

Antygen RhD i jego słabe odmiany — charakterystyka serologiczna i molekularna

RhD antigen and its weak variants — serological and molecular characterization

Monika Pelc-Kłopotowska, Agnieszka Orzińska, Bogumiła Michalewska

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie

Zaprezentowano aktualny stan wiedzy na temat słabych odmian antygenu D, ich immunogenności oraz podatności na immunizację prawidłowym antygenem D.

Słowa kluczowe: antygen RhD, odmiany/warianty antygenu D, D słaby, D częściowy, DEL, gen RHD, mutacje genu RHD

J. Transf. Med. 2012; 5: 25–30

Summary

The paper presents the current state of the knowledge on weak variants of RhD-antigen, their immunogenicity and susceptibility to immunization by normal antigen D.

Key words: D antigen, variety/variants of D antigen, D weak, D partial, DEL, RHD gene, mutations of the RHD gene

J. Transf. Med. 2012; 5: 25–30

Antygen D z układu Rh ma duże znaczenie kliniczne ze względu na swą wysoką immunogenność. Ocena obecności lub braku antygenu D na krwinkach czerwonych, która jest podstawą do rozróżnienia odpowiednio osób RhD-dodatnich lub RhD-ujemnych, oparta wyłącznie na badaniach metodami serologicznymi, nie zawsze daje jednoznaczne wyniki. Przyczyną trudności w ustaleniu statusu fenotypu RhD-dodatni lub RhD-ujemny są tak zwane odmiany/warianty antygenu D. Na podstawie charakterystycznych cech serologicznych i genetycznych zostały one sklasyfikowane jako: antygeny D częściowe, antygeny D słabe oraz antygeny DEL [1–4]. Wśród każdej z tych grup występuje wiele odmian, które, szczególnie w ostatnich latach, zostały scharakteryzowane przy zastosowaniu me-

tod biologii molekularnej. Potencjalne znaczenie kliniczne słabych odmian antygenu D należy rozpatrywać w dwóch aspektach:

- czy osoba z wariantem antygenu D po kontakcie z krwinkami RhD-dodatnimi w wyniku transfuzji lub ciąży może produkować odpornościowe przeciwciała anti-D [5–7] oraz
- czy osoba bez antygenu D, biorca krwi/kobieta w ciąży, jest narażona na ryzyko alloimmunizacji, gdy dawca krwi określony jako RhD-ujemny lub płód ma słabą odmianę antygenu D.

Wiadomo, że tylko niektóre z odmian/wariantów RhD mają znaczenie kliniczne [4]. Ustalenie ich roli klinicznej jest możliwe wraz z gromadzeniem wiedzy na temat ich występowania oraz obserwacji klinicznych uzyskiwanych przez transfuzjologów

Adres do korespondencji: mgr Monika Pelc-Kłopotowska, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5, 00–975 Warszawa, e-mail:mpelc@ihit.waw.pl

oraz ginekologów i położników. W obecnym opracowaniu przedstawiono aktualny stan wiedzy o molekularnym podłożu wariantów D.

Molekularne podłoże fenotypu RhD-ujemny

Częstość występowania u osób rasy kaukaskiej fenotypu RhD-ujemny wynosi około 15%. Najczęstszą przyczyną tego fenotypu jest homozygotyczna delecja genu *RHD* i fragmentów towarzyszących mu regionów *Rhesus box* [1, 2, 7–9]. Nieznaczny odsetek stanowią osoby, które mają cały gen *RHD*, ale nonsensowna mutacja bądź delecja spowodowały przesunięcie ramki odczytu i powstanie kodonu stop, a w konsekwencji brak produktu białka zawierającego determinanty antygeny RhD.

W rasie negroidalnej aż 95% stanowią osoby o fenotypie RhD-dodatni, u pozostałych nie wykrywa się antygeny D na krwinkach. Spośród tych ostatnich delecja genu *RHD* występuje tylko u 18%. Najczęściej (ok. 70%) przyczyną występowania fenotypu RhD-ujemny w tej grupie osób jest nieaktywny gen zwany pseudogenem *RHD* lub *RHD Ψ* (*psi*), który zawiera duplikację 37 par zasad obejmującą 19 nukleotydów intronu 3 i 18 pierwszych nukleotydów eksonu 4. Mutacje te powodują zmianę ramki odczytu, czego konsekwencją jest powstanie przedwczesnego kodonu stop; *RHD Ψ* ma także nonsensowną mutację w eksonie 6, która powoduje brak ekspresji białka RhD na błonie krwinki czerwonej. Jako kolejną przyczynę fenotypu RhD-ujemny u 15% osób rasy negroidalnej wymienia się obecność genu hybrydowego *RHD-CE-D^s*, który składa się z eksonu 1, 2 i końca 3' eksonu 3 genu *RHD*, końca 5' eksonu 3 i eksonów 4–7 genu *RHCE* oraz eksonu 9 i 10 genu *RHD*. Na podstawie sekwencji tego hybrydowego genu nie powstaje białko o swoistości RhD, ale, prawdopodobnie, produkowane jest białko z nieprawidłowym antygenem C [2]. W krajach wschodniej Azji fenotyp RhD-ujemny występuje u mniej niż 1% osób, a jego podłożem jest obecność genu hybrydowego *RHD-CE(3-9)-D* lub, podobnie jak w rasie kaukaskiej, brak genu *RHD*. Często, bo w 10–30% przypadków występuje antygen DEL, który, stosując metody serologiczne, można wykryć jedynie za pomocą adsorpcji/elucji [10].

Antygen D słaby

Historia badań nad słabą ekspresją antygeny D sięga 1948 roku, kiedy po raz pierwszy zjawisko niejednoznacznie dodatnich/ujemnych wyników w wykrywaniu antygeny opisał Stratton. Antygen taki

nazwał D^u [11]. Antygeny D^u zostały podzielone na tak zwane słabe antygeny niskiego stopnia (*low grade*), jeśli antygen D był wykrywany wyłącznie w pośrednim teście antyglobulinowym (PTA), i wysokiego stopnia (*high grade*), gdy krwinki były bezpośrednio aglutynowane przez niektóre przeciwciała anti-D. Definicja D^u ewoluowała i z czasem termin ten zaczął odnosić się tylko do takich słabych odmian antygeny D, które nie ulegały aglutynacji przy pomocy przeciwciał anti-D klasy IgM, a które można było wykryć w teście PTA z przeciwciałami anti-D klasy IgG. Z chwilą wprowadzenia do diagnostyki przeciwciał monoklonalnych część słabych odmian D zaczęła być typowana jako prawidłowy antygen D [2]. Na wystąpienie reakcji aglutynacji krwinek z przeciwciałami anti-D i na jej nasilenie wpływa liczba miejsc antygenowych D na powierzchni krwinek, co można było wykazać w późniejszych latach przy zastosowaniu metod ilościowych (tab. 1) [2, 12].

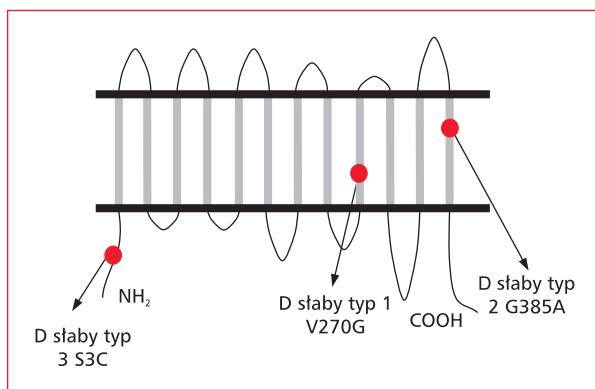
D^u został wówczas uznany za czysto ilościowy wariant antygeny D, posiadający wszystkie epitopy, różniący się od prawidłowego jedynie liczbą miejsc antygenowych na krwinkach. Konsekwencją tego było założenie, że osoby z D^u nie mogą produkować przeciwciał anti-D po zetknięciu się z antygenem D podczas transfuzji krwi lub ciąży, ale mogą immunizować RhD-ujemnego biorcę krwi lub kobietę w ciąży, jeśli krwinki D^u są obecne w przetaczanej krwi lub na krwinkach płodu.

W następnych latach antygen D^u został przemianowany na D słaby (*D weak*). Określenie antygeny terminem D słaby w bardzo dużym stopniu zależy od stosowanych do oznaczania odczynników i technik badania. Trudno jest więc określić częstość, z jaką występuje D słaby, stosując metody serologiczne. Bardziej pomocne są badania metodami biologii molekularnej.

Tabela 1. Liczba miejsc antygeny D na krwince czerwonej

Table 1. Number of D antigen sites per RBC

Wariant antygeny D	Liczba miejsc antygenowych
Prawidłowy antygen D	10 000–30 000
D częściowy	Jak w prawidłowym antygenie D, rzadko > 30 000
D słaby	200–10 000 < 500 — jeśli mutacja w części przezbłonowej [12] 500–2000 — jeśli mutacja w części cytoplazmatycznej [12]
DEL	< 50



Rycina 1. Molekularne podłoże najczęściej występujących typów D słaby. Na podstawie [13]

Figure 1. Molecular background of the most frequent weak D phenotypes. Based on [13]

Na poziomie molekularnym wyróżnia się kilka mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie odmiany D słaby. Są to przede wszystkim mutacje w części kodującej aminokwasy leżące w części przezbłonowej lub cytoplazmatycznej białka RhD. Najczęściej jako przyczynę powstawania D słaby wymienia się 1–3-punktowe mutacje zmiany sensu genu *RHD*, co prowadzi do zamiany nukleotydów, a ta z kolei do substytucji aminokwasów w białku. Na rycinie 1 przedstawiono przykłady mutacji odpowiedzialnych za powstawanie najczęściej występujących wariantów D słaby.

Wydawałoby się, że skoro mutacje te nie dotyczą zewnątrzłonowej części białka, to ich wpływ na antygen D powinien być ograniczony. Okazuje się jednak, że są one przyczyną powstania zdecydowanej większości alleli genu kodujących różne typy D słaby. Dotychczas opisano ponad 80 typów. Każdy z typów D słaby różni się sekwencją przynajmniej jednego aminokwasu w białku RhD, a więc posiada odrębny fenotyp, ale serologicznie są one nie do odróżnienia [2, 7, 14, 15].

Obecnie uważa się (Flegel i Wagner, Ansart-Pirenne, Denomme), że osoby z niektórymi typami D słaby mogą wytwarzać alloprzeciwciała anty-D po stymulacji antygenem D prawidłowym w wyniku transfuzji/ciąży. Za niepodatnych na ten rodzaj immunizacji uznano osoby z D słaby typu 1, 2, 3, 4.1 i 5 [5, 6, 16]. Twierdzenie o niepodatności na alloimmunizację jest oparte na tym, że takich obserwacji nie zanotowano w literaturze oraz że do utworzonego rejestru (<http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/RIR/rirres.html>) gromadzącego obserwacje o przeciwciałach identyfikowanych u osób z antygenem D słaby, nie wpłynęły doniesienia

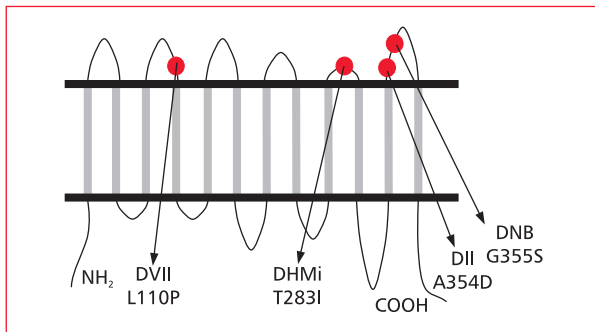
o wykryciu alloprzeciwciał anty-D u osób z typami 1, 2, 3, 4.1 i 5. Są natomiast doniesienia o wykryciu przeciwciał u osób z D słabym typu 11, 15, 21, 45 [12, 17, 18].

W badaniach serologicznych obserwuje się również przypadki osłabionej ekspresji antygeny D, występującej wtedy, kiedy haplotyp kodujący antygen D znajduje się w pozycji trans w stosunku do haplotypu *dCe*, rzadziej *dCE*, kodującego antygen C. Jest to cecha, której się nie dziedziczy i mówi się wówczas o supresorowym wpływie haplotypu *dCe* na gen *RHD*. Osoby takie mają słabszą ekspresję antygeny D na krwinkach, natomiast u pozostałych członków rodziny jest ona prawidłowa [2, 15, 19].

Antygen D częściowy

Od czasów publikacji Argall i wsp. w 1953 roku było wiadomo, że niektóre osoby z RhD-dodatnim mogą produkować przeciwciała anty-D [20]. W latach 60. XX wieku ukazały się doniesienia o występowaniu tak zwanego częściowego antygeny D (inne określenia to *partial D*, D-częściowy, kategorie antygeny D), któremu towarzyszyła obecność w surowicy alloprzeciwciał anty-D. Pionierską pracę nad charakterystyką serologiczną różnych kategorii częściowego D i usystematyzowaniem ich w 6 kategorii (I–VI) przeprowadziły Tippett i Sanger [21]. Na podstawie badań rodzinnych wykazały one, że kategorie antygeny D są dziedziczone. W latach 80. XX wieku badania nad antygenem D zostały zrewolucjonizowane po wyprodukowaniu przeciwciał monoklonalnych skierowanych do pojedynczych epitopów antygeny D. Reakcje tych przeciwciał z różnymi krwinkami z D częściowym były zróżnicowane, przez co wykazano brak pewnych epitopów antygeny D na takich krwinkach. Brak niektórych epitopów D ma też konsekwencje kliniczne. Organizmy osób, u których antygen D nie ma jakiegoś epitopu/części „mozaiki” po ekspozycji na antygen D, mogą produkować przeciwciała do brakujących fragmentów [2]. D częściowy jest określanym mianem jakościowego wariantu antygeny D.

W przeciwieństwie do odmiany D słaby mutacje genu *RHD* prowadzące do powstania D częściowego odnoszą się do zewnątrzłonowej części białka RhD. Literatura podaje 3 mechanizmy na poziomie molekularnym odpowiedzialne za powstawanie kategorii antygeny D: allel hybrydowy, pojedyncze mutacje zmiany sensu oraz kilka rozproszonych punktowych mutacji w białku RhD. Ponad 30% D częściowych powstaje w wyniku utworzenia się genu hybrydowego *RHD-CE-D* lub *RHCE-D-CE*. Do powstania tego genu przyczynia się nierówny



Rycina 2. Molekularne podłoże niektórych D częściowych. Na podstawie [13]

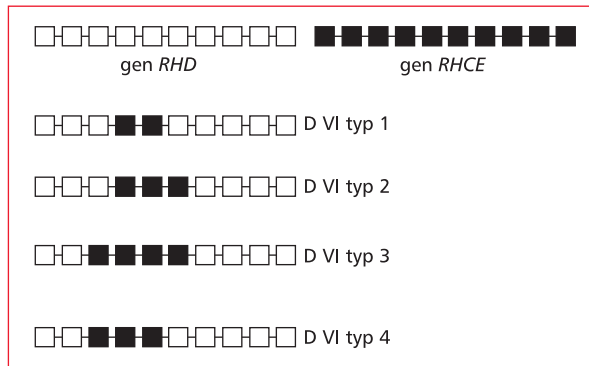
Figure 2. Molecular background of some of the partial D. Based on [13]

crossing-over i konwersja genu prowadząca do rekombinacji blisko położonych homologicznych genów *RHD* i *RHCE*. Może to być makrokonwersja, która powoduje zastąpienie dużych fragmentów genu *RHD* fragmentami genu *RHCE*, jak i mikrokonwersja, w przypadku której dochodzi do zamiany jednego lub kilku małych regionów (często prowadząca do zamiany pojedynczych aminokwasów w białku) [2, 7, 22]. Należy podkreślić, że wiele antygenów kwalifikowanych do kategorii D częściowego cechuje się dodatkowo małą ekspresją na krwinkach. Określenia D słaby i D częściowy są stosowane umownie w celu zachowania porządku wśród dużej liczby polimorfizmów genu *RHD*. Terminy te coraz częściej zastępuje się mianem wariantów D.

Na rycinach 2 i 3 zaprezentowano przykłady molekularnego podłoża niektórych D częściowych.

Antygen DEL

Badania molekularne doprowadziły do dalszych odkryć w dziedziny antygeny D. Okazało się, że u niektórych osób, które mają gen *RHD* ekspresja kodowanego przez ten gen antygeny D jest tak mała, że nie jest on wykrywany żadnymi rutynowo stosowanymi testami serologicznymi. Antygen D można u nich wykryć tylko metodą adsorpcji/elucji. W metodzie tej po inkubacji krwinek z przeciwciałem anti-D następuje ich związanie z antygenem D, lecz w tak małych ilościach, że nie wykrywa ich surowica antyglobulinowa. Wykonując eluat z krwinek, na których związały się anti-D, odczepia się je od determinantów antygenowych D, a wykrycie aktywności anti-D w eluacie dowodzi, że wiązały się one z determinantami antygeny D. Antygen RhD wykrywany jedynie metodą adsorpcji/elucji określo-



Rycina 3. Molekularne podłoże antygeny D kategorii VI jako przykład genu hybrydowego *RHD-CE-RHD*

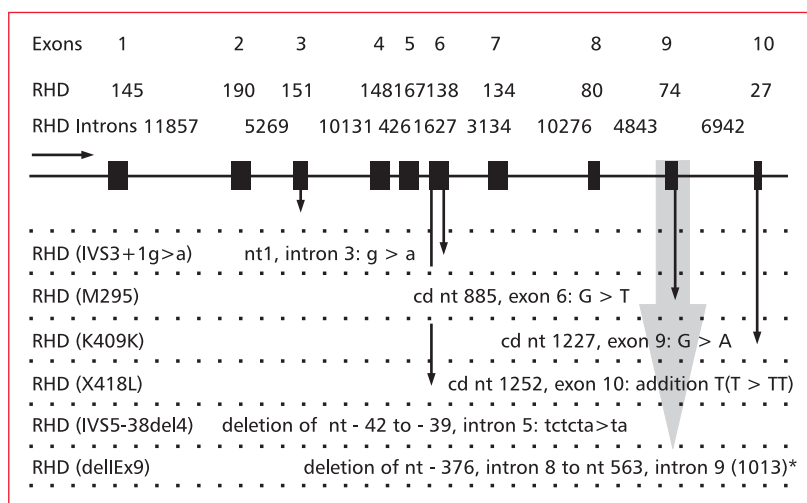
Figure 3. Molecular background of partial DVI as an example of a hybrid gene *RHD-CE-RHD*

no mianem DEL. Wiadomo, że osoby z takim wariantem D są podatne na immunizację antygenem D, ale ich erythrocyty mogą również być powodem alloimmunizacji, gdy przetoczone zostaną osobie RhD-ujemnej [23, 24]. Fenotyp DEL jest bardzo rzadki w rasie białej, lecz częsty u Azjatów (ok. 30% osób serologicznie RhD-ujemnych jest DEL). Gen DEL jest prawie zawsze położony w pozycji *cis* do allelu *Ce* genu *RHCE*, co objawia się zwiększoną ekspresją antygeny C na krwinkach.

Antygen DEL może, podobnie jak warianty RhD, mieć bardzo różne podłoże genetyczne [23, 25–27]. Są to mutacje zmiany sensu zachodzące zarówno w intronach, jak i eksonach genu *RHD*, mutacje nonsensowne, które prowadzą do powstania kodonu stop, tak zwane *splice site* mutacje — powodujące błędne przepisanie informacji na mRNA i utworzenie nieprawidłowego białka RhD, delecje nukleotydów których wynikiem jest przesunięcie ramki odczytu i kodonu start, a także delecje całego eksonu 8 lub 9 genu *RHD*.

Opisano dotychczas 6 różnych alleli *DEL*, z których *RHD(M295I)* i *RHD(IV3+1 g > a)* występują wśród osób rasy kaukaskiej, *RHD(K409K)* i *RHD(delex9)* są najczęściej wykrywane wśród *DEL* na Dalekim Wschodzie, a pozostałe 2 allele *RHD(X418L)* i *RHD(IVS5-38del14)* zostały wykryte i opisane w Austrii [25]. Molekularne podłoże znanych alleli *DEL* przedstawiono na rycinie 4. Kórmöczy i wsp. [25] na podstawie badań *DEL* z różnymi przeciwciałami monoklonalnymi, doszli do wniosku, że niektóre z nich są pozbawione pewnych epitopów, a inne mają kompletny antygen D. Można, więc twierdzić, że istnieją *DEL* słaby i *DEL* częściowy.

Metody biologii molekularnej w znacznym stopniu rozszerzyły, wyjaśniły i usystematyzowały



Rycina 4. Molekularne podłoże znanych alleli *DEL* (na podstawie: [21])

Figure 4. Molecular background of known *DEL* alleles (based on: [21])

wiedzę na temat odmian antygeny RhD. Ich zastosowanie w przypadkach, gdy wyniki rutynowo stosowanych metod serologicznych są niejednoznaczne, pozwala na precyzyjne ustalenie, jaki allel koduje antygen RhD u badanej osoby. Dzięki stale poszerzającej się wiedzy, w tym dzięki gromadzeniu obserwacji klinicznych można z coraz większym prawdopodobieństwem ustalić, czy osoba z danym wariantem antygeny RhD jest podatna na alloimmunizację oraz czy jej erytrocyty mogą być powodem alloimmunizacji. Wiedza ta ma istotne znaczenie praktyczne. Na trudności z interpretacją wyników badań serologicznych laboratoria immunologii transfuzjologicznej napotykają stosunkowo rzadko. Wydaje się, że zasadne jest by w takich przypadkach kierowały one próbki krwi do pracowni konsultacyjnej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w celu wykonania badań molekularnych.

Piśmiennictwo

- Westhoff C.M. The structure and function of the Rh antigen complex. *Semin. Hematol.* 2007; 44: 42–50.
- Daniels G. Human blood group. Wyd. 2 Blackwell Science, Oxford 2002; 195–223.
- Flegel W.A. The genetics of the Rhesus blood group system. *Dtsch Arztebl.* 2007; 104 (10) A: 651–657.
- Westhoff C.M. Rh complexities: serology and DNA genotyping. *Transfusion* 2007S; 47: 17S–22S.
- Flegel W.A. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Current Opinion in Hematology* 2006; 13: 476–483.
- Ansart-Pirenne H., Asso-Bonnet M., Le Penne P.Y., Roussel M., Patereau C., Noizat-Pirenne F. RhD variants in Caucasians: con-
- sequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion* 2004; 44: 1282–1286.
- Wagner F.F., Flegel W.A. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology* 2004; 20: 23–34.
- Wagner F.F., Frohmajer A., Flegel W.A. RhD positive haplotypes in D negative Europeans. *BCM Genetics* 2001; 2: 10.
- Gassner C., Doescher A., Drnovsek T.D. i wsp. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion* 2005; 45: 527–538.
- Luyi Ye, Danqui Yue, Dele Wo i wsp. Molecular bases of unexpressed RHD alleles in Chinese D-persons. *Transfusion* 2009; 49: 1655–1660.
- Stratton F. A new Rh allelomorphology. *Nature* 1946; 158: 25–26.
- Wagner F.F., Frohmajer A., Ladewig B. i wsp. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood* 2000; 95: 2699–2708.
- Connie M. Westhoff. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. *Transfusion* 2004; 44: 1663–1673.
- Flegel W.A., Wagner F.F. Rhesus Immunisationsregister (RIR)[The Rhesus Immunization Surveillance]. Ulm, DRK-Blutspendedienst Baden Württemberg, Ulm 2009. <http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/RIR>.
- Wagner F.F., Gassner C., Müller T.H., Schönitzer D., Schunter F., Flegel W.A. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999; 93: 385–393.
- Denomme G.A., Dake L.R., Vilensky D., Ramyar L., Judd W.J. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion* 2008; 48: 473–478.
- McGann H., R.E. Wenk R.E. Alloimmunization to the D antigen by a patient with weak D type 21. *Immunohematology* 2010; 26: 27–29.
- St-Louis M., Richard M., Côté M., Éthier C, Long A. Weak D type 42 cases found in individuals of European descent. *Immunohematology* 2011; 27: 20–24.
- Mota M., Fonseca N.L., Rodrigues A., Kutner J.M., Castilho L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang.* 2005; 88: 130–135.

20. Argall C.I., Ball J.M., Trentelman E. Presence of anti-D antibody in the serum of a D^e patient. *J. Lab. Clin. Med.* 1953; 41: 895.
21. Tippett P., Sanger R. Observations on subdivisions of the Rh antigen D. *Vox Sang.* 1962; 7: 9–13.
22. Flegel W.A., Wagner F.F. Molecular biology of partial D and weak D: Implications for blood bank practice. *Clin. Lab.* 2002; 48: 53–59.
23. Yasuda H., Ohto H., Sakuma S., Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion* 2005; 45: 1581–1584.
24. Wagner T., Körmöczy G.F., Buchta C. i wsp. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005; 45: 520–526.
25. Körmöczy G.F., Gassner C., Shao C.P., Uchikawa M., Legler T.J. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion* 2005; 45: 1561–1567.
26. Richard M., Perreault J., Constanzo-Yanez J., Khalifé S., St-Louis M. A new DEL variant caused by exon 8 deletion. *Transfusion* 2007; 47: 852–857.
27. Yan L., Wu J., Zhu F., Hong X., Xu X. Molecular basis of D variants in Chinese persons. *Transfusion* 2007; 47: 471–477.