékelő rendszerrel egészítettük ki, melynek segítségével a nyers adatokból (PCR-amplifikáció során meghatározott C_T -értékekből) a génszámot közvetlenül meghatározhatjuk. Egy ilyen megközelítés általában a CNV-k vizsgálata során is előnyös lehet, de hasznos a C4A ill. C4B géndózis analízis esetében is, mivel ezen génkópia polimorfizmus klinikai jelentősége feltehetően igen nagy. A komplement rendszer és így a C4 fehérje a nem specifikus immunvédekezés egyik fontos eleme, működéséhez mind a C4A, mind a C4B fehérje jelenléte elengedhetetlenül szükséges. Számos kórkép hátterében azonosították valamelyik izoforma relatív vagy abszolút hiányát: a C4A-hiány – más genetikai összetevőkkel kapcsolatban az ún. 8.1 haplotípus részeként – szisztémás lupus erythematosus genetikai rizikófaktora lehet (Candore, 2002), a C4B-hiány pedig szerepet játszhat az autizmus (Odell, 2005), a Schönlein–Hennoch-purpura (Ault, 1990) és a bakteriális meningitisre való fokozott hajlam

(Rowe, 1989) örökítésében. Mindezek figyelembevételével elmondható, hogy az általunk kifejlesztett real-time PCR technika hozzájárulhat a C4A és C4B génszám variáció klinikai jelentőségének pontosabb megismeréséhez, ezen túlmenően pedig modellrendszerként szolgálhat más CNV polimorfizmusok real-time PCR alapú vizsgálata során.

A bemutatott munka a GVOP AKF 311 2004 05 0324_3.0 és a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal (NKTH) támogatásával készült.

Levelezési cím:

Dr. Rónai Zsolt, PhD

Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani,

Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet

Budapest, 1088 Puskin utca 9.

Tel.: 459-1500 / 4090, Fax: 266-2615

e-mail: ronai@puskin.sote.hu

IRODALOM

- Ault BH, Stapleton FB, Rivas ML, Waldo FB, Roy S 3rd, McLean RH, Bin JA, Wyatt RJ. Association of Henoch-Schonlein purpura glomerulonephritis with C4B deficiency. *J Pediatr.* 1990 Nov; 117 (5): 753-5.
- Bubner B, Baldwin IT. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 2004 Nov; 23 (5): 263-71.
- Candore G, Lio D, Colonna Romano G, Caruso C. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. *Autoimmun Rev.* 2002 Feb; 1 (1-2): 29-35.
- Check E. Human genome: patchwork people. *Nature.* 2005 Oct 20; 437 (7062): 1084-6.
- Degli-Esposti MA, Abraham LJ, McCann V, Spies T, Christiansen FT, Dawkins RL. Ancestral haplotypes reveal the role of the central MHC in the immunogenetics of IDDM. *Immunogenetics.* 1992; 36 (6): 345-56.
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'Connell RJ, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ, Ahuja SK. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science.* 2005 Mar 4; 307 (5714): 1434-40.
- Kramer J, Rajczy K, Hegyi L, Fulop T, Mohacsi A, Mezei Z, Keltai M, Blasko G, Ferenczy E, Anh-Tuan N. C4B* Q0 allotype as risk factor for myocardial infarction. *BMJ.* 1994 Jul 30; 309 (6950): 313-4.
- Kramer J, Harcos P, Prohaszka Z, Horvath L, Karadi I, Singh M, Csaszar A, Romics L, Fust G. Frequencies of certain complement protein alleles and serum levels of anti-heat-shock protein antibodies in cerebrovascular diseases. *Stroke.* 2000 Nov; 31 (11): 2648-52.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 15; 28 (2): 655-61.
- Law SK, Dodds AW, Porter RR. A comparison of the properties of two classes, C4A and C4B, of the human complement component C4. *EMBO J.* 1984 Aug; 3 (8): 1819-23.
- Melo MR, Faria CD, Melo KC, Reboucas NA, Longui CA. Real-time PCR quantitation of glucocorticoid receptor alpha isoform. *BMC Mol Biol.* 2004 Oct 26; 5 (1): 19.
- Odell D, Maciulis A, Cutler A, Warren L, McMahon WM, Coon H, Stubbs G, Henley K, Torres A. Confirmation of the association of the C4B null allele in autism. *Hum Immunol.* 2005 Feb; 66(2):140-5.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006 Nov 23; 444 (7118): 444-54.
- Rowe PC, McLean RH, Wood RA, Leggiadro RJ, Winkelstein JA. Association of homozygous C4B deficiency with bacterial meningitis. *J Infect Dis.* 1989 Sep; 160 (3): 448-51.
- Szilágyi A, Blasko B, Ronai Z, Fust G, Sasvari-Szekely M, Guttman A. Rapid quantification of human complement component C4A and C4B genes by capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 2006 Apr; 27 (8): 1437-43.
- Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yu CY. Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. *J Biol Chem.* 1999 Apr 23; 274 (17): 12147-56.