

# Molekularbiologie von partial D und weak D

## Bedeutung für die Arbeit in der Blutzentrale\*

W. A. Flegel, F. F. Wagner, Abteilung Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Ulm und DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH, Institut Ulm

*Die beiden Gene RHD und RHCE kodieren die Antigene des Blutgruppensystems RH. Antigen D ist das klinisch wichtigste Antigen dieses Systems und das Produkt eines normalen funktionalen RHD-Gens. Zirka 18 % aller Europäer sind Rhesus negativ, was meist – aber nicht immer – durch die RHD-Deletion bedingt ist.*

*Der Rhesus-negative Phänotyp in Afrikanern ist verursacht durch die RHD-Deletion, das RHD-„Pseudogen“ RHD $\Psi$  oder das Cde<sup>s</sup>-Allel. Ungefähr 1 % der Europäer weisen aberrante (strukturell veränderte) RHD-Allele auf, die ein verändertes Antigen D bedingen. In afrikanischer Bevölkerung ist die Frequenz aberranter RHD-Allele wesentlich höher. Aberrante RHD-Allele kodieren Partial-D-Phänotypen, von denen ein Teil als D-Kategorien bezeichnet werden, oder Phänotypen mit schwach ausgeprägtem Antigen D, deren molekulare Ursache von unseren Autoren nachgewiesen wurde und die man seitdem in unterschiedliche Weak-D-Typen differenzieren kann. Seitdem die molekulare Basis der RHD-Deletion geklärt werden konnte, ist der spezifische Nachweis heterozygoter Träger möglich. Im nachfolgenden Beitrag erläutern die Autoren diese komplexen Zusammenhänge. Zahlreiche Abbildungen erleichtern das Verständnis.*

### Struktur des RH-Genortes und des Rh-Proteins

Der RH-Genort besteht aus zwei Genen, RHD und RHCE, die sich sehr ähnlich sowie entgegengesetzt orientiert sind, jeweils aus ca. 60 Kilobasen (kb) bestehen und von ei-

nem DNA-Segment von nur 30 000 kb getrennt werden (Abb. 1a). Die RhD- und RhCE-Proteine bestehen aus jeweils 417 Aminosäuren und bilden membranständige Proteine mit 6 extrazellulären Schleifen. In Abhängigkeit von den Allelen unterscheiden sich RhD und RhCE in 32 bis 35 Aminosäuren, die über das ganze Protein verteilt sind (Abb. 1b).

### Molekulare Grundlage der Partial-D-Phänotypen

Partial-D-Phänotypen weisen veränderte RhD-Proteine auf, die sich soweit vom normalen RhD unterscheiden, dass eine Bildung von Allo-Anti-D möglich wird bzw. sie

mit einigen monoklonalen Anti-D-Reagenzien nicht reagieren. D-Kategorien bilden eine Untergruppe der Partial-D-Phänotypen. Drei Arten molekularer Ursachen wurden gefunden: RHD/CE-Hybridallele sowie einzelne oder mehrere Aminosäureaustausche in den extrazellulären Proteinsegmenten.

### Hybridallele

Über 20 Partial-D-Allele vom Hybridtyp sind bekannt. Die zwischen RHD und RHCE ausgetauschten Gensegmente sind einige wenige bis weit über 10 000 Basenpaare (bp) lang (laufend aktualisierte Liste siehe „The Rhesus Site“: <http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/>). Der Phänotyp jedoch wird

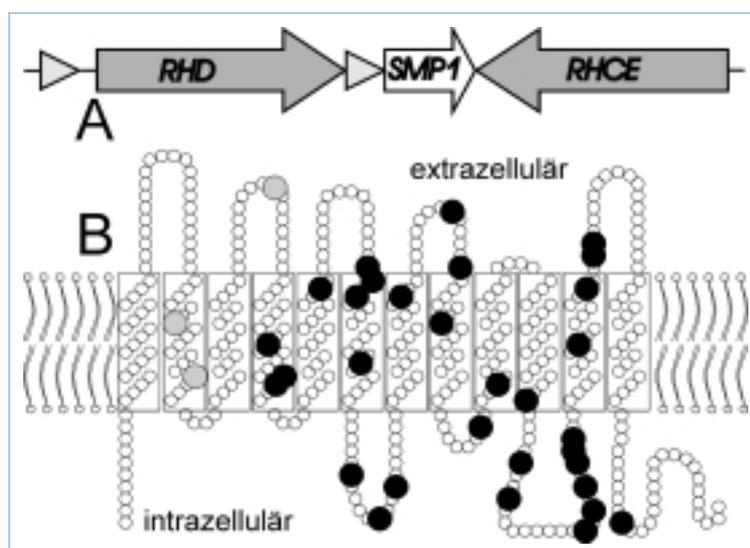


Abb. 1: Struktur des RH-Genortes und des Rh-Proteins

a: Der RH-Genort auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1. Die beiden RH-Gene, RHD und RHCE, haben unterschiedliche Orientierung und ein drittes Gen, SMP1, ist dazwischen lokalisiert. Das RHD-Gen ist umgeben von zwei weitgehend identischen „Rhesus-Boxen“ (graue Dreiecke), die die gleiche Orientierung aufweisen.

b: Die Rh-Proteine in der Erythrozytenmembran. Die Aminosäuren, die sich zwischen den beiden Rhesus-Genen unterscheiden, sind über das ganze Protein verteilt (schwarze und graue Kreise). Drei Aminosäuren (graue Kreise) unterscheiden sich allerdings nicht zwischen RhD und dem C-Allel von RhCE. Die Rh-Proteine bilden zwölf transmembranäre Segmente und sechs extrazelluläre Schleifen.

● **Tab. 1: Phänotypmuster und beteiligte extrazelluläre Proteinschlaufen.**

Phänotypmuster	extrazelluläre Schlaufe			Anzahl der bekannten Allele	Beispiele
	3	4	6		
D <sup>III</sup>	+	+	+	2	D <sup>IIIb</sup> , D <sup>IIIc</sup>
DFR	-	+	+	2	DFR Typ I
D <sup>V*</sup>	+	-	+	>5	D <sup>Va</sup> Typ I
D <sup>IVb</sup> -ähnlich	+	+	-	4	D <sup>IV</sup> Typ III
D <sup>VI</sup>	-	-	+	4	D <sup>VI</sup> Typ III
DBT	+	-	-	2	DBT-1
R <sub>0</sub> <sup>Har</sup>	-	+	-	1	R <sub>0</sub> <sup>Har</sup>
D negativ	-	-	-	>5	Cde <sup>S</sup>

\* Eine weitere erhebliche Heterogenität wurde beobachtet und basiert auf einem Ala/Pro Polymorphismus im Kodon 226.

hauptsächlich durch die beteiligten extrazellulären Schleifen bestimmt, weswegen nur 8 unterschiedliche Muster von Phänotypen resultieren (Tab. 1). Allele des gleichen Phänotypmusters sind kaum durch serologische Methoden zu unterscheiden. Obwohl es Ausnahmen gibt, werden D-Kategorien typischerweise durch Hybridallele verursacht.

*Einzelne und mehrere, verteilte Aminosäureaustausche*

Mehr als 10 Partial-D-Allele werden durch jeweils einzelne, in den extrazellulären Schleifen lokalisierte Aminosäureaustausche verursacht. Im allgemeinen sind weniger Epitope des Antigens D betroffen als bei D-Kategorien. Partial D, die nicht D-Kategorien sind, werden typischerweise durch solche einzelne Aminosäureaustausche verursacht. Wieder andere Partial-D-Phänotypen werden verursacht durch den Austausch mehrerer Aminosäuren, die über das Rh-Protein verteilt sind; Beispiele dafür sind die D-Kategorie IIIa, D-Kategorie III Typ IV, D-Kategorie IVa und DAR.

**Molekulare Grundlagen des schwach ausgeprägten Antigen D**

Ein schwach ausgeprägtes Antigen D wird auch als so genanntes „weak-D“ bezeichnet. Der früher für diesen Phänotyp gebräuchliche Begriff „D<sup>u</sup>“ sollte nicht mehr verwendet werden.

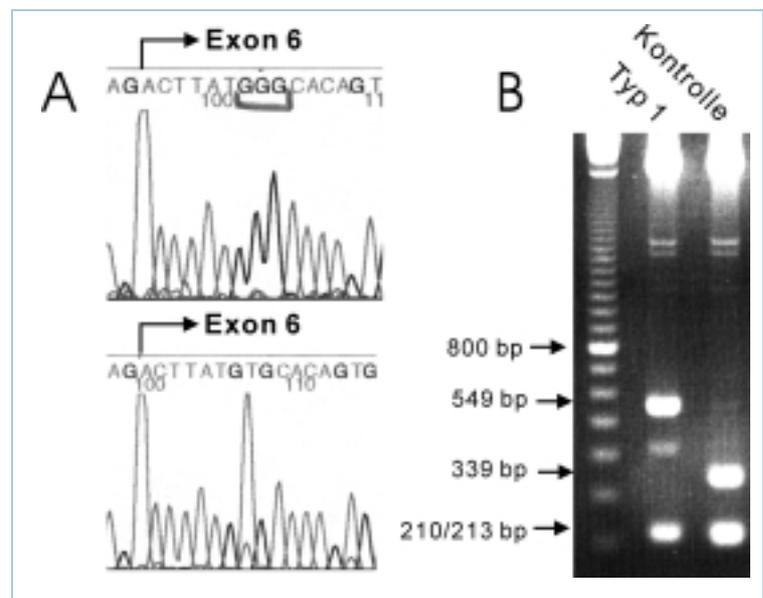
Alle untersuchten Weak-D-Blute weisen Mutationen ihrer RHD-Allele auf. Der häu-

figste Weak-D-Phänotyp unter Europäern ist der Weak-D-Typ 1 (Abb. 2). Derzeit sind mehr als 20 Weak-D-Typen bekannt (siehe „The RhesusBase“: <<http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>>). Im Gegensatz zum partial D sind die Aminosäureaustausche

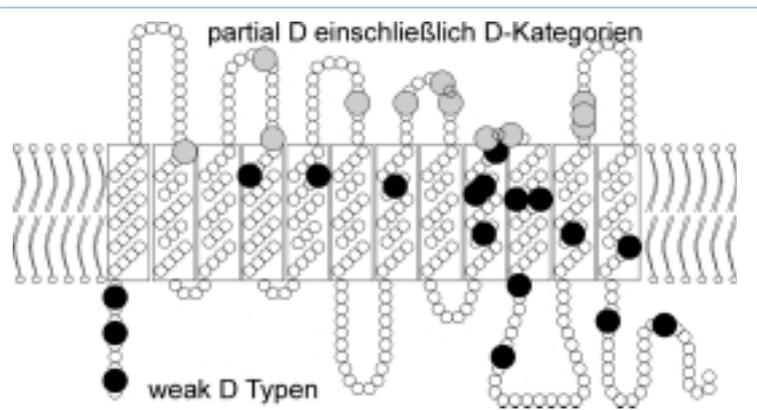
beim weak-D ausschließlich in den transmembranären oder intrazellulären Proteinsegmenten zu finden (siehe Abb. 3). Jeder molekular definierte Weak-D-Typ weist einen unterschiedlichen Phänotyp mit einer verminderten Antigendichte und geringgradigen Veränderungen des Antigen D auf. Die extreme Form des weak-D ist der D<sub>el</sub>-Phänotyp, bei dem das Antigen D so schwach ausgeprägt ist, dass es nur mit Adsorption und Elution nachweisbar ist.

**Klinischer Stellenwert der Bestimmung von partial-D und weak-D**

- a) Träger der meisten Partial-D- und einiger Weak-D-Typen sind für eine Anti-D-Immunsierung anfällig. Daher ist es klinisch vorteilhaft, sie so zu typisieren, dass Rhesus-positive Transfusionen vermieden werden.
- b) Träger der meisten Weak-D-Typen können *kein* Anti-D bilden und sollten folglich mit Rhesus positiven Blut transfundiert werden; damit kann die häufig beobachtete Vergeudung von Rhesus ne-



● **Abb. 2: Molekulare Struktur des Weak-D-Typ 1 und seine Bestimmung durch RHD-Exon-spezifische Sequenzierung von genomischer DNA oder durch PCR-RFLP**  
a: Das Elektrophoretogramm von Exon 6 einer Weak-D-Typ 1 Blutprobe (oben) und einer D-positiven Kontrollprobe (unten) zeigt die zugrundeliegende Nukleotidmutation (GGG versus GTG).  
b: Die Mutation von G nach T zerstört eine Alw44I-Restriktionsenzymstrecke (GTGCAC). Deswegen wird in einer PCR-RFLP (PCR mit Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) mit dem Enzym Alw44I ein Weak-D-Typ 1-spezifisches 549 bp Fragment nachgewiesen anstelle von zwei 339 und 210 bp Fragmenten. Weitere Fragmente (210 bp und >2,000 bp) treten bei diesem Test immer auf.



**Abb. 3:** RHD-Allele mit einzelnen Aminosäureaustauschen  
Aminosäureaustausche, die einen abgeschwächten Antigen-D-Phänotyp verursachen sind schwarz unterlegt; solche, die einen Partial-D-Phänotyp, einschließlich einiger D-Kategorien, verursachen sind grau markiert. Die betroffenen Aminosäurepositionen bei „weak D“ sind in intrazellulären oder transmembranären Proteinsegmenten lokalisiert; Aminosäurepositionen bei partial D finden sich in den extrazellulären Proteinschlaufen.

- gativen Erythrozytenpräparaten vermieden werden.
- c) Die Untersuchung mit molekularen Methoden wird unter vermeintlich Rhesus negativen Spendern etliche Blutspender mit Weak-D-Bluten aufdecken, was nachweislich schon zu Anti-D-Immunsierungen bei Transfusionsempfängern geführt hat – eine Schlussfolgerung, die leider auch für unsere Blutzentrale zu trifft.
- d) Die klinische Bedeutung von bekannten und neuen RHD-Allelen wird zunehmend deutlicher werden, sobald die molekulare Typisierung routinemäßig zur Verfügung steht.

### Molekulare Grundlagen der Rhesus-negativen Phänotyps

Der Rhesus-negative Phänotyp wird entweder durch eine Deletion des kompletten RHD-Gens verursacht, durch RHD/CE-Hybridallele, die alle Schlaufen 3 bis 6 betreffen, oder durch Nonsense- bzw. Splice-site-Mutationen. Rhesus-negativ bei Europäern ist fast immer durch die RHD-Deletion bedingt, die man seit kurzem mittels PCR spezifisch nachweisen kann.

### Auswirkungen auf die Rhesus-Bestimmung: Serologie

Klinische Probleme bei Transfusionsempfängern und schwangeren Frauen werden

meist durch einige wenige RHD-Allelen verursacht. Diese Allele kommen in der Bevölkerung eher häufig vor und ihre Träger können leicht Anti-D immunisiert werden. Die D-Kategorie VI ( $D^{VI}$ ) ist unter diesen Allelen die wichtigste. Seit 1996 wird die Rhesus-Typisierung in Deutschland mit monoklonalen Anti-D empfohlen, die nicht mit  $D^{VI}$  reagieren. Daher werden Träger von  $D^{VI}$  bewusst falsch „negativ“ typisiert, um eine Transfusion mit Rhesus-positivem Blut mit der wahrscheinlichen Folge einer Anti-D-Immunsierung zu verhindern. Eine laufende Studie zur Qualitätssicherung unseres Verfahrens ergab, dass die meisten Anti-D-Immunsierungen heute bei Trägern der D-Kategorie IV (nicht mit  $D^{VI}$  zu verwechseln) und des Partial-D-Typs DNB vorkommen.

Im Gegensatz dazu wurde bisher keine Allo-Anti-D-Immunsierungen bei den häufigen Weak-D-Typen (Weak-D-Typ 1, -Typ 2 und -Typ 3) beobachtet. Diese Qualitätssicherung sagt viel darüber aus, dass Patienten mit weak-D sicher Rhesus-positiv transfundiert werden können, wie dies gemäß der Hämotherapierichtlinien in Deutschland seit 1996 vorgesehen ist. Diese häufigen Weak-D-Typen sollten mit monoklonalen Anti-D vom IgM-Typ als D-positiv typisiert werden.

Erythrozytensuspensionen von molekular definierten Weak-D-Typen eignen sich

hervorragend zur Reagenz- und Methodenstandardisierung. Wir empfehlen den Weak-D-Typ 2 zur Qualitätssicherung in Routinelaboratorien, da man solche Blute von Patienten, Schwangeren und Neugeborenen routinemäßig als Rhesus-positiv erkennen muss.

### Auswirkungen auf die Rhesus-Bestimmung: Molekulare Methoden

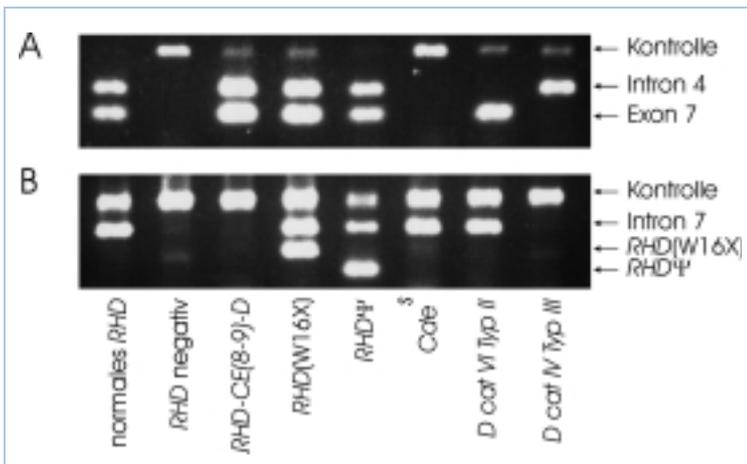
Zur Zeit gelten folgende Indikationen zur RH-Genotypisierung als gesichert:

- Bestimmung beim Föten aus der Amnionflüssigkeit oder den Trophoblastenzellen (Chorionzotten);
- bei massiv transfundierten Patienten, wenn die Standardmethoden der Serologie keine Bestimmung zulassen;
- im Falle von auto- und alloimmunhämatologischer Anämie, wenn die Standardserologie versagen und
- zur Testung auf Weak-D-Typen und andere Formen von RH-Allelen, wenn die Serologie keine Entscheidung über die Transfusionsstrategie bzw. Anti-D-Prophylaxe erlaubt.

Indikation a) ist die Methode der ersten Wahl zur Rhesus-Bestimmung beim Föten, weil weniger invasive und damit weniger gefährliche Prozeduren der Probengewinnung erforderlich sind. Wenn die Indikation zur Genotypisierung gezielt gestellt wird, sind auch die Indikationen b) bis d) sehr kosteneffizient.

### Auswirkungen auf die Rhesus-Bestimmung: Nachweis der RHD-Heterozygotie bei Vätern

Für Jahrzehnte war die Unterscheidung von RHD-heterozygot und RHD-homozygot unmöglich, da alle serologischen Methoden hierfür ungeeignet waren. Eine der aktuellsten Entwicklungen ist der spezifische Nachweis der RHD-Deletion bei Rhesus positiven Probanden. Wenn eine Frau Anti-D immunisiert ist, kann die Chance eines Paares für eine Rhesus-negative – und damit blutgruppenserologisch praktisch risikofrei – Schwangerschaft eindeutig bestimmt werden. Dazu muss der Rhesus positive Vater lediglich mit molekularen Methoden auf die RHD-Deletion getestet werden.



**Abb. 4:** Eine für die Spezifität optimierte RHD-PCR-SSP. Diese empfohlene PCR wird als modulares System durchgeführt, das sich aus zwei Multiplex-Reaktionen zusammensetzt. Eine RHD-Intron-4/Exon-7-„multiplex PCR-SSP“ (Teil A) wird kombiniert mit einer RHD Intron 7 PCR, die als Multiplex-Reaktion zusammen mit den spezifischen Reaktionen für RHD(W16X) und RHDΨ durchgeführt wird (Teil B). Die Ergebnisse zeigen eine normale D-positive Blutprobe (Spalte 1), eine normale D-negative Blutprobe (Spalte 2), mehrere seltene D-negative Proben (Spalten 3 bis 6) und wichtige D-positive RHD-Varianten (Spalten 7 und 8). Die normal D positiven and D negativen Proben sowie die D-Kategorien VI und IV werden in der Reaktion A erkannt. Das RHD-CE(8-9)-D Allel fällt in der Reaktion B durch die fehlende Bande des Intron 7 auf (Spalte 3). Die beiden Allele RHD(W16X) und RHDΨ werden in der Reaktion B durch ihre spezifischen Amplifikationsprodukte nachgewiesen (Spalten 4 und 5). Weitere technische Details dieses empfohlenen RHD-Genotypisierungsverfahrens wurden kürzlich veröffentlicht und sind auch online verfügbar.  
© 2001 Wagner et al., licensee BioMed Central, mit freundlicher Genehmigung der Autoren.

**RHD-Genotypisierung: empfohlene Methode**

Die Testung von spezifischen Nukleotiden im RHD-Exon 7 und in einer zweiten Region vorzugsweise im Exon 4 oder Intron 4 ist üblich. Generell ist die Untersuchung von zwei oder mehr „diagnostischen Stellen“ erforderlich, um die Rate falsch-negativer Ergebnisse zu minimieren. Eine RHD-Genotypisierung ausschließlich basierend auf RHD-spezifischen Sequenzen im Exon 10 kann nicht mehr als verlässliche Methode betrachtet werden. Vor kurzem haben wir eine RHD-PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP) konstruiert, deren Spezifität für die deutsche Bevölkerung optimiert ist und die wir für eine RHD-Genotypisierung empfehlen (Abb. 4). Die erwartete Rate der falsch-positiver Ergebnisse liegt bei der Anwendung dieser Methode unter 1 zu 12 000.

Literatur bei den Verfassern

**Danksagung:** Die Autoren danken Bettina Gerstlauer (MTA) und Pamela Loos (MTA) für die Unterstützung bei der deutschen Übersetzung. Die zugrundeliegenden Arbeiten wurden gefördert vom DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen und der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (Projekt DGTI/fle/00-01).

\* Gekürzte Übersetzung der Veröffentlichung der Autoren Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. Clin. Lab. 2002; 48: 53–59, die im „Technical/Clinical Track: Applications of Molecular Biology to Immunohematology“, 54th Annual Meeting, American Association of Blood Banks am 16. Oktober 2001 in San An-

▶ *Partial-D-Phänotypen weisen veränderte RhD-Proteine auf, die sich so weit vom normalen RhD unterscheiden, dass die Bildung von Allo-Anti-D möglich wird bzw. die Reaktion mit einigen monoklonalen Anti-D-Reagenzien ausbleibt.*

▶ *Drei verschiedene molekulare Ursachen für dieses Phänomen sind bisher bekannt: RHD/CE-Hybridallele sowie der Austausch einzelner oder mehrerer Aminosäuren.*

▶ *Abberante RHD-Allele kodieren Partial-D- oder Weak-D-Phänotypen.*

▶ *Träger der meisten Partial-D- und einiger Weak-D-Typen sind für eine Anti-D-Immunsierung anfällig, weshalb Rhesus-positive Transfusionen vermieden werden sollten.*

▶ *Träger der meisten Weak-D-Typen können kein Anti-D bilden und sollten deshalb mit Rhesus-positivem Blut transfundiert werden.*

▶ *Durch molekulare Methoden können unter vermeintlich Rhesus-negativen Spendern einige mit Weak-D-Blut gefunden werden.*

▶ *Die wachsende klinische Bedeutung bekannter und neuer RHD-Allele korrespondiert mit dem routinemäßigem Einsatz molekularer Typisierungen.*

tonio, USA vorgetragen wurde. Abdruck mit freundlicher Erlaubnis durch den Verlag Klinisches Labor GmbH, Heidelberg.

Anschrift der Verfasser:  
Priv.-Doz. Dr. med. Willy A. Flegel  
Universitätsklinikum Ulm  
Abteilung Transfusionsmedizin  
Helmholtzstraße 10  
D-89081 Ulm  
E-Mail: willy.flegel@medizin.uni-ulm.de  
Internet: http://www.uni-ulm.de/~wflegel/