

Krvné skupiny erytrocytov Junior a Langereis

Marta Kučeráková
HTO Čadca

Kľúčové slová: ABC proteíny, anti-Jr^a, anti-Lan, hemolytická choroba plodu a novorodenca, hemolytická potransfúzna reakcia,

Súhrn: Antigény s vysokou frekvenciou výskytu Lan a Jr^a boli prvýkrát opísané v roku 1961 resp. 1970. Krvné skupiny Langereis (LAN) a Junior (JR) sa však podarilo zadefinovať len pred niekoľkými mesiacmi vďaka objasneniu ich biochemickej podstaty a genetického podkladu. Obidva skupinové systémy sú lokalizované na ABC proteínoch, ktoré majú významnú úlohu pri ochrane organizmu proti toxínom a pri transporte niektorých látok vrátane porfírinov.

Protilátky anti-Jr^a a anti-Lan patria do kategórie klinicky významných: anti-Lan a anti-Jr^a môžu zapríčiniť akútnu hemolytickú potransfúzna reakciu i spôsobiť hemolytickú chorobu plodu a novorodenca.

Keďže na Slovensku máme niekoľkých pacientov s týmito protilátkami, nie je problematika LAN a JR len literárnou záležitosťou a nasledujúce riadky sú venované stručnému súhrnu dobre známych i nových faktov o týchto krvných skupinách.

História skupinových systémov JR a LAN

Prvých 5 nálezov anti-Jr^a opísali v krátkom časovom období Stroup a MacIlroy v r.1970. V ISBT klasifikácii mal Jr^a antigén dlhodobo svoje miesto medzi antigénmi s vysokou frekvenciou výskytu (HFA) v sérii 900 ako 900012, po roku 1990 po zmene nomenklatúry v sérii 901 a to konkrétne s číselným označením 901005.

Antigén Langereis získal pomenovanie podľa prvého známeho Lan negatívneho prabanda identifikovaného v r.1961, u ktorého sa po podaní krvi rozvinula ťažká hemolytická potransfúzna reakcia a podobne ako Jr^a bol klasifikovaný v skupinke HFA ako 901002.

Koncom roku 2011 sa začali objavovať správy o úspešnej identifikácii proteínov zo skupiny ABC, ktoré „nesú“ epitopy Jr^a a Lan a génoch kódujúcich tieto membránové transportéry. Na základe početných prác (hlavne Saisonovej, Zelinskeho a kol) sa tak definitívne v ISBT nomenklatúre „udomácnujú“ nové krvné skupiny JR (032) a LAN (033) [1, 6, 7, 22].

Terminológia skupinových systémov Junior a Langereis

ISBT označenie skupinového systému Junior:

- symbolom: **JR**
- číslom: 032

Antigén: Jr^a (032001); iné mená antigénu: Junior

ISBT označenie skupinového systému Langereis:

- symbolom: **LAN**
- číslom: 033

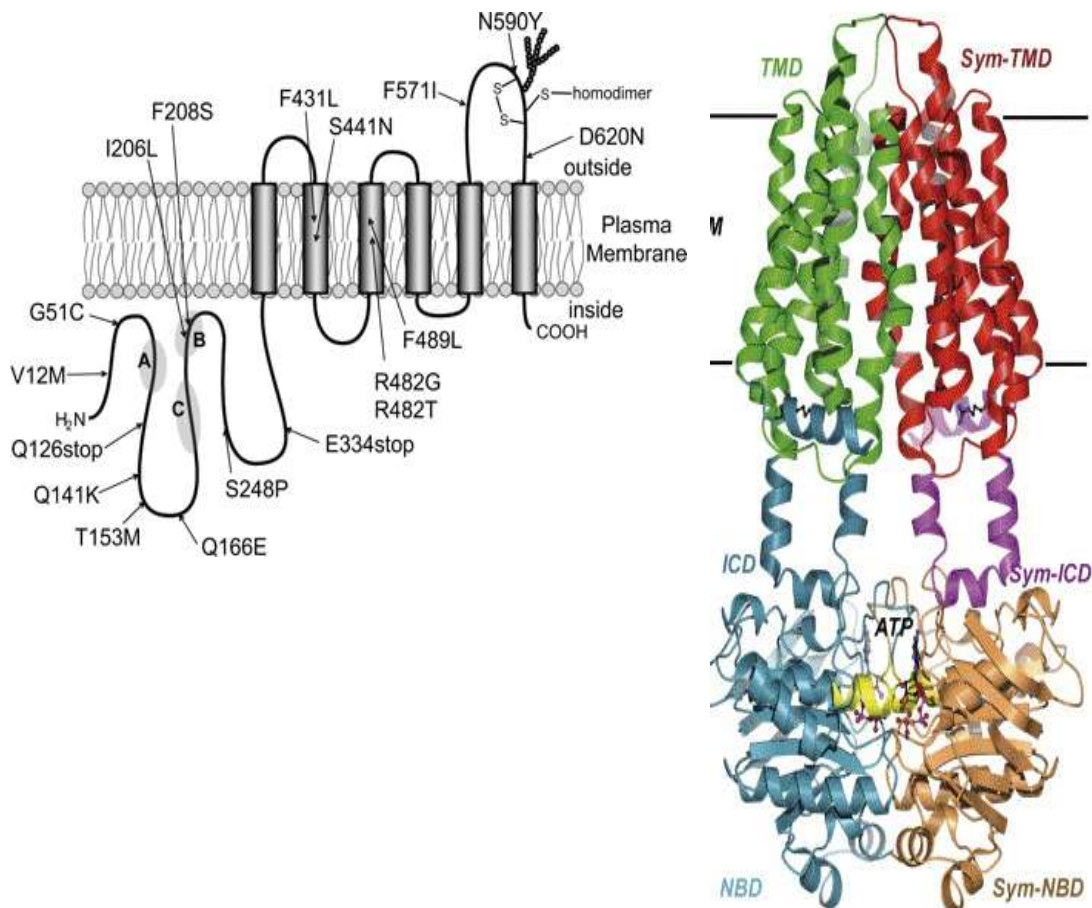
Antigén: Lan (033001); iné mená a označenia antigénu: Langereis, Gonsowski (Gn^a), So [1, 7, 22].

Lokalizácia skupinových systémov Junior a Langereis

Skupinové systémy JR a LAN sú lokalizované na ABC transportných proteínoch, ktoré sa skladajú z 2 hlavných domén: TMD (transmembránovej) a NBD (nukleotid-viažúcej). Niekoľkokrát prestupujú bunkovou membránou. Sekvencie TMD zodpovedajú substrátovej špecificite konkrétneho transportného proteínu. NBD alebo ABC-binding cassette doména obsahuje väzbové miesto pre molekulu ATP, ktorá je zdrojom energie. Obsahuje klasické Walker A, Walker B a ABC označené motívy- sekvencie aminokyselín.

- JR sa nachádza konkrétne na ABCG2 proteíne, patriacom k ABC a podskupine G s číslom 2 (pre Homo sapiens). Molekulová hmotnosť ABCG2 je 70 kDa a skladá sa zo 655 aminokyselín. Tento proteín je tiež známy ako BCRP (breast cancer resistance protein), CD338 a v súčasnosti JR glykoproteín. Funkčná molekula má pravdepodobne podobu diméru alebo tetraméru zloženého z rovnakých podjednotiek.

- LAN je „umiestnený“ na ABCB6 proteíne, patriacom tiež do rodiny ABC podskupiny B (MDR/TAP) a s číslom 6 (pre *Homo sapiens*). V bunkovej membráne sa nachádza ako homodimér, skladá sa z 842 aminokyselín a má 93,9 kDa [1, 18, 31].
- JR molekula je orientovaná NH₂ terminálnym koncom smerom von a COOH smerom dnu z perspektívy erytrocytovej membrány. ABCB6 má opačné usporiadanie v plazmatickej membráne.



Obr.1. Molekula ABCG2, vpravo 3-rozmerný model diméru [15, 27]. (Jr (a-) fenotyp je spôsobený napr.: R113X, Q126X, R236X, Q244X, R246X, G262X, Q531X)

Funkcia ABCG2 a ABCB6

ABC proteíny vo všeobecnosti zohrávajú dôležitú úlohu v bunkovej homeostáze.

- Najvýznamnejšou úlohou ABCG2 a ABCB6 je ochraňovať organizmus pred toxínmi ich transportom z bunky.
- ABCG2 zabezpečuje transport rôznych molekúl vrátane urátov, porfirínu, riboflavínu. Predpokladá sa význam over expresie ABCG2 pri multi-drug rezistencii nádorových buniek na chemoterapeutiká. Lan proteín patrí medzi MDR/TAP, ktoré spôsobujú rovnako rezistenciu na lieky. ABCG2 je exprimovaný na kmeňových bunkách hepatopózy a predpokladá sa jeho význam pri regulácii hemotopózy.
- ABCB6 a ABCG2 sa významným spôsobom podieľajú na modulácii porfirínovej koncentrácie v bunkách vo fyziologických i patologických podmienkach. ABCB6 sa nachádza v mitochondriálnej membráne a podporuje vstup porfirínu do mitochondrií, tým ovplyvňuje syntézu hému a hém-obsahujúcich proteínov. ABCG2 sa nachádza aj v plazmatickej membráne a molekula je orientovaná tak, že zabezpečuje transport nadbytku porfirínov z bunky. ABCG2 je v membráne aktívnejšia počas hypoxie, počas ktorej sa vo zvýšenej miere tvoria porfiríny a týmto mechanizmom sa zrejme chránia bunky pred ich nadmernou akumuláciou [5, 12].

Tkanivová distribúcia ABCG2 a ABCB6

- ABCG2 sa nachádza v mnohých tkanivách, vysoká expresia je napríklad v placentе a v hematoencefalickej bariére, ďalej na hepatocytoch, v bunkách proximálnych tubulov obličiek, v hematopoetickom tkanive, na zrelých erythrocytoch, v bunkách stien vén a kapilár.
- ABCB6 je exprimovaný na povrchu erythrocytov a bol tiež potvrdený v plazmatickej membráne buniek hepatocelulárneho karcinómu.
- Antigény Lan a Jr^a sú dokázateľné už na pupečníkových erythrocytoch [8, 27].

Fenotypy JR a LAN

Skupinový systém Junior a Lan zatiaľ rozpoznávajú len po 1 antigéne: Jr^a, Lan, ktoré patria do skupiny antigénov s vysokou frekvenciou výskytu v populácii, t.j. antigénov nachádzajúcich sa u viac ako 90 %, de facto 99 % populácie.

Fenotypy Jr(a-) a Lan- sú veľmi zriedkavé.

Jr(a-) sa potvrdil u príslušníkov rôznych populácií: najmä v Japonsku, kde prevalencia tohto fenotypu je približne 0,066 %, nižší výskyt je u beduínskych Arabov, v Mexiku, v severnej Európe. Niekoľko prípadov je tiež u nás na strednom Slovensku, konkrétne v rómskej komunite. Genetickým podkladom sú nonsense a frameshift mutácie ABCG2 génu (minimálne 12 aliel kóduje Jr(a-) fenotyp). Jr(a-) u Európskych Cigánov je konkrétne spôsobený nonsense mutáciou 706C>T, ktorej výsledkom je alterácia JR glykoproteínu v pozícii Arg236X [7, 23, 30, 31].

Lan- fenotyp je spôsobený nonsense, frameshift a split-site mutáciami (v súčasnosti je známych minimálne 10 ABCB6 „nulových“ mutácií). Prevalencia Lan- fenotypu u Japonských darcov krvi bola stanovená na 0,002 %. Existujú kvantitatívne varianty, tzv. weak Lan, kedy je expresia antigénu veľmi slabá a môže byť zamenená s Lan- fenotypom [8, 26].

Genetika skupinových systémov JR a LAN

- Gén pre JR ABCG2 je lokalizovaný na 4q22.1, skladá sa zo 16 exónov a má približne 68,6 kb.
- Gén pre LAN ABCB6 je lokalizovaný na 2q36, skladá sa zo 19 exónov a má približne 9 kb.
- Dedičnosť fenotypu Jr(a-) a Lan- je autozómovo recesívna [1, 6, 30].

Klinický význam LAN a JR

- Fenotypy Lan- a Jr(a-) nie sú asociované s chorobnými symptómami.

Protilátky

Klinický význam anti-Jr^a je kontroverzný. Keďže pacientov s fenotypom Jr(a-) nie je v populácii veľa, v literatúre sa objavujú len práce v podobe kazuistik.

Na jednej strane sú v súvislosti s anti-Jr^a **a hemolytickou chorobou plodu a novorodenca** uvedené početné prípady klinickej nevýznamnosti protilátky [21] alebo HChN s miernym priebehom, na druhej strane kazuistiky HChN s obrazom hydropsu plodu a ťažkej anémie plodu/novorodenca/ [4, 13, 27]. Otázkou zostáva validita výsledkov vyšetrení.

- Peyrard dokumentuje tehotenstvo 28-ročnej ženy Kaukazkej populácie- Španielskej Rómky- s pozitívnou transfúznou anamnézou, anamnézou 2 abortov a 1 pôrodu v termíne, monitorovanej od 29. týždňa gravidity (t.g.). Sonografické vyšetrenie poukázalo na fatálnu kardiomegáliu a hepatomegáliu. Skrining antierythrocytových protilátok tehotnej bol pozitívny, protilátka bola namierená proti antigénu s vysokou frekvenciou výskytu, nebola však špecifikovaná. V 36.t.g. žena porodila emergentne S.C. Novorodenec mal známky hydropsu a ťažnú anémiu. Na následky HChN zomrelo dieťa 30 hod po pôrode. Dodatočne sa vyšetroval titer anti-Jr^a (nepriamy antiglobulínový test NAT 1:1024) a podtrieda IgG protilátky (IgG1 a malý podiel IgG4). Podobný fatálny priebeh anti-Jr^a HChN opisali Arriaga a kol. u 39-ročnej ženy Kaukazkej populácie s anamnézou viacerých tehotenstiev [3, 21].
- Masumoto a kol. uvádzajú prípad 20-ročnej, 1. krát tehotnej ženy s anti-Jr^a s titrom 1:64 v NAT, u ktorej bolo tehotenstvo predčasne ukončené v 37.t.g. pre anémiu plodu (hodnota DeltaOD450 bola v nižšej strednej zóne). U novorodenca sa nevyvinula hyperbilirubinémia vyžadujúca výmennú transfúziu a anémia novorodenca sa riešila ferropreparátmi a EPO [16].
- Ishihara a kol. opisali kazuistiku Japonskej ženy s anti-Jr^a, ktorej plod v 29. t.g. mal obraz hydropsu a kordocentézou sa potvrdila ťažká anémia s hladinou Hb 23 g/l. Po 4 intrauterinných transfúziách sa zlepšil klinický nález a v 35. t. g. žena porodila zdravé dievčatko s pôrodnou hmotnosťou 2120 g a hladinou Hb 72 g/l a po následných 2 transfúziách sa ďalej anemický syndrom neprehlboval a nevyvinula sa hyperbilirubinémia vyžadujúca intervenciu [10].

- Sasamoto a kolektív observovali Japonskú ženu s titrom anti-Jr^a 1:1024 v 20 t.g. Fetálne MCA-PSV (prietok na vrchole systoly v arteria cerebri media) malo hodnotu 1,5 násobku mediánu, preto bol indukovaný pôrod v 33 t.g. Novorodenec mal hladinu Hb 82 g/l, hladinu Bil 15 umol/l a Rtc 4,5 %. Dieťa nemalo klinické a laboratórne známky hemolýzy. Autori uvažujú o anti-Jr^a aloimunizácii ako príčine anémie bez priameho evidentného hemolytického procesu [24].

Protilátka anti-Jr^a a hemolytická potransfúzna reakcia

- V prípadoch nálezu anti-HFA je často veľmi ťažké vyjadriť sa k potencionálnej klinickej významnosti protilátky. Jednou z metódik, ktorá má k tomu napomôcť je MMA (monocyte monolayer assay). Arndt a Garraty retrospektívne zhodnotili výsledky 20 ročného obdobia používania MMA. Došli k záveru, že ak hodnota MMA je nižšia ako 5%, protilátka nie je klinicky významná, ak dosahuje 5,1 až 20% riziko hemolytickej potransfúznej reakcie po podaní inkompatibilnej krvi je asi 1/3 a pri hodnote viac ako 20% asi 2/3 [2].
- Kwon a kol. uvádzajú kazuistiky 2 pacientov s rovnakou hodnotou titra anti-Jr^a 1:32 pred hemoterapiou. V prvom prípade 69-ročný polytransfundovaný Japonec po podaní 4 Jr(a+) TU nemal žiadne klinické a laboratórne známky hemolýzy. U druhej 45-ročnej pacientky sa objavili 6 hod po podaní Jr^a inkompatibilnej krvi klinické symptómy akútnej hemolytickej potransfúznej reakcie. U prvého pacienta bol stanovený výsledok MMA 3,3 %, u pacientky 24,5 % [14].
- Kendall použil pri hodnotení anti-Jr^a klasickú metódu ⁵¹Cr-značených Jr(a+) erytrocytov. T ½ týchto erytrocytov bol približne 80 min, čo svedčí o potencionálnej in vivo klinickej významnosti [11].

Protilátka anti-Lan môžu spôsobiť hemolytickú potransfúzna reakciu a hemolytickú chorobu plodu a novorodenca. Protilátka vzniká imunizáciou v súvislosti s tehotenstvom a po podaní transfúzií.

- Anti-Lan vyvolala hemolytickú potransfúzna reakciu vo viacerých dokumentovaných prípadoch.
- Prvý prípad anti-Lan HChN bol zaznamenaný v roku 1969. Novorodenec mal pozitívny PAT a ľahkú anémiu.
Anti-Lan zvyčajne nespôsobuje hemolytickú chorobu plodu a novorodenca, alebo zapríčiňuje len jej miernu formu.
- Anti-Lan protilátka spôsobila minimálne u jedného pacienta AIHA s miernou hemolýzou, s pozitívitou PAT a s oslabeným fenotypom Lan [7, 9, 20, 25, 28, 29].

Laboratórna in vitro charakteristika erytrocytových skupinových systémov JR a LAN

- **antigény Jr^a a Lan**
 - Sérologický dôkaz Jr^a fenotypu umožnili od r.1994 Miyazaki a kol., ktorí pripravili monoklonálnu protilátku anti-Jr^a (MHR0921), podobne Tani a kol. izolovali anti-Lan monoklonálnu protilátku (OSK43) v r.2007 [1, 17].
 - Antigény Jr^a a Lan sú rezistentné na opracovanie ficinom/papaínom, trypsinom, α-chymotrypsínom, pronázou, sialidázou, DTT 200 mM.
- **protilátky anti-Jr^a a anti-Lan:**
 - sú triedy IgG, anti-Jr^a obvykle podtriedy IgG1, niekedy IgG3 a IgG4; anti-Lan IgG1 a IgG3, niekedy IgG2 a IgG4,
 - reagujú v NAT,
 - niekedy viažu komplement [7, 22].

Záver: vďaka novým poznatkom z oblasti biochémie a genetiky sa podarilo rozlúsknuť hádanku s indíciou Jr^a a Lan, ktoré konečne získali svoje miesto v novodefinovaných skupinových systémoch JR a LAN. Polymorfizmus ABC molekúl, ktoré nesú epitopy týchto krvných skupín predznamenáva možnosť objavov nových erytrocytových antigénov. Napriek pribúdajúcim vedomostiam zostáva nezodpovedaná otázka klinického významu protilátok anti-Jr^a a anti-Lan u konkrétneho pacienta. Literárne fakty nás však vyzývajú k zachovaniu obozretnosti najmä v súvislosti s hemoterapiou. Nevyhnutné je vyhľadávanie antigén-negatívnych darcov krvi, predovšetkým spomedzi rodinných príslušníkov pacientov.

Použitá literatúra:

1. Arnaud L. Identification of two new blood group systems, Langereis (LAN) and Junior (JR). *Vox Sanguinis ISBT Science Series* 2012; 7:256 – 259

2. Arndt PA, Garratty G: A retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting the clinical significance of blood group alloantibodies. *Transfusion* 2004; 44:1273-81
3. Arriaga F, Gomez I, Linares MD, Gascon A, Carpio N, Perales A: Fatal hemolytic disease of the fetus and newborn possibly due to anti-Jra. *Transfusion* 2009; 49:813
4. Bolzero U, Bianchini E, Chiesa I, Motta F, Galli L, Lerna F, Riccardi E, Recalde H: A case of anti-Jra alloimmunization in pregnancy. *Blood Transfus* 2005; 3:231-2
5. Borst P, Elferink RO: Mammalian ABC transporters In health and disease. *Ann. Rev Biochem.* 2002, 71:537-592
6. Coghlan G : The JR blood group system: genetic and molecular investigations. *Vox Sanguinis ISBT Science Series* 2012; 7:260 – 263
7. Daniels G: Human blood groups. Blackwell Science 2002 576 s.
8. Helias et al. : ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies a new blood group system Langeresis. *Nature Genetics* 2012; 44:170-172
9. Heuft HG, Genth R, Wittmann G, Salama A: Alloantibodies Directed against High-Frequency Red Blood Cell Antigens *Infusion Therapy and Transfusion Medicine* 1999; 26:234–239
10. Ishihara Y, Miyata S, Chiba Y, Kawai T. Successful treatment of extremely severe fetal anemia due to anti-Jra alloimmunization. *Fetal Diagn Ther* 2006; 21:269–271
11. Kendall AG: Clinical importance of the rare erythrocyte antibody anti-Jra. *Transfusion* 1976; 16:646-7
12. Krishnamurthy P, Schuetz JD: The role of ABCG2 and ABCB6 in porphyrin metabolism and cell survival. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;12:647-55
13. Kim H, Park MJ, Sung TJ, Chi JS, Hyuk J, Park KU, Han KS: Hemolytic disease of the newborn associated with anti-Jra alloimmunization in atwin pregnancy: the first case report in Korea. *Korean J Lab Med* 2010; 30:511-5 [abstrakt]
14. Kwon MY, Su L, Arndt PA, Garratty G, Blackall DP: Clinical significance of anti-Jra: report of two cases and review of the literature. *Transfusion* 2004; 44:197-201
15. Li Y, Polgar O, Okada M, Esser L, Bates SE, Xia D: Towards understanding the mechanism of action of the multidrug resistance-linked half-ABC transporter ABCG2: A molecular modeling study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* 2007; 25: 837–851
16. Masumoto A, Masuyama H, Sumida Y, Segawa T, Hiramatsu Y: Successful management of anti-Jra alloimmunization in pregnancy: a case report. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;69(2), ABSTRAKT: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923849>
17. Miyazaki T, Kwon KW, Yamamoto K, Tone Y, Ihara H, Kato T, Ikeda H, Sekiguchi S: A human monoclonal antibody to high-frequency red cell antigen Jra. *Vox Sang.* 1994; 66:51-4
18. Nakagawa H, Tamura I, Wakabayashi K et al.: Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonmzous SNP variants of human ABC transporter ABCG2. *Biochem. J* 2008; 411:623 - 631
19. Nakajima H, Ito K: An example of anti-Jra causing hemolytic disease of the newborn and frequency of Jra antigen in the Japanese population. *Vox Sang* 1978; 5:265-7
20. Page PL: Hemolytic disease of the newborn due to anti-Lan. *Transfusion* 1983; 23:256–257
21. Peyrard T, Pham BN, Arnaud L, Fleutiaux S, Brossard Y, Guerin B, Desmoulins I, Rouger P, Le Pennec PY. Fatal hemolytic disease of the fetus and newborn associated with anti-Jr. *Transfusion* 2008; 48:1906-11
22. Reid ME, Lomas-Francis Ch: The Blood Group Antigen FactsBook, Second Edition (Factsbook), Academic Press, 2003, 505 - 508
23. Saison et al.: Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior. *Nature Genetics.* 2012; 44:174-177
24. Sasamoto N, Tomimatsu T, Nagamine K et al: Fetal and neonatal anemia associated with anti-Jr(a) : a case report showing a poorly hemolytic mechanism. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2011; 33:1132–1136
25. Smith DS, Stratton F, Johnson T, Brwn T, Howell P, Riches R: Haemolytic disease of the newborn caused by anti-Lan antibody. *British Medical Journal* 1969; 3:90-92
26. Storry JR, Qyen R: Variation in Lan expression. *Transfusion* 1999; 39:109-10
27. Tamura A, Watanabe M, Saito H, Nakagawa H, Kamachi T, Okura I, Ishikawa T: Functional Validation of the Genetic Polymorphisms of Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCG2: Identification of Alleles That Are Defective in Porphyrin Transport. *Mol Pharmacol* 2006; 70:287–296
28. Toy P, Reid M, Lewis T, Ellis S, Avoy DR.: Does anti-Jra cause hemolytic disease of the newborn? *Vox Sang.* 1981; 41:40-4
29. Yoshiharu K: Rare Instance of Anti-Lan Antibody in a Man Lacking Lan Antigen. *Japanese Journal of Transfusion Medicine* 1999; 45:632-635
30. Zelinski T: ABCG2 null alleles define the JR(a-) blood group phenotype. *Nature Genetics* 2012; 44:131-132
31. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCB6>