

Received: 2007.10.29  
Accepted: 2008.01.03  
Published: 2008.01.16

## Molekularne podstawy układu grupowego ABO

### Molecular background of the ABO blood group system

Dorota Smolarek<sup>1</sup>, Anna Krop-Wątopek<sup>1</sup>, Kazimiera Waśniowska<sup>1,2</sup>,  
Marcin Czerwiński<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu  
<sup>2</sup> Wydział Wychowania Fizycznego i Fizjoterapii, Politechnika Opolska

#### Streszczenie

W skład układu grupowego ABO, który należy do najważniejszych układów grupowych krwi ludzkiej, wchodzi antygeny A i B oraz przeciwciała je rozpoznające. Antygeny A i B, które różnią się terminalnym cukrem (N-acetylogalaktozamina w antygenie A i galaktoza w antygenie B) powstają w aparacie Golgiego w wyniku działania swoistych glikozylotransferaz A i B, które przenoszą odpowiednie cukry na akceptor oligosacharydowy, nazywany antygenem H. Sekwencje aminokwasowe glikozylotransferaz A i B różnią się czterema resztami aminokwasowymi, z czego tylko dwie decydują o zmianie swoistości enzymu. Są to aminokwasy w pozycji 266 (leucyna w A, metionina w B) i 268 (glicyna w A, alanina w B). Badania strukturalne wykazały, że obecność metioniny i alaniny, aminokwasów o większych łańcuchach bocznych, w transferazie B powoduje, że enzym może związać tylko galaktozę, a nie N-acetylogalaktozaminę. Fenotyp O, który jest cechą recesywną, charakteryzuje się brakiem determinant antygenowych A i B; przyczyną jego powstania jest obecność nieaktywnego enzymu, w którym najczęściej brakuje domeny katalitycznej w wyniku zmiany ramy odczytu spowodowanej przez delecję jednego nukleotydu. Oprócz podstawowych wariantów genu *ABO*, istnieje wiele rzadziej spotykanych jego odmian, których ekspresja może spowodować powstanie fenotypów o zmienionej charakterystyce. W pracy opisano mechanizm powstawania antygenów A i B, molekularne podstawy zmienności genów *ABO*, ich alleliczne warianty oraz możliwe przyczyny ich powstawania.

#### Słowa kluczowe:

układ grupowy ABO • antygeny ABO(H) • polimorfizm genu *ABO* • glikozylotransferazy A i B

#### Summary

The ABO human blood group system consists of A antigens, B antigens, and antibodies against these antigens. The antigenic determinants are synthesized in the Golgi apparatus by specific glycosyltransferases which transfer proper sugars to an oligosaccharide acceptor, called H antigen. N-acetylgalactosaminotransferase (transferase A) uses a UDP-GalNac donor to convert the H antigen to A antigen, whereas galactosyltransferase (transferase B) uses a UDP-galactose donor to convert the H antigen to B antigen. The amino-acid sequences of transferases A and B differ by four residues, of which only two cause a change in enzyme specificity. These residues are Leu/Met266 and Gly/Ala268 in transferases A and B, respectively. Structural studies revealed that the presence of amino acids with bulky side chains (methionine and alanine) in transferase B cause its inability to bind N-acetylgalactosamine. The recessive trait O, in which antigens A and B are not present, is caused by the expression of an incomplete enzyme as a result of a base deletion and a subsequent reading frame change. In addition to the basic *ABO* gene variants, several alleles are rarely found that may lead to the expression of enzymes with different specificities. In this article the mechanism of the synthesis of A and B antigens, the molecular background of *ABO* gene variability, their allelic variants, and possible mechanisms by which they emerge are described.

**Key words:** ABO blood group system • antigens ABO(H) • polymorphism of ABO gene • glycosyltransferases A and B

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_62/11531.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_62/11531.pdf)

**Word count:** 5177

**Tables:** 2

**Figures:** 8

**References:** 51

**Adres autora:** doc. dr hab. Marcin Czerwiński, Zakład Immunochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: czerwinski@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **GTA** – UDP-N-acetylogalaktozamino:  $\beta$ -galaktozydo- $\alpha$ -1,3-N-acetylogalaktozaminylotransferaza (N-acetylogalaktozylotransferaza); **GTB** – UDP-galaktozo:  $\beta$ -galaktozydo- $\alpha$ -1,3-N-galaktozylotransferaza (galaktozylotransferaza); **pz** – pary zasad

## WPROWADZENIE

Odkrycie grup krwi i wykazanie, że warunkiem powodzenia transfuzji jest ich zgodność, należy do najważniejszych odkryć XX wieku. Postęp w biochemii i genetyce molekularnej pozwolił na wyjaśnienie struktury genów i białek oraz przyczynił się do przemiany immunohematologii z opisowej serologii w naukę badającą zależności struktury i funkcji antygenów grupowych krwi na poziomie molekularnym. Antygeny grupowe ABO są strukturami węglowodanowymi, które powstają w wyniku działania glikozylotransferaz, czyli enzymów przenoszących cukry. Struktura antygenów ABO oraz genów kodujących te glikozylotransferazy została określona, a ich charakterystyka oraz zmienność jest tematem niniejszego opracowania.

Karol Landsteiner, odkrywca układu grupowego krwi ABO, opisał w roku 1900 zjawisko izoaglutynacji ludzkich erytrocytów przez surowice ludzkie i zwierzęce [26], a rok później, na podstawie obserwacji dokonanych podczas mieszania krwi różnych osób wyróżnił trzy podstawowe grupy krwi, które nazwał I, II i III. Erytrocyty grupy I nie zawierały receptorów dla aglutynin wykrywanych w grupie II i III, podczas gdy erytrocyty grupy II i III zawierały dwa rodzaje receptorów, nazwane później B i A. Obserwacje te pozwoliły na sformułowanie wniosku, że w krwi ludzkiej występują różne i charakterystyczne dla poszczególnych osób „naturalne” izoaglutyniny, oraz że są one odpowiedzialne za aglutynację [27] (Nagroda Nobla 1930). W roku 1901 jego uczniowie, Sturli oraz von Decastello, wyodrębnili kolejną, czwartą (IV) grupę nazwaną później AB [10]. Pracę nad systemem grupowym ABO prowadził również Ludwik Hirszfeld; wraz z Erichem von Dungernem wykazali, że grupy krwi dziedziczą się zgodnie z prawami Mendla. Sugerowali oni istnienie dwóch dominujących alleli A i B oraz recesywnego allelu H. Zmieniłi także nazwy grup krwi z ustalonych przez Landsteina na stosowane do dziś A, B, O i AB [11, 38].

Uważa się, że układ ABO (układ nr 1 według Międzynarodowego Towarzystwa Transfuzji Krwi – ISBT) ma największe znaczenie w transfuzji krwi. W układzie tym wy-

różnia się cztery podstawowe fenotypy. Charakteryzują je odpowiednio: grupa A – antygen A na krwinkach i przeciwciała anty-B w osoczu, grupa B – antygen B na krwinkach i przeciwciała anty-A, grupa O – na krwinkach znajdują się antygeny H (prekursory antygenów A i B), a w osoczu są obecne zarówno przeciwciała anty-A jak i anty-B, grupa AB: antygeny A i B na erytrocytach, brak przeciwciał w osoczu (ryc. 1).

## BUDOWA ANTYGENÓW ABO

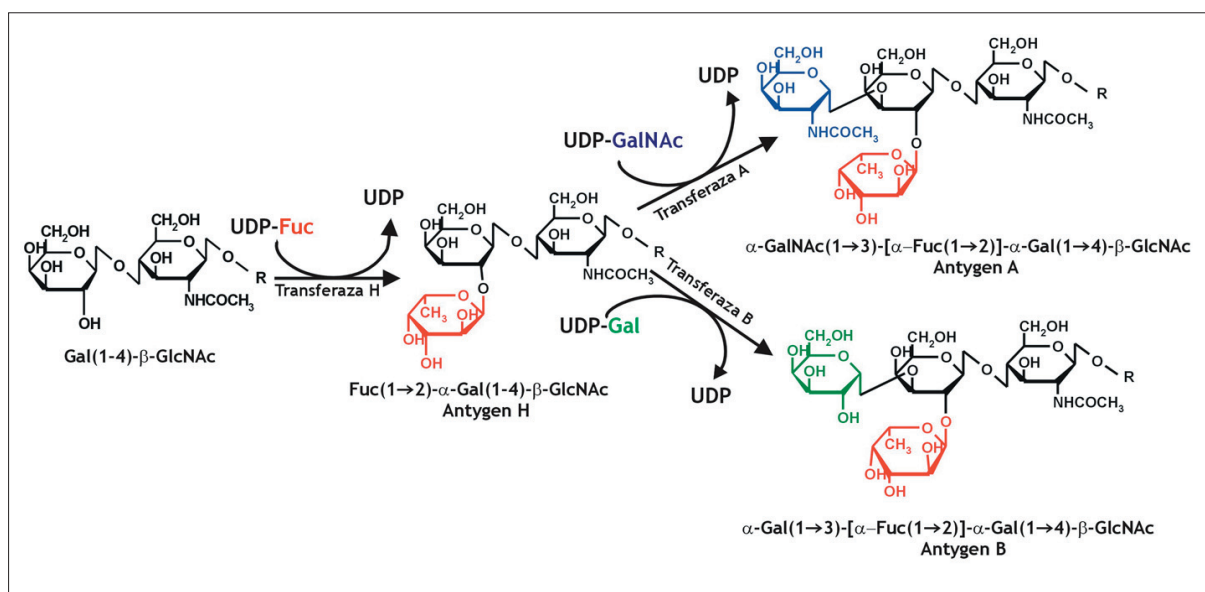
Antygeny układu grupowego ABO są łańcuchami oligosacharydowymi glikolipidów lub glikoprotein obecnymi zarówno na erytrocytach, jak i komórkach somatycznych oraz w wydzielinach. Podstawą ich budowy jest łańcuch prekursorowy, który występuje w dwóch typach, różniących się wiązaniem między końcową galaktozą a poprzedzającą ją N-acetyloglukozaminą. Wiązanie  $\beta$ 1-3 obecne jest w typie I łańcuchów, które występują w tkankach i wydzielinach, a wiązanie  $\beta$ 1-4 znajduje się w łańcuchach typu II, które są charakterystyczne dla krwinek. W wyniku przyłączenia fukozy do łańcucha prekursorowego typu I lub II powstaje antygen H (Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3/4), który z kolei jest strukturą prekursorową dla antygenów A i B. Różnica między tymi antygenami polega na terminalnym cukrze: w antygenie A jest to N-acetylogalaktozamina, a w antygenie B galaktoza (ryc. 2). Oba antygeny powstają w wyniku działania enzymów nazywanych transferazami A i B: pierwsza z nich przenosi resztę N-acetylogalaktozaminy i tworzy antygen A, druga resztę galaktozy i tworzy antygen B. Enzymy te wykazują swoistość zarówno co do rodzaju przenoszonego monocukru, jak i rozpoznawanego akceptora [8,48]. Schemat ich działania przedstawiono na ryc. 2.

## GENY KODUJĄCE TRANSFERAZY ABO

Transferazy ABO, podobnie jak inne glikozylotransferazy, są białkami transbłonowymi typu II. Część cząsteczki enzymu składa się z krótkiego N-końcowego odcinka cytoplazmatycznego, fragmentu transbłonowego oraz długiej części C-końcowej skierowanej do wnętrza aparatu Golgiego. W C-końcowym fragmencie znajduje się centrum aktywne enzymu [8,39].

	Grupa A	Grupa B	Grupa AB	Grupa O
Eryocyty				
Przeciwciała obecne w osoczu	Anty - B	Anty - A	Brak przeciwciał	Anty - B Anty - A
Antygeny na powierzchni erycytów	Antygen A	Antygen B	Antygen A i B	Antygen H

Ryc. 1. Antygeny układu grupowego ABO występujące na erycytach oraz przeciwciała występujące w osoczu



Ryc. 2. Struktura antygenów grupowych układu ABO oraz ścieżki ich biosyntezy

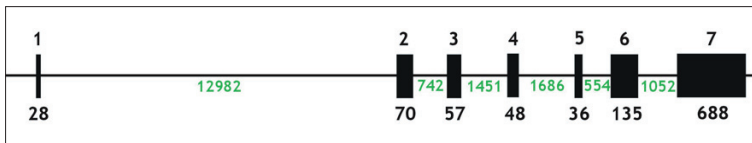
Transferazy A i B (dalej nazywane GTA i GTB) różnią się siedmioma pojedynczymi mutacjami (tabela 1), z których cztery powodują zmianę aminokwasu, a tylko dwie (C796A, G803C) zmieniają swoistość enzymu wobec przenoszonej reszty cukrowej. Oprócz tego możemy również wyróżnić wiele aminokwasów, które mają zasadnicze znaczenie w aktywności enzymu. Według Seltsam i wsp. [40], resztami tymi są: Met214, Phe216, Glu223, Asp291 i Arg352. Zmiana któregośkolwiek z wymienionych aminokwasów znacząco obniża aktywność enzymu. Aktywność enzymatyczna GTB jest mniejsza niż aktywność GTA, w związku z czym liczba antygenów B na powierzchni erycytu jest mniejsza niż liczba antygenów A [32].

Enzymy odpowiedzialne za syntezę antygenów układu grupowego ABO kodowane są przez trzy geny zlokalizowane w trzech osobnych loci: *Hh*, *Sese* i *ABO*.

**Gen *Hh*** (GenBank DQ092446; ENSEMBL ENSG00000174951): jego *locus* znajduje się u człowieka na 19 chromosomie (19q13.3). Gen *Hh* ma długość 3,6 kbp, składa się z 8 eksonów, przy czym region kodujący obejmuje 1 ekson i ma długość 1095 par zasad (365 ami-

nokwasów). Gen ten koduje α-1,2-L-fukozylotransferazę (FUT1), enzym katalizujący przyłączenie fukozy do galaktozy, w wyniku czego powstaje antygen H. Antygen ten jest prekursorem antygenów A i B na erycytach i komórkach śródbłonna. Niekiedy (1:13 000 w Indiach, 1:312 000 w Niemczech) stwierdza się defektywną postać tego enzymu, która nie jest zdolna do przyłączenia fukozy. Gen kodujący taki enzym nosi nazwę *h*; stwierdzono, że przyczyną utraty aktywności mogą być mutacje powodujące powstanie nieaktywnego białka [19]. Przykładem może być mutacja nukleotydu w pozycji 948, w wyniku czego następuje przedwczesna terminacja łańcucha polipeptydowego [17]. Gen *H* ujawnia się zarówno u homozygot *H/H* jak i heterozygot *H/h*. Rzadki przypadek homozygoty *h/h* powoduje brak przyłączenia fukozy, do struktury prekursorowej, do której transferazy A lub B nie są w stanie przyłączyć odpowiedniej reszty cukrowej. W efekcie powstaje pozornie grupa O, mimo że gen *ABO* może wytwarzać prawidłowe enzymy. Fenotyp taki nosi nazwę „Bombay” a bardziej prawidłowo  $O_h$  lub  $ABH_{null}$  [19].

**Gen *Sese*** (GenBank DQ321371; ENSEMBL ENSG00000176920) znajduje się również na chromoso-



Ryc. 3. Schemat organizacji genu *ABO*; podano numery eksonów oraz wielkość eksonów i intronów w parach zasad

mie 19 w odległości 20 kpz od genu *Hh*. Podobnie jak gen *Hh*, gen *Sese* koduje  $\alpha$ -1,2-L-fukozylotransferazę, ale enzym nazywany jest FUT2. Oba geny wykazują 70% homologii sekwencji nukleotydowej. Gen *Sese* składa się z 2 eksonów, przy czym region kodujący obejmuje 1 ekson i ma długość 1029 par zasad (343 aminokwasy). Gen *Se* (zwany genem sekrecji, *FUT2*) koduje enzym o takiej samej aktywności co gen *Hh*, różnica między nimi polega na tym, że enzym ten katalizuje powstawanie antygeny H w tkankach innych niż krew (głównie w nabłonkach) ślinie oraz płynach ustrojowych. Podobnie jak w przypadku genu *Hh*, mutacje mogą powodować powstanie nieaktywnego białka; gen kodujący takie nieaktywne białko nazywa się genem *se* [19]. W zależności od allelu genu *Se*, ludzi można podzielić na wydzielaczy (o genotypie *Se/Se* lub *Se/se*), którzy charakteryzują się obecnością antygenów ABO w tkankach i wydzielinach, oraz niewydzielaczy, którzy mają nieaktywny enzym FUT2 (z genotypem *se/se*). Niewydzielacze stanowią prawie 25% populacji ludzkiej [20]. W Europie i Azji najczęściej spotykaną postacią genu *se* jest gen zawierający mutację G428T, która powoduje powstanie kodonu zatrzymania (Trp143ter) [18], podczas gdy w Afryce dominuje mutacja A385T (Ile129Phe) [19].

**Gen *ABO*** (GenBank BC111575; ENSEMBL ENSG00000175164) jest umiejscowiony na długim ramieniu chromosomu 9 (9q34). W zależności od sekwencji nukleotydowej, gen ten koduje transferazę A (UDP-N-acetylogalaktozamino:  $\beta$ -galaktozydo- $\alpha$ -1,3-N-acetylogalaktozaminylotransferaza, w skrócie N-acetylogalaktozaminylotransferaza) lub transferazę B (UDP-galaktozo:  $\beta$ -galaktozydo- $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferaza, w skrócie galaktozylotransferaza). Gen ma długość 19,5 kpz, region kodujący ma długość 1065 par zasad (353 aminokwasów) i składa się z siedmiu eksonów (ryc. 3). W bazie danych ENSEMBL podano omyłkowo osiem eksonów. Centrum katalityczne jest kodowane w 91% przez eksony 6 i 7. Eksony 1-5 kodują część N-kończącą oraz odcinek transbłonowy. Istnieją trzy allele genu *ABO*: A i B są dominujące, natomiast O jest recesywny.

Z układem grupowym ABO związany jest układ grupowy Lewis. Antygeny tego układu znajdują się na komórkach nabłonka i w płynach ustrojowych, a powstają w wyniku działania fukozylotransferaz katalizujących powstanie wiązania  $\alpha$ 1-3 lub  $\alpha$ 1-4. Molekularne podstawy powstawania antygenów Lewis oraz ich charakterystyka zostały omówione w innym artykule [36].

### STRUKTURA TRANSFERAZ ABO

Transferazy ABO zaliczamy do rodziny szóstej glikozylotransferaz (GT6), enzymów przenoszących galaktozę lub N-acetylogalaktozaminę z urydylodifosforanu na akceptor z wytworzeniem wiązania  $\alpha$ 1-3 [14]. Charakterystyczną ich cechą jest obecność motywu DVD (kwas asparaginowy,

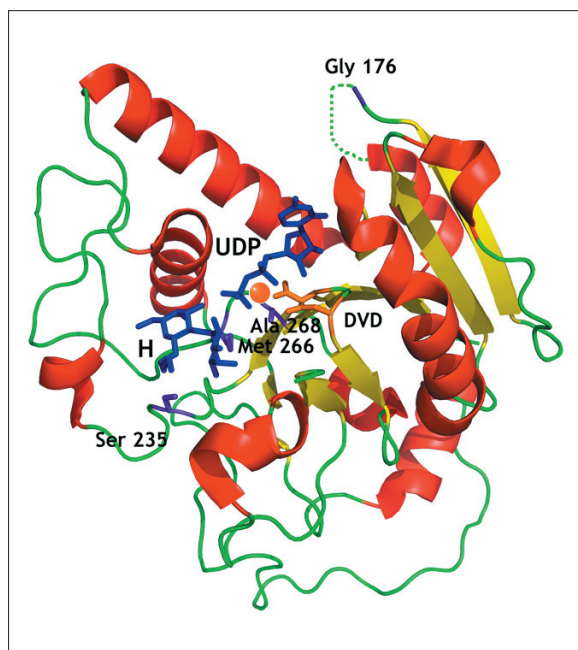
walina, kwas asparaginowy), który koordynacyjnie wiąże niezbędny dla aktywności enzymatycznej jon manganowy [6]. W 2007 r. w bazie danych CAZY (<http://www.cazy.org>) znajdowały się 103 sekwencje glikozylotransferaz należących do rodziny GT6. U człowieka do rodziny GT6 należą: transferaza ABO, syntetaza Forssman (nieaktywna) i syntaza iGB3, odpowiedzialna za syntezę glikolipidów serii Globo.

Istotną cechą transferaz ABO jest przenoszenie reszty N-acetylogalaktozaminy lub galaktozy na resztę galaktozy z podstawioną fukozą, czyli antygen H. Krystaliczna struktura transferaz ABO została opracowana przez Patenaude i wsp. [37]. Wykazano, że topologia transferaz ABO przypomina strukturę nieaktywnej u człowieka transferazy galaktozy  $\alpha$ 1-3 [6,12]: łańcuch polipeptydowy transferazy ABO tworzy dwie domeny wiążące, pomiędzy którymi znajduje się szczelina z miejscem aktywnym. Szczelina ma około 13 Å szerokości i zawiera dwie reszty aminokwasowe, różne w transferazach A i B, których obecność jest niezbędna do określenia swoistości enzymu. Fragment N-kończący zawiera „kieszonkę Rossmana” – fragment, który wiąże cukier połączony z nukleotydem. Disacharydowy akceptor jest rozpoznawany przez domenę C-kończącą (ryc. 4). Glikozylotransferazy ABO tworzące wiązanie  $\alpha$ -glikozydowe są zaliczane do transferaz zachowujących (retaining) konformację  $\alpha$  cukru związanego z nukleotydem, który jest donorem w reakcji przyłączania (w przeciwieństwie do transferaz odwracających – inverting). Nazwa pochodzi stąd, że w UDP-cukrze wiązanie glikozydowe jest typu  $\alpha$ , a wiązanie przyłączonego cukru (galaktozy lub N-acetylogalaktozaminy) jest również typu  $\alpha$ , czyli enzym zachowuje konformację pomiędzy cukrem a cząsteczką. Podobnie jak w przypadku większości glikozylotransferaz, centrum katalityczne enzymu zawiera motyw DVD (Asp211, Val212 i Asp213). Dwie reszty kwasu asparaginowego wiążą jon  $Mn^{2+}$ , którego rola polega na koordynacyjnym wiązaniu reszt fosforanowych w UDP-cukrze.

Domena wiążąca akceptor jest umiejscowiona w obrębie reszt aminokwasowych 228-337, a rozpoznawanym fragmentem łańcucha jest Fuc $\alpha$ 1-2Gal, czyli antygen H. Kluczowymi resztami zaangażowanymi w rozpoznawanie tego antygeny są: His233, Glu303 i Thr245, które wiążą cząsteczkę galaktozy, oraz Asp326, która wiąże fukozę. Dodatkowo, obie reszty akceptora (Gal i Fuc) tworzą silne wiązania z grupą  $\beta$ -fosforanową UDP związanego z donorem, co sugeruje, że wiązanie tej cząsteczki jest niezbędnym krokiem poprzedzającym rozpoznanie akceptora (ryc. 5A).

Wśród glikozylotransferaz wykazujących różną swoistość, glikozylotransferazy A i B należą do najbardziej homologicznych, ponieważ różnią się tylko czterema resztami aminokwasowymi. Wiązanie dwóch różnych monosacharydów w domenie wiążącej donor jest uzależnione od obecności różnych aminokwasów w czterech pozycjach:





Ryc. 4. Przestrzenna struktura transferazy B. Enzym składa się z dwóch domen rozdzielonych szeroką szczeliną z centrum aktywnym, wiążącym substraty, które zaznaczono kolorem granatowym: antygen H (akceptor) i UDP (donor). Aminokwasy Asp211 i Asp213 (kolor pomarańczowy) wchodzą w skład motywu DVD wiążącego koordynacyjnie jon  $Mn^{2+}$  (pomarańczowa kula). Aminokwasy, które w transferazie B są inne niż w transferazie A (Gly176, Ser235, Met266 i Ala268) zaznaczono kolorem fioletowym. Nieuporządkowaną pętlę obejmującą reszty 179-194 przedstawiono zieloną przerywaną linią. Ryc. opracowana za pomocą programu PyMol na podstawie struktury 1LZJ z Protein Data Bank

176, 235, 266 i 268. Reszty Arg/Gly 176 i Gly/Ser 235 nie tworzą bezpośrednich wiązań z cząsteczką donora, przez co ich znaczenie dla swoistości enzymu jest mniejsze, chociaż ich obecność ma znaczenie dla aktywności. Nieuporządkowana pętla, obejmująca reszty 179-194 odgrywa rolę w uwalnianiu produktu; wykazano, że obecność glicyny w pozycji 176 (tak jak w transferazie B) powoduje 11-krotne obniżenie liczby obrotów enzymu. Krytyczna reszta Gly/Ser w pozycji 235 nie oddziałuje bezpośrednio z donorem, ale powoduje, że alifatyczny fragment akceptora w glikozylotransferazach A i B przyjmuje różne pozycje. Uważa się, że taka zmiana pozycji akceptora jest przyczyną trzykrotnego podwyższenia stałej  $K_m$  dla GTA w porównaniu z GTB [37].

Zmiana którejkolwiek z dwóch pozostałych reszt (Leu/Met 266 i Gly/Ala 268) ma znaczący wpływ na swoistość enzymu. Badania kinetyczne wykazały, że zamiana leucyny na metioninę w pozycji 266 ma większy wpływ na zmianę swoistości, niż obecność reszty Gly lub Ala w pozycji 268. Aminokwas w pozycji 266 (Leu/Met) znajduje się w miejscu umożliwiającym kontakt z grupą hydroksylową (w przypadku GTB) lub acetamidową (w przypadku GTA), natomiast Gly/Ala 268 wiąże się z grupami hydroksylowymi przy trzecim i czwartym węglu donora, identycznymi w obu przyłączanych monosacharydach. Można więc powiedzieć, że obecność leucyny lub metioniny w pozycji 266 decyduje bezpośrednio o wiązaniu

niem różnych cukrów, czyli odpowiednio N-acetylogalaktozaminy w grupie A i galaktozy w grupie B, a znaczenie reszty 268 jest mniejsze. W przypadku transferazy B oba aminokwasy (Met266 i Ala268) mają większe łańcuchy boczne, niż w przypadku transferazy A (Leu266, Gly268), przez co domena wiążąca w GTB może wiązać galaktozę, ale nie jest w stanie przyłączyć N-acetylogalaktozaminy, ponieważ jej cząsteczka ma większe rozmiary. Glikozylotransferaza A ma szczelinę o zbyt dużej objętości, aby galaktoza mogła utworzyć wiązania ze wszystkimi niezbędnymi resztami aminokwasowymi. Ponadto, obniżone dno szczeliny w miejscu aktywnym GTA pozwala na odsłonięcie histydyny w pozycji 233, która może utworzyć wiązanie wodorowe z grupą acetamidową N-acetylogalaktozaminy, dzięki czemu cukier ten może być właściwie umiejscowiony (ryc. 5B).

Swoistość enzymu może się zmienić również w wyniku zmiany reszty aminokwasowej innej niż 266 i 268. Jak wykazali Marcus i wsp., podstawienie prolina 234 przez serynę powoduje, że transferaza B może przenosić nie tylko UDP-Gal, ale i UDP-GalNAc, a więc enzym taki może syntetyzować zarówno antygeny A, jak i antygeny B. Jest to spowodowane tym, że reszta seryny w miejscu 234 poprzez oddziaływanie steryczne wpływa na położenie krytycznej reszty Met 266, co z kolei umożliwia wiązanie się N-acetylogalaktozaminy w miejscu aktywnym GTB [29].

#### PODGRUPY W UKŁADZIE ABO

Oprócz trzech podstawowych grup (A, B i O) wyróżniamy wiele podgrup różniących się głównie ilością antygeny obecnego na krwinkach. Wynika to z różnorodnych rzadkich mutacji w genach kodujących transferazy grupowe, co niejednokrotnie przekłada się na zmiany aktywności enzymu i w następstwie na ilościową zmianę ekspresji antygeny. Aktywność transferaz kodowanych przez poszczególne allele jest zależna od ilości mutacji w genie oraz od tego, czy mutacje te dotyczą reszt uznawanych za krytyczne (takimi resztami są np. reszty różniące swoistość transferaz A i B). Ogólnie, malejąca aktywność transferaz układa się w szereg dający podgrupy z malejącą ilością antygeny [49]:

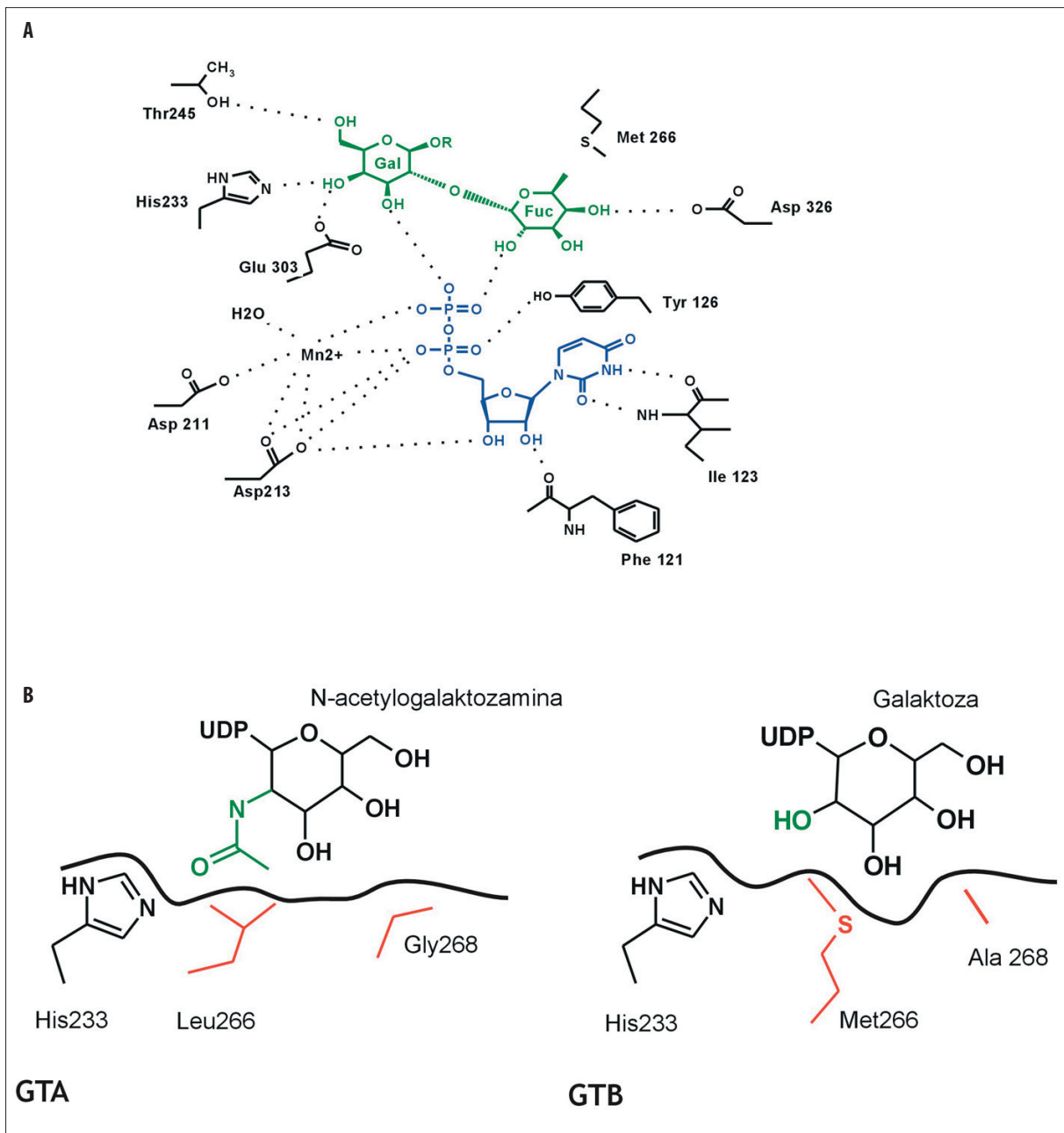
- dla alleli A:  $A1 > A2 > A3 > Ax > Ael$
- dla alleli B:  $B > B3 > Bx > Bel$

W obrębie podgrup mogą występować różne dodatkowe mutacje.

#### Grupa A i jej podgrupy

**Grupa A1** jest podstawową, konsensową i najprawdopodobniej najstarszą ewolucyjnie grupą krwi; dodatkowo wyróżniamy wiele jej podgrup różniących się pojedynczymi mutacjami (tabela 2A) [9,47]. Najczęściej są to substytucje, które nie powodują zmian fenotypowych, należą do nich podgrupy:

- A101** – klasyczny, podstawowy,
- A102** – charakteryzuje się obecnością znaczącej mutacji C467T (Pro156Leu); mutacja ta nie zmienia jednak swoistości transferazy ani jej aktywności,
- A103** – tak jak A102 plus dodatkowo C564T,
- A104** – tak jak A101 plus A297G,
- A112** – tak jak A102 plus A297G,



Ryc. 5. **A.** Schemat miejsca aktywnego transferazy B z uwzględnieniem wiązań między resztami aminokwasowymi centrum aktywnego oraz łańcuchem H i UDP-galaktozą. **B.** Schematyczne przedstawienie centrum aktywnego transferazy A i B. Transferaza B nie może związać UDP-N-acetylogalaktozamy, ponieważ centrum aktywne zawiera większe reszty aminokwasowe (Met266 i Ala268), które ograniczają dostęp dla większego substratu. W przypadku transferazy A, mniejsze reszty aminokwasowe (Gly268 i Leu266) pozwalają na związanie większego cukru. Ponadto, obniżone dno szczeliny w GTA pozwala na utworzenie wiązania wodorowego między His233 i grupą acetylamidową N-acetylogalaktozy, dzięki czemu cukier ten może być właściwie umiejscowiony

**A113** – jak A101 i dodatkowo mutacja C526G (Arg176Gly), która to mutacja jest identyczna z jedną z mutacji odróżniających transferazy A od B [49].

**Podgrupa A2:** allel A2 jest również polimorficzny i w jego obrębie można wyróżnić wiele mutacji; podgrupa A2 jest często spotykana w Europie, na Bliskim Wschodzie i w Afryce [49].

**A201** – najczęściej występująca podgrupa zawiera dwie charakterystyczne mutacje: substytucję C467T

(Leu156Pro) oraz delecję jednej z trzech cytozyn pomiędzy nukleotydem 1059–1061. Ta ostatnia zmiana powoduje przesunięcie ramy odczytu i przesunięcie kodonu zatrzymywania, co powoduje wydłużenie łańcucha polipeptydowego enzymu o 21 aminokwasów. Aktywność enzymatyczna białka powstałego w wyniku transkrypcji takiego genu jest obniżona o co najmniej 50%, w wyniku czego liczba antygenów A na powierzchni erytrocytów grupy A2 jest również znacząco niższa. Pozostałe warianty grupy A2 to:

Tabela 1. Znaczące różnice pomiędzy transferazami A i B

Numer nukleotydu Numer aminokwasu	297 (99)	526 (176)	657 (219)	703 (235)	796 (266)	803 (268)	930 (310)
GTA	A (Thr)	C (Arg)	C (His)	G (Gly)	C (Leu)	G (Gly)	G (Leu)
GTB	G (Thr)	G (Gly)	T (His)	A (Ser)	A (Met)	C (Ala)	A (Leu)

Mutacje zmieniające swoistość enzymu zaznaczone pogrubioną czcionką.

**A202** – C1054T (Arg352Trp),

**A203** – C1054G (Arg352Gly),

**A204** – ma cztery mutacje A297G, C526G (Arg176Gly), C657T, G703A (Gly235Ser) jak w grupie B oraz dwie analogiczne do O: C771T, G829A (Val277Met), co sugeruje, że jest to allel hybrydowy. Jeżeli allel ten występuje z allelem O to daje grupę A1, a jeżeli z B to powstaje A2B,

**A206** – del1060C,

**A206** – A1009G (Arg337Gly),

**Podgrupa A3:** w grupie tej wyróżnić możemy dwie podgrupy prowadzące do powstania fenotypu A3, charakteryzującego się znacznym obniżeniem ilości antygenów A na erytrocytach [4,49]:

**A301** – G871A (Asp291Asn),

**A302** – G829A (Val277Met) jak w O201, 1060delC jak w A201

Molekularne podstawy tego fenotypu nie są do końca poznane, dotąd zsekwencjonowano tylko 6 i 7 ekson allelu A3. Ze względu na obecność mutacji znalezionych wcześniej w innych allelach możliwe jest również, że A3 jest hybrydowym allelem powstałym z połączenia A201-O201-A201 [4].

**Podgrupa Ax:** fenotyp ten wykazuje znaczny spadek aktywności transferazy; jako główną mutację wyróżniającą tę podgrupę podaje się substytucję T646A (Ile216Phe), najprawdopodobniej mającą znaczny wpływ na zmniejszenie aktywności enzymu. Co ciekawe, żadna z mutacji występujących w allelach Ax nie jest charakterystyczna tylko dla nich; nasuwa to przypuszczenie, że podgrupa ta powstaje w wyniku łączenia się dwóch alleli - A lub B/O2 (O301) z O1v (O201):

**Ax01** – T646A,

**Ax02** – A297G, T646A, G681A, C771T, G829A,

**Ax03** – T646A, G681A C771T, G829A,

**Ax04** – T646A, G681A.

Dziedziczenie tej grupy jest dosyć skomplikowane, w niektórych przypadkach jest ono zgodne z zasadami Mendla, ale są również udokumentowane przypadki odstępstw od tych reguł. Podejrzewa się, że wytłumaczeniem może być zjawisko wzmocnienia allelicznego (omówionego w dalszej części pracy) [31,34,49].

**Podgrupa Ae1:** bardzo rzadka, charakteryzująca się insercją G w obrębie siedmiu guanin pomiędzy nukleotydami 798-804. Mutacja ta powoduje zmianę ramy odczytu i przesunięcie kodonu zatrzymania, co powoduje wydłużenie łańcucha polipeptydowego o 37 aminokwasów, obniżając

tym samym aktywność enzymatyczną białka. Stwierdzono również podstawienie w miejscu splajsingowym eksonu 6 w pozycji +5 (konsensowe miejsce GTAAGT zmienia się na GTAAAT). W wyniku takiego podstawienia cały ekson 6 zostaje wycięty w czasie potranskrypcyjnej obróbki mRNA [44]. Fenotypowo grupa ta objawia się brakiem aglutynacji z przeciwciałami anty-A i anty-AB, ale erytrocyty takie silnie reagują z anty-H. Zazwyczaj w osoczu obecne są przeciwciała anty-A:

**Ae101** – ins800G,

**Ae102** – A102 (C476T) i T646A oraz G681A jak w O201, zawiera więc mutację Phe216Ile, która znacznie zmniejsza aktywność enzymu.

**Podgrupa Am:** fenotyp ten charakteryzuje obniżona ilość antygeny na krwinkach, podczas gdy jego ilość w ślinie pozostaje niezmienną. Mutacja G664A (Val222Met) może obniżać aktywność enzymu, możliwe jest również, że istnieją mutacje w regionie promotorowym, zmniejszające wydajność transkrypcji [2,28].

**Podgrupa Aend:** zmiana w miejscu splajsingowym w intronie 6, A do G w pozycji +4.

**Podgrupa Abantu:** jest allelem rekombinowanym, powstałym w wyniku połączenia się alleli O1v (O201) i A2 z miejscem crossing-over w eksonie piątym. Delecja guaniny w czwartym intronie zmienia miejsce splajsingowe, co powoduje wyłączenie z transkryptu całego eksonu czwartego [16].

### Grupa B i jej podgrupy

Grupa B różni się od konsensowej A1 siedmioma mutacjami nukleotydowymi, z czego cztery powodują zmianę aminokwasu (tabela 1).

Zmiany aminokwasów prowadzą do zmiany swoistości enzymu, który uzyskuje w ten sposób swoistość wobec galaktozy zamiast N-acetylogalaktozaminy, a aktywność enzymu ulega obniżeniu. Grupa B, podobnie jak A, nie jest genotypowo homogenna i można ją podzielić na wiele podgrup (tabela 2B) [49].

**Podgrupa B1** – zaliczamy do niej:

**B101** – klasyczna, zawiera mutacje wymienione w tabeli 1,

**B102** – nie ma mutacji nukleotydu 930,

**B103** – nie ma mutacji nukleotydu 657,

**B107** – nie ma mutacji nukleotydu 526, która jest jedną z mutacji znaczących, odróżniających grupę A i B. Swoistość enzymu pozostaje niezmienną,

**B108** – nie ma mutacji nukleotydu 297.

**Podgrupa B301** wykazuje mutację na miejscu +5 trzeciego intronu, które jest miejscem splajsingowym. Zamiana guaniny na adeninę powoduje zmiany w obróbce potranskrypcyjnej mRNA, czego skutkiem jest brak eksonu 3 w końcowym transkrypcie. Białko takie ma niekompletny fragment transbłonowy i w większości pozostaje w cytoplazmie [51]. Ponadto allele takie mają substytucję C1054T (Arg352Trp). Erytrocyty tej grupy wykazują słabą aglutynację erytrocytów przez przeciwciała anty-B.

**Podgrupa Bx** ma mutację G871A (Asp291Asn). Aktywność enzymu jest obniżona.

**Podgrupa Bel** ma mutacje prowadzące do tak znacznego obniżenia transkrypcji, że aktywność transferazy B jest praktycznie niewykrywalna:

- Bel 01** – T641G (Met214Arg),
- Bel 02** – G669T (Glu223Asp).

Do tych dwóch podtypów [49] dodać można kolejny z mutacją C502T, zidentyfikowany przez Sun i wsp., mutacja ta, choć nieznająca, jest podawana przez autorów jako przyczyna powstawania fenotypu Bel [43].

**Podgrupa Bm:** antygen B jest bardzo trudny do wykrycia, nie reaguje z przeciwciałami anty-B i anty-AB, a słaba aktywność transferazy B powoduje, że jedynie niewielki procent antygenów H jest podstawiony galaktozą. Przyczyna jego powstawania nie jest dokładnie znana, najprawdopodobniej jest wynikiem mutacji w obrębie genu *ABO* [42,50].

**Podgrupa B(A):** w przypadku tej grupy na krwinkach znajduje się prawidłowa ilość antygeny B i dodatkowo pewna ilość antygeny A, który można zidentyfikować za pomocą monoklonalnych przeciwciał anty-A. Obecność antygeny A na krwinkach typowanych jako B tłumaczy się nieco zmienioną swoistością enzymu kodowanego przez allel *B(A)*. Enzym taki może przenosić nie tylko galaktozę, ale i N-acetylogalaktozaminę. Zjawisko to występuje również w przypadku krwinek typowanych jako B, z tym że w przypadku allelu *B(A)* efekt ten jest wzmocniony poprzez mutacje nukleotydów krytycznych dla różnicowania się grup A i B (tabela 2B); wyróżniamy trzy podgrupy powodujące ce powstanie fenotypu B(A):

- B(A)01** – (w porównaniu z allelem *B101*): T657C (mutacja cicha), A703G (Ser235Gly),
- B(A)02** – (w porównaniu z allelem *B101*): C700G (Pro234Ala) mutacja ta zmienia nie tylko krytyczną resztę (G703A, Gly235Ser), ale i resztę z nią sąsiadującą, co może mieć wpływ na budowę centrum katalitycznego i zmianę swoistości enzymu,
- B(A) var** – C657T oraz G703A (Gly235Ser).

**Podgrupa cisAB:** fenotypowo objawia się w identyczny sposób jak AB, czyli jednoczesną ekspresją na krwinkach antygenów A i B. Typowa grupa AB, nazywana również transAB, powstaje w wyniku kodominacji dwóch alleli (zarówno A jak i B), co prowadzi do powstania dwóch enzymów o różnych aktywnościach. Natomiast cisAB powstaje, kiedy jeden allel koduje enzym o aktywności transferazowej zarówno A jak i B [48]. Zmiana jednego z czterech aminokwasów swoistych dla grupy B powoduje zmianę

w centrum aktywnym, w wyniku czego enzym uzyskuje zdolność do przenoszenia reszt zarówno galaktozy jak i N-acetylogalaktozminy;

- cisAB01** – (w porównaniu z grupą A102): G803C (Gly268Ala) (czyli dodatkowo mutacja C476T – Pro156Leu),
- cisAB02** – (w porównaniu z grupą B101): A796C,
- cisAB03** – (w porównaniu z grupą B101) C700T (Pro234Ser) [48].

## Grupa O i jej podgrupy

Fenotyp O charakteryzuje się brakiem determinant antygenowych A i B na erytrocytach. Allel *O* w wyniku mutacji stracił zdolność do kodowania aktywnych postaci enzymów. Grupa ta jest niezwykle zróżnicowana, w bazie alleli *ABO* na stronie Blood Group Antigen Mutation Database [5] znajduje się 68 alleli o różnych sekwencjach (część z nich przedstawiono w tabeli 2C). Można jednak wyróżnić dwie grupy zasadniczo różniące się między sobą [15,33]. Pierwszą z nich jest grupa alleli zawierających konstytutywną delecję guaniny w pozycji 261, która powoduje pojawienie się wcześniejszego kodonu zatrzymania. Zmiana ta jest głównym powodem utraty aktywności przez enzym, ponieważ powstałe białko jest złożone tylko z 88 aminokwasów i brak w nim centrum aktywnego, w wyniku czego nie ma możliwości katalizowania reakcji przeniesienia reszty cukrowej na odpowiedni donor. Najczęściej spotykany allel *O101* jest identyczny z allelem *A101*, a jedyną różnicą między nimi jest delecja w pozycji 261. Allele grupy O mogą zawierać również inne mutacje, zarówno identyczne z mutacjami w grupach A i B jak i zupełnie nowe, charakterystyczne tylko dla danego allelu *O*. Do tych pierwszych (zawierających mutacje znane wcześniej z allelu A lub B) zaliczymy allele, takie jak: *O102* (T579C), *O117* (768A), czy *O107* (mutacja C467T charakterystyczna dla allelu *A102*) oraz *O110* (substytucja C657T – typowa dla allelu *B101*).

Jeżeli oprócz delecji nukleotydu 261 (261delG), allel zawiera również mutację A297G, to zaliczany jest do grupy *O1v*, nazywanej inaczej *O201* [7]. Zaliczamy tu allele, takie jak: *O205* z podstawieniami T646A, G681A, C771T, G829A; *O212* mający dodatkową substytucję G351A w porównaniu z *O205*, czy *O209* z dodatkową w stosunku do *O205* zamianą G542A (tabela 2C).

Allele *O* niezawierające delecji 261G mają charakterystyczną substytucję G802A. Mutacja ta powoduje zmianę Gly268Arg, a jej obecność uniemożliwia wiązanie substratu w miejscu aktywnym enzymu [1]. Do grupy tej zaliczamy allele, takie jak *O303*, *O304*, *O302* czy *O301*. Wszystkie one mają mutację G802A oraz inne dodatkowe mutacje. Ostatnie doniesienia wskazują jednak na to, że w niektórych przypadkach niedelecyjne allele *O* mogą kodować białko mające niewielką aktywność transferazową, zdolne do wytwarzania antygeny A. Aktywność katalityczna takiego enzymu jest bardzo mała, a antygeny wykrywane są jedynie bardzo czułymi metodami typu absorpcja – elucja [40].

Schematy najważniejszych alleli *ABO* oraz białek przez nie kodowanych przedstawiono na ryc. 6.



Tabela 2A. Punktowe mutacje obecne w allelach grup A, B, O w porównaniu z konsensowym allelem A 101

A Nukleotyd Allel	Ekson															
	6						7									
	297	467	526	564	646	657	664	681	703	771	798-804	829	871	1009	1054	1059-1061
A101	A	C	C	C	T	C	G	G	G	C		G	G	A	C	
A102		T														
A103		T		C												
A104	G															
A112	G	T														
A113			G													
A201		T														delC
A202																T
A203															G	
A204	G		G			T			A	T		A				
A205																delC
A206		T												G		
A301													A			
A302												A				delC
Ax01					A											
Ax02	G				A			A		T		A				
Ax03					A			A		T		A				
Ax04					A			A								
Ael01											delG					
Ael02		T			A			A								
Am							A									
Aminokwas konsensowy	Thr	Pro	Arg	Arg	Phe	His	Val	Pro	Gly	Pro		Val	Asp	Arg	Arg	
Aminokwas zmieniony		Leu	Gly		Ile		Met	Gly	Ser			Met	Asn	Gly	Trp/Gly	

**MOŻLIWE MECHANIZMY POWSTAWANIA WARIANTÓW ABO**

**Rekombinacja w obrębie genu ABO – allele hybrydowe**

Niektóre allele genu ABO powstają w wyniku rekombinacji, czyli łączenia się dwóch różnych alleli. Istnieją dwa mechanizmy mogące prowadzić do powstawania takich hybrydowych genów: crossing-over i konwersja genów. Jeśli fragment jednego allelu otoczony jest przez inny, to mamy do czynienia z konwersją genów, natomiast jeśli jedna część genu pochodzi od jednego, a druga od innego allelu, to mówimy o crossing-over. Takie właśnie mechanizmy mogą być odpowiedzialne za ogromną różnorodność alleli układu grupowego ABO. Według przeglądowego artykułu Yip z 2002

roku prawie połowa alleli, z wymienionych siedemdziesięciu jeden, powstała w wyniku rekombinacji [34,41,49].

**Crossing-over**

Allele powstałe w wyniku crossing-over składają się z dwóch części pochodzących od dwóch różnych alleli. Dzięki analizom SNP (single nucleotide polymorphism – pojedyncze zmiany nukleotydów) w intronach można stwierdzić czy przyczyną powstania podgrupy była wymiana części chromosomu oraz dosyć dokładnie określić miejsce ich łączenia (przykłady alleli na ryc. 7A).

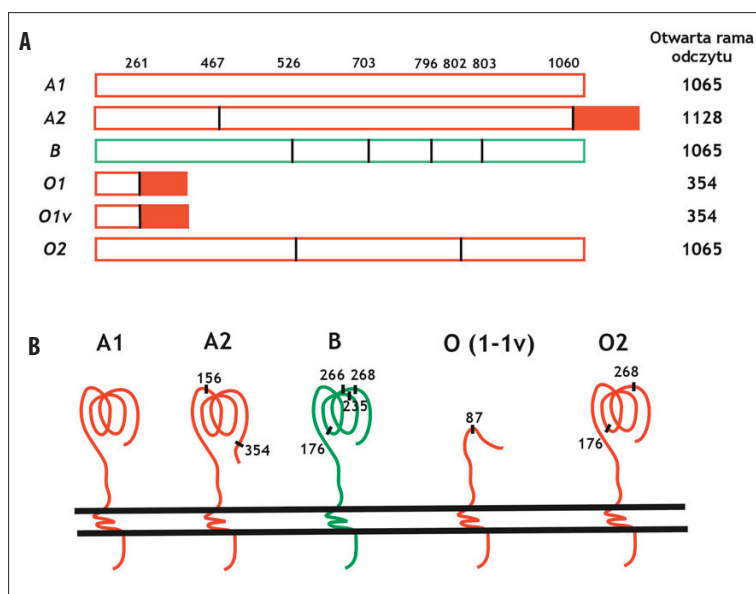
W zależności od tego, który z eksonów pochodzi z którego allelu, mogą powstawać różne podgrupy. Na przy-

Tabela 2B. Punktowe mutacje obecne w allelach grup A, B, O w porównaniu z konsensowym allelem A 101

<b>B</b>	<b>Ekson</b>												
	<b>6</b>						<b>7</b>						
Nukleotydy Allel	297	467	526	641	657	669	700	703	796	803	871	930	1054
<i>A101</i>	A	C	C	T	C	G	C	G	C	G	G	G	C
<i>B101</i>	G		G		T			A	A	C		A	
<i>B102</i>	G		G		T			A	A	C			
<i>B103</i>	G		G					A	A	C		A	
<i>B107</i>	G				T			A	A	C		A	
<i>B108</i>			G		T			A	A	C		A	
<i>B301</i>	G		G		T			A	A	C		A	T
<i>Bx</i>	G		G		T			A	A	C	A	A	
<i>Bel01</i>	G		G	G	T			A	A	C		A	
<i>Bel02</i>	G		G		T	T		A	A	C		A	
<i>B(A)01</i>	G		G						A	C		A	
<i>B(A)02</i>	G		G		T		G	A	A	C		A	
<i>cisAB01</i>		T								C			
<i>cisAB02</i>	G		G		T			A		C			
Aminokwas konsensowy	Thr	Pro	Arg	Met	His	Glu	Pro	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Arg
Aminokwas zamieniony	–	–	Gly	Arg	–	Asp	Ala	Ser	Met	Ala	Asn	–	–

Tabela 2C. Punktowe mutacje obecne w allelach grup A, B, O w porównaniu z konsensowym allelem A 101

<b>O</b>	<b>Ekson</b>																
	<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>		<b>6</b>				<b>7</b>						
Nukleotydy Allel	53	106	188	189	220	261	297	467	526	646	681	771	802	829	893	927	1096
<i>A101</i>	G	G	G	C	C	G	A	C	C	T	G	C	G	G	C	C	G
<i>O101</i>						del G											
<i>O201</i>		T	A	T	T	del G	G			A	A	T		A			
<i>O203</i>						del G		T									T
<i>O301</i>								T									T
<i>O302</i>																	A
<i>O303</i>	T				T	G	G						A				A
Aminokwas konsensowy	Arg	Val	Arg	Pro	Val	Thr	Pro	Arg	Phe	Pro	Pro	Gly	Val	Ala	Tyr		
Aminokwas zamieniony	Leu	Phe	His	Ser	–	–	Leu	Gly	–	–	–	Arg	–	Val	Stop		



Ryc. 6. **A.** Otwarte ramy odczytu (długość podana w parach zasad) głównych alleli ABO oraz miejsca mutacji powodujących zmianę aminokwasu (czarne kreski) w sekwencji nukleotydowej w porównaniu z konsensusowym allelem A1. Sekwencję prawidłową (sensowną) przedstawiono w postaci pustej ramki, a sekwencję nonsensowną (ze zmienioną ramką odczytu) w postaci wypełnionego prostokąta. Allel A2 zawiera mutację w pozycjach 467 i 1060; allel B w pozycjach 526, 703, 796 i 803; allele O1 i O1v w pozycji 261, a allel O2 w pozycjach 526 i 802. **B.** Schematyczny obraz łańcuchów polipeptydowych kodowanych przez geny ABO. Zaznaczono numery reszt aminokwasowych, które są inne niż w konsensusowym allelu A1

kład rekombinacja *O1O1-O2O1* powoduje powstanie grupy O202, a *O2O1-O1O1* grupy O103. Różne są też miejsca rekombinacji dla tych alleli; miejsce dla *O2O2* znajduje się pomiędzy nukleotydami 235-446 intronu szóstego, a dla *O1O3* pomiędzy 950-1011 tego samego intronu. Przykładem alleli, które powstały w wyniku crossing-over mogą być również allele: *B108* powstały w wyniku połączenia *A1O2* i *B1O1*, oraz *A112* złożony z *A1O4* i *B1O2*. Miejsce rekombinacji w obu przypadkach znajduje się w intronie szóstym [30]. Wyróżnić można co najmniej pięć miejsc rekombinacji wspólnych dla wielu alleli: są to nukleotydy 188-226, 280-446, 786-891, 950-1011 (wszystkie w intronie 6) i od 1013 nukleotydu w intronie 6 do 526 w eksonie 7 [30]. Częstsze występowanie rekombinacji crossing-over w obrębie genu *ABO* może być związane z sekwencjami *chi* (5'-GCTGGTGG-3') i *chi*-podobnymi (5'-GCTGGCGG-3'), które występują przy 3'-końcu szóstego eksonu (nukleotydy 853-860) i które pokrywają się z jednym z pięciu częstych miejsc rekombinacji wymienianych przez Ogasawarę, oraz w intronie trzecim (nt. 269-276) [32,49]. Sekwencje te są określane jako „gorące miejsca”, czyli miejsca inicjacji procesu crossing-over (*chi* – crossover hotspot instigator).

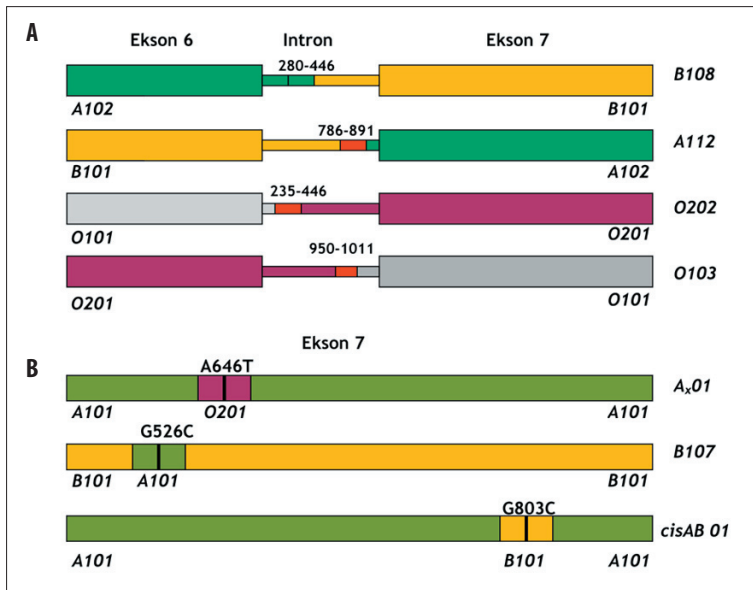
Wykazano, że w organizmach prokariotycznych sekwencje te stymulują nukleazę RecBCD, która jest enzymem mogącym inicjować homologiczną rekombinację. Enzym RecBCD (złożony z trzech podjednostek) wykazuje aktywność helikazy, egzonukleazy, endonukleazy oraz ATP-azy zależnej od DNA. Białko to przesuwa się wzdłuż dwuniciowego DNA, rozwijając je i nacinając. Po napotkaniu sekwencji *chi* nacinana jest nić 3', a następnie podjednostka mająca aktywność nukleazową ulega dezaktywacji. W wyniku tego powstaje jednoniciowe DNA rozpoznawane przez białko RecA, a powstały w ten sposób kompleks RecA-ssDNA atakuje homologiczny chromosom i przesuwa się wzdłuż niego w poszukiwaniu komplementarnych sekwencji. Pomiedzy komplementarną sekwencją a nicią związaną z białkiem RecA tworzą się wiązania wodorowe i powstaje trypleks. Następnie nić z sekwencją *chi* odsuwa drugą z nici dwuniciowego DNA, która to nić może

następnie parować z nicią „pozostawioną” przez nić 3' mającą sekwencję *chi* [3]. Do tej pory udowodniono znaczenie sekwencji *chi* w rekombinacji u Prokaryota (głównie u bakterii *E. coli*) niemniej jednak to, że miejsca crossing-over znajdują się często na długim ramieniu chromosomu 9 (czyli w *locus* genu *ABO*) może świadczyć o tym, że również u ludzi sekwencje *chi* mogą być zaangażowane jako „hot-spot” wymiany części chromosomów.

### Konwersja genów

Drugim typem rekombinacji wpływającym na różnorodność alleli *ABO* jest konwersja genów. Znane są dwa mechanizmy dające taki efekt. Pierwszy z nich występuje, jeśli podczas replikacji jedna z nici znajdzie się podczas mejozy pomiędzy rozplecionymi niciami homologicznego chromosomu; na matrycy homologicznego chromosomu dosyntetyzowany jest wtedy fragment genu. W drugi mechanizm zaangażowane są systemy naprawcze DNA: występuje wtedy, kiedy następuje błędne parowanie zasad i enzymy naprawcze na podstawie drugiej, losowo wybranej nici naprawiają ten błąd. Jeżeli wybrana nić pochodzi z chromosomu homologicznego, mówimy o konwersji genów. Zrekombinowany gen, który powstał w wyniku działania jednego z wymienionych mechanizmów, ma krótki fragment sekwencji pochodzącej z drugiego allelu. Proces ten różni się od crossing-over tym, że nie zachodzi tu wymiana części chromosomu, ale włączenie fragmentu jednego genu w drugi, homologiczny [45].

Allele *ABO*, które powstały w ten sposób, mają jedną lub kilka mutacji pochodzących z innego allelu. Jako przykład można wymienić allel *B107*, który nie ma charakterystycznej dla alleli *B* substytucji C526G, tylko sekwencję zgodną z konsensusowym allelem *A1O1* (ryc. 7B). Działanie tego mechanizmu tłumaczy również powstanie alleli *cis-AB*, które mają część mutacji, takich jak allel *A*, a część jak *B*. Oprócz tego istnieją również allele, które powstały w wyniku więcej niż jednej konwersji. Takim allelem jest np. *A110*, który prawdopodobnie jest złożony z alleli *A-B-A-O2-A*.



Ryc. 7. **A.** Przykłady alleli *ABO* powstałych w wyniku rekombinacji crossing-over w intronie między eksonami 6 i 7. Nazwy alleli podlegających rekombinacji podano poniżej eksonów, a nazwę nowego allela po prawej stronie rysunku. Przybliżone położenie miejsca rekombinacji oznaczono czerwonym kolorem oraz numerami nukleotydów (numeracja od początku intronu). **B.** Przykłady alleli *ABO* powstałych w wyniku konwersji genów w eksonie 7. Nazwy alleli podlegających rekombinacji podano poniżej eksonów, a nazwę nowego allela po prawej stronie rysunku. Zaznaczono miejsca, w których wystąpiła konwersja genów, oraz mutacje nukleotydowe wprowadzone w wyniku konwersji

### Wzmocnienie alleliczne (allelic enhancement)

Zjawisko to polega na wzmacnianiu ekspresji jednego z alleli przez drugi homologiczny allel. W wyniku takiego mechanizmu jeden z alleli, którego ekspresja jest słaba lub nie ma jej wcale, w wyniku obecności drugiego allelu daje sygnał większy niż spodziewany. Mechanizm działania allelicznego wzmocnienia nie jest do końca poznany, aczkolwiek istnieje dwie hipotezy tłumaczące jego powstawanie.

Pierwsza zaproponowana przez Hosseini-Maff i wsp. [15] podaje jako możliwą przyczynę powstawania wzmocnienia allelicznego mitotyczną rekombinację w komórkach szpiku kostnego. W jej wyniku, za pośrednictwem rekombinacji homologicznej lub konwersji genów, miałyby dochodzić do wymiany części chromosomu pomiędzy dwoma allelami. W ten sposób, z dwóch niefunkcyjnych alleli (np. *O1* i *O2*) powstałyby podczas rekombinacji dwa nowe, z których jeden mógłby kodować białko mające aktywność enzymatyczną. Autorzy jako potencjalne miejsca rekombinacji wymieniają opisane wcześniej sekwencje *chi*.

Autorzy drugiej hipotezy [35] sugerują, że wzmacnianie odbywa się nie na poziomie genu, ale białka, a „osłabiona” mutacjami transferaza może być wzmacniana przez pełnej długości peptyd. Wzmocnienie odbywałoby się poprzez stabilizowanie struktury nieaktywnego normalnie enzymu w wyniku tworzenia dimeru pomiędzy nieaktywnym białkiem a białkiem ulegającym ekspresji z drugiego allelu.

Jednym z przykładów ilustrujących działanie wzmocnienia allelicznego jest opisany przez Cho i wsp. [9] allel *Avar*. W zależności od allelu, z którym jest współdziedziczony, allel taki może prowadzić do powstania różnych fenotypów. Jeśli współdziedziczonym allelem jest *O*, powstaje grupa krwi *O*, jeśli zaś takim allelem jest *B*, to ujawnia się słaba grupa *A* połączona z *B* ( $A_{\text{weak}}B$ ).

Podobny mechanizm opisano również w przypadku grupy *Ax*. Wykazano, że jeśli allel *Ax* jest współdziedziczony

z allelem *B*, to na erytrocytach jest podwyższona ekspresja antygeny *A*. Jeżeli natomiast allel ten jest dziedziczony wspólnie z *O*, to ekspresja antygeny *A* jest obniżona. W tym przypadku mechanizm jest podobny: allel *B* daje się wzmacniać ekspresję antygeny *A* [35].

### Regulacja ekspresji genu *ABO*

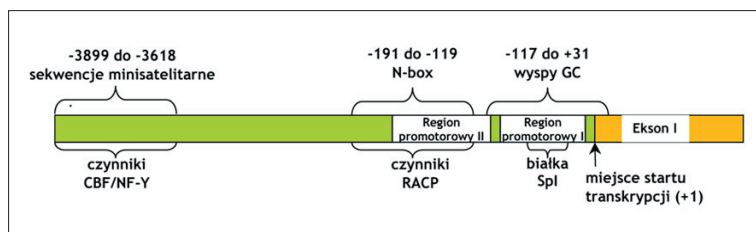
Gen *ABO* znajduje się pod kontrolą konstytutywnego promotora znajdującego się tuż przed miejscem inicjacji transkrypcji (oznaczanym jako +1), oraz alternatywnego promotora umiejscowionego bezpośrednio za 5'-końcem wysp GC [21,23,46]. Oprócz tego w regionie powyżej miejsca początku transkrypcji znajdują się sekwencje regulatorowe (ryc. 8).

Jedną z nich jest obszar pomiędzy -117 a +31 nukleotydem. W regionie tym znajdują się liczne wyspy GC, będące miejscem przyłączenia się czynnika Sp1 (wiąże się on do sekwencji pomiędzy -22 a -14 nukleotydem regionu powyżej miejsca początku transkrypcji). Czynnikiem ten jest białkiem kontrolującym transkrypcję.

Wyspy GC są również potencjalnym miejscem metylacji, wpływającym na przyłączanie się czynnika Sp1. Zależność między metylacją a wzmacnianiem jest odwrotnie proporcjonalna – im bardziej metylowane są cytozyny w parach GC, tym słabiej wiąże się białko wzmacniające i w rezultacie transkryptu jest mniej. Hipermetylacja może nawet doprowadzić do zupełnego braku ekspresji genu [13,24].

Elementami mogącymi mieć wpływ na wzmacnienie transkrypcji są również tandemowo powtarzające się minisatelitarne sekwencje w regionie od -3899 do -3618. Do miejsc tych wiąże się czynnik transkrypcyjny CBF/NF-Y, rozpoznający sekwencję CCAAT [25]. Wykazano, że liczba tych powtórzeń jest zależna od grupy krwi, a im więcej powtórzeń, tym proces transkrypcji jest bardziej efektywny. Allele *A1* i *O2* (*O301*) mają po jednym powtórzeniu, a allele *A2*, *B*, *O* i *O1v* (*O201*) po cztery [8]. Więcej wzmacniaczy w przypadku genu *B* prawdopodobnie powoduje podwyższoną eks-





Ryc. 8. Schemat budowy regionu promotorowego genu *ABO*. Powyżej genu zaznaczono sekwencje regulatorowe, poniżej czynniki transkrypcyjne, które się do nich wiążą. Czynniki CBF/NF-Y oraz Spl powodują wzrost transkrypcji, natomiast czynnik RACP działa hamująco

presję mRNA dla tego genu, co częściowo może kompenso-  
wać obniżoną aktywność enzymatyczną transferazy B [8].

Oprócz sekwencji wzmacniających, wpływ na transkrypcję mogą mieć również sekwencje hamujące. Negatywnym regulatorem transkrypcji jest położony w obrębie nukleotydów od -191 do -119 tzw. N-box o sekwencji CACNAG. Element ten rozpoznawany jest przez czynniki jądrowe, które nie są jeszcze dokładnie określone, a stosuje się do nich wspólną nazwę RACP (repressor for the *ABO* constitutive promoter – represor konstytutywnego promotora *ABO*) [22]. N-box jest również rozpoznawany przez czynniki z rodziny bHLH, które mogą oddziaływać z kompleksem deacetylującym histony, co również wpływa na hamowanie transkrypcji.

Dodatkowymi czynnikami wpływającymi na regulację ekspresji mogą być również czynniki translacyjne oraz lokalizacja w aparacie Golgiego.

## PIŚMIENICTWO

[1] Amado M., Bennett E.P., Carneiro F., Clausen H.: Characterization of the histo-blood group O(2) gene and its protein product. *Vox Sang.*, 2000; 79: 219–226

[2] Asamura H., Ota M., Takayanagi K., Saito S., Tsukada K., Fukushima H.: Molecular genetic analysis of the Am phenotype of the ABO blood group system. *Vox Sang.*, 2002; 83: 263–267

[3] Baj J., Markiewicz Z.: *Biologia molekularna bakterii*. Wydawnictwo Naukowe PWN 2006

[4] Barjas-Castro M.L., Carvalho M.H., Locatelli M.F., Bordin S., Saad S.T.: Molecular heterogeneity of the A3 subgroup. *Clin. Lab. Haematol.*, 2000; 22: 73–78

[5] Blumenfeld O.O., Patnaik S.K.: Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database. *Human Mutat.*, 2004, 23: 8–16

[6] Boix E., Zhang Y., Swaminathan G.J., Brew K., Acharya K.R.: Structural basis of ordered binding of donor and acceptor substrates to the retaining glycosyltransferase, alpha-1,3-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 28310–28318

[7] Bugert P., Rutten L., Goerg S., Kluter H.: Characterization of a novel O(1) variant allele at the ABO blood group locus. *Tissue Antigens*, 2001; 58: 422–424

[8] Chester M.A., Olsson M.L.: The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev.*, 2001, 15: 177–200

[9] Cho D., Shin M.G., Yazer M.H., Kee S.J., Shin J.H., Suh S.P., Jeon M.J., Song J.W., Ki C.S., Ryang D.W.: The genetic and phenotypic basis of blood group A subtypes in Koreans. *Transfus. Med.*, 2005; 15: 329–334

[10] Decastello A. von, Sturli A.: Ueber die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. *Muenchener Medizinische Wochenschrif*, 1902; 49: 1090–1095

[11] Dungern E. von, Hirsfeld L.: Über Vererbung gruppenspezifischer Strukturen des Blutes. *Z Immun. Forsch. Exper. Ther.*, 1910; 6: 284–292

[12] Gastinel L.N., Bignon C., Misra A.K., Hindsgaul O., Shaper J.H., Joziase D.H.: Bovine alpha1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases. *EMBO J.*, 2001; 20: 638–649

## NAZEWNICTWO

Nomenklatura alleli *ABO* jest bardzo niejednorodna, ponieważ prawie każdy autor ma własny pomysł na nazewnictwo poszczególnych alleli; na przykład podstawowy allel *A101* jest również określany jako  $A^{1-1}$ ,  $ABO^*A101$ ,  $ABO^*A(Pro)$ . Największą niejednorodność napotkamy przy nazewnictwie alleli O, które są najbardziej zróżnicowane, a w dodatku dają taki sam fenotyp. Dodatkowym utrudnieniem są liczne mutacje w obrębie intronów, przez co pojawiają się allele o takim samym nazewnictwie a z indeksem „intrinsic” lub „exonic” [8].

## PODZIĘKOWANIE

Autorzy dziękują Pani Profesor Elwirze Lisowskiej za przeczytanie manuskryptu i cenne uwagi.

[13] Hata Y., Kominato Y., Yamamoto F.I., Takizawa H.: Characterization of the human ABO gene promoter in erythroid cell lineage. *Vox Sang.*, 2002; 82: 39–46

[14] Hennet T.: The galactosyltransferase family. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002; 59: 1081–1095

[15] Hosseini-Maaf B., Irshaid N.M., Hellberg A., Wagner T., Levene C., Hustinx H., Steffensen R., Chester M.A., Olsson M.L.: New and unusual O alleles at the ABO locus are implicated in unexpected blood group phenotypes. *Transfusion*, 2005; 45: 70–81

[16] Hosseini-Maaf B., Smart E., Chester M.A., Olsson M.L.: The  $A_{\text{Bantu}}$  phenotype in the ABO blood group system is due to a splice-site mutation in a hybrid between a new O1-like allelic lineage and the A2 allele. *Vox Sang.*, 2005; 88: 256–264

[17] Kelly R.J., Ernst L.K., Larsen R.D., Bryant J.G., Robinson J.S., Lowe J.B.: Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (Oh) and para-Bombay individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 5843–5847

[18] Kelly R.J., Rouquier S., Giorgi D., Lennon G.G., Lowe J.B.: Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group alpha (1,2)fucosyltransferase gene (FUT2): Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 4640–4649

[19] Koda Y., Soejima M., Kimura H.: The polymorphisms of fucosyltransferases. *Leg. Med. (Tokyo)*, 2001; 3: 2–14

[20] Koda Y., Soejima M., Liu Y., Kimura H.: Molecular basis for secretor type alpha(1,2)-fucosyltransferase gene deficiency in a Japanese population: a fusion gene generated by unequal crossover responsible for the enzyme deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 1996; 59: 343–350

[21] Kominato Y., Hata Y., Matsui K., Takizawa H.: Regulation of ABO gene expression. *Leg. Med. (Tokyo)*, 2005; 7: 263–265

[22] Kominato Y., Hata Y., Matsui K., Takizawa H., Tsukada J., Nakajima T., Kaneko Y., Kishi K.: Transcriptional regulation of the human ABO histo-blood group genes is dependent on the N box upstream of the proximal promoter. *Transfusion*, 2004; 44: 1741–1749

[23] Kominato Y., Hata Y., Takizawa H., Matsumoto K., Yasui K., Tsukada J., Yamamoto F.: Alternative promoter identified between a hypermethylated upstream region of repetitive elements and a CpG island in human ABO histo-blood group genes. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 37936–37948

- [24] Kominato Y., Hata Y., Takizawa H., Tsuchiya T., Tsukada J., Yamamoto F.: Expression of human histo-blood group ABO genes is dependent upon DNA methylation of the promoter region. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 37240–37270
- [25] Kominato Y., Tsuchiya T., Hata N., Takizawa H., Yamamoto F.: Transcription of human ABO histo-blood group genes is dependent upon binding of transcription factor CBF/NF-Y to minisatellite sequence. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 25890–25898
- [26] Landsteiner K.: Zur Kenntnis des antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentralbl. Bakteriol.*, 1900; 27: 357–362
- [27] Landsteiner K.: Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift.*, 1901; 46: 1132–1134
- [28] Lin M., Hou M.J., Twu Y.C., Yu L.C.: A novel A allele with 664G>A mutation identified in a family with the Am phenotype. *Transfusion*, 2005; 45: 63–69
- [29] Marcus S.L., Polakowski R., Seto N.O., Leinala E., Borisova S., Blancher A., Roubinet F., Evans S.V., Palcic M.M.: A single point mutation reverses the donor specificity of human blood group B-synthesizing galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 12403–12405
- [30] Ogasawara K., Yabe R., Uchikawa M., Nakata K., Watanabe J., Takahashi Y., Tokunaga K.: Recombination and gene conversion-like events may contribute to ABO gene diversity causing various phenotypes. *Immunogenetics*, 2001; 53: 190–199
- [31] Olsson M.L., Chester M.A.: Heterogeneity of the blood group Ax allele: genetic recombination of common alleles can result in the Ax phenotype. *Transfus. Med.*, 1998; 8: 231–238
- [32] Olsson M.L., Chester M.A.: Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfus. Med.* 2001, 11: 295–313
- [33] Olsson M.L., Guerreiro J.F., Zago M.A., Chester M.A.: Molecular analysis of the O alleles at the blood group ABO locus in populations of different ethnic origin reveals novel crossing-over events and point mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 234: 779–782
- [34] Olsson M.L., Irshaid N.M., Hosseini-Maaf B., Hellberg A., Moulds M.K., Sareneva H., Chester M.A.: Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood*, 2001; 98: 1585–1593
- [35] Olsson M.L., Michalewska B., Hellberg A., Walaszczyk A., Chester M.A.: A clue to the basis of allelic enhancement: occurrence of the Ax subgroup in the offspring of blood group O parents. *Transfus. Med.*, 2005; 15: 435–442
- [36] Orczyk-Pawilowicz M.: The role of fucosylation of glycoconjugates in health and disease. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2007; 61: 240–252
- [37] Patenaude S.I., Seto N.O., Borisova S.N., Szpacenko A., Marcus S.L., Palcic M.M., Evans S.V.: The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.*, 2002; 9: 685–690
- [38] Schwarz H.P., Dorner F.: Karl Landsteiner and his major contributions to haematology. *Br. J. Haematol.*, 2003; 121: 556–565
- [39] Seltsam A., Blasczyk R.: Missense mutations outside the catalytic domain of the ABO glycosyltransferase can cause weak blood group A and B phenotypes. *Transfusion*, 2005; 45: 1663–1669
- [40] Seltsam A., Das Gupta C., Wagner F.F., Blasczyk R.: Nondeletional ABO\*O alleles express weak blood group A phenotypes. *Transfusion*, 2005; 45: 359–365
- [41] Seltsam A., Hallensleben M., Kollmann A., Blasczyk R.: The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood*, 2003; 102: 3035–3042
- [42] Sousa N., Anicchino-Bizzacchi J.M., Leite E.M., Locatelli M.F., Albuquerque D., Costa F.F., Barjas-Castro M.L.: Association of ABO gene mutations resulting in a rare B subgroup. *Vox Sang.*, 2005; 88: 31–34
- [43] Sun C.F., Chen D.P., Lin K.T., Wang W.T., Wang Y.C., Yu L.C.: Molecular genetic analysis of the Bel phenotype. *Vox Sang.*, 2003; 85:216–220
- [44] Sun C.F., Yu L.C., Chen I.P., Chou D.L., Twu Y.C., Wang W.T., Lin M.: Molecular genetic analysis for the Ae1 and A3 alleles. *Transfusion*, 2003; 43: 1138–1144
- [45] Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R.: *Molecular Biology of the Gene*, Benjamin Cummings, 2004
- [46] Yamamoto F.: Review: ABO blood group system--ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematol.*, 2004; 20: 3–22
- [47] Yamamoto F., Marken J., Tsuji T., White T., Clausen H., Hakomori S.: Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 1146–1151
- [48] Yazer M.H.: What a difference 2 nucleotides make: a short review of ABO genetics. *Transfus. Med. Rev.*, 2005; 19: 200–209
- [49] Yip S.P.: Sequence variation at the human ABO locus. *Ann. Hum. Genet.*, 2002; 66: 1–27
- [50] Yoshida A., Yamato K., Dave V., Yamaguchi H., Okubo Y.: A case of weak blood group B expression (Bm) associated with abnormal blood group galactosyltransferase. *Blood*, 1982; 59: 323–327
- [51] Yu L.C., Twu Y.C., Chou M.L., Chang C.Y., Wu C.Y., Lin M.: Molecular genetic analysis for the B(3) allele. *Blood*, 2002; 100: 1490–1492