

Medizinische Biotechnologie (Master)
WS 2017/2018

**Polymorphismen von Strukturen der
Erythrozytenmembran (Blutgruppen)**
Einführung Serologie

V. Kiefel

Inst. für Transfusionsmedizin

Blutgruppen

- Alloantigene auf Erythrozyten, genetisch determiniert
- Biochemisch werden
 - Protein- und Peptidantigene (Beispiel Rhesus) von
 - Determinanten aus Oligosacchariden auf Glykoproteinen und Glykolipiden (Beispiel ABO, Lewis) unterschieden, hier kodieren die zugrundeliegenden Gene für Glykosyltransferasen
 - Bei manchen Blutgruppen setzt ihre immunologische Erkennung eine „korrekte“ Glykosylierung voraus.
- **Blutgruppensystem:** von einem Genort gesteuerte Gruppe von Antigenen

Blutgruppensysteme 2017

No.	System name	System symbol	Gene name(s)*	Chromosomal location	CD numbers
001	ABO	ABO	<i>ABO</i>	9q34.2	
002	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, (GYPE)</i>	4q31.21	CD235a CD235b
003	P1PK	P1PK	<i>A4GALT</i>	22q13.2	CD77
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11	CD240
005	Lutheran	LU	<i>BCAM</i>	19q13.2	CD239
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	7q33	CD238
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	19p13.3	
008	Duffy	FY	<i>ACKR1</i>	1q21-q22	CD234
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	18q11-q12	
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	17q21.31	CD233
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	7q22	
012	Xg	XG	<i>XG, MIC2</i>	Xp22.32	CD99†
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	1p34.2	
014	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	12p13-p12	CD297
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	7p14	
016	Landsteiner-Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	19p13.2	CD242

017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	6p21.3	
018	H	H	<i>FUT1</i>	19q13.33	CD173
019	Kx	XK	<i>XK</i>	Xp21.1	
020	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	2q14-q21	CD236
021	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	1q32	CD55
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	1q32.2	CD35
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	11p13	CD44
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	19p13.3	CD147
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	11p15.5	CD151
026	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	15q22.3-q23	CD108
027	I	I	<i>GCNT2</i>	6p24.2	
028	Globoside	GLOB	<i>B3GALNT1</i>	3q25	
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	9p13	
030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	<i>RHAG</i>	6p12.3	CD241
031	FORS	FORS	<i>GBGT1</i>	9q34.13-q34.3	
032	JR	JR	<i>ABCG2</i>	4q22.1	CD338
033	LAN	LAN	<i>ABCB6</i>	2q36	
034	Vel	VEL	<i>SMIM1</i>	1p36.32	
035	CD59	CD59	<i>CD59</i>	11p13	CD59
036	Augustine	AUG	<i>SLC29A1</i>	6p21.1	

*As recognised by the HUGO Gene Nomenclature Committee

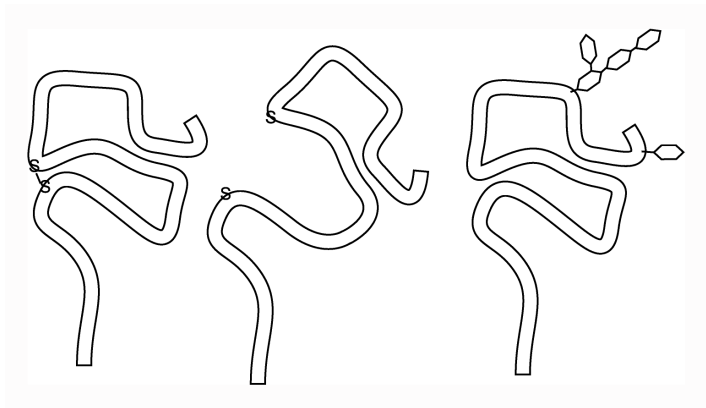
<http://www.genenames.org/>

†MIC2 product

() no gene product on normal RBCs

Klinische Bedeutung von Alloantikörpern gegen Blutgruppen

- Transfusionen, Schwangerschaften → Irreguläre erythrozytäre Antikörper
- Irreguläre erythrozytäre Antikörper können Ursache für einen *morbus haemolyticus neonatorum*, Transfusionsreaktionen sein
- die biologische Wirksamkeit verschiedener Alloantikörper ist sehr variabel, oft abhängig von
 - serologischer Spezifität (Anti-P1: relativ „harmlos“, Anti-Fy^a: hohe Potenz zur Auslösung hämolytischer Transfusionsreaktionen, Anti-D: hohe Wirksamkeit bei Auslösung eines *mhn*)
 - Antikörperkonzentration, -titer
- Alloimmunisierter Patient, der eine Transfusion erhalten soll: Ak-Screening → Differenzierung → Auswahl Ag-negativer Erythrozytenkonzentrate



Prinzip der ABO-Blutgruppenbestimmung

Serumgegenprobe Probandenserum + Testerythrozyten				Antigenbestimmung Probandenery. + Testserum			Blutgruppe
O-Ery.	A1-Ery.	A2-Ery.	B-Ery.	Anti-A	Anti-B	neg. Ko ¹	
–	+	+	–	–	+	–	B
–	–	–	+	+	–	–	A
–	–	–	–	+	+	–	AB
–	+	+	+	–	–	–	0

ABO-Antigene, immunogene Determinanten

Präcursor



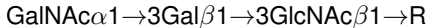
H



2



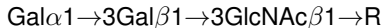
A



2



B



2



Häufigkeiten der ABO-Blutgruppen

Blutgruppe	Häufigkeit (%)
0	41.21
A ₁ , A ₂	43.26
B	10.71
A ₁ B, A ₂ B	4.82

20 % der Personen mit der Blutgruppe A sind A₂ (niedrigere Dichte der erythrozytären A-Determinanten)

Bestimmung der A-Untergruppen A₁, A₂

Reagenz	A ₁	A ₁ B	A ₂	A ₂ B
Anti-A ₁ (verd.)	+	+	–	–
Anti-A ₁ (unverd.)	++	++	(+)	–
Anti-H (verd.)	–	–	++	+
Anti-H (unverd.)	+	(+)	++	+

Agglutination von Erythrozyten durch ein Lectin



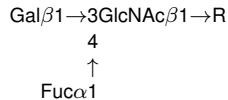
Ulex europaeus (gewöhnlicher Stechginster, [Leguminosae]):
„Anti-H“

Weitere blutgruppenspezifische Lektine

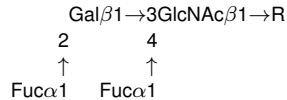
Herkunft	Blutgruppenspezifität
<i>Phaseolus lunatus</i> , Limabohne	A
<i>Dolichus biflorus</i>	A1
<i>Ptilota plumosa</i>	B
<i>Ulex europaeus</i> , gewöhl. Stechginster	H

Le-Antigene

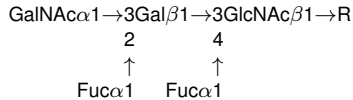
Le^a



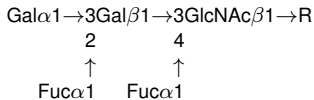
Le^b



ALe^b



BLe^b



Lewis- Sekretor-Merkmale

Genotyp		Erythrozyten	Sekrete	
Lewis	Sekretor		Le ^a	Le ^b
<i>Le/Le</i> oder <i>Le/le</i>	<i>Se/Se</i> oder <i>Se/se</i>	Le(a-b+)	+	+
<i>Le/Le</i> oder <i>Le/le</i>	<i>se/se</i>	Le(a+b-)	+	-
<i>le/le</i>	<i>Se/Se</i> oder <i>Se/se</i>	Le(a-b-)	-	-
<i>le/le</i>	<i>se/se</i>	Le(a-b-)	-	-

- Lewis-Blutgruppensubstanz wird an Erythrozyten adsorbiert
- Se-Genort: 80% „Ausscheider“: ABH-Antigene in Speichel, Körpersekreten
- Le-Genort (*Le*, *le*): **Erwachsene mit *Le*: Nichtsekretoren Le(a+b-), Sekretoren Le(a-b+); Personen mit *le/le*: Le(a-b-)**

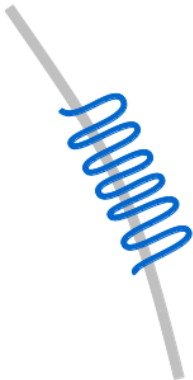
Antikörper gegen Lewis-Antigene

- Anti-Le^a wird **ausschließlich** von Personen mit Le(a-b-)-Phänotyp gebildet
- Anti-Le^b wird **fast ausschließlich** von Personen mit Le(a-b-)-Phänotyp gebildet, selten von Le(a+b-)-Individuen der Blutgruppe A1B oder A1

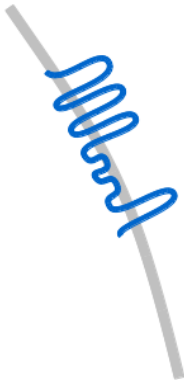
Rhesus-Blutgruppensystem

- Wichtigstes Antigen „D“ (85%), Fehlen von D („dd“) (15%)
- „D“ ist eine Blutgruppe mit extrem hoher Immunogenität
- Quantitative Variante mit verminderter Expression: „D^{weak}“ (0.23-0.5%, früher teilw. als D^u bezeichnet)
- Qualitative Varianten mit (partial-D, Kategorie-D) z. B. D^{VI} (0.02%). **Partial-D-Individuen können Anti-D bilden!**

D



partial D



Rhesus-Blutgruppensystem

- Weitere Merkmale C, $\bar{c}$, (C^w), E, $\bar{e}$
- Alloantikörper: Anti-C, Anti- $\bar{c}$, Anti-E, Anti- $\bar{e}$
- Prinzip der serologischen Typisierung der Rhesusantigene:

Anti-C	Anti-c	Anti- C^w	Anti-D	Anti-E	Anti-e	Phänotyp
+	+	–	+	–	+	CcD.ee
–	+	–	–	–	+	ccddee
+	+	+	+	–	+	C^w cD.ee
–	+	–	–	+	+	ccddEe

- **Klinische Bedeutung:** MHN, hämolytische Transfusionsreaktionen, Autoantikörper reagieren mit den Rh-Proteinen

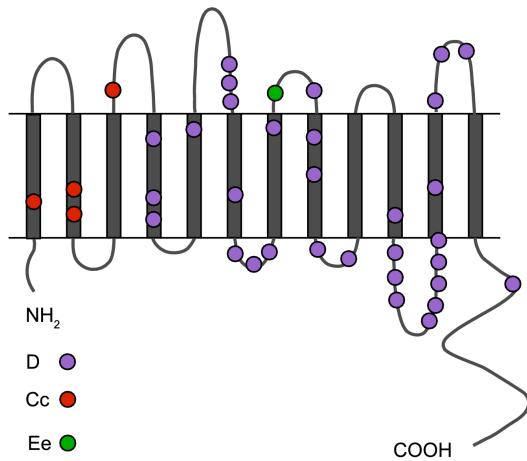
Frequenzen häufiger Rhesus-Phänotypen

Rhesus positiv	
CcDee	30,11%
CCDee	16.63%
CcDEe	10.65%
ccDEe	9.57%
ccDEE	1,72%
ccDee	1,41%
CCDEe	0,12%
CcDEE	0,03%
CCD.EE	0,0003%
Rhesus negativ	
ccddee	15.81%
Ccddee	0,83%
ccddEe	0,43%
CcddEe	0.00016%
CcddEE	0.00016%

Häufigkeiten häufiger Rhesusgenkomplexe in Mitteleuropa

Haplotyp	cde	CDe	cDE	cDe	Cde	cdE	CDE	CdE
Frequenz	0,394	0,431	0,136	0,021	0,011	0.0056	0,0015	< 0,0001





Morbus haemolyticus neonatorum durch Anti-D

- Mütterliche Alloimmunisierung (meist im Wochenbett) führt bei Rhesus-D negativer Mutter (fetomaternale Transfusion) zu Alloimmunisierung
- Bei Folgeschwangerschaften mit D. Feten und Transfer von Anti-D über die Placenta in den Feten: Hämolyse
- Fetale Anämie, *Hydrops fetalis*, Neugeborenes: **Ikterus** mit mögl. neurologischen Dauerschäden: Kernicterus

Morbus haemolyticus neonatorum:

Therapie/Prophylaxe

- Intrauterine Transfusionen
- Beim Neugeborenen Austauschtransfusionen, Phototherapie
- Prophylaxe durch Anti-D an die Mütter bei gegebener Risikokonstellation

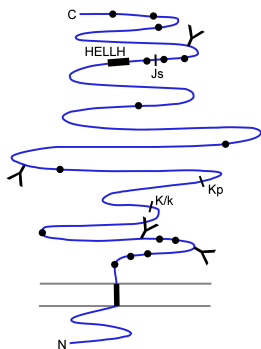
Morbus haemolyticus neonatorum: **Konstellation bei der immunhämatologischen Untersuchung**

- Serum der Mutter: **Anti-D** oder anderer irregulärer erythrozytärer Antikörper
- Direkter Antiglobulintest beim Neugeborenen (DAT, Coombs-Test): **positiv**
- Direkter Antiglobulintest bei der Mutter: negativ
- Eluat Erythrozyten beim Neugeborenen: **positiv** (z. B. Anti-D)

Morbus haemolyticus neonatorum: **Auswahl kompatibler Erythrozyten für Transfusionen beim Feten/Neugeborenen**

- ABO-kompatibel für Neugeborenes (und Mutter), in Zweifelsfällen O
- Alloantikörper-kompatibel in Bezug auf den Alloantikörper der Mutter (dd bei Anti-D der Mutter)
- Kreuzprobe mit
 1. Blut der Mutter
 2. Blut des Kindes, sofern ausreichend vorhanden

Kell-System



- Wichtigste Antigene K und k
- Anti-K nach Antikörpern gegen D der häufigste irreguläre erythrozytäre Antikörper
- Phänotyp-Häufigkeiten:

Genotyp	Frequenz
<i>K/K</i>	0.2 %
<i>K/k</i>	8.8 %
<i>k/k</i>	90.9 %

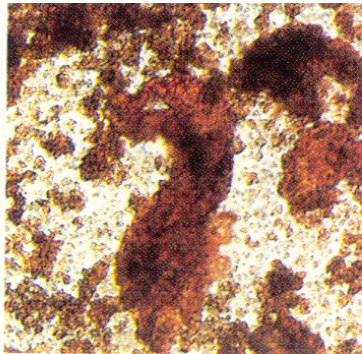
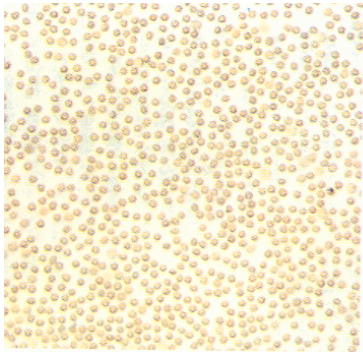
- Klinische Bedeutung: MHN, hämolytische TR

Frequenzen weiterer Antigene des Kell-Systems

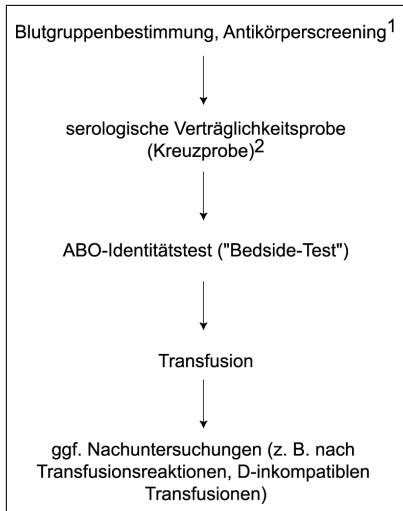
Antigen	Numerische	
	Bezeichnung	% pos Individuen
Kp ^a	K3	2
Kp ^b	K4	99.9
Js ^a	K6	< 0.1
Js ^b	K7	99.9
Côté	K11	> 99.9
Wk ^a	K17	0.3

Transfusionsimmunologische Labormethoden

(Antikörper gegen) Antigene auf
Blutzellen



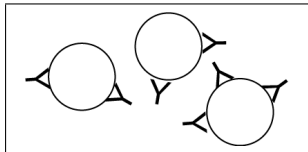
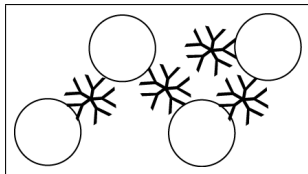
Erythrozytenimmunologische Untersuchungen vor Transfusionen



Proben für (1) und (2) müssen
aus zwei getrennten Entnahmen
stammen

Nachweis erythrozytärer Antikörper in Agglutinationstests

- „Komplette“ Antikörper, meist IgM, Beispiele: Anti-A, -B
- „Inkomplette“ Antikörper, meist IgG, Beispiele: Anti-D, Anti-Kell

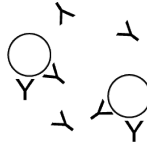


Nachweis „inkompletter“ erythrozytärer Antikörper

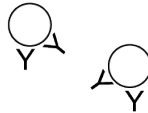
1. Supplemente: Zellsuspension in Albuminlösung (Rinderalbumin)
2. Enzymbehandlung (Proteasen) der Erythrozyten: Bromelin, Ficin, Papain
3. Indirekter Antiglobulintest

Indirekter Antiglobulintest

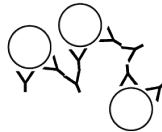
1) Serum und
Testerythrozyten



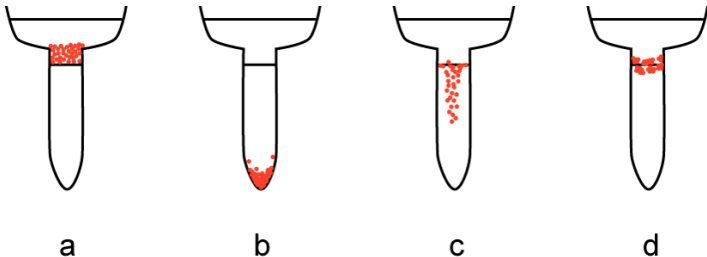
2) Waschen
(freies Ig entfernen)



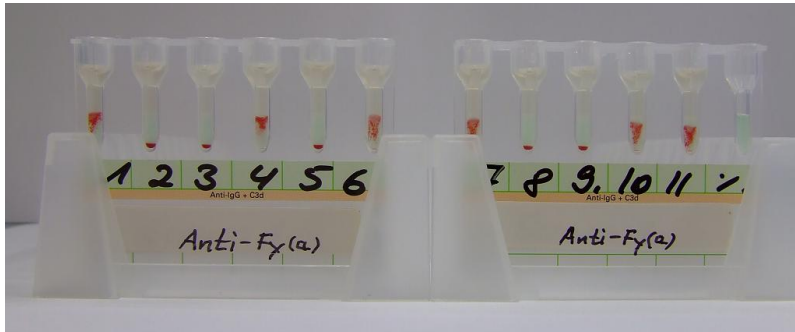
3) Antihumanglobulin
(Coombs)



Prinzip: Antikörpernachweis im Geltest



Antikörperdifferenzierung



Antikörperdifferenzierung

	D	C	E	c	e	K	k	...	Resultat
1	+	+	-	-	+	+	+	...	0
2	+	+	-	+	+	-	+	...	0
3	+	+	-	-	+	-	+	...	0
4	+	+	+	+	+	-	+	...	3
5	-	+	-	+	+	-	+	...	0
6	-	-	-	+	+	-	+	...	0
7	-	-	+	+	+	+	+	...	4
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Antikörperdifferenzierung

	D	C	E	c	e	K	k	...	Resultat
1	+	+	-	-	+	+	+	...	0
2	+	+	-	+	+	-	+	...	0
3	+	+	-	-	+	-	+	...	0
4	+	+	+	+	+	-	+	...	3
5	-	+	-	+	+	-	+	...	0
6	-	-	-	+	+	-	+	...	0
7	-	-	+	+	+	+	+	...	4
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Bewertung: Anti-E

Antikörperdifferenzierung

	D	C	E	c	e	K	k	...	Resultat
1	+	+	-	-	+	+	+	...	4
2	+	+	-	+	+	-	+	...	0
3	+	+	-	-	+	-	+	...	0
4	+	+	+	+	+	-	+	...	3
5	-	+	-	+	+	-	+	...	0
6	-	-	-	+	+	-	+	...	0
7	-	-	+	+	+	+	+	...	4
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Antikörperdifferenzierung

	D	C	E	c	e	K	k	...	Resultat
1	+	+	-	-	+	+	+	...	4
2	+	+	-	+	+	-	+	...	0
3	+	+	-	-	+	-	+	...	0
4	+	+	+	+	+	-	+	...	3
5	-	+	-	+	+	-	+	...	0
6	-	-	-	+	+	-	+	...	0
7	-	-	+	+	+	+	+	...	4
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Bewertung: Anti-E und Anti-Kell

Serologische Verträglichkeitsprobe: „Kreuzprobe“

Majoransatz: Empfängerserum + Spendererythrozyten

Minoransatz: Spenderplasma + Empfängererythrozyten

- Die serologische Verträglichkeitsprobe (Majoransatz) wird in verschiedenen Reaktionsmilieus angesetzt (NaCl-Ansatz, Enzymansatz, indirekter Antiglobulintest), um auch „inkomplette“ IgG-Antikörper zu erfassen.
- Der Minoransatz spielt heute praktisch keine Rolle mehr

Serologische Verträglichkeitsprobe: „Kreuzprobe“

1	2	3	4	5	6	7	8
Kreuzprobe			leer	Empf.		Kons.	
NaCl	Enzym	Eigenans.		Anti-A	Anti-B	Anti-A	Anti-B
–	–	–		+	–	–	–
–	(+)	–		+	–	+	–
+++	+++	–		–	–	+	–

Weitere Blutgruppen

MNSs-System

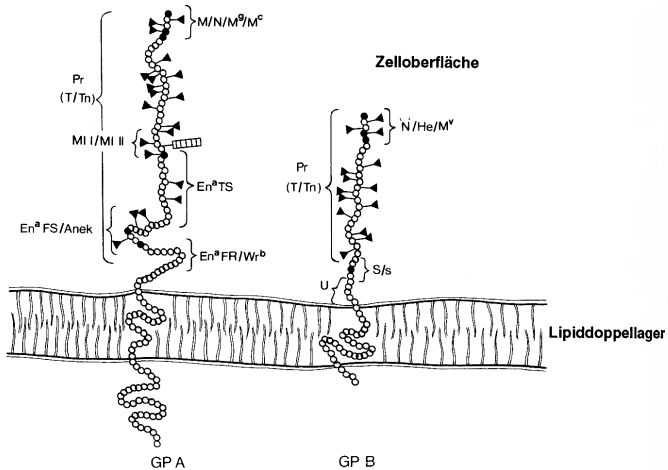
Phänotyp	Weißer	Farbige (USA)
M+, N–	28 %	25 %
M+, N+	50 %	49 %
M–, N+	22 %	26 %

Phänotyp	Weißer	Farbige (USA)
S+, s–	11 %	5.9 %
S+, s+	44 %	25.5 %
S–, s+	45 %	68.1 %
S–, s–	0	1.5 %

MN Phänotyp	Ss-Phänotyp		
	Alle (%)	S+ (%)	s+ (%)
Alle	100	55	89
M+N–	28	72	78
M+N–	50	56	92
M–N+	22	31	97

Unterschiedliche Häufigkeit von S(+)-Individuen bei unterschiedlichen MN-Phänotypen → Assoziation zwischen MN und Ss

MNSs-System



MNSs-System

- Die MN-Antigene sind auf Glycophorin A exprimiert,
- S $\bar{s}$ auf Glycophorin B
- Glykophorine tragen eine Reihe niedrigfrequenter Merkmale
- Ein S(-), $\bar{s}$ (-) Phänotyp häufiger bei Schwarzen
- Anti-M ist relativ häufig, meist optimale Reaktion bei 4 °C, in der Regel unfähig, eine Hämolyse zu bewirken

Duffy (Fy)-System

Phänotyp	Frequenz	
	Weiß	Afrikaner
Fy(a+b-)	17	9
Fy(a+b+)	49	1
Fy(a-b+)	34	22
Fy(a-b-)	< 0.1	68

- Anti-Fy^a, Anti-Fy^b können schwere Hämolyse verursachen
- Duffy Glykoprotein **Chemokinezeptor** (IL-8, MGSA: *melanoma growth stimulatory activity*)
- Personen mit Fy(a-b-)-Phänotyp sind vor Infektionen mit *plasmodium vivax* (M. tertiana) geschützt

Kidd (Jk)-System

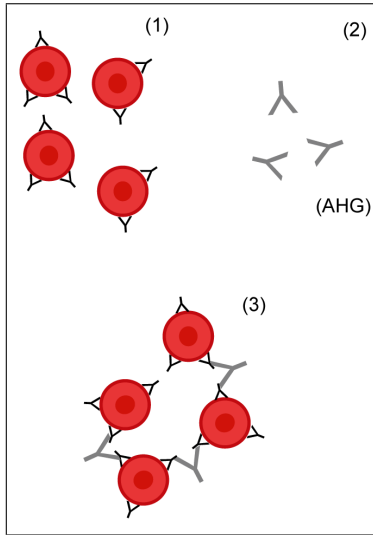
Phänotyp	Frequenz
Jk(a+b-)	27.5
Jk(a+b+)	49.4
Jk(a-b+)	32.1
Jk(a-b-)	< 0.1

- Antikörper gegen die Merkmale des Jk-Systems können schwere Hämolysen verursachen
- Funktion des die Jk-Merkmale tragenden Proteins ist die eines Harnstofftransporters (Erythrozyten mit Jk(a-b-) Phänotyp lysieren in 2 Mol Harnstofflösung langsamer als normale Erythrozyten)

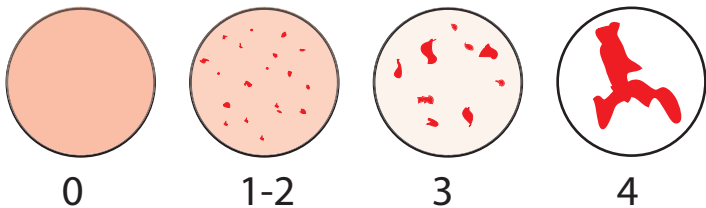
Autoimmunhämolytische Anämie vom Wärmetyp

- IgG Autoantikörper gegen Erythrozyten (Untersuchungsverfahren: direkter Antiglobulintest)
- Patienten aller Altersgruppen betroffen, die meisten Erkrankungen treten zwischen 60 und 70 Jahren auf, etwa 60 % der betroffenen Patienten sind weiblich,
- Symptome: Blässe, Schwächegefühl, Ikterus, seltener Fieber, Hämoglobinurie,
- Bei 50–60% der Patienten mäßige Splenomegalie,
- Typisch ist eine Erhöhung der Retikulozytenzahl, bei manchen Patienten wird aber auch eine Retikulozytopenie festgestellt.

Direkter Antiglobulintest



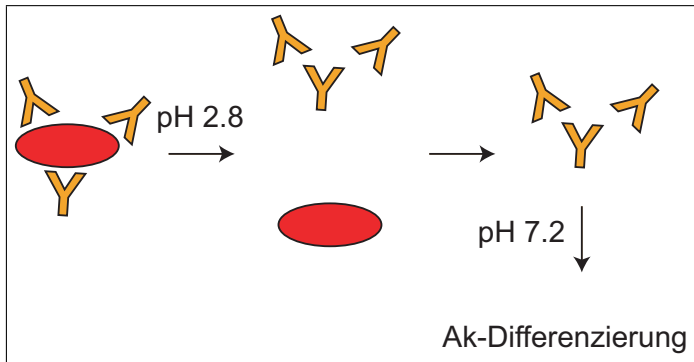
Erythrozyten-Agglutination: Scores



Reaktionsstärke des direkten Antiglobulintests (DAT) und quantitativ bestimmte IgG-Beladung von Erythrozyten

DAT Score	Moleküle IgG/Erythrozyt
0	<25-100
(1) oder 1/2	120
1+	200
2+	300–500
3+ und 4+	>500

Charakterisierung von Antikörpern auf Erythrozyten: **Elution**



Indikationen zum direkten Antiglobulintest

- Autoimmunhämolytische Anämie (→ erythrozytärer Autoantikörper im Eluat)
- Transfusionsreaktion, z. B. verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion (→ irregulärer erythrozytärer Alloantikörper im Eluat)
- Neugeborenes mit einem *morbus haemolyticus neonatorum* (→ irregulärer erythrozytärer Alloantikörper im Eluat)

Inhalt der Kurseinheit

- 1. Aufgabe** Bestimmung von ABO-Blutgruppe und von Isoagglutininen
- 2. Aufgabe** Bestimmung des Merkmals Rhesus D
- 3. Aufgabe** Kreuzprobe: Majortest
- 4. Aufgabe** Identitätstest am Krankenbett („Bedside-Test“)
- 5. Aufgabe** Ableitung des Rh-Phänotyps aus einer Antigenbestimmung

Vorbereitung auf die Kurseinheit

1. **Dies ist eine Praktikumseinheit!** Kittel mitbringen
2. Praktikumsanleitung lesen und die darin empfohlene Literatur (Skript) (<https://transfusion.med.uni-rostock.de/lehre/>)
3. Praktikumsanleitung mitbringen

Fragen, Fakten/Stichworte zum Einprägen

- Häufigkeit der Merkmale des ABO–Blutgruppensystems in Europa?
- Was versteht man unter ‘Sekretoreigenschaft’? Wie häufig ist diese annähernd bei Europäern?
- Was besagt die „Landsteiner–Regel“?
- In welcher Weise werden die ABO–Antigene bei der Bluttransfusion berücksichtigt?
- Immunodeterminante Gruppen der ABO– und Le–Blutgruppensysteme?
- Lewis–Antigene auf Erythrozyten adsorbiert, Zusammenhang zwischen Lewis–Phänotyp und Sekretoreigenschaft?
- Wichtigste Merkmale des Rhesus–Blutgruppensystems?
- Welche Gene kodieren für die Rhesus–Antigene?
- In welcher Weise werden Rhesusantigene bei der Bluttransfusion berücksichtigt?
- Wie häufig ist das Rhesus–D–Antigen bei Europäern?
- Individuen mit einem ‘D^{weak}’ gelten als D–positiv, sie bilden kein Anti–D nach Übertragung von D–Erythrozyten, Individuen mit einem Partial D dagegen können u. U ein Anti–D bilden.

Fragen, Fakten/Stichworte zum Einprägen

- Wie bezeichnet man die beiden wichtigsten Merkmale des Kell-Blutgruppensystems?
- Worin liegt die praktische Bedeutung von Antikörpern gegen hochfrequente Antigene?
- Blutgruppenbestimmungen im ABO-System schließen immer eine Bestimmung der Serumeigenschaften (Isoagglutinine) ein.
- Aus serologischen Testresultaten zur Bestimmung der Rhesus-Antigene C, c, D, E, e sollten die Rhesus-Phänotypen (Beispiel für die übliche Schreibweise: CcD.ee) abgeleitet werden können.
- Beschreiben Sie das Prinzip, das der A₁/A₂-Untergruppenbestimmung zugrundeliegt.
- Mögliche Ausprägungen des Rhesus D-Antigens sind D positiv, D^{weak}, Partial-D, D negativ. Wie unterscheiden sich diese?
- Aus Reaktionsmustern eines Serums mit Zellen eines Differenzierungspanels sollte(n) die serologische(n) Spezifität irregulärer erythrozytärer Antikörper abgeleitet werden können.