

Von der Erbsubstanz über die molekulare Blutgruppendiagnostik zum Routinescreening des Rhesus-D-Gens bei Blutspendern

Christoph Niederhauser, Hein Hustinx

Einführung

Die Entdeckung der Nukleinsäure im Jahr 1869 durch Friedrich Miescher bildet den Beginn der molekularen Diagnostik. Die chemische Beschreibung der Erbsubstanz, bestehend aus Zucker, Phosphat und den vier Basen Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin durch Phoebus Levene im Jahr 1931 sowie die physikalische Beschreibung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) in den frühen 50er Jahren durch Maurice Wilkins, Rosalind Franklin, James Watson und Francis Crick stellen eine Grundlage für die Entwicklung molekularer Methoden dar.

Weitere wichtige Entdeckungen, welche nicht nur in der Grundlagenforschung und der angewandten Forschung, sondern auch in der Diagnostik allgemein zu ersten bahnbrechenden Erfolgen führten, waren die Entdeckung der Plasmide, der Restriktionsendonukleasen, der Techniken des Sequenzierens etc. Eine der wohl wichtigsten Entdeckungen der letzten 25 Jahre war diejenige der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Kary Mullis hat diese «Entdeckung» gemäss sagenumwobener Aussagen während einer Mondscheinfahrt mit seiner Freundin gemacht. Dank dieser Technik konnten in allen Bereichen der Grundlagen- und angewandten Forschung, aber insbesondere auch in der Routinediagnostik sehr grosse Fortschritte erzielt werden.

Anwendungsgebiete der molekularen Blutgruppendiagnostik

Die molekularen Techniken werden heute in den verschiedensten Gebieten wie der Grundlagenforschung, der

Genetechnologie bei Pflanzen und Tieren, der Lebensmittelanalytik, der Archäologie, der Forensik, der Umweltanalytik und auch der medizinischen Diagnostik mit grossem Erfolg eingesetzt.

Mittlerweile haben die molekularen diagnostischen Techniken auch in der Immunhämatologie Einzug gehalten. In verschiedenen Situationen, bei denen die serologischen Techniken an ihre Grenze stossen, bieten sich mit molekularen Methoden Lösungen an. So zum Beispiel bei der Genotypisierung von Patienten mit starken IgG-Beladungen der Erythrozyten (Auto-Antikörper) oder der Genotypisierung von transfundierten Patienten. Die Auswahl von geeigneten Blutprodukten kann erleichtert und Alloimmunisierungen, vor allem bei chronisch transfusionsbedürftigen Patienten, vermieden werden. Aber auch beim Lösen von serologischen Diskrepanzen bei den Blutgruppen AB0, Rhesus etc., der Identifizierung von seltenen *RHD*-Varianten, welche als Spender potentiell eine Anti-D-Alloimmunisierung beim Patienten auslösen könnten oder dem Nachweis von *RHD*-Zygoten und zur Konfirmation des Genotyps bei einer sehr schwachen Ausprägung eines Antigens wie zum Beispiel DEL oder Fy^x. Einige weitere erwähnenswerte Beispiele sind das Aufdecken von RhD-positiven Patienten mit Anti-D (Auto- oder Alloantikörpern, z.B. DNB), das molekulare Massenscreening für seltene Phänotypen, die Genotypisierung von Spendern, deren Erythrozyten für Antikörperidentifikationspanels eingesetzt werden und die Bereitstellung von seltenen Erythrozytenkonzentraten. Für den Fall, dass

keine kommerziell erhältlichen serologischen Reagenzien vorhanden sind, wie beispielsweise für die Bestimmung der Blutgruppe Dombrock, muss auf molekulare Methoden zurückgegriffen werden.

Zusätzlich können molekularbiologische Methoden zum Einsatz kommen, wenn die serologischen Reagenzien nur sehr schwer erhältlich sind oder aber der Einsatz der serologischen Methoden wesentlich teurer ist als derjenige der molekularbiologischen. Zum Beispiel sind gute polyklonale Antikörper für gewisse Antigene nicht mehr kommerziell erhältlich oder monoklonale Antikörper können nicht alle gewünschten Antigene detektieren.

Das Rhesus-D-Gen/-Protein

Das Antigen D wurde im Jahr 1939 von Landsteiner und Wiener als erstes Rhesus-Antigen beschrieben. Bereits 1946 wurde eine als D^u benannte, quantitative Variante mit schwach ausgeprägtem Antigen entdeckt. Diese Varianten mit quantitativ abgeschwächtem D-Antigen werden heute «weak D» genannt. 1953 wurde dann die erste qualitative Veränderung des D-Antigens, das sogenannte «partial D», beschrieben. 1990 gelang der genetische Nachweis des ersten Rhesus-Gens in Form von C/E. Zwei Jahre später, 1992, wurde auch das Rhesus-D-Gen beschrieben. Das Rhesus-D-Gen ist ungefähr 50 kb lang und aus 10 Exons und 10 Introns aufgebaut. Bei der kaukasischen Bevölkerungsgruppe ist bei RhD-negativen Individuen in den meisten Fällen das gesamte Rhesus-D-Gen deletiert. Eigentlich gibt es die Bezeichnung «dd» gar nicht, da

eben in diesem Fall das Rhesus-D-Gen nicht im Genom des entsprechenden Individuums vorhanden ist. Nichtsdestotrotz wird die Bezeichnung «dd» aus Verständlichkeitsgründen weiterhin gebraucht. Weitere Möglichkeiten, die zum Verlust des D-Antigens führen und insbesondere auch in der schwarzen Bevölkerung vorherrschend sind, werden in der Regel durch Punktmutationen (SNP «single nucleotide polymorphism») wie die Missense-, die Frameshift- oder die Spleiss-Stellen-Mutationen ausgelöst. Hybridallele, welche aus Gensequenzen des C/E- und des D-Gens bestehen, führen dazu, dass ein Individuum RhD-negativ sein kann. Neben dem Fehlen des RhD-Proteins gibt es noch eine Reihe unterschiedlicher Veränderungen im RhD-Protein. Diese Varianten werden heute in die Allele «weak D», «partial D» und «DEL» eingeteilt.

Das RhD-Protein durchspannt die Erythrozytenmembran 12-mal. Dadurch wird nur ein gewisser Anteil des gesamten Proteins auf der Oberfläche der Erythrozyten exponiert. Findet nun eine Mutation in einem Basentriplett statt, welches eine Aminosäure betrifft, die das Rhesus-Protein auf dem nach aussen exponierten Anteil verändert, so können einzelne Epitope des D-Antigens verlorengehen oder es können neue Antigene auftreten. Diese Art von Varianten werden «partial D» genannt und die Träger solcher Rhesus-D-Proteine können typischerweise Anti-D-Antikörper bilden. In Abbildung 1 sind einige dieser Aminosäureaustausche dargestellt.

Befindet sich solch eine ausgetauschte Aminosäure im Teil des Rhesus-Proteins, welches in der Erythrozytenmembran oder innerhalb dieser liegt, führt dies in der Regel zu einer weak D-Variante (Abbildung 2). Aufgrund dieser Mutationen wird das Rhesus-D-Protein so verändert, dass die Integration in die Erythrozytenmembran je nach Mutation verschieden stark behindert wird. Aus diesem Grund erscheint dann auf der Erythrozytenmembran eine kleinere Menge an Rhesus-D-Antigenen. Die Rhesus-D-Antigene sind in der Regel unverändert, was normalerweise eine Anti-D-Immunisierung ausschliessen würde. Leider gibt es auch hier Ausnahmen,

denn in der Literatur sind Patienten beschrieben worden, welche gleichwohl Anti-D gebildet haben. Aufgrund des aktuellen Wissens werden die weak D-Typen 1, 2 und 3 bei Transfusionen und bei Schwangeren als RhD-positiv gewertet, alle anderen als RhD-negativ.

Bei den DEL-Varianten liegen auf der Erythrozytenoberfläche noch weniger D-Antigene vor als bei den weak D-Varianten. Sie werden in der Regel, wenn überhaupt, serologisch nur mit Elutionstechniken nachgewiesen. Die Mutationen führen normalerweise zu schwerwiegenderen Veränderungen des Rhesus-D-Proteins, so dass die Membranintegration sehr stark behindert, aber dennoch nicht vollständig beeinträchtigt wird.

Normale Rhesus-D-positive Individuen besitzen ungefähr 10000 bis 33000 D-Antigene auf der Oberfläche eines Erythrozyten, weak D-Varianten einige 100 bis einige 1000 D-Antigene. Bei den DEL-Varianten wurden auch schon nur ca. 20 D-Antigene pro Erythrozyt festgestellt.

Immer mehr Mutationen werden entdeckt, welche nicht eindeutig ins Schema «weak D», «partial D» oder «DEL» passen. Aus diesem Grund werden Überlegungen über eine neue Nomenklatur angestellt. Ein Beispiel dafür ist weak D-Typ 30, bei welchem der Austausch der Aminosäure innerhalb der Erythrozytenmembran liegt und so per Definition ein «weak D» darstellt. Serologisch verhält sich diese Variante aber wie ein «partial D».

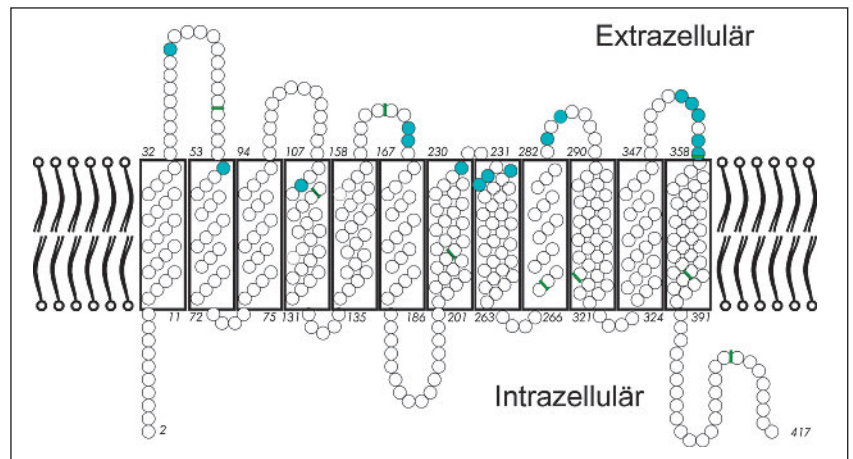


Abbildung 1.
Aminosäureaustausche (hellblaue Punkte), die zu partial D-Rhesus-D-Varianten führen.

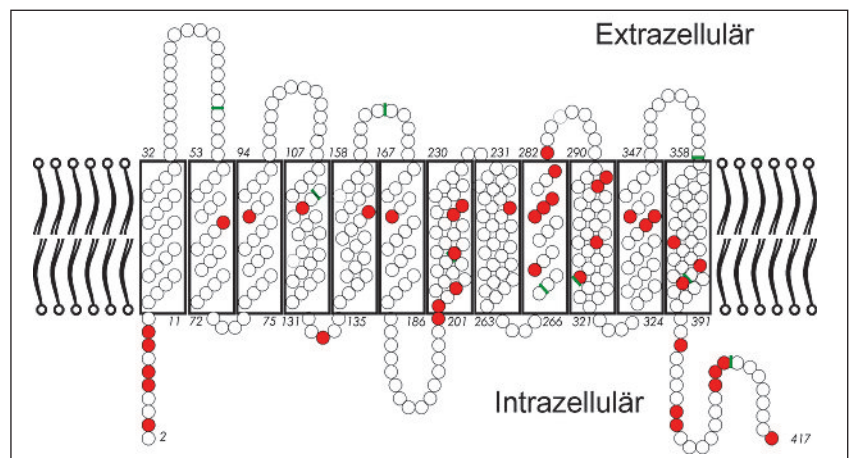


Abbildung 2.
Aminosäure-Austausche (rote Punkte), die zu weak D-Rhesus-D-Varianten führen.

Abbildungen 1 und 2: Prof. Dr. med. Willy A. Flegel Abteilungsleiter Blutgruppenserologie und Immunhämatologie, Universität Ulm.

Die in den letzten Jahren in der Literatur beschriebenen Vorkommnisse von Alloimmunisierungen durch Blutprodukte von angeblich Rhesus-D-negativen Spendern haben uns dazu bewogen, Abklärungen an der Spenderpopulation vorzunehmen. Mit molekularen Techniken sollte es möglich sein, unter vermeintlich Rhesus-D-negativen Blutspendern etliche Individuen mit weak D- oder DEL-Varianten aufzudecken. Man geht davon aus, dass ohne molekulare Diagnostik immer wieder D-negative Transfusionsempfänger durch das D-Antigen solcher Blutspender immunisiert werden.

Ob abgeschwächte RhD-Antigene im Screening gefunden werden, ist von den verwendeten Anti-D-Seren abhängig. Aktuell ist gemäss den Richtlinien des Blutspendedienstes SRK zusätzlich ein indirekter Antiglobulintest obligatorisch, um gewisse abgeschwächte RhD-Antigene nachweisen zu können. Weak D-Individuen kommen in ca. 0,2 bis 1% der kaukasischen Völkergruppe vor, in der Schweiz sind vorwiegend die Typen 1 und 2 zu finden. Individuen mit DEL-Erythrozyten können mit dem indirekten Antiglobulintest meistens nicht erfasst werden.

Um Immunisierungen bei Patienten zu verhindern, sollte die Exposition von RhD-negativen Individuen mit D-positiven Erythrozytenkonzentraten möglichst vermieden werden. Heutige Routine-Screeningmethoden sind in der Regel nicht effizient genug, um alle weak D-, partial D- oder sonstige selten vorkommende D-Varianten zu detektieren.

Molekulares Screening des Rhesus-D-Gens

Aufgrund der aus der Literatur beschriebenen Immunisierungen von Patienten, die mit Erythrozytenkonzentraten aus DEL- oder weak D-Spendern gewonnen wurden, wird vorgeschlagen, letztere aus dem Rhesus-D-negativen Blutspenderpool heraus zu selektionieren [1–3]. Dies ist besonders wichtig für Empfängerinnen von Blutprodukten, welche sich vor dem oder im gebärfähigen Alter befinden. Mit geeigneten molekularen biologischen Methoden sollte dieses Unterfangen sowohl technisch als auch finanziell problemlos durchführbar sein. In

einer multizentrischen Studie wurde festgestellt, dass die Frequenzen der gefundenen *RHD*-Allele sogar zwischen eng benachbarten geographischen Regionen stark variieren [4]. Es ist daher nachvollziehbar, dass jedes Land oder sogar jede grössere Region seine eigenen Daten dazu erheben sollte. Aus diesem Grund wurden im Blutspendedienst Bern zwei Studien durchgeführt. Das Ziel dieser beiden Studien war die Erarbeitung der epidemiologischen Daten betreffend serologisch RhD-negativen, aber molekular *RHD*-positiven Schweizer Spendern. Gleichzeitig geben diese beiden Studien auch einen Überblick über die in der Schweiz vorwiegend vorkommenden abweichenden *RHD*-Allele. Verschiedene Fragestellungen waren Basis dieser beiden Studien:

- Müssen alle serologisch RhD-negativen Spenderinnen und Spender genetisch auf *RHD* gescreent werden?
- Kann allenfalls nur ein kleiner Teil der Spenderinnen und Spender untersucht werden?
- Müssen überhaupt keine Spenderinnen und Spender molekular auf *RHD* untersucht werden?
- Falls ein molekulare biologisches Screening eingeführt würde, könnte man in Zukunft auf die RhD-Bestimmung mittels indirektem Antiglobulintest verzichten?

Das Ziel ist eine Reduktion des Immunisierungsrisikos für Empfänger von

Rhesus-D-negativen Blutprodukten zu erreichen.

In einem ersten Teilprojekt wurden 644 Spender (Spendenproben der Blutspendedienste Bern, Waadt, Innerschweiz und Nordostschweiz), welche Rhesus-D-negativ aber C- und/oder E-positiv waren, molekular auf das *RHD*-Gen untersucht. Von diesen 644 serologisch Rhesus-D-negativen Spendern waren 23 (3,57%) mit mindestens einem der 3 von 10 untersuchten *RHD*-Exons genetisch positiv. Die Erythrozyten von 12 dieser 23 Spender sind in der Lage bei einem Rhesus-D-negativen Empfänger eine Anti-D-Alloimmunisierung auszulösen. Daher müssen diese Spender klar als Rhesus D-positiv deklariert werden. Die anderen 11 Spender haben Rhesus-D-Varianten, welche beim Rhesus-D-negativen Empfänger (laut Literatur) keine Alloimmunisierungen auslösen. Im zweiten Teilprojekt wurden insgesamt 17391 Proben von ccddee-Spendern molekular untersucht. Hier konnten praktisch flächendeckend für die gesamte Schweiz Daten erhoben werden, da sich 12 von den insgesamt 13 Regionen daran beteiligt haben. Die 17391 Spenden wurden in Minipools von 24 Einzelproben auf die drei Exons 3, 5 und 10 des *RHD*-Gens untersucht (Abbildung 3).

Bei positiven molekularen Ergebnissen, d.h. mindestens eines der 3 Exons ist im molekularen Screening positiv,

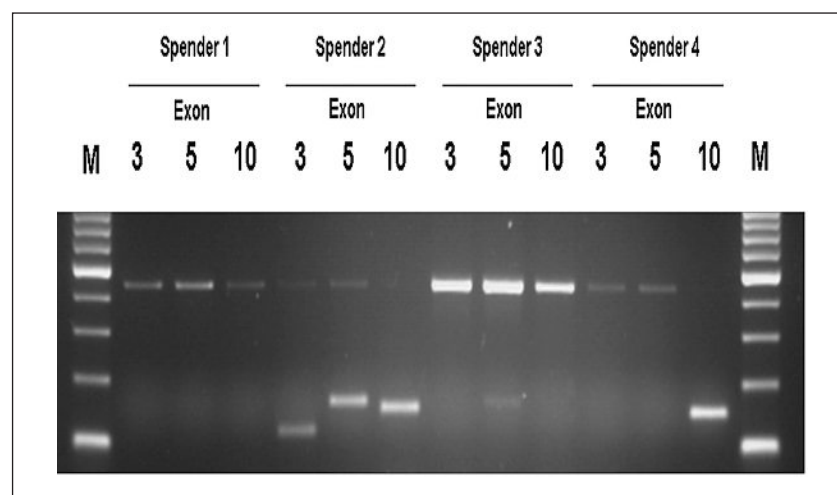


Abbildung 3. Agarosegel von 4 Spendern. Bei den Spendern 1 und 3 sind alle 3 Exons (3, 5, 10) positiv. Bei den Spendern 2 und 4 sind nur die beiden Exons 3 und 5 positiv.

Dr. Peter Gowland, Blutspendedienst SRK Bern AG, Bern.

wurden die positiven Proben serologisch und mit zwei kommerziell erhältlichen SSP (single strand polymorphism)-PCR-Testsystemen nachuntersucht. In einigen Fällen konnte eine spezifische D-Variante entdeckt werden. In anderen Fällen führten auch die kommerziellen PCR-Testsysteme zu keinem Resultat. Von diesen Proben wurden anschliessend alle 10 Rhesus-Exons amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert. So wurden auch neue D-Varianten entdeckt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass von insgesamt 644 C/E-positiven Spenden des Pilotprojekts 19 genetisch *RHD*-positiv waren. Bei 12 dieser 19 Spender musste der Rhesus-Status von negativ auf *RHD*-positiv gewechselt werden. Von den 17 391 Spendern des Hauptprojekts waren vier (ccddee) genetisch *RHD*-positiv. Keiner dieser Spender muss aber als RhD-positiv deklariert werden, son-

dern konnte weiterhin als RhD-negativ geführt werden. Aufgrund der vorliegenden Daten, der epidemiologischen Zusammensetzung der Rhesus-D-Varianten in der Schweiz sowie der aktuellen, in den 13 Regionen eingesetzten serologischen Testsysteme sollte eine Diskussion geführt werden, wie ein zukünftiges Rhesus-D-Screening bei Blutspendern in der Schweiz aussehen könnte.

Danksagung

Wir möchten herzlich allen Leitern der regionalen Blutspendedienste danken, welche uns tatkräftig unterstützt haben, um dieses Projekt durchzuführen.

Korrespondenz:

Dr. phil. nat. Christoph Niederhauser
Blutspendedienst SRK Bern AG
Murtenstrasse 133
3008 Bern
christoph.niederhauser@bsd-be.ch

Literatur

- 1 Flegel WA, Khull SR, Wagner FF. Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs. *Transfusion*. 2000;40:428–34.
- 2 Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*. 2005;45:1581–4.
- 3 Wagner T, Körmöczy GF, Buchata C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, Legler TJ. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*. 2005;45:520–6.
- 4 Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eicher NI, Legler TJ, Lukin S, Garritsen H, Kleinrath T, Egger B, Ehling R, Kormoczi GF, Kilga-Nogler S, Schoenitzer D, Petershofen EK. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*. 2005;45:527–38.