

# Het Rh-eiwit

**Auteurs** M.B. Hemker en D.J. van Rhenen

**Trefwoorden** Rh-eiwit; bloedtransfusie; hemolytische ziekte van de pasgeborene; auto-immuun hemolytische anemie van het warmte type.

## Samenvatting

Sinds de ontdekking van de Rh-bloedgroep in 1939 is de kennis van de opbouw en de functie van het Rh-eiwit sterk vergroot. Met name door het beschikbaar komen van monoklonale antistoffen in de jaren tachtig van de vorige eeuw en DNA-technieken in de jaren negentig van de vorige eeuw is nu bekend dat Rh een van de meest complexe bloedgroepen is. Het klinisch belang is groot. Bij transfusies wordt standaard met de RhD-bloedgroep rekening gehouden vanwege het grote risico op anti-D-antistofvorming.

Het optreden van hemolytische ziekte van de pasgeborene was zeker vóór het toedienen van anti-D-profylaxe in de jaren zestig van de vorige eeuw een belangrijke oorzaak van sterfte onder pasgeborenen. Daarnaast speelt het Rh-eiwit een rol bij auto-immuun hemolytische anemie van het warmte type. In dit artikel wordt een overzicht gegeven van recent beschikbaar gekomen relevante informatie aangaande het Rh-eiwit.

(*Ned Tijdschr Hematol* 2004;1(1):17-22)

## Inleiding

### *Immunogeniciteit van Rh*

De Rh-bloedgroep speelt een belangrijke rol in de klinische transfusiepraktijk, bij hemolytische ziekte van de pasgeborene en bij warmte auto-immuun hemolytische anemie. De Rh-bloedgroep is nog niet zolang geleden ontdekt. In 1939 werd het Rh-bloedgroepsysteem voor de eerste keer beschreven door Levine en Stetson.<sup>1</sup> Zij observeerden bij een vrouw, die net bevallen was van een doodgeboren kind, een hemolytische reactie nadat zij getransfundeerd was met het bloed van haar man. Uit het bloed van de moeder werd een antilichaam geïsoleerd dat niet alleen met het bloed van haar man agglutineerde, maar ook met 80% van alle ABO-compatibele donoren. Levine en Stetson lieten zien dat het antigeen, waartegen dit antilichaam was gericht onafhankelijk was van de ABO-, MN- en P-bloedgroepen.<sup>1</sup> Landsteiner en Wiener dachten hetzelfde antilichaam te hebben geïdentificeerd na injectie van rode bloedcellen van rhesusapen in cavia's en konijnen, waardoor het antilichaam anti-rhesus werd genoemd.<sup>2</sup> Hoewel later bleek dat het hier twee verschillende antilichamen betrof, heeft het klinische relevante alloantilichaam de naam anti-Rh gekregen, terwijl het heteroantilichaam

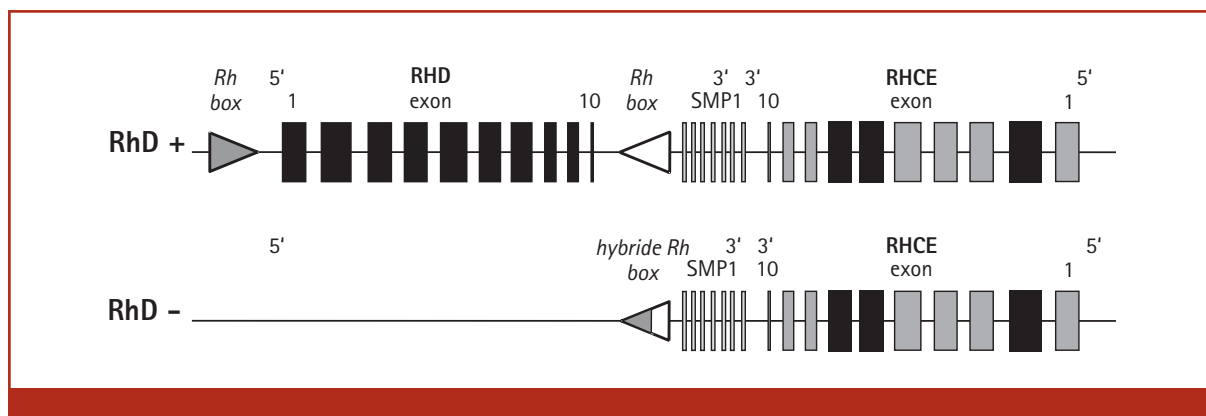
de naam anti-LW heeft gekregen. Dit ter ere van de ontdekkers Landsteiner en Wiener.

Tot nu toe zijn meer dan 45 verschillende Rh-antigenen beschreven, waarvan maar enkele klinisch relevant zijn. Het belangrijkste Rh-antigeen is RhD. De aanwezigheid van dit antigeen resulteert in het RhD-positieve fenotype. Na ABO is RhD het meest immunogene rode bloedcelantigeen; 80% van de RhD-negatieve individuen zal antistoffen maken na het eerste contact met RhD-positief bloed, terwijl slechts 7-8% van deze personen nooit antistoffen zal maken. Klinisch gezien is Rhc na RhD het meest van belang; 14-21% van de Rhc-positieve baby's geboren uit moeders die anti-Rhc-antistoffen gemaakt hebben, hebben een wisseltransfusie nodig. Ook anti-RhC-, anti-RhE-, anti-Rhe- en anti-G-antistoffen kunnen hemolytische ziekte van de pasgeborene (HZP) veroorzaken, zij het in zeer zeldzame gevallen en in milde mate.<sup>3</sup>

## Rh-bloedgroepsysteem

### *Moleculaire basis*

Het Rh-bloedgroepsysteem wordt gecodeerd door 2 zeer homologe genen: RHD en RHCE, beide gelo-



**Figuur 1.** Situering van het RHD- en RHCE-gen op chromosoom 1. De genomische organisatie van de Rh-genen bij een RhD-positieve en RhD-negatieve haplotype. Bij het RhD-positieve haplotype worden in het RHD-gen de twee homologe Rh-boxes en het SMP I in een 5' tot 3' oriëntatie gevonden en het RHCE-gen in een 3' tot 5' oriëntatie. Bij het RhD-negatieve haplotype is er een deletie van RHD-gen en een deel van elke Rh-box.<sup>5</sup>

kaliseerd op chromosoom 1 (p34.3-p36.1). Elk gen bestaat uit 10 exonen en is verantwoordelijk voor transcripten van 1.251 baseparen (bp), resulterend in een eiwit van 417 aminozuren (az).<sup>4</sup>

De gehele RHD- en RHCE-genen (exonen én intronen) zijn respectievelijk 57.295 en 57.831 bp groot en worden gescheiden door ongeveer 30 kbp, waarin de sequentie coderend voor het 'small membrane protein I' gen (SMP I-gen) ligt (zie *Figuur 1*). De RHD- en RHCE-genen liggen in tegenovergestelde richting op het chromosoom (5'-RHD3'-3'RHCE5'); het RHD-gen ligt centromeer van het RHCE-gen. Voor en achter de RHD-sequentie liggen 2 zeer homologe gebieden (98,6%), de 'upstream' en 'downstream' Rh-box.<sup>6</sup>

Het RHD-gen codeert voor het RhD-eiwit en het RHCE-gen codeert voor de RhCcEe-eiwitten. De RHD- en RHCE-genen verschillen 40 basen, die leiden tot 35 aminozuurverschillen. Het RhD-negatieve fenotype wordt in de Kaukasische bevolkingsgroep voornamelijk veroorzaakt door een deletie van het RHD-gen. Door de deletie van het RHD-gen ontstaat een hybride van de 'upstream' en 'downstream' Rh-box. Bij niet-Kaukasische bevolkingsgroepen zijn ook gemuteerde RHD-genen gevonden, die leiden tot het RhD-negatieve fenotype.

Het RHCE-gen heeft 4 allelen: het RhCE-, RhCe-, RhcE- en Rhce-allel. Aminozuursubstituties op 4 plekken (az16 in exon 1 en az60, -68 en -103 in exon 2) zijn verantwoordelijk voor de expressie van C/c. Een mutatie in exon 5 is van belang voor de expressie van E/e.

Kennis over de moleculaire achtergrond van Rh is van essentieel belang voor genotypering, in het geval dat

er geen rode bloedcellen voor handen zijn bij prenatale diagnostiek, na bloedtransfusies en bij ernstige vormen van auto-immuun hemolytische anemie (AIHA).

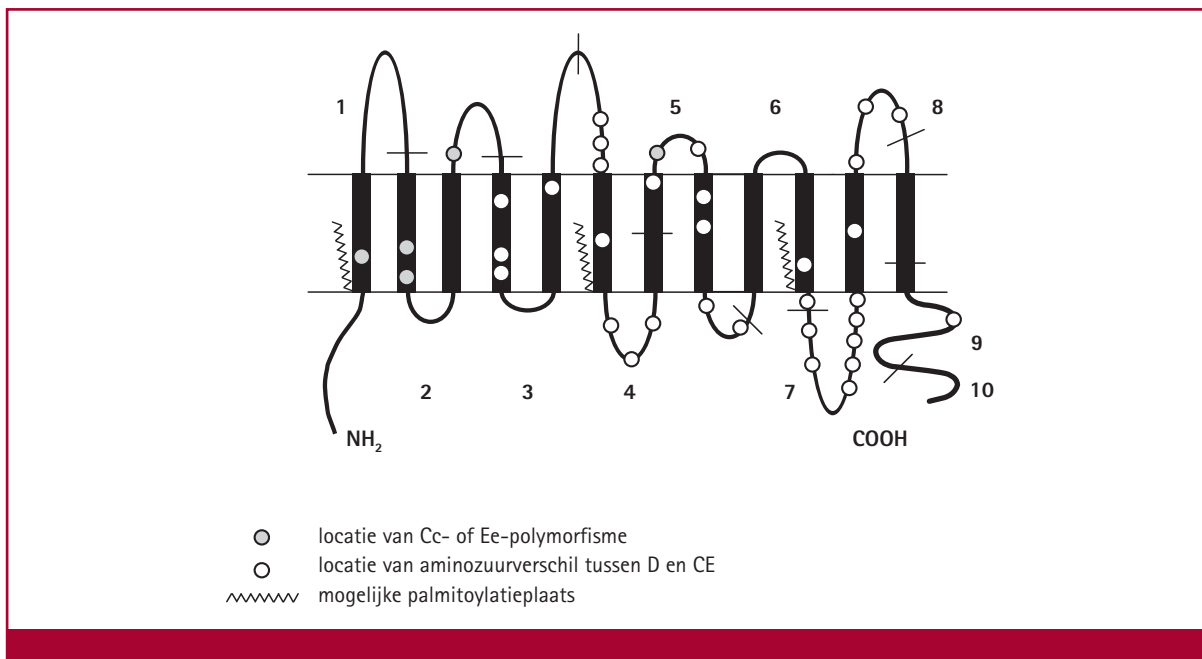
#### *Rh in de rodebloedcelmembraan*

De RhCcEe- en RhD- eiwitten hebben een bijna identieke organisatie. Beide eiwitten hebben hun NH<sub>2</sub>- en COOH-termini intracellulair en daartussen 12 transmembraan domeinen, die 6 extracellulaire loops vormen (zie *Figuur 2*, op pagina 19). Van het gehele eiwit steekt slechts 25% aan de extracellulaire zijde uit.

De Rh-eiwitten worden op de membraan gepresenteerd in een complex, waarvan de kern bestaat uit een tetrameer van 2 RhD/RhCcEe-eiwitten en 2 RhAg-eiwitten. In dit complex zitten ook andere membraaneiwitten als LW, CD47 en glycoforine-B.<sup>7</sup>

Het RhAg-eiwit, gecodeerd door het RHAG-gen, heeft 36% homologie met het RhD/RhCcEe-eiwit en heeft een gelijke membraanorganisatie. In tegenstelling tot het RhD/RhCcEe-eiwit is het RhAg-eiwit op ten minste een plaats geglycosyleerd.

Het Rh-complex is stevig gebonden aan het rodebloedcelskelet. Uit onderzoek met rode bloedcellen van patiënten met sferocytose als gevolg van het ontbreken van proteïne 4.2, is gebleken dat proteïne 4.2 via CD47 is gebonden aan het Rh-complex. Met band-3-deficiënte rode bloedcellen en coprecipitatie-experimenten is gebleken dat een tetrameer van band-3-eiwitten bindt aan ankyrine en proteïne 4.2 en daarmee een belangrijk anker vormt tussen de rodebloedcelmembraan en het rodebloedcelskelet (zie *Figuur 3*, op pagina 20).<sup>8</sup>



**Figuur 2.** Model van de RhD- en RhCcEe-eiwitten in de rode bloedcelmembran. Het Rh-eiwit heeft twaalf transmembraan domeinen met de N- and C-termini aan de intracellulaire zijde. De zig-zag lijnen geven de mogelijke locatie van palmitoylatieplaatsen aan. De cirkels geven de aminozuursverschillen tussen RhD-, RhC-, Rhc-, RhE- en Rhe-eiwitten aan.

## Expressie van RhD

### Kwalitatieve variatie

Kwalitatieve variatie van RhD-expressie werd ontdekt toen bij personen met een vermeende RhD-positiviteit, na transfusie alloantistoffen werden aangetroffen.

Meerdere epitopen worden tot expressie gebracht door het RhD-eiwit. Indien echter een (of meerdere) van deze epitopen ontbreken, kan allo-immunisatie plaatsvinden en is er sprake van een partiële-D-variant. Genherschikkingen en puntmutaties zijn de moleculaire oorzaak van partiële-D-varianten. Dat er veel verschillende partiële-D-varianten bestaan en dus veel verschillende genherschikkingen hebben plaatsgevonden, is waarschijnlijk het gevolg van de hoge homologie en de tegenovergestelde lokalisatie van de RHD- en RHCE-genen. Genconversie, resulterende in RHD-RHCE-RHD- en RHCE-RHD-RHCE-hybriden kunnen makkelijk ontstaan na haarspeldformatie van het RH-locus (zie *Figuur 4*, op pagina 21).<sup>6</sup>

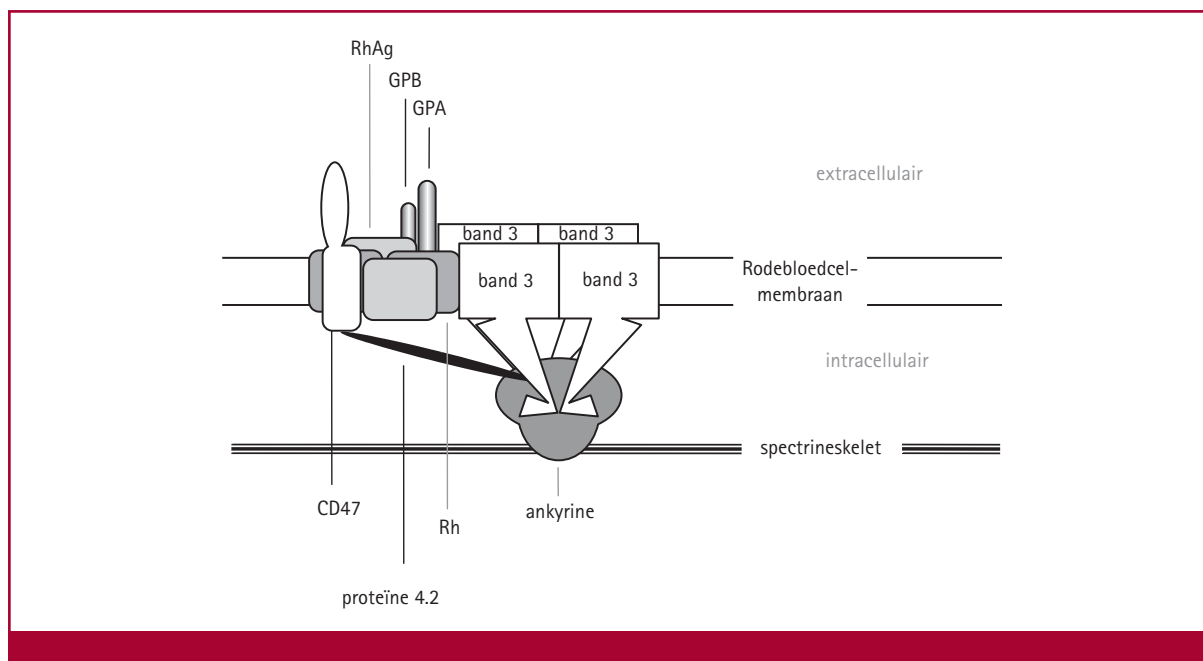
### Kwantitatieve variatie

Het aantal RhD-antigenen dat tot expressie wordt gebracht op de rode bloedcel kan worden bepaald met Scatchard-plotanalyse. Met deze techniek kan het aantal RhD-antigenen berekend worden per rode bloedcel, met behulp van de hoeveelheid radioactiviteit na incubatie met <sup>125</sup>I-gelabelde anti-RhD-antistoffen. Een verschil in hoeveelheid RhD-antigenen is ge-

vonden tussen de verschillende normale fenotypen; in afnemende sterkte van 33.000 tot 15.000 antigenen per cel: R2R2, R1R2, R1R1, R2r en R1r.

Naast de normale fenotypen zijn er ook rode bloedcellen met extreem verhoogde expressie van RhD-antigenen, zoals in het geval dat C- en E-expressie ontbreken (D--) of verlaagde expressie van RhD-antigeen (zwak D).

Verlaagde expressie van RhD-antigenen wordt veroorzaakt door gemuteerde RHD-allelen. Er zijn 22 verschillende mutaties in het RHD-gen, die ten grondslag kunnen liggen aan het zwakke RhD-fenotype. De mutaties leiden tot aminozuurveranderingen, die zijn gelegen op transmembraan- of intracellulaire locaties van het RhD-eiwit.<sup>9</sup> Elke mutatie leidt tot een specifiek zwak D-fenotype, genummerd van 1 tot en met 24, met sterk verlaagde epitooptichtheden, variërend van 70 tot 5.200 RhD-antigenen per cel. Of deze zwakke D-eiwitten alleen een verlaagde expressie hebben of dat er toch een kwalitatieve verandering heeft plaatsgevonden, is nog steeds niet zeker. Kennis hierover is van belang voor het transfusiebeleid, aangezien in het geval van kwalitatieve verandering van het RhD-eiwit alloantistofformatie kan plaatsvinden na transfusie met normaal RhD-positief bloed. Alloantistoffen bij personen met het zwakke D-fenotypen na een transfusie met RhD-positief bloed zijn nooit gevonden, hetgeen een aan-



**Figuur 3.** Associatie van het Rh-complex met de rodebloedcelmembraan. Een tetrameer van het band-3-eiwit is via ankyrine gebonden aan het spectrincytooskelet van de rode bloedcel. Proteïne 4.2 verbindt het band-3-eiwit met CD47 van het Rh-complex. GPA=glycoproteïne A en GPB=glycoproteïne B.

duiding kan zijn dat immunologisch het zwakke D-eiwit niet verschilt van het normale RhD-eiwit.

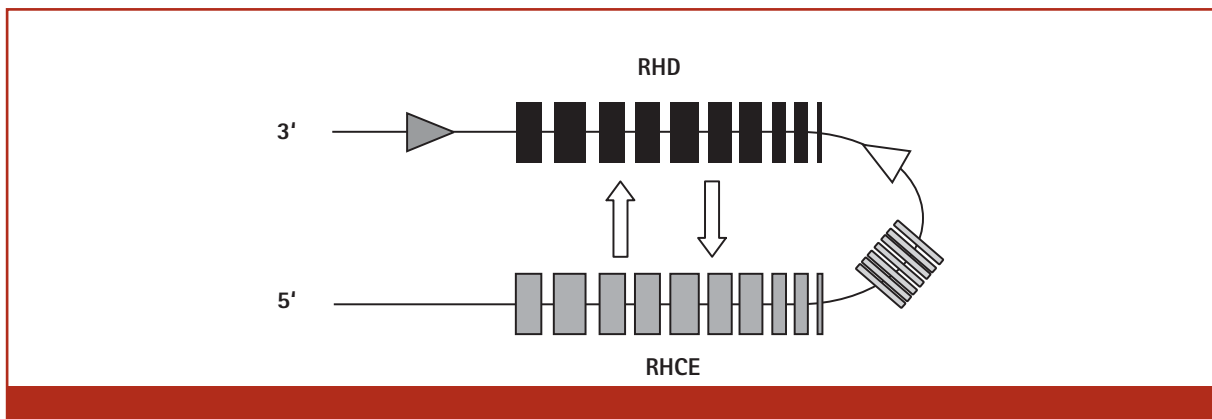
#### *Etnische verschillen*

De Rh-bloedgroep is zeer polymorf en duidelijke verschillen in haplotyfefrequentie tussen de verschillende etnische groepen zijn aanwezig. RhD-negativiteit komt bij ongeveer 15% van de Kaukasische bevolking in Noord-Amerika en Europa voor, terwijl het bij minder dan 5% van de Negroïde bevolking voorkomt en zelfs bij nog minder van de Aziatische bevolking voorkomt. Daarnaast wordt het RhD-negatieve fenotype in de Kaukasische bevolking met name bepaald door de afwezigheid van het RHD-gen, terwijl in de Negroïde bevolking ook mutaties in het RHD-gen (zoals het RHD-pseudogen) kunnen leiden tot RhD-negativiteit. Dus niet alleen verschilt de frequentie van bepaalde varianten tussen de verschillende bevolkingsgroepen, ook het voorkomen van bepaalde varianten lijkt beperkt te zijn tot zekere bevolkingsgroepen.

#### *Functie van het Rh-complex*

De manier waarop het Rh-eiwit zich in de rodebloedcelmembraan bevindt (meerdere malen door de membraan met N- en C-termini intracellulair), is kenmerkend voor zogenaamde membraantransporters, structuren die zorgen voor transport van kleine mole-

culen door de celmembraan (zoals  $\text{HCO}_3^-$  en  $\text{Cl}^-$ ). Naast de Rh-eiwitten die voorkomen op rode bloedcellen (RhD, RhCcEe en RhAg), de erytroïde Rh-homologen, zijn Rh-eiwitten beschreven met grote aminozuurovereenkomsten die voorkomen op andere cellen, de non-erytroïde Rh-homologen (RhBG, RhCG). RhBG komt voor op cellen in de lever, huid en proximale tubulus van de nier. RhCG komt voor op cellen in de testes en in het verzamelbuisje van de nier.<sup>10</sup> Bij gewervelde dieren was tot voor kort geen ammoniumtransporteiwit geïdentificeerd. Van de non-erytroïde homologen wordt een ammoniumtransportfunctie vermoed, vanwege de locatie van voorkomen, maar ook vanwege een aanzienlijke aminozuurovereenkomst met ammoniumtransporteiwitten. Met transportexperimenten, waarbij de opname en uitstoot van radioactief ammonium werd vergeleken, tussen rode bloedcellen die het Rh-complex tot expressie brengen (RhD-positief en RhD-negatief) en Rh-deficiënte cellen (Rh<sub>null</sub>-cellen), is gebleken dat het Rh-complex betrokken is bij de uitstoot van ammonium uit de rode bloedcel.<sup>11</sup> Dit zou van belang kunnen zijn voor de bescherming van rode bloedcellen in een milieu met hoge ammoniumconcentraties, zoals in de nier. Afwezigheid van Rh leidt dan tot verhoogde hemolyse, zoals gezien wordt bij individuen met het Rh<sub>null</sub>-fenotype.



**Figuur 4.** Haarspeldformatie die leidt tot RHD-RHCE-RHD- of RHCE-RHD-RHCE-hybriden.

### Klinisch belang van de Rh-bloedgroep

Het klinisch belang van Rh wordt bepaald door het vormen van antistoffen na de blootstelling van Rh-negatieve individuen aan Rh-positief bloed. Verreweg het meest immunogeen is RhD. Immunisatie wordt gezien in circa 80% van de gevallen. Immunisatie tegen de Rh-bloedgroepantigenen Cc en Ee is veel minder frequent en niet hoger dan 1%.

De ziektebeelden waarbij Rh-antistoffen een rol spelen, zijn bloedtransfusiereacties na een Rh-incompatibele transfusie, hemolytische ziekte van de pasgeborene en auto-immuun hemolytische anemie van het warmte type.

#### *Incompatibele transfusies*

Het is gebruikelijk om van alle donors en ontvangers van erythrocytenproducten de RhD-bloedgroep te bepalen en compatibel bloed te transfunderen. In geval van vergissingen, waarbij per ongeluk RhD-positieve erythrocyten worden toegediend aan een RhD-negatieve ontvanger, kan dit leiden tot zeer ernstige transfusiereacties, waarbij het getransfundeerde bloed intravasculair wordt afgebroken.

Voor de Rh-bloedgroep CcEe worden donor en ontvanger in het algemeen niet van tevoren geselecteerd. Mocht zich antistofvorming voordoen, dan geeft dit over het algemeen milde transfusiereacties. Bij een volgende bloedtransfusie wordt, als een antistof is aangetoond, echter wel passend bloed geselecteerd.

#### *Hemolytische ziekte van de pasgeborene*

De zwangerschap is een belangrijke oorzaak van Rh-immunisatie. In 75% van de zwangerschappen kan worden vastgesteld dat bloed van de ongeborene terecht komt in de circulatie van de moeder. Bij een groot aantal bloedgroepen zijn dan ook immunisaties beschreven. Ook hier is voor de klinische praktijk

RhD het meest belangrijke. Vóór het introduceren van anti-D-profylaxe in de jaren zestig van de vorige eeuw was het risico van anti-D-immunisatie bij RhD-incompatibele zwangerschappen 1%. Door postnatale anti-D-profylaxe daalde dit risico naar 0,2% en door prenatale anti-D-profylaxe (30<sup>e</sup> week) naar 0,07%.<sup>13</sup>

Als er toch sprake is van anti-D-antistofvorming tijdens een zwangerschap dan is het van groot belang te bepalen of de foetus van de daaropvolgende zwangerschappen RhD-positief en dus bedreigd is. Zeker als de vader heterozygoot is voor RhD is het niet op voorhand zeker of de foetus RhD-negatief is. Nieuwe technieken zijn voorhanden om de bloedgroep van de foetus vast te stellen via vruchtwaterpunctie of via onderzoek van het plasma van de moeder. Aangezien noch in vruchtwater noch in matернаal plasma erythrocyten voor de RhD-bloedgroepbepaling aanwezig zijn, wordt gebruik gemaakt van DNA-technieken.

#### *Auto-immuun hemolytische anemie van het warmte type*

Deze vorm van AIHA wordt gekenmerkt door chronische hemolyse, die veroorzaakt wordt door IgG-antistoffen die het meest actief zijn bij 37°C. De antistoffen zijn vaak gericht tegen het Rh-eiwit, maar meestal niet tegen de specifieke D-, C-, c-, E- en e-kenmerken die bij immunisatie door incompatibele transfusies worden gezien. De antistoffen reageren dan ook met alle Rh-fenotypes, echter niet als het Rh-eiwit totaal ontbreekt, zoals bij Rh<sub>null</sub>-cellen. De reden waarom de antistoffen ontstaan, is niet bekend. Het is bekend dat dergelijke antistoffen voorkomen na langdurig gebruik van het antihypertensiemiddel methyldopa en frequent worden aangetroffen bij lymfatische maligniteiten.

## Aanwijzingen voor de praktijk

1. Het gebruik van monoklonale antistoffen en DNA-technieken verbetert in de klinische praktijk in belangrijke mate de diagnostiek van ziekten waarbij de RhD-bloedgroep een belangrijke rol speelt.
2. Aangezien noch in vruchtwater noch in maternaal plasma erythrocyten voor de RhD-bloedgroepbepaling aanwezig zijn, wordt gebruik gemaakt van DNA-technieken. Deze vroegdiagnostiek maakt een snelle interventie mogelijk.
3. Vanwege de grote immunogeniciteit van RhD-positieve erythrocyten bij een RhD-negatieve ontvanger is het van groot belang RhD-compatibele transfusies te geven.

## Conclusie

De Rh-bloedgroep speelt sinds de ontdekking in 1939 een onverminderd relevante rol in de pathogenese van een aantal belangrijke ziekteprocessen. Door het beschikbaar komen van monoklonale antistoffen en de ontwikkeling van DNA-technieken is de kennis over de grote variabiliteit en inzicht in de functie van het Rh-systeem sterk toegenomen. Nieuwe diagnostische technieken maken preventie van ziekte meer en meer mogelijk.

## Referenties

1. Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. *J Am Med Assoc* 1939;113:126-70.
2. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for Rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1940;43:223.
3. The Rh blood group system. In: Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M, editors. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 10th edition. Oxford Blackwell Scientific Publications; 1997. p. 156.
4. Chérif-Zahar B, Raynal V, Cartron JP. RH gene structure: re-assignment of two exon-exon junctions. *Blood* 1997;89:4661-2.
5. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Muller TH, et al. Weak D alleles express disint phenotypes. *Blood* 2000;95:2699-708.
6. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the rhesus box. *Blood* 2002;95:3662-8.
7. Cartron JP. Defining the blood group antigens-Biochemistry and molecular genetics. *Blood reviews* 1994;8:199-212.
8. Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delauney J, et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the red blood cell membrane. *Blood* 2003;101:4180-8.
9. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385-93.
10. Liu Z, Peng J, Mo R, Hui CC, Huang CH. Rh type B Glycoprotein is a new member of the Rh superfamily and a putative ammonia transporter in mammals. *J Biol Chem* 2001;276:1424-33.
11. Hemker MB, Cheroutre G, Van Zwieten R, Maaskant- Van

Wijk PA, Roos D, Loos JA, et al. The Rh-complex exports ammonium from human red blood cells. *Br J Haematol* 2003;122:333-40.

12. Bowman JM, Pollock JM, Penstron LE. Fetomaternal transplental hemorrhage during pregnancy and after delivery. *Vox Sang* 1986;51:117-21.

13. Bowman JM, Pollock JM. Antenatal Th prophylaxis: 28 weeks gestation service program. *Can Med Assoc J* 1978;118:627.

Ontvangen 6 januari 2004, geaccepteerd 29 januari 2004.

## Correspondentieadres

**Mw. drs. M.B. Hemker, arts-onderzoeker**

Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest  
Postbus 23370  
3001 KJ Rotterdam

Stichting Sanquin Bloedvoorziening  
Plesmanlaan 125  
1066 CX Amsterdam

**Prof. dr. D.J. van Rhenen, internist-hematoloog**

Erasmus MC  
Afdeling Hematologie  
Dr. Molewaterplein 40  
3015 GD Rotterdam

Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest  
Postbus 23370  
3001 KJ Rotterdam

Tel: 010-4630630  
Fax: 010-4630640  
E-mail: dick.van.rhenen@bloodrtd.nl

*Correspondentie graag richten aan de laatste auteur.*

Belangenconflict: geen gemeld.  
Financiële belangen: geen gemeld.