

# Nowe osiągnięcia w badaniach nad podstawami molekularnymi grup krwi

## w świetle doniesień prezentowanych na 23 Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi w Amsterdamie

The latest news on molecular basis of blood groups  
presented during the 23<sup>rd</sup> Regional Congress of the  
International Society of Blood Transfusion in Amsterdam

Agnieszka Orzińska, Katarzyna Guz, Ewa Brojer

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej  
Instytut Hematologii i Transfuzjologii

W dniach 2–5 czerwca 2013 roku odbył się w Amsterdamie 23. Regionalny Zjazd Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi (ISBT, *International Society of Blood Transfusion*). Jednym z zagadnień poruszanych na zjeździe była najnowszą wiedza o podstawach molekularnych swoistości antygenowych krwinki czerwonej. Temat ten omawiano na wykładach w czasie sesji *Novel Blood Group Findings, Immunohematology — Rh* oraz *Carbohydrate Blood Groups*, a także podczas sesji dotyczącej nowych technologii do typowania grup krwi metodami biologii molekularnej *New Technology for Blood Group Typing*.

Podczas otwierającego pierwszą sesję wykładu pt. *Intergrative genomics identities SMIM1 as the locus of a novel erythrocyte membrane protein and the Vel blood group system* profesor Storry (Lund, Szwecja) przedstawiła wyniki badań, których celem było wykrycie genu i charakterystyka molekularna cząsteczki noszącej swoistość antygeny Vel [1]. Antygen ten opisano w 1952 roku (Sussman i wsp. [2]) u chorego, u którego wystąpiła ostra reakcja hemolityczna po przetoczeniu krwi. W wielu innych doniesieniach potwierdzono, że przeciwciała do tego antygeny są klinicznie istotne. Badania sugerowały, że antygen Vel jest dziedziczny, jako cecha autosomalna recesywna. Do tej pory nie udało się za pomocą żadnych metod biochemicznych i genetycznych ustalić jego podłoża. Autorzy

szwedzcy zastosowali w swoich badaniach nową metodologię opartą na tak zwanym skanowaniu całego genomu (*GWAS, genome-wide association studies*) przy użyciu testu Illumina HumanOmni 2,5M BeadChip. Przeprowadzono poszukiwanie różnic w DNA od 20 osób Vel-ujemnych i 8 Vel-dodatnich, aby ustalić sekwencje DNA kodujące ten antygen. W wyniku analizy stwierdzono, że u wszystkich osób Vel-ujemnych na chromosomie 1p36 występuje region o wielkości 97 tysięcy par zasad o takim samym „wzorze”, różnym od „wzoru” u osób Vel-dodatnich. W regionie tym mieści się gen *SMIM1* kodujący białko transbłonowe erythrocytu o nieznannej funkcji. Białko to nie jest polimorficzne — uważa się je za „konserwowane ewolucyjnie”. Dalsze badania techniką sekwencjonowania tego genu ujawniły u 39 Vel-ujemnych osób różnego pochodzenia homozygotyczną delecję 17 nukleotydów w eksonie 3 kodującym analizowane białko. Częstość występowania haplotypu z delecją w populacji szwedzkiej określono na 1/17. Badania technikami immunoblotingu i cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał króliczych anti-*SMIM1* lub ludzkich anti-Vel potwierdziły korelację między poziomem ekspresji antygeny na krwince czerwonej, a statusem zygocytowości delecji w genie *SMIM1*.

Z kolei grupa naukowców holenderskich (Haer-Wigman i wsp., Amsterdam) zaprezentowała

**Adres do korespondencji:** dr n. biol. Agnieszka Orzińska, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT, 00–975 Warszawa, ul. Chocimska 5, tel.: 22 349 66 00 wew.154, faks: 22 349 66 14, e-mail: [orzinska@ihit.waw.pl](mailto:orzinska@ihit.waw.pl), [kguz@ihit.waw.pl](mailto:kguz@ihit.waw.pl), [ebrojer@ihit.waw.pl](mailto:ebrojer@ihit.waw.pl)

badania, których celem było ustalenie zależności wytwarzania przeciwciał anti-Vel u osób Vel-ujemnych od antygenów HLA klasy II [3]. Przebadano DNA od 10 osób Vel-ujemnych, z których 6 wytworzyło przeciwciała anti-Vel po transfuzji lub w ciąży. Wykazano podwyższoną częstość występowania allelu *DRB1\*11* w grupie zimmunizowanej. W tej samej pracy autorzy badali osobę o wyjątkowo słabej ekspresji antygeny Vel i postawili hipotezę, że osoby takie noszą mutację obniżającą poziom ekspresji białka SMIM1. Badacze zidentyfikowali w intronie 2 genu *SMIM1* polimorfizm rs1175550 (G>A) odpowiedzialny za modyfikację wiązania białek jądrowych w tym regionie. Badania techniką cytometrii przepływową potwierdziły niższy poziom ekspresji białka SMIM1 u osób noszących allel z polimorfizmem A, a wysoką ekspresją u tych o genotypie GG.

Grupa badaczy niemieckich (Weinstock wsp., Ulm) przedstawiła glikoproteinę CD59 jako kandydata do utworzenia nowego układu grupowego krwi [4]. Białko to, znane od dawna pod nazwą MIRL (*membrane inhibitor of reactive lysis*) w alternatywnej drodze aktywacji dopełniacza blokuje tworzenie kompleksu atakującego błonę na etapie wiązania składników C8 i C9. Jest ono zakotwiczone w błonie komórkowej erythrocytu oraz innych komórek za pomocą kotwicy GPI (*glycosylphosphatidylinositol*). Dotychczas jednakże nie wykazano jego immunogenności. Weinstock i wsp. opisali przypadek dziecka pochodzenia tureckiego z homozygotyczną delecją (146del A) w genie kodującym białko CD59, u którego w osoczu wykryto przeciwciała skierowane do antygeny powszechnego o nieznanym swoistości, wytworzone najprawdopodobniej po transfuzji. W celu określenia swoistości przeciwciał wykrytych u dziecka do jego osocza dodano rekombinowane białko CD59 i techniką cytometrii przepływową oceniono stopień zahamowania aktywności przeciwciał. W eksperymencie tym uzyskano całkowitą inhibicję aktywności przeciwciał pacjenta przez CD59. Rekombinowane białko hamowało też aktywność komercyjnych anti-CD59. Naukowcy przeprowadzili również badania rodzinne i wykazali, że allel z delecją kodujący białko CD59 został odziedziczony od heterozygotycznych rodziców. Według obowiązujących kryteriów białko CD59 spełnia formalne kryteria włączenia do rodziny antygenów z układów grupowych.

Kolejne doniesienie grupy naukowców z Bristolu i Barcelony (Karamatic Crew i wsp.) dotyczyło charakterystyki serologicznej i molekularnej antygeny DOLC — nowej swoistości z układu

grupowego Dombrock [5]. U pacjentki pochodzenia kaukaskiego wykryto niezidentyfikowane przeciwciała niereagujące jedynie krwinkami z Gy(a-)[Donnull]. Bezpośrednie sekwencjonowanie genu *DO*, kodującego antygeny z układu Dombrock, wykazało obecność homozygotycznej mutacji 566C>T w eksonie 2, przekładającej się na zmianę aminokwasową Thr189Met. Badania rodzinne potwierdziły dziedziczenie mutacji w trzech pokoleniach i stąd autorzy doniesienia postulowali o wprowadzenie antygeny DOLC jako dziewiątego antygeny do układu Dombrock.

Wykład omawiający ewolucję rodziny supergenów *ABO* otwierał sesję o węglowodanowych grupach krwi. Blancher (Tuluza, Francja) przedstawił obecny stan wiedzy o genach *ABO* występujących w świecie zwierzęcym, ich ewolucji jak również scharakteryzował glikotransferazy, przenoszone reszty cukrowe i ich produkty [6].

Dokładną analizę podłoża genetycznego wariantów *ABO* zaprezentował zespół badaczy chińskich (Cai i wsp., Szanghaj) [7]. Spośród 2,1 mln dawców wyłoniono grupę 322 osób z nietypową ekspresją antygenów grupy głównej. Technika sekwencjonowania zidentyfikowano 61 wariantów genu *ABO*, wśród których wykryto 29 nowych alleli z mutacjami, przede wszystkim typu zamiany pojedynczego nukleotydu. Polimorfizmy zlokalizowano głównie w eksonach 6 i 7, ale także w regionie promotorowym, co wiązało się tworzeniem słabych fenotypów antygenów A i B. Przedstawiono także mutacje typu stop kodon (7G>T i 52C>T) w regionie 5' dające fenotypowo podtypy o krańcowo słabej ekspresji tzw.  $A_{el}$  i  $B_{el}$ . Poziom korelacji genotypu z fenotypem w grupie badanej wynosił 68%.

W dalszej części sesji badacze japońscy (Ogasawara i wsp., Tokio) scharakteryzowali podłoże molekularne fenotypów o bardzo niskiej ekspresji antygenów A lub B na krwinkach zwanych  $B_m$  i  $AB_m$  dość często występujących w Japonii [8]. W badanej grupie zidentyfikowano specyficzną dla tego fenotypu szeroką delecję 5.8kb w intronie 1 genu *ABO* w regionie zawierającym elementy przyłączania się czynnika transkrypcyjnego GATA-1. W trzech przypadkach za powstanie tego samego fenotypu  $B_m$  i  $A_m$  odpowiadała zamiana jednego nukleotydu w tym samym regionie regulatorowym w motywie GATA. Tym samym tematem zajmowali się następnie, szwedzcy prelegenci (Thuresson i wsp., Lund), którzy przeprowadzili sekwencjonowanie intronu 1 genu *ABO* w podstawowych allelach kodujących antygeny tego układu *ABO*\*A1.01, \*A2.01, \*B.01, \*O1.01, \*O1.02 i \*O2.01, a także u osób o fenotypach  $B_m$  i  $A_m$  [9]. Wykryli 68 miejsc

polimorficznych specyficznych dla danego allelu, a 26 specyficznych dla 2 alleli. Badania próbek o słabych fenotypach nie wykryły obecności delekcji występującej w populacji japońskiej, lecz zmianę typu SNP w motywie GATA w regionie przyłączenia czynnika transkrypcyjnego GATA-1, co potwierdza rolę intronu 1 w prawidłowości ekspresji antygenów grupy głównej.

Z doniesień w sesji plakatowej zespół polski (Karolak i wsp., Wrocław i Opole) zaprezentował ciekawe doniesienie o badaniach częstości występowania polimorfizmów w genie *FY* kodującym swoistości antygenowe z układu Duffy w populacji polskiej przy użyciu analizy krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości (HRM, *high resolution melting*) [10]. W przebadanej grupie 495 dawców pochodzenia polskiego częstość występowania allelu *FY\*A* wynosiła 69%, a *FY\*B* — 77%, a częstość polimorfizmu *FY\*B298G>A*, kodującego wariant fenotypu słabe Fyb, określono na 30%. Zastosowana technika pozwoliła zidentyfikować 3 nowe, ciche mutacje dotyczące zmiany jednego nukleotydu w regionie promotorowym lub kodującym.

Doniesienie zespołu polsko-szwedzkiego (Michalewska i wsp., Warszawa i Lund) przedstawiało nowe podłoże genetyczne fenotypu cis-AB wykrytego u pacjentki polskiego pochodzenia [11]. Podstawy genetyczne fenotypu cis-AB w 2000 roku opisali Mifsud et al. [12], a obecna nazwa zgodna z nomenklaturą ISBT wariantu to *cisAB.02*. Metodami SSP i RFLP-PCR określono genotyp pacjentki, jako *ABO\*cisAB.02/0.01*, a sekwencjonowanie eksonów 1-7 allelu *cisAB* ujawniło polimorfizm C w pozycji 796 charakterystyczny dla allelu *A*, ale obecny w allelu *B* — tak jak to opisali Mifsud i wsp. Jednakże równocześnie wykryto sekwencję na końcu eksonu 7 genu *ABO* — specyficzną jedynie dla alleli *nie-B*, co jest nowym odkryciem, gdyż we wspomnianej wcześniej pracy nie sekwencjonowano tego regionu.

Z sesji plakatowej warto wspomnieć o doniesieniach na temat badań podłoża molekularnego antygenów powszechnych Lan i  $Jr^a$  u osób nieposiadających tych swoistości. Typowanie serologiczne dawców zgodnych z takim biorcą jest wyjątkowo trudne ze względu na ograniczony dostęp do unikatowych surowic z przeciwciałami. Stąd techniki genotypowania alleli kodujących te powszechne swoistości antygenowe stanowią szybką i tanią alternatywę identyfikowania dawców o rzadkim genotypie. Haer-Wigman i wsp. prezentowała wyniki sekwencjonowania tych genów u 6 osób Lan-ujemnych i 4 osób  $Jr^a$ -ujemnych pochodzenia holenderskiego. Przedstawiła też opracowany

protokół badań techniką dyskryminacji alleli pozwalający na ich identyfikację [13]. Opisała 9 nowych mutacji w genie *ABCB6*, kodującym antygen Lan, z których 7 przekładało się na fenotyp null. Wykryte przez Haer-Wigman i wsp. warianty kodujące antygen  $Jr^a$  *ABCG2 \*376C>T* i *\*706C>T* zostały już wcześniej opisane. Z kolei zespół japoński (Yamamuro i wsp.) prezentował doniesienie o wykryciu 10 nowych alleli genu *ABCB6* u osób Lan-ujemnych w populacji japońskiej, z których najczęściej wykrywany wariant nosi delekcję jednego nukleotydu w obrębie eksonu 1 [14]. W sesji plakatowej dwa zespoły japońskie (Tobita i wsp. i Tanaka i wsp., Tokio) przedstawiły analizę podłoża genetycznego antygenu  $Jr^a$  w populacji japońskiej u osób  $Jr^a$ -ujemnych [15, 16]. Badacze wykryli wariant *ABCG2 \*376C>T* u 80% badanych dawców i 13 nowych mutacji, które przekładały się na fenotyp  $Jr^a$ -ujemny, a także 2 nowe mutacje typu missens o bardzo słabej ekspresji  $Jr^{a+w}$ . Doniesienia te ukazują szeroką heterogenność podłoża molekularnego grupy o fenotypie Lan-ujemny w różnych rasach, co przekłada się na zrozumienie, jak trudny będzie screening rzadkich dawców Lan-ujemnych metodami biologii molekularnej. Natomiast wiedza o genetyce fenotypu  $Jr^a$ -ujemnego pozwala przypuszczać, że identyfikowanie dawców o rzadkim fenotypie  $Jr^a$ -ujemnym techniką genotypowania pozycji 376 i 706 genu *ABCG2* jest możliwe. Ze względu na niską częstość tego allelu w kierunku jego wykrycia może być wykonywane nawet w pulach przygotowanych ze zlania wielu próbek.

Podsumowując, wiele zaprezentowanych doniesień o nowych polimorfizmach czy allelach wykrytych w genach kodujących swoistości antygenowe pozwala na dalsze poszerzanie i uaktualnianie wiedzy o ich podłożu molekularnym, co prowadzi do lepszego zrozumienia i przełożenia wyników otrzymywanych metodami biologii molekularnej na prawdopodobny fenotyp.

## Piśmiennictwo

1. Storry J., Joud M., Kronberg Christophersen M. i wsp. Integrative genomics identifies *SMIM1* as the locus of a novel erythrocyte membrane protein and the Vel blood group system. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 29.
2. Sussman L., Miller E. New blood factor: Vel. *Rev Hematol.* 1952; 7: 368–371.
3. Haer-Wigman L., de Haas M., van der Schoot C. The immune response to the Vel antigen is HLA-class II DRB1\*11 restricted. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 29.
4. Weinstock C., von Zabern I., Hochsmann B. i wsp. CD59 defines a new blood group system. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 29–30.
5. Karamatic Crew V., Thornton N., Bullock T. i wsp. Serological and molecular characterization of DOLC, a novel high incidence

- antigen in the Dombrock blood group system. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 30.
6. Blancher A. Evolution of the ABO supergene family. *Vox Sang.* 2013; 105: (supl. 1): 43.
  7. Cai X, Jin S., Liu X., Xiang D. Molecular genetic analysis of ABO blood group variations reveals 29 novel ABO subgroup alleles. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 43–44.
  8. Ogasawara K., Isa K., Tsuneyama H. i wsp. Molecular basis for Japanese individuals with B<sub>m</sub> and A<sub>m</sub>. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 44.
  9. Thuresson B., Hellberg A., Olsson M. Disruption of a binding site for the erythroid transcription factor GATA-1 in intron 1 of the ABO gene in A<sub>m</sub> and B<sub>m</sub> subgroup samples. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 44.
  10. Karolak E., Waśniowska K., Grodecka M., Klaus E., Misiaszek A. Frequency of Duffy gene polymorphism in Polish population studied by high resolution melting (HRM) analysis. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 198.
  11. Michalewska B., Hellberg A., Pelc-Kłopotowska M. i wsp. Genetic basis of cis-AB in a woman from Poland where the phenotype was first described. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 228.
  12. Mifsud N., Watt J., Condon J., Haddad A., Sparrow R. A novel cis-AB variant allele arising from a nucleotide substitution A796C in the B transferase gene. *Transfusion* 2000; 40: 1276–1277.
  13. Haer-Wigman L., Soussan A., de Haas M., van der Schoot C. Molecular analysis of immunized Lan- or Jra- negative patients and validation of genotyping assays to screen blood donors for Lan- or Jra-negativity. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 229.
  14. Yamamuro Y., Isa K., Ogasawara K. i wsp. The new mutation of ABCB6 gene in Lan- Japanese. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl.1): 230.
  15. Tobita R., Kaito S., Osabe T. i wsp. Genetic analysis of the Jr(a-) in Japanese people. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 230.
  16. Tanaka M., Kamada I., Takahashi J., Kimura K., Matsukura H., Tani Y. Novel Jr null allele in the Japanese population. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 230.