

18. Intaglietta M. Microcirculatory basis for the design of artificial blood. *Microcirculation* 1999; 6: 247-258.
19. Zhang L, Looney CG, Qi WN, Chen LE, Seaber AV, Stamler JS, Urbaniak JR. Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Appl Physiol* 2003; 94: 1473-1478.
20. Nakai K, Togashi H, Yasukohchi T, Sakuma I, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A. Preparation and characterization of SNO-PEG-hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material. *Int J Artif Organs* 2001; 24: 322-328.
21. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997; 276: 2034-2037.
22. Gladwin MT, Ognibene FP, Pannell LK, Nichols JS, Pease-Fye ME, Shelhamer JH, Schechter AN. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9943-9948.
23. Kuchan MJ, Jo H, Frangos JA. Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *Am J Physiol* 1994; 267: C753-758.
24. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Burch JM, Haenel JB, Garcia J, et al. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 113-120.
25. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Ness PM, Norris EJ, Carson JL, et al. The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable. *J Am Coll Surg*. 2002; 195: 445-452.
26. Levy JH, Goodnough LT, Greilich PE, Parr GV, Stewart RW, Gratz I, et al. Polymerized bovine hemoglobin solution as a replacement for allogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: results of a randomized, double-blind trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 35-42.
27. Baldwin AL, Wiley EB, Alayash AI. Comparison of effects of two hemoglobin-based O(2) carriers on intestinal integrity and microvascular leakage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1292-301.

Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 267-274

Ontwikkeling van moleculaire diagnostiek van bloedgroepen binnen de bloedbank

P.A. MAASKANT-van WIJK¹ en G.H.M. GROOTKERK-TAX^{1,2}

De ontwikkeling van moleculair-biologische technieken heeft het mogelijk gemaakt de genetische achtergrond van veel bloedgroepsystemen te ontrafelen. Dit betekent dat het nu mogelijk is om op DNA-niveau te typeren voor een bloedgroep en het fenotype te voorspellen. Binnen de dagelijkse praktijk van de bloedtransfusie wordt het genotyperen steeds vaker gebruikt. Vooral wanneer het serologisch lastig is om een bloedgroep te bepalen, zoals in geval van multitransfusees, onbetrouwbare of zeldzame antisera of varianten, kan DNA-typering uitkomst bieden.

Veel van de huidige DNA-typeertesten zijn gebaseerd op de kaukasische bevolking terwijl steeds duidelijker wordt dat er binnen de bloedgroepsystemen een grote etnische variabiliteit bestaat. Daarom vereist het typeren op DNA-niveau een uitgebreide kennis van de genen die coderen voor bloedgroepsystemen in verschillende bevolkingsgroepen. De polymerase chain reaction (PCR) assay die nu gebruikt wordt voor het typeren van RhC en Rhc is een voorbeeld van een test die wij recent hebben aangepast voor typeren in een multiraciale samenleving.

De ontwikkeling van de moleculair-biologische technieken en de groeiende kennis omtrent etnische va-

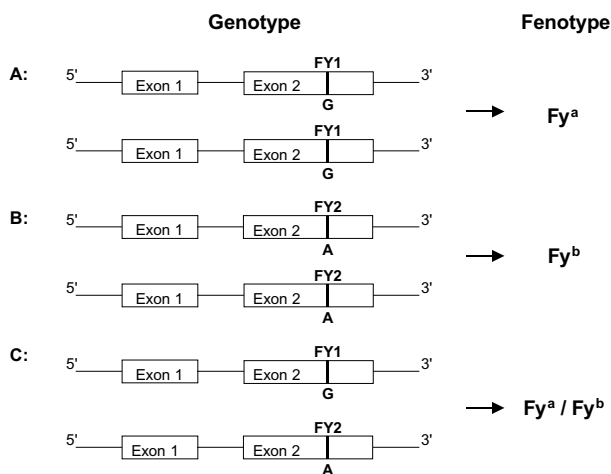
riabiliteit maken dat genotyperen leidt tot betrouwbare voorspellingen van het fenotype. Hierdoor ontstaat de behoefte aan technieken die grotere aantallen monsters kunnen verwerken. Deze technieken zijn nu volop in ontwikkeling. Op dit moment wordt de Pyrosequencing-techniek in de praktijk getoetst en vergeleken met allelische discriminatie met behulp van real-time PCR (Taqman-techniek) wat betreft betrouwbaarheid, kosteneffectiviteit en snelheid. Tevens wordt gewerkt aan de ontwikkeling van een bloedgroepenchip in zowel nationaal als Europees verband. Omdat met deze technieken veel donoren/patiënten voor veel bloedgroepsystemen tegelijk getypeerd kunnen worden, zal het genotyperen in de transfusiepraktijk waarschijnlijk een steeds grotere plaats gaan innemen.

Trefwoorden: genotypering, bloedgroepsysteem, transfusie

Op de celmembranen van de humane erythrocyt komen meer dan 270 bloedgroepantigenen tot expressie. Deze bloedgroepantigenen behoren toe aan 26 erkende bloedgroepsystemen. Elk bloedgroepsysteem wordt gecodeerd door een enkel gen of door een cluster van twee of drie zeer homologe genen. De meeste van deze genen zijn inmiddels gekloneerd en de sequenties zijn bekend. Door van bloeddonoren met verschillende fenotypen de genen in kaart te brengen, is duidelijk geworden wat de genetische achtergrond is van de verschillende bloedgroepantigenen. Hier-

Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest, Rotterdam¹ en Sanquin Research at CLB, Amsterdam²

Correspondentie: P.A. Maaskant-van Wijk, Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest, Wijtamaweg 10, 3015 CN Rotterdam. E-mail: petra.maaskant@bloodrtd.nl

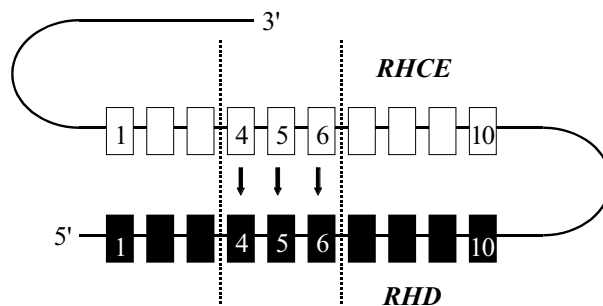


Figuur 1. Moleculaire basis van het Duffy(Fy^a/Fy^b)-polymorfisme. A: Op beide chromosomen het *FY1*-allel (een G-nucleotide op plaats 125: G125); homozygoot *FY1/FY1*; Fy^a -expressie: fenotype Fy^a . B: Op beide chromosomen het *FY2*-allel (A125); homozygoot *FY2/FY2*; Fy^b -expressie: fenotype Fy^b . C: Op het ene chromosoom het *FY1*-allel en op het andere het *FY2*-allel; heterozygoot *FY1/FY2*; Fy^a - en Fy^b -expressie: fenotype Fy^a/Fy^b .

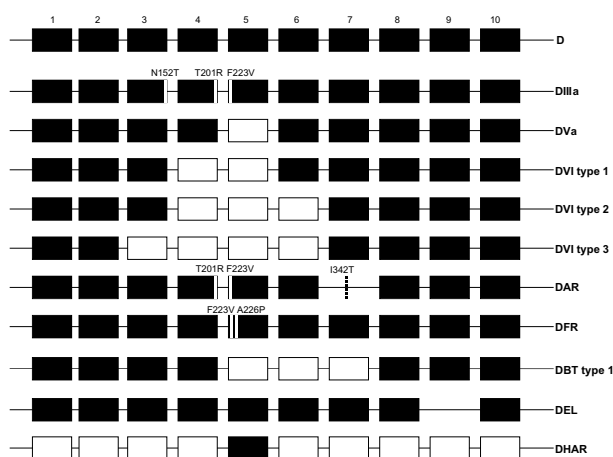
door is het mogelijk om op DNA-niveau een bloedgroep te typeren en te voorspellen welk bloedgroepantigeen tot expressie gebracht zal worden. Momenteel worden DNA-technieken voor het bepalen van een bloedgroep vooral gebruikt ter ondersteuning van de serologie. DNA-analyse wordt bijvoorbeeld gebruikt bij het bepalen van een bloedgroep van een patiënt die meerdere bloedtransfusies heeft gekregen. Serologisch is het dan lastig om onderscheid te maken tussen erythrocyten van de patiënt en die van de donor. Ook bij het maken van onderscheid tussen allo- of auto-antistoffen of wanneer serologische antiseren zeldzaam of minder betrouwbaar zijn of bij serologische typeerproblemen veroorzaakt door variante antigenen, kan DNA-typering uitkomst bieden. Bovendien is DNA-typering erg waardevol in situaties waarin erythrocyten niet voorhanden zijn, zoals in de prenatale diagnostiek. Foetale DNA kan worden geïsoleerd uit vruchtwater of maternaal plasma en hiermee kan de foetale bloedgroep worden voorspeld (1). In dit artikel wordt weergegeven hoe het genotyperen van bloedgroepen tegenwoordig gebruikt kan worden in de dagelijkse praktijk van de bloedtransfusie. De nadruk zal liggen op de klinisch meest belangrijke bloedgroepsystemen met uitzondering van het ABO-systeem. Dit betreft dan de bloedgroepen Rhesus (Rh), Kell, Kidd (Jk) en Duffy (Fy).

Moleculaire basis van bloedgroepen

Antigenen van een bepaalde bloedgroep worden gecodeerd door verschillende allelen van het voor die bloedgroep coderende gen. De verscheidenheid aan allelen van dat gen bepaalt dus mede het aantal verschillende antigenen dat binnen een bloedgroep tot expressie kan komen. Verschillende genetische biologische mechanismen kunnen ten grondslag liggen aan de moleculaire diversiteit van bloedgroepen, zoals nucleotidesubstituties, crossing over, genconversies, alternatieve RNA-splicing, deleties van nucleotiden,



Figuur 2. Verondersteld mechanisme voor *RH*-genconversie. In dit voorbeeld worden de *RHD*-exonen 4, 5 en 6 uitgewisseld met de corresponderende exonen van het *RHCE*-gen. Dit leidt tot het *RHD(1,2,3)-RHCE(4,5,6)-RHD(7,8,9,10)*-hybridegen dat karakteristiek is voor de DVI-type-II variant. Uit: Human Blood Groups door G. Daniels (15).



Figuur 3. Genotypen van diverse variante RhD-fenotypen. ■: exonen afkomstig van het *RHD*-gen, □: exonen/nucleotiden afkomstig van het *RHCE*-gen. ∴: nucleotidesubstitutie niet corresponderend met het *RHCE*-gen. Uit: Human Blood Groups, door G. Daniels (15).

exonen of genen, inserties van nucleotiden en duplicaties van exonen (2). De meeste bloedgroepen worden echter bepaald door polymorfismen van één nucleotide (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs). Dit betekent dat één nucleotide verschil in het gen bepaalt welk bloedgroepantigeen op de erythrocyt tot expressie komt (figuur 1). Voor het detecteren van SNPs zijn relatief eenvoudige PCR(polymerase chain reaction)-assays te ontwikkelen. Naast SNPs komen genconversies het meest voor. Een voorbeeld hiervan is het Rh-bloedgroepsysteem. De Rh-bloedgroepantigenen worden gecodeerd door het *RHCE*-gen, dat codeert voor de RhCE-, RhCe-, RhcE-, en Rhce-eiwitten en het *RHD*-gen dat codeert voor het RhD-polypeptide. Door de grote homologie tussen de twee *RH*-genen en de manier waarop de genen op chromosoom 1p34.3 - p36.1 gelokaliseerd zijn (3), kunnen delen van het *RHD* en *RHCE* onderling uitgewisseld worden, waardoor *RH*-hybridegenen ontstaan (figuur 2). Dit mechanisme en het voorkomen van nucleotidesubstituties zijn de oorzaak van de verscheidenheid aan varianten binnen het Rh-systeem. Van het *RHD*-gen zijn veel varianten beschreven die het typeren op DNA-niveau compliceren (figuur 3).

Tabel 1. Voorbeelden van discrepanties tussen het genotype en het voorspelde fenotype; tabel naar Reid et al. (21)

Moleculair mechanisme	Effect op genotype	Bloedgroepfenotype
Transcriptie	mutatie in GATA-box	Fy(b-)
Alternatieve RNA-splicing	mutatie in splice-site deletie van nt	S-s-; Gy(a-) Dr(a-)
Vroegtijdig stopcodon	deletie van nt: frameshift insertie van nt: frameshift mutatie	Fy(a-b-); D-; Rh _{null} ; Ge: -2, -3, -4; Gy(a-); K ₀ ; McLeod D-; Co(a-b-) Fy(a-b-); r'; Gy(a-); K ₀ ; McLeod
Aminozuurverandering	mutatie	D-; Rh _{null} ; K ₀ ; McLeod
Verminderde hoeveelheid eiwit	mutatie	Fy ^x ; Co(a-b-)
Hybride genen	cross-over genconversie	GP.Vw; GP.Hil; GPTSEN GP.Mur; GP.Hop; D- -; DHAR
Interfererend eiwit	afwezigheid van RhAg afwezigheid van Kx afwezigheid van aa 59-76 van GPA afwezigheid van eiwit 4.1	Rh _{null} zwakke expressie van Kell-antigeen Wr(b-) zwakke expressie van Ge-antigenen
Modificerend gen	<i>ln (LU)</i> <i>IN (JK)</i>	Lu(a-b-) Jk(a-b-)

PCR-assays

Een SNP kan gedetecteerd worden met een zogenaamde ASPA (Allel Specifieke Primer Amplificatie) ook wel bekend als SSP (Sequentie Specifieke Primer). Voor een ASPA worden een sense- en een anti-sense-primer ontwikkeld, waarbij één van deze twee primers specifiek is voor het te detecteren nucleotide van de te bepalen SNP. Voor een volledige typering van een SNP moeten dus twee ASPAs uitgevoerd worden (figuur 4A). Aan de ASPA wordt een interne controle toegevoegd ter voorkoming van fout-negatieve uitslagen.

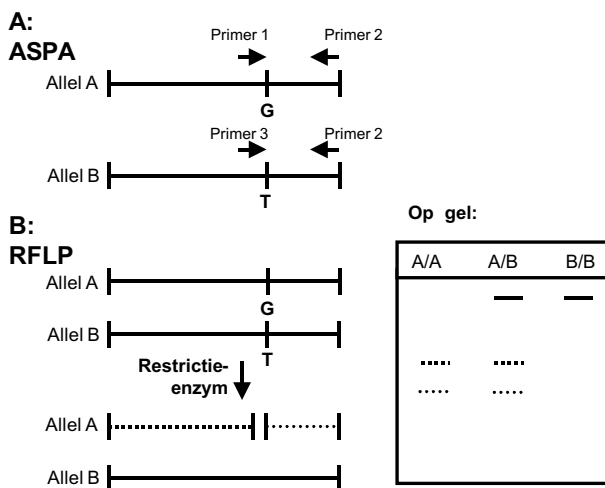
Een ander manier om een SNP te detecteren is met behulp van een PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). In deze assay wordt met behulp van consensus-primers een PCR-product gevormd rondom de SNP. Vervolgens wordt met een restrictie-enzym op de plaats van de SNP het PCR-product wel of niet gedigesteerd. Aan de hand van de lengte van de producten die zijn ontstaan, kan worden afgeleid welk(e) nucleotide(n) van te bepalen SNP aanwezig is (zijn) in het geanalyseerde DNA (figuur 4B).

Etnische variabiliteit

Wanneer genotyperen wordt gebruikt in klinische situaties, is het van belang te weten dat het kan voorkomen dat het genotype niet correleert met de desbetreffende antigeenexpressie op de erythrocyt (tabel 1). Een patiënt met een grotendeels normaal gen dat niet tot expressie komt, is in staat antistoffen te produceren wanneer hij getransfundeerd wordt met antigeenpositief bloed. Dit betekent dat DNA-testen dusdanig ontwikkeld moeten worden dat er getypeerd wordt op die kenmerken van het gen die een goede voorspelling van het fenotype waarborgen. Dit vereist een brede kennis op DNA-niveau. Heel belangrijk hierbij is de etnische variabiliteit binnen bloedgroepsystemen. Voorbeelden van etnische verschillen waarmee bij DNA-typering rekening moet worden gehouden, worden hieronder beschreven voor de bloedgroepen RhD, RhCc, Fy, Kell en Jk.

Het rhesusbloedgroepsysteem

Het rhesusbloedgroepsysteem bestaat uit 46 antigenen die, zoals gezegd, gecodeerd worden door het *RHD*-gen en het *RHCE*-gen. Beide genen zijn gelokaliseerd op chromosoom 1p36.13-p34.3. De rhesus-eiwitten passeren het celmembraan 12 maal en hebben 6 extracellulaire domeinen. Zowel de NH₂- als de COOH-termini liggen intracellulair. De rhesusantigenen zijn erg afhankelijk van de conformatie van het eiwit in het membraan en kunnen gevormd worden door interacties tussen twee of meerdere extracellulaire domeinen. Het RhD-eiwit is zeer immunogeen, 80% van de RhD-negatieve mensen die in contact komen met het RhD-eiwit zullen antistoffen hiertegen vormen.



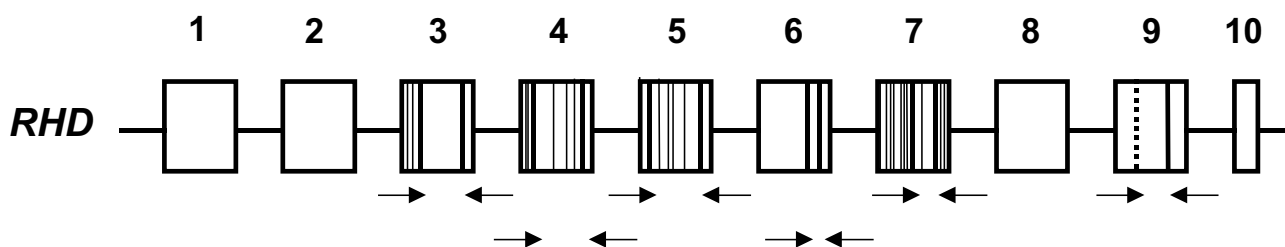
Figuur 4. A: Principe van een Allel Specifieke Primer Amplificatie (ASPA). Primer 1 is specifiek voor nucleotide G van allel A en zal dus in combinatie met primer 2 een product genereren als nucleotide G aanwezig is. Hetzelfde geldt voor primer 3 (specifiek voor nucleotide T van allel B) in combinatie met primer 2. B: Principe van een Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Het consensus-PCR-product wordt gedigesteerd als nucleotide G van allel A aanwezig is. Het product wordt niet gedigesteerd als nucleotide T aanwezig is, wat wijst op de aanwezigheid van allel B. De aanwezigheid van zowel ongedigesteerd als gedigesteerd product wijst op aanwezigheid van beide allelen (heterozygoot).

In kaukasiërs wordt RhD-negativiteit meestal veroorzaakt door deletie van het *RHD*-gen (3). In de Zuid-Afrikaanse negroïde bevolking echter, komen drie verschillende vormen van RhD-negativiteit met hoge frequentie voor, nl. het *RHD*-pseudogen (4), het *RHD-CE-D^s*-hybridegen (5, 6) en de *RHD*-deletie. In 82 RhD-negatieve Zuid-Afrikanen werd de RhD-negativiteit in 67% veroorzaakt door het *RHD*-pseudogen, in 15% door het *RHD-CE-D^s*-hybridegen en in 18% door deletie van het *RHD*-gen. Het *RHD*-pseudogen kenmerkt zich door een duplicatie van 37 baseparen op de grens van intron3/exon 4, waardoor door een verschuiving in het leesframe een stopcodon ontstaat met als gevolg dat het gen niet verder wordt afgelezen en er geen eiwit tot expressie wordt gebracht (4). In het *RHD-CE-D^s*-hybridegen is de 3'-kant van exon 3, en zijn de gehele exonen 4, 5, 6 en 7 van het *RHD*-gen vervangen door corresponderende sequenties vanuit het *RHCE*-gen. Dit gen is karakteristiek voor het (C)cde^s-haplotype dat voor zover bekend geen RhD-epitopen tot expressie brengt, maar wel leidt tot RhC-expressie (5, 6).

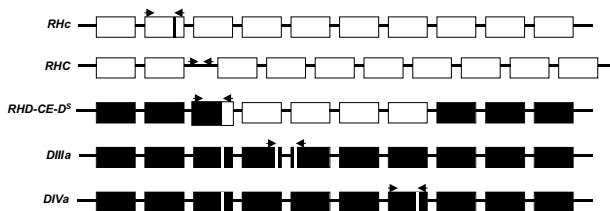
Vele PCR-assays zijn ontwikkeld om het RhD-fenotype te voorspellen (7). Gezien de verscheidenheid aan *RHD*-varianten (figuur 3) verdient het de voorkeur om op meerdere plaatsen het *RHD*-gen te typeren (8, 9). Wanneer slechts op één plaats in het *RHD*-gen zou worden getypeerd, is de kans dat een variant *RHD*-gen als normaal RhD-positief of, afhankelijk van welke plaats op het gen getypeerd wordt, als RhD-negatief getypeerd wordt duidelijk aanwezig. Het bloed van een donor met een variant-*RHD*-gen dat fout-negatief getypeerd wordt, kan antistofvorming veroorzaken in een RhD-negatieve patiënt. Een patiënt met een *RHD*-variant die fout-positief getypeerd wordt, kan antistoffen vormen tegen de ontbrekende epitopen als er getransfundeerd wordt met normaal RhD-positief bloed. Ter voorkoming hiervan hebben wij de *RHD*-multiplex(MPX)-PCR ontworpen die in één PCR-reactie alle *RHD*-specifieke exonen amplificeert (figuur 5). Aan de hand van de aan- of afwezigheid van bepaalde exonen kan dan in de meeste gevallen de betreffende variant geïdentificeerd worden (10). De meeste *RHD*-typeringsassays voorspellen een RhD-negatief fenotype als er geen *RHD*-specifieke fragmenten geamplificeerd worden. Dit geldt alleen als de RhD-negativiteit veroorzaakt wordt door de *RHD*-gendeletie. In geval van een *RHD*-pseudogen of een *RHD-CE-D^s*-hybridegen zijn *RHD*-specifieke sequenties aanwezig die in deze assays leiden tot fout-

positieve voorspelling van het RhD-fenotype. Groot voordeel van de *RHD*-MPX-PCR is dat alledrie de vormen van RhD-negativiteit hiermee gedetecteerd kunnen worden. Afwezigheid van alle *RHD*-specifieke producten impliceert RhD-negativiteit veroorzaakt door de deletie van het *RHD*-gen, de aanwezigheid van alleen het PCR-product specifiek voor exon 9 wijst op de aanwezigheid van een *RHD-CE-D^s*-hybridegen en de afwezigheid van het exon-5-fragment kan wijzen op RhD-negativiteit veroorzaakt door het *RHD* pseudogen. Wanneer op het ene allel een pseudogen en op het andere allel het *RHD-CE-D^s*-hybridegen voorkomt, dan zal de *RHD*-MPX-PCR alleen de aanwezigheid van een *RHD*-pseudogen impliceren en de aanwezigheid van het *RHD-CE-D^s*-hybridegen missen. Omdat het *RHD-CE-D^s* hybridegen geen RhD tot expressie brengt, heeft deze vorm van fout typeren geen nadelige effecten voor de patiënt noch voor de donor.

Het *RHCE*-gen verschilt van het *RHD*-gen op 35 van de 1251 nucleotiden. De polymorfismen die het verschil bepalen tussen Rhc en RhC liggen in exon 1 (G48C respectievelijk) en in exon 2 (3 polymorfismen; C178A, A203G en C307T respectievelijk) van het *RHCE*-gen. Het RhEe-polymorfisme wordt bepaald door C676G in exon 5. Het Rhc-eiwit is zeer immunogeen. Er bestaan grote verschillen tussen de *RH*-genen van populaties met verschillende etnische achtergronden. De meeste genotyperingsassays zijn gebaseerd op resultaten verkregen uit onderzoek met kaukasisch materiaal en er moet rekening gehouden worden met de etnische variabiliteit. Een voorbeeld van het belang hiervan vormt het onderzoek naar het genotypen voor RhCc in een multiraciale samenleving. Het *RHCc*-genotype werd altijd bepaald met behulp van ASPA's specifiek voor het C-nucleotide op plaats 48 (nt C48) voor *RHC* en nt C178 voor *RHc* (5, 11). Gebleken is echter dat er voor *RHC*, met name in de negroïde bevolking, discrepanties bestaan tussen de genotypering en de serologische typering. Binnen de negroïde populatie geeft de *RHC*-ASPA een positieve uitslag in 52% van de gevallen, terwijl de serologie negatief is. Oorzaak hiervan is de G48C-mutatie in het *RHc*-allel die zeer frequent voorkomt bij negroïden, en dus leidt tot een fout positieve voorspelling van het RhC-fenotype (12). Daniels et al. (3) heeft vervolgens een MPX-PCR-assay ontwikkeld gebaseerd op een *RHC*-specifiek insert in intron 2 en C307 voor *RHc*. Typeren voor *RHc* met deze test levert geen problemen op. Het, bij negroïden frequent



Figuur 5. Schematische weergave van de *RHD*-MPX-PCR (10). De pijlen geven de *RHD*-specifieke primers aan. In de MPX-PCR worden in één reactie *RHD*-exon 3, 4, 5, 6, 7 en 9 geamplificeerd, resulterend in fragmenten met een lengte van respectievelijk 111, 126, 157, 96 en 71 baseparen. Een interne controle is toegevoegd ter voorkoming van een fout-negatieve uitslag.

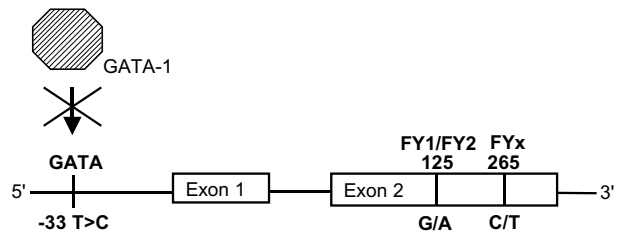


Figuur 6. Schematische weergave van de *RHCc*-, *RHD-CE-D^s*-, *DIIIa*- en *DIVa*-type-1-allelen. De pijlen geven de primers aan die gebruikt worden in de *RHCchex3*-MPX-PCR en in de intron4/exon-7-MPX-PCR (12).

voorkomende, *RHD-CE-D^s*-hybridegen wordt echter niet met deze test gedetecteerd. In ongeveer 38% van de gevallen geeft deze test een fout-negatieve voorspelling van het RhC-fenotype. Dit komt omdat in dit hybride gen intron 2 van *RHD* afkomstig is. Omdat het *RHD-CE-D^s*-hybridegen wel RhC tot expressie brengt, is het van groot belang ervoor te zorgen dat dit gen ook met de *RHCc*-genotyperingstest gedetecteerd wordt. Daarom is binnen onze onderzoeksgroep een nieuwe typeerassay opgezet voor het genotyperen van *RHCc* (12). Aan de bestaande *RHCc*-MPX-PCR werd een ASPA toegevoegd die het D-CE-hybride-exon 3 kan detecteren. Het hybride-exon 3 is echter niet specifiek voor het *RHD-CE-D^s*-hybridegen, maar komt ook voor in de RhD-varianten *DIIIa* en *DIVa* type 1. Om vervolgens onderscheid te kunnen maken tussen het *RHD-CE-D^s*-hybridegen, *DIIIa* en *DIVa* type 1, is een intron 4/exon 7-MPX-PCR ontwikkeld die een intron-4-product oplevert in geval van een *DIIIa* en een exon-7-product in geval van een *DIVa* type 1 (figuur 6). Als een monster positief is voor het hybride-exon 3 en tevens positief is voor *DIIIa* (intron 4) of *DIVa* type 1 (exon 7), dan moet de voorspelling voor het RhC-fenotype negatief zijn. Op deze manier wordt fout-positief typeren voor RhC voorkomen. In 1069 van de 1071 donoren werd met deze test het goede RhC-fenotype voorspeld (0,19% fout negatief en 0,19% fout positief) en in 1071 van de 1071 donoren werd het juiste Rhc-fenotype voorspeld.

Het Duffy-bloedgroepsysteem

Het Fy(Duffy)-glycoproteïne is het product van het *FY*-gen dat is gelocaliseerd op chromosoom 1q21-q25. Het Fy-bloedgroepsysteem bestaat uit 6 antigenen. De *FY1/FY2*(G125A)-SNP bepaalt of er voor het Fy^a-(*FY1*-allel) of het Fy^b-(*FY2*-allel)-antigen wordt gecodeerd (figuur 1). De Fy-bloedgroep is een receptor voor o.a. de Plasmodium-vivax- en de P.knowlesi-malariaparasieten. Fy kent 4 verschillende fenotypen waarvan het Fy(a-b)-fenotype alleen voorkomt in negroïde populaties. Dit fenotype is resistent voor de invasie van bovengenoemde malariaparasieten. De oorzaak van dit fenotype is een (homozygote) mutatie in de GATA-box van het *FY2*-allel. De GATA-box is een DNA-motief in het promotorgebied van het *FY*-gen waar transcriptiefactoren binden die de transcriptie van het gen reguleren. Bij Afrikaanse negroïden komt in de GATA-box een mutatie (-33 T>C) voor die ertoe leidt dat het *FY2*-allel niet tot expressie



Figuur 7. Weergave van het *FY*-gen met de voor DNA-typing belangrijke SNPs.

wordt gebracht op de erythrocyt (figuur 7). De transcriptiefactor GATA-1 kan niet binden aan de gemuteerde GATA-box, waardoor het gen niet wordt afgeschreven en er geen Fy^b-antigeen tot expressie komt. Wanneer alleen getypeerd wordt op de *FY1/FY2*-SNP, dan kan dit leiden tot een vals positieve voorspelling van het Fy^b-fenotype.

Het Fy^x-antigeen kenmerkt zich door een zwakke Fy^b-expressie en wordt veroorzaakt door een C265T-mutatie in exon 2 van het *FY2*-gen (figuur 7). Door deze mutatie wordt in plaats van het positief geladen aminozuur arginine het neutrale cysteïne ingebouwd. Waarschijnlijk leidt dit tot instabiliteit van het Duffy-eiwit, waardoor er minder eiwit in de celmembranen wordt ingebouwd. Het Fy^x-antigeen is moeilijk detecteerbaar met anti-Fy^b (soms lukt het met adsorptie/elutie-technieken) en kan daardoor discrepanties veroorzaken tussen de serologie en de moleculaire biologie.

Het Kell-bloedgroepsysteem

Het Kell-bloedgroepsysteem bestaat uit 24 antigenen. De antigenen K en k worden gecodeerd door, respectievelijk het *KEL1* en *KEL2* allel (SNP: nt T698C). Het Kell-glycoproteïne passeert eenmaal het celmembranen waarbij het NH₂-domein zich intracellulair bevindt. De exacte functie van de Kell-bloedgroep is niet bekend. Ook binnen de Kell-bloedgroep bestaat het null-fenotype, het K_o-fenotype. De moleculaire basis voor het K_o-fenotype is echter nogal divers en bestaat uit mutaties die een stopcodon veroorzaken, splice-site mutaties en mutaties die het transport van het eiwit naar de celmembranen verhinderen (13, 14) (tabel 2). Mutaties die een vroegtijdig stopcodon veroorzaken, hebben tot gevolg dat het gen niet volledig

Tabel 2. *KEL*-mutaties die het K_o-fenotype veroorzaken.

Mutatie	Oorsprong
Cys83Stop (exon 4)	Joegoslavië
Arg128Stop (exon 4)	Afrikaanse Amerikanen
Arg192 Stop (exon 6)*	USA
Gln348Stop (exon 9)	Portugal
Ser363Asn (exon 10)**	USA
Ser676Asn (exon 18)	Israël, USA
g naar a, intron 3 5' splice site	Réunion Island, USA, Taiwan

*gevonden heterozygoot met Ser363Asn, ** gevonden heterozygoot met Arg192Stop of 5'-intron 3 mutatie.

Tabel 3. Mutaties in het JK-gen die het Jk_{null}-fenotype veroorzaken.

Oorsprong	Jk _{null} -frequentie (%)	Allel	Mutatie
Polynesian; Amerikaans Chinees	0,27; onbekend	<i>JK2</i>	3'-acceptor splice site of intron 5 (AG > AA)
Finland	0,03	<i>JK2</i>	Ser291Pro (T871 in exon 9)
Frankrijk	heel zeldzaam	<i>JK2</i>	5'-donor splice site of intron 7 (GT > TT)
Engeland, Tunesië	onbekend	<i>JK1</i>	deletie exon 4 en 5
Zwitserland	onbekend	<i>JK1</i>	Tyr194STOP (C582G in exon 7)

wordt afgeschreven en er geen Kell-eiwit tot expressie wordt gebracht. De mutatie in intron 3 heeft tot gevolg dat het *KEL*-RNA niet goed gespliced wordt. *KEL*-exon 3 wordt overgeslagen, hetgeen resulteert in een verschuiving van het leesframe en het vroegtijdig stoppen van het afschrijven van het gen. De Ser363Asn- en de Ser676Asn-mutaties hebben tot gevolg dat het Kell-eiwit in de cel wordt vastgehouden in het Golgi-apparaat, waardoor het niet in de celmembraan ingebouwd kan worden.

De klinisch relevante antigenen van het Kell-bloedgroepsysteem worden allemaal gecodeerd door SNPs (15). Om te voorkomen dat er door een null-allel een fout-positieve uitslag wordt gegeven, zouden de hiervoor beschreven mutaties met de assays voor de *KEL*-SNPs gecombineerd moeten worden. In de kaukasische en Japanse populatie is de genfrequentie van het *K_o*-gen 0,007. Van andere etnische populaties zijn geen null-allelen bekend.

Het Kidd-bloedgroepsysteem

Het Kidd(*Jk*)-bloedgroepsysteem bestaat uit 3 antigenen. Het coderende gen (*JK*) ligt op chromosoom 18q11-q12 en codeert voor 4 verschillende fenotypen. Dit eiwit functioneert als transporteur van ureum. In verschillende etnische populaties zijn verschillende *JK^{null}*-allelen beschreven (tabel 3). Ook de moleculaire basis voor het Jk_{null}-fenotype is divers en betreft mutaties die een stopcodon veroorzaken, splice-site-mutaties, mutaties die het transport van het eiwit naar het celmembraan verhinderen en exondeleties. Om de vijf verschillende *JK^{null}*-allelen die betrokken zijn bij het Jk_{null}-fenotype te kunnen detecteren, is een MPX-PCR ontwikkeld (16). Wanneer deze test gecombineerd wordt met een ASPA voor de JK1/JK2-SNP wordt de kans op fout-positieve voorspellingen van het Jk-fenotype klein.

Evaluatie van één jaar bloedgroepgenotypering in de dagelijkse bloedtransfusiepraktijk van Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest

Naast het ABO-systeem, zijn Rh, Kell, Duffy en Kidd de klinisch meest belangrijke bloedgroepsystemen in de dagelijkse bloedtransfusiepraktijk. Antistoffen tegen deze bloedgroepantigenen zijn betrokken bij hemolytische ziekte van de pasgeborene en kunnen (ernstige) hemolytische transfusiereacties veroorzaken. Voor deze bloedgroepen zijn PCR-assays opgezet die nu routinematig gebruikt worden op het referentielaboratorium erythrocytenserologie van de Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest. Voor ABO is de combinatie van ASPA's gebruikt die ontwikkeld zijn door

Gassner et al. (17). Voor de RhD(*RHD*)-typering wordt de *RHD*-MPX-PCR gebruikt (figuur 5) (10). Voor RhCc (*RHCc*) wordt de *RHCchex3*-MPX-PCR in combinatie met de intron 4/exon 7-MPX-PCR (figuur 6) (12). ASPA's zijn opgezet voor het typeren van RhEe (*RHE/e: C676G*), Kk (*K1/K2: T698C*) en Jk^a/Jk^b (*JK1/JK2: G838A*) (18). Voor Fy^a/Fy^b (*FY1/FY2: G125A*) en *GATA-FY* (-33 T>C) zijn PCR-RFLP-assays gebruikt (19).

In het afgelopen jaar is voor 88 patiënten (patiëntmateriaal werd ingestuurd door ziekenhuizen uit de regio Zuidwest) aanvullende DNA-typering uitgevoerd (3 *ABO*, 15 *RHD*, 43 *RHEe*, 32 *RHCc*, 22 *KEL*, 21 *JK* and 8 *FY*). De indicaties voor aanvullende DNA-typering waren vooral typeerproblemen bij multitransfusees, problemen bij het maken van onderscheid tussen allo- en autoantistoffen en typeerproblemen bij variante antigenen. 66/88 patiënten hadden recent een bloedtransfusie ontvangen. In 61/66 patiënten werd "the best serological guess" bevestigd. In 5/66 patiënten werd het transfusieadvies aangepast (8,1%). Het betrof hier drie maal het maken van onderscheid tussen een auto- en een alloantistof (RhE, Rhe en Jk^a) en twee maal werd een alloantistof bevestigd door homozygote PCR-resultaten (alloanti-Jk^a bij *JK2/JK2*-ASPA-resultaat) en allo-antiRhE bij *RHE/RHE*-ASPA-resultaat). Van één patiënt was het onmogelijk om met behulp van serologie een bloedgroep te bepalen en daarom zijn voor het transfusieadvies de uitslagen van de DNA-typering gebruikt (*RHCc*, *RHE* en *KEL2*).

Materiaal van 22/88 patiënten werd ingestuurd vanwege typeringsproblemen (3 *ABO*, 13 *RhD*, 3 *RhCc*, 5 *RhEe*). Deze patiënten waren of niet recent getransfundeerd of de transfusiehistorie was niet bekend. In deze groep is één aanpassing van een transfusieadvies gemaakt (4,5%). Het betrof hier een patiënt met de D-variant *DAU2* (20) in plaats van een zwakke RhD-expressie. In het geval van een D-variant bestaat de mogelijkheid tot antistofvorming wanneer getransfundeerd wordt met RhD-positief bloed, terwijl dat bij een RhD-antigeen met zwakke expressie onwaarschijnlijk is. De overige RhD-monsters bestonden uit een DHAR, 2 maal DVI type II, 1 maal DVa, 3 maal zwakke D type 1, 1 maal zwakke D type 2, 1 maal zwakke D type 3 en 3 maal een zwakke D die nog nader gekarakteriseerd moeten worden.

Bovenstaande resultaten geven aan dat DNA-typering een meerwaarde heeft en sommige gevallen zelfs onmisbaar is geworden in de dagelijkse praktijk van de bloedtransfusie en bijdraagt aan het verhogen van de veiligheid van bloedtransfusie.

De toekomst van de moleculaire diagnostiek van bloedgroepen

De ontwikkeling van de moleculair-biologische technieken samen met de groeiende kennis omtrent de genetische variabiliteit binnen bloedgroepsystemen maken dat genotyperen leidt tot betrouwbare voorspellingen van het fenotype. Hierdoor groeit de behoefte aan technieken die meer monsters aankunnen zodat genotyperen breder toepasbaar wordt. Technieken die een hoger aantal monsters kunnen doorvoeren zijn volop in ontwikkeling. Voorbeelden van dit soort technieken, gebaseerd op allelische discriminatie, zijn onder andere real-time PCR (Taqman-technologie), snapshotanalyse, massaspectrometrie, pyrosequencing en de micro-arraytechniek.

Met deze technieken wordt het mogelijk om grote aantallen donoren en patiënten voor veel bloedgroepsystemen tegelijk te typeren. Voor de implementatie van deze technieken is grootschalig onderzoek nodig naar de betrouwbaarheid, kosteneffectiviteit, etc. Binnen de Sanquin Bloedbank regio Zuidwest wordt de Pyrosequencing-techniek in de praktijk getoetst. Om de betrouwbaarheid van de techniek te staven zal op grote schaal de serologische typering van donoren worden vergeleken met de genotypering. Tevens zullen de gekozen SNPs worden getoetst op bruikbaarheid binnen een multiraciale samenleving.

Ook voor de Human Platelet Antigens (HPA) worden typeertesten opgezet. Het HPA-systeem kan serologisch niet getypeerd worden door gebrek aan antisera en de DNA-testen die nu gebruikt worden zijn erg bewerkelijk. Typeertesten voor HPA 1, 2, 3, 5 en 15 worden ontwikkeld met de Pyrosequencing-techniek (Bloedbank Regio Zuidwest) en de Taqman-techniek (Sanquin Research). Beide technieken worden vergeleken op voor implementatie belangrijke aspecten als betrouwbaarheid, kosteneffectiviteit en snelheid.

Zowel in nationaal als in Europees verband wordt gewerkt aan de ontwikkeling van een zogenaamde bloedgroepenchip (micro-arraytechniek). De kracht van de bloedgroepenchip is dat er een groot aantal probes op gezet kunnen worden, waardoor het mogelijk wordt om veel bloedgroepsystemen uitgebreid te typeren. Naast de gangbare typering biedt de chip ook de mogelijkheid om variante antigenen, laagfrequente antigenen, en null-allelen te detecteren. Voor donoren zou naast de bloedgroepen ook gedacht kunnen worden aan virusscreening. Door de beschikbaarheid van een volledig getypeerde donorpopulatie wordt het makkelijker donoren met zeldzame typering te selecteren.

Het genotyperen van bloedgroepen gaat een steeds grotere plaats innemen binnen de bloedtransfusiepraktijk. Het komt binnen handbereik om voor de klinisch meest relevante antigenen donor en patiënt volledig te matchen en antistofvorming te voorkomen.

Literatuur

1. Schoot CE van der, Tax GHM, Rijnders RJP, Haas M de, Christiaens GCML. Prenatal typing of Rh and Kell blood group system antigens: The edge of a watershed. *Transfusion Medicine Reviews* 2003; 17: 31-44.

2. Yazdanbakhsh K. Molecular mechanisms underlying defective expression of blood group antigens. *Transfusion Medicine Reviews* 2001; 15: 53-66.
3. Wagner FF, Flegel WA. *RHD* gene deletion occurred in the *Rhesus box*. *Blood* 2000; 95: 3662-3668.
4. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, et al. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000; 95: 12-18.
5. Faas BHW, Beckers EAM, Wildoer P, Ligthart PC, Overbeeke MAM, Zondervan HA, Borne AEGKr von dem, et al. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion* 1997; 37: 38-44.
6. Daniels GL, Faas BHW, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, Zondervan HA, et al. The Rh VS and V blood group polymorphisms in africans: a serological and molecular analysis. *Transfusion* 1998; 38: 951-958.
7. Flegel WA, Wagner FF, Müller TH, Gassner C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med* 1998; 8: 281-302.
8. Simsek S, Faas BHW, Bleeker PMM, Overbeeke MAM, Cuijpers HThM, Schoot CE van der, et al. Rapid RH D genotyping by polymerase chain reaction-based amplification of DNA. *Blood* 1995; 85: 2975-2980.
9. Avent ND, Martin PG, Armstrong-Fisher SS, Liu W, Finning KM, Maddocks D, Urbaniak SJ. Evidence of genetic diversity underlying Rh D-, weak D (Du), and partial D phenotypes as determined by multiplex polymerase chain reaction analysis of the RHD gene. *Blood* 1997; 89: 2568-2577.
10. Maaskant-van Wijk PA, Faas BHW, Ruijter JAM de, Overbeeke MAM, Borne AEGKr von dem Rhenen DJ van, Schoot CE van der. Genotyping of *RHD* by multiplex polymerase chain reaction analysis of all *RHD*-specific exons. *Transfusion* 1998; 38: 1015-1021. Erratum in *Transfusion* 1999; 39: 546.
11. Faas BHW, Beuling EA, Ligthart PC, Rhenen DJ van, Schoot CE van der. Partial expression of Rhesus c in the Rhesus D polypeptide. *Transfusion* 2001; 41:1136-1142.
12. Tax GHM, Schoot CE van der, Doorn R van, Douglas-Berger L, Rhenen DJ van, Maaskant-van Wijk PA. *RHC* and *RHc* genotyping in different ethnic groups. *Transfusion* 2002; 42: 634-644.
13. Yu LC, Twu YC, Chang CY, Lin M. Molecular basis of the Kell-null phenotype: a mutation at the splice site of human *KEL* gene abolishes the expression of Kell blood group antigens. *J Biol Chem* 2001; 276: 10247-10252.
14. Lee S, Russo DCW, Reiner AP, Lee JH, Sy MY, Telen MJ, Judel WJ et al. Molecular defects underlying the Kell null phenotype. *J Biol Chem* 2001; 276: 27281-27289.
15. Daniels G. *Human Blood Groups*. 2002; 2e ed. Blackwell Science Ltd.
16. Irshaid NM, Eicher NI, Hustinx H, Poole J, Olsson M. Novel alleles at the JK blood group locus explain the absence of the erythrocyte urea transporter in European families. *Br J Haematol* 2002; 116: 445-454.
17. Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, Schönitzer. ABO Glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 1996; 88: 1852-1856.
18. Rozman P, Gassner C. Differentiation of autologous *ABO*, *RHD*, *RHCE*, *KEL*, *JK* and *FY* blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion* 2000; 40: 936-942.
19. Denomme GA, Rios M, Reid ME. *Molecular protocols in transfusion medicine*. 2000 by Academic Press.
20. Wagner FF, Ladewig B, Angert KS, Heymann GA, Eicher NI, Flegel WA. The *DAU* allele cluster of the *RHD* gene. *Blood* 2002; 100: 306-311.
21. Reid ME, Lomas-Francis C. Molecular approaches to blood group identification. *Current Opinions in Hematology* 2002; 9: 152-159.

Summary

Maaskant-van Wijk PA and Grootkerk-Tax GHM. Development of molecular diagnostics of blood group systems within a bloodbank. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2003; 23: 267-274.

The development of molecular biology techniques has made it possible to elucidate the genetic background of many blood-group antigens. In blood-transfusion laboratories these techniques are increasingly used for blood-group genotyping to predict the blood-group phenotype. This has proven to be very useful when serological typing becomes difficult as with multi-transfused patients, when antisera are unreliable or rare or in case of variant antigens.

Most of the DNA-typing tests are based on results from caucasians while there is growing evidence for ethnic variability within many blood-group systems. Therefore, DNA-typing demands knowledge of the genes encoding blood-group sys-

tems in different populations. The PCR-assay that is now being used for typing of RhC and Rhc is an example of an assay we recently adapted for RhC and Rhc typing in a multi-racial society.

The development of molecular biological techniques and the growing knowledge on ethnic variability results in reliable predictions of the blood-group phenotype. This creates a need for medium/high throughput systems. These systems are now being developed. The Pyrosequencing technique is now being tested and will be compared to the allelic discrimination technique with real time PCR (Taqman) for reliability, cost-effectiveness and speed. Also, a blood-group chip is being developed in national as well as in European collaboration.

Because these techniques facilitate typing of many donors/patients for many blood-group systems at the same time, genotyping may have great implications for transfusion practise.

Keywords: genotyping, blood-group system, transfusion