

Lékařská biologie a genetika (III. díl)

Aleš Panczak a kolektiv
Berta Otová (ed.)



UČEBNÍ TEXTY UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

Lékařská biologie a genetika (III. díl)

**MUDr. Aleš Panczak, CSc. a kolektiv
doc. RNDr. Berta Otová, CSc. (ed.)**

Recenzovali:

prof. MUDr. Radim Brdička, DrSc.

RNDr. Eduard Kočárek, Ph.D.

Autorský kolektiv:

doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

MUDr. Jaroslav Kotlas

doc. RNDr. Berta Otová, CSc. (ed.)

MUDr. Aleš Panczak, CSc.

RNDr. Lucie Schwarzová, Ph.D.

MUDr. Antonín Šípek

Vydala Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum

jako učební text pro 1. lékařskou fakultu UK

Sazba DTP Nakladatelství Karolinum

Vydání první

© Univerzita Karlova v Praze, 2013

© Aleš Panczak a kolektiv, Berta Otová (ed.), 2013

Text neprošel jazykovou ani redakční úpravou nakladatelství

ISBN 978-80-246-2415-0

ISBN 978-80-246-2423-5 (online : pdf)



Univerzita Karlova v Praze
Nakladatelství Karolinum 2014

<http://www.cupress.cuni.cz>

Obsah

Předmluva	7
12. Imunogenetika (A. Panczak, B. Otová, M. Kohoutová)	9
12.1 Úvod – Základní pojmy a definice	9
12.2 Genetika antigenů	10
12.2.1 Charakteristika antigenů	10
12.2.2 Rozdělení antigenů	11
12.2.3 Krevně skupinové antigenní systémy	11
12.2.3.1 AB0	11
12.2.3.1.1- Genetická determinace AB0	12
12.2.3.1.2- Bombajský fenotyp	13
12.2.3.1.3- Sekretorství antigenů AB0 a krevní skupina Lewis	14
12.2.3.1.4- Význam AB0	14
12.2.3.2 Rh systém	15
12.2.3.2.1- Genetická determinace Rh systému	16
12.2.3.2.2- Inkompatibilita matky a plodu v Rh systému	17
12.2.3.3 Krátce o dalších krevně skupinových systémech člověka	18
12.2.3.3.1- MNS	18
12.2.3.3.2- Diego, Duffy a další	19
12.2.4 Histokompatibilní antigenní systémy	20
12.2.4.1 Hlavní histokompatibilní komplex	21
12.2.4.1.1 Hlavní histokompatibilní komplex člověka	22
12.2.4.1.1.1 Molekuly I. třídy HLA	24
12.2.4.1.1.2 Molekuly II. třídy HLA	25
12.2.4.1.1.3 Oblast III. třídy v HLA	25
12.2.4.1.1.4 Polymorfismus molekul HHK	26
12.2.4.1.1.5 Funkce molekul HHK	26
12.2.4.2 Slabé (minor) histokompatibilní systémy	27
12.3 Buňky imunitního systému	29
12.3.1 Fagocyty	29
12.3.2 Lymfocyty	30
12.3.2.1 Lymfocyty B	31
12.3.2.2 Lymfocyty T	31
12.3.2.3 Buňky NK – přirození zabíječi	32
12.3.2.4 Aktivace lymfocytů	33
12.3.2.4.1- Vazba specifických antigenů – teorie klonální selekce	34
12.3.2.4.2- Vazba nespecifických antigenů	34
12.3.2.5 Metodologie klasifikace buněčných subpopulací pomocí protilátek – imunofenotypizace	35
12.3.2.5.1- Morfologie buněk krvetvorby a imunitního systému	35
12.3.2.5.2- Imunofenotypizace	35

12.3.2.5.3	Monoklonální protilátky v diagnostice	35
12.3.2.5.4	Vícebarevná imunofluorescence	36
12.3.2.5.5	Průtoková cytometrie	36
12.3.2.5.6	Třídíče buněk	38
12.4	Receptorové molekuly pro vazbu antigenu	39
12.4.1	Imunoglobuliny	39
12.4.1.1	Struktura protilátek	40
12.4.1.2	Funkce protilátek	41
12.4.2	Receptor T buněk	42
12.4.2.1	Struktura TCR _{αβ}	42
12.4.3	Genetika Ig, B a T receptorů	42
12.4.3.1	Genetika Ig a receptoru B buněk	43
12.4.3.1.1	IgK komplex (chr. 2p11.2)	43
12.4.3.1.2	IgL komplex (chr. 22q11.2)	44
12.4.3.1.3	IgH komplex (chr. 14q32.33)	44
12.4.3.1.4	Alelická exkluze	44
12.4.3.1.5	Variabilita Ig	45
12.4.3.2	Genetika receptoru T buněk	46
12.4.3.2.1	Somatická rekombinace	46
12.4.3.3	Imunoglobulinová superrodina	48
12.5	Imunitní odpověď	48
12.5.1	Rozpoznání antigenu	48
12.5.1.1	Rozpoznání antigenu imunoglobulinem	49
12.5.1.2	Rozpoznání antigenu receptorem na T buňkách	50
12.5.1.3	Zpracování a prezentace antigenu	51
12.5.2	Efektorové imunitní mechanismy – kooperace buněk	51
12.5.2.1	Kooperace buněk v protilátkové odpovědi	51
12.5.2.2	Kooperace buněk v buněčně zprostředkované odpovědi	53
12.5.2.3	Centrální role lymfocytů Th	54
12.6	Imunologická tolerance	54
12.6.1	Tolerance vlastních složek organismu	55
12.6.2	Tolerance indukovaná k cizím antigenům	56
12.7	Genetika transplantací	57
12.7.1	Transplantační zákony	57
12.7.2	Odhojení, odvržení (rejekce) štěpu	61
12.7.3	Reakce štěpu proti hostiteli	62
12.7.4	Typizace antigenů HLA	63
12.7.4.1	Sérologická typizace	63
12.7.4.2	Reakce ve smíšených lymfocytárních kulturách (MLR – mixed lymphocyte reaction)	63
12.7.4.3	Typizace pomocí molekulárních technik	64
12.7.5	Imunosuprese	64
12.8	Genetika imunopatologií	65
12.8.1	Imunodeficiencie	65
12.8.1.1	Primární imunodeficiencie	66
12.8.1.1.1	Deficiencie B buněk, protilátkové deficity	66
12.8.1.1.2	Deficiencie T buněk	68
12.8.1.1.3	Imunodeficiencie způsobené poruchami fagocytózy	69
12.8.1.1.4	Imunodeficiencie způsobené poruchami komplementu	69
12.8.1.1.5	Imunodeficiencie způsobené poruchami dalších mechanismů	71
12.8.1.2	Získané imunodeficiencie	72
12.8.2	Autoimunita	73
12.8.2.1	HHK a výskyt autoimunitních onemocnění	74
12.8.2.2	Hormonální faktory a výskyt autoimunitních onemocnění	75
12.8.3	Alergie, hypersensitivita	75
13.	Populační genetika (A. Panczak, A. Šípek ml.)	78
13.1.	Zákonitost Hardy-Weinbergova (H-W)	78
13.1.1	Populační polymorfismus	81
13.1.2	Odhad genových frekvencí	82
13.1.3	Geny X vázané a geny s mnohotnou alelií	82

13.2	Selekce	83
13.2.1	Selekce proti (recesivním) homozygotům	84
13.2.2	Selekce proti dominantnímu (AD) fenotypu	86
13.2.3	Selekce proti oběma typům homozygotů	87
13.2.4	Selekce proti heterozygotům	89
13.3	Mutace	89
13.3.1	Spontánní mutace	90
13.3.2	Indukované mutace	92
13.3.3	Mutačně-selekční rovnováha	95
13.4	Inbred	96
13.4.1	Inbred a jeho míry	96
13.4.2	Příbuzenské sňatky	99
13.4.3	Inbred v populaci	99
13.4.3.1	Genetická zátěž populace	99
13.5	Struktura populací	100
13.5.1	Genový drift	100
13.5.2	Efektivní velikost populace	104
13.5.3	Asortativní párování	105
13.6	Migrace	106
13.7	Klinický případ	109
13.7.1	Úvod	109
13.7.2	Řešení klinického případu s využitím populační genetiky	109
13.7.3	Řešení klinického případu s využitím molekulární genetiky	110
13.8	Příloha	110
13.8.1	H-W rovnováha pro dva geny	110
13.8.2	Podíl příbuzenských sňatků v populaci	111
13.8.3	Extrémně malé populace ($N = 2$)	112
13.8.4	Wahlundův rozptyl	115
13.8.5	Genový drift v lidských populacích	116
14.	Evoluční biologie (L. Schwarzová)	118
14.1	Co je evoluce?	118
14.1.2	Vývoj evolučního myšlení	118
14.2	Vznik života na Zemi	120
14.2.1	Počátky života	120
14.2.2	Vznik mnohobuněčných organismů	121
14.2.3	Evoluce genetického kódu	121
14.3	Evoluční mechanismy	122
14.3.1	Přírodní výběr	122
14.3.2	Pohlavní výběr	122
14.3.3	Mutace	123
14.3.4	Genetický drift	123
14.3.5	Migrace	124
14.4	Druh a speciace	124
14.4.1	Geografické modely speciace	125
14.4.2	Negeografické modely speciace	125
14.5	Evoluce genů	126
14.5.1	Vznik genů	126
14.5.2	Molekulární hodiny	127
14.6	Evoluce Y chromosomu	127
14.6.1	Formy určení pohlaví	127
14.6.2	Vznik Y chromosomu	128
14.6.3	Vývoj Y chromosomu	128
14.7	Evoluce člověka	129
14.7.1	Fylogeneze primátů	129
14.7.2	Od lidoopů k člověku	129
14.7.2.1	Chromosomální evidence	129
14.7.2.2	Molekulární evidence	130
14.7.3	Vznik moderního člověka	131
14.7.3.1	Nejstarší předkové	131

14.7.3.2 Australopitékové	131
14.7.3.3 Vývoj rodu Homo	131
14.7.3.3.1 Modely vzniku moderního člověka	132
15. Lékařská genetika (J. Kotlas)	134
15.1 Historie	134
15.2 Lékařská genetika v ČR	135
15.3 Genetická konzultace	135
15.3.1 Diagnóza	135
15.3.2 Stanovení rizika	136
15.3.3 Prognóza, návrh preventivních opatření a právo klienta být (nebýt) informován	136
15.4 Cíle a úkoly lékařské genetiky	137
15.4.1 Prekoncepční (primární) péče	137
15.4.2 Prenatální (sekundární) péče	138
15.4.3 Postnatální (terciární) péče	140
15.5 Etické a právní aspekty lékařské genetiky	143
15.5.1 Lékařské tajemství	143
15.5.2 Informovaný souhlas	144
15.5.3 Umělé ukončení těhotenství	144
15.6 Užitečné odkazy	145

Předmluva

Vážené studentky, vážení studenti,

dostává se vám do rukou poslední, třetí díl učebního textu Lékařská biologie a genetika. V prvním dílu našich skript (Karolinum 2008) jsou uvedeny základní poznatky z formální genetiky, o regulaci buněčného cyklu a přenosu signálu, o buněčném dělení, a z cytogenetiky. Druhý díl (Karolinum 2012) zahrnuje základy molekulární genetiky a onkogenetiky a vybrané poznatky genetiky vývoje (včetně vzniku vrozených vad, vlivu teratogenů a interakcí genů s prostředím). Tento, třetí díl Lékařské biologie a genetiky obsahuje kapitoly Imunogenetika, Populační genetika, Evoluční biologie a Lékařská genetika.

Biologické školy současnosti i základní učebnice genetiky (obecné či ty více zaměřené na výuku na lékařských fakultách) se dělí podle toho, zda přinášejí výklad imunogenetiky či nikoli. Jakkoli na většině fakult v ČR výuka biologie a genetiky předchází výklad základů imunologie (a později i klinické imunologie), zařazujeme tradičně imunogenetiku do výukových plánů předmětu B00360 Biologie a genetika 2. V případě ÚBLG 1. LF UK to není jen proto, že imunogenetický výzkum zde měl dlouhá léta silnou pozici (a též vynikající výsledky), ale protože jsme přesvědčeni, že „klasická“ imunogenetika v kombinaci s nejnovějšími poznatky molekulární imunologie či obecněji molekulární biologie, přináší velmi zásadní poznatky a nové pohledy na fungování lidského genomu. Naším cílem bylo ukázat, že imunogenetika už dávno není jen o krevních skupinách, hemolytické nemoci novorozenců a transplantačních pravidlech.

Populační genetika je dnes, po více než 100 letech od položení základů svébytným oborem s multidisciplinárním přístupem (obecná genetika, molekulární genetika, epidemiologie, matematika a statistika, ale též ekologie, etologie a sociologie). Předkládaný text považujeme za (minimalistický) kompromis, který poslouží jako zdroj základních informací a zároveň nezachází do větších detailů, které by vyžadovaly rozsáhlejší matematický aparát.

Na výklad o „statické“ populační genetice navazuje poutavé čtení o jejích dynamických souvislostech – evoluční genetice. S potřebným nadhledem ukazuje úlohu a význam (populačně) genetických jevů v evoluci, biologickou a vývojovou determinaci našeho druhu.

Kapitola lékařská genetika je zpracována ve formě, která odpovídá požadavkům sylabu na znalosti studentů v teoretické části studia. Sdělení podstatně většího množství informací z tohoto proudu se rozvíjejícího oboru bude součástí stáží z klinické genetiky ve čtvrtém ročníku.

Stále narůstající množství poznatků v oblasti genetiky nelze předkládat v plné šíři. Proto jsme se ve třetím díle skript soustředili zejména na poznatky významné z hlediska studia medicíny a budoucí klinické praxe. Jsou zde uvedeny též informace (tištěny petitem), které rozšiřují základní text. Tyto informace jsou začleněny zejména pro ty studenty, které daná oblast zaujme.

Studium lékařské biologie a genetiky vyžaduje porozumění obecným principům, pochopení genetických zákonitostí a schopnost je aplikovat a propojovat. Proto se při studiu třetího dílu skript patrně budete muset vracet i k dílu prvnímu a druhému. Pro studium samotné i jeho úspěšné zakončení zkouš-

kou je důležitá vaše aktivní účast na přednáškách, ve kterých jednotliví přednášející přináší nejnovější poznatky a souvislosti v tomto dynamicky se rozvíjícím oboru. Stejně tak si myslíme, že k porozumění oboru přispívá vaše předběžná domácí příprava před praktickým cvičením a aktivita v jeho průběhu.

*Autoři děkují prof. MUDr. Radimu Brdičkovi, DrSc. a odb. as. RNDr. Eduardu Kočárkovi, Ph.D. za vysoce kvalifikovanou recenzi učebního textu. Poděkování patří také všem našim kolegům, kteří opo-
novali text a obrazový doprovod již v průběhu jeho vzniku, zejména doc. MUDr. Františkovi Liškovi,
Ph.D.; jemu též za pomoc s obrazovou dokumentací v kapitole Imunogenetika a Populační genetika.
Hlavní redaktorce celého cyklu skript paní doc. RNDr. Bertě Otové, CSc. autoři děkují za podporu,
shovívavost a výdrž.*

*Vážené studentky, vážení studenti! Přejeme vám hodně úspěchů při studiu předmětu a úspěšné zvlád-
nutí zkoušky z biologie a genetiky. Přejeme vám též, abyste nabyté poznatky dlouho podrželi v paměti
a využili je při studiu dalších preklinických a klinických předmětů a ve vaší budoucí praxi.*

Autoři

Doporučená literatura a internetové zdroje informací:

Šeda O., Liška F., Šedová L.: Aktuální genetika (<http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/>)

Šeda O., Šedová L.: Genomika v medicíně ([http://biol.lf1.cuni.cz/extensions/Genomika_v_Medicine/
index.html](http://biol.lf1.cuni.cz/extensions/Genomika_v_Medicine/index.html))

Strachan T., Read AP.: Human Molecular Genetics 3, 2004

Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)

12. Imunogenetika

Aleš Panczak, Berta Otová, Milada Kohoutová

12.1 Úvod – Základní pojmy a definice

Imunitní systém se vedle systému nervového a endokrinního podílí na udržení stálého vnitřního prostředí – homeostázy organismu. Prvořadou vlastností imunitního systému je schopnost rozlišit cizorodý materiál zevního prostředí (např. patogen a jeho některé toxické produkty), ale i vlastní poškozené nebo staré buňky od běžných složek organismu, proti kterým za fyziologických podmínek nereaguje.

Zmiňujeme-li **makroorganismus**, je třeba uvést, že do současného značně složitého stavu se mechanismy imunitních reakcí vyvinuly během evoluce jako obranná odpověď na napadení infekčními **mikroorganismy** (viry, bakterie atd.), které jsou přítomné v okolním prostředí a které mohou způsobit poškození až smrt svého hostitele. Avšak na každém stupni evolučního vývoje je systém imunologické obranyschopnosti nejdokonalejší možný, protože by jinak příslušný druh nemohl v neustálém souboji s agresivními patogeny přežít.

Imunitní odpověď na cizorodý materiál má dvě základní složky – začíná rozpoznáním cizích struktur a pokračuje rozvojem imunitní reakce, která má za cíl jejich zneškodnění. Různé **typy imunitních odpovědí** lze zařadit do dvou kategorií:

- 1) **vrozené** (nespecifické; evolučně starší), které fungují jako první obranná linie proti infekci. Je to úkol především pro **fagocytující buňky** (monocyty, makrofágy, polymorfonukleární neutrofilny). Buňky této skupiny jsou schopné invazivní mikroorganismy vázat na svých površích, pohltit je (tzv. fagocytóza) a posléze zneškodnit. Neméně důležité jsou **přirozeně cytotoxické buňky NK** (angl. *natural killers*), které používají primitivní, nespecifické rozpoznávací systémy. Na nespecifické imunitě se podílí i **humorální složka**; patří do ní složky komplementu, interferony a další proteiny. Nespecifické složky imunity reagují rychle, ale nemají imunologickou paměť (viz dále).
- 2) **adaptivní** (specifické), které navazují na časné nespecifické imunitní reakce (činnost fagocytů apod.). Na rozdíl od vrozených odpovědí je adaptivní imunitní odpověď vysoce specifická. Uplatňují se při ní **lymfocyty**, které prostřednictvím svých specializovaných struktur – **antigenně specifických receptorů** rozpoznávají např. jednotlivé antigenní determinanty mikroorganismů (v hostitelských buňkách i mimo ně) nebo změny struktury a funkce vlastních buněk (starých, mutacemi změněných atp.). Humorální složku specifické imunity tvoří zejména **protilátky**, které kromě uvedené funkce rozpoznávací plní i další úkoly při obraně organismu. Při specifické imunitní reakci se ustavuje **imunologická paměť** – imunitní odpověď se zdokonaluje a zrychluje po opakovaném setkání s tímž antigenem.

Rozlišujeme dvě velké skupiny lymfocytů (podrobně dále – Buňky imunitního systému):

- a) **lymfocyty B**, které vytvářejí protilátky a uplatňují se zejména v obraně proti extracelulárním patogenům nebo jejich produktům,
- b) **lymfocyty T**, které v závislosti na jejich rozdílných aktivitách lze dále rozdělit do několika subpopulací. Některé T buňky zajišťují buněčně zprostředkovanou imunitu, jiné kontrolují vývoj B buněk a tím i produkci protilátek, další spolupracují s fagocyty atp.

Antigen byl původně definován jako jakákoliv substance nebo velká molekula, která je po vstupu do organismu schopná vyvolat tvorbu protilátek (*antibody generator*). V současnosti se tato definice rozšiřuje: antigen je jakákoliv substance nebo molekula, která může být specificky rozpoznána buňkami imunitního systému. Důsledkem je aktivace buněk imunitního systému s následnou řadou buněčných i látkových interakcí, které vyústí v **imunitní odpověď** – buněčnou nebo humorální.

Funkcí imunitního systému je zneškodnění cizorodého materiálu, který by mohl poškodit organismus. V určitých situacích však tento systém může být sám příčinou poškození organismu. Těmito situacemi jsou:

- 1) chybné rozpoznání vlastních (autologních) antigenů, v důsledku toho se rozvíjí **autoimunitní reakce, autoimunitní onemocnění**;
- 2) defekt (často geneticky podmíněný) některé ze složek imunitního systému, vzniká tak **imunodeficiency (imunodeficit)**;
- 3) dojde k imunitní odpovědi, která způsobí větší poškození než patogen nebo cizí látka, hovoříme o **hypersensitivitě (alergii)**.
- 4) imunitní systém funguje normálně, ale **imunitní odpověď je nevýhodná** z pohledu potřeb jedince a současné medicíny – např. jako překážka krevní transfúze nebo při transplantacích orgánů.

12.2 Genetika antigenů

12.2.1 Charakteristika antigenů

Antigeny jsou **organické makromolekuly**. Jako antigeny nejlépe fungují proteiny, které vyvolávají imunologickou odpověď T lymfocytů. Ostatní antigeny aktivují především B lymfocyty. Polysacharidy jsou slabšími antigeny, zatímco čisté lipidy a nukleové kyseliny imunitní odpověď zpravidla nevyvolávají.

Velikost molekuly antigenu má značný význam pro odezvu imunitního systému. Existují nízkomolekulární substance – **hapteny**, které mohou vázat protilátky, ale imunitní odpověď indukují pouze tehdy, jsou-li vázány na nějakou velkou molekulu jako **nosič**. Hapteny mohou být zcela syntetické. Mohou to být krátké peptidy nebo větvené oligosacharidy podobné mikrobiálním nebo krevněskupinovým antigenům (viz dále 12.2.3.1 ABO).

Vazby antigenu s membránovými receptory lymfocytů nebo s volnými protilátkami se nezúčastní celá molekula antigenu, ale pouze její určitá místa – tzv. **antigenní determinanty – epitopy**. Receptory a protilátky jsou tedy specifické pro epitopy. Takto na každé antigenní molekule může být rozpoznáváno několik epitopů. Proto imunizace jedním antigenem (molekulou) vede k aktivaci lymfocytů s různými specifickými receptory a k produkci směsi protilátek (viz dále Teorie klonální selekce).

Cizorodé látky z vnějšího prostředí (exoantigeny, např. mikroorganismy či jejich součásti nebo produkty) procházejí po vstupu do organismu řadou změn. Imunitní odpověď vyvolávají zejména tehdy, jestliže vniknou do organismu parenterální cestou (mimo trávicí trakt), např. při poranění kůže nebo dýchacími cestami. Při perorálním podání mohou být molekuly s potenciální antigenní aktivitou v gastrointestinální soustavě enzymaticky rozštěpeny dřív, než se dostanou do krve (existuje však řada bakterií a dalších mikroorganismů, které mohou proniknout gastrointestinálním systémem až do střev, aniž by byly při průchodu trávicí trubici zlikvidovány enzymy). Důležitá je rovněž dávka antigenu. Příliš nízká

dávka nestačí aktivovat lymfocyty, zatímco příliš velké množství antigenu může způsobit neodpovídavost organismu.

12.2.2 Rozdělení antigenů

Každý organismus má svou individuální, jedinečnou antigenní výbavu, která je součástí jeho integrity a kterou se zároveň liší od jiných organismů. Antigeny lze posuzovat a třídit podle různých hledisek, např. na základě genetické rozdílnosti.

Exoantigeny jsou cizorodé látky vnějšího prostředí. Většinou jsou to **mikroorganismy** a jejich produkty. Mezi exoantigeny patří **alergeny** (nejrůznějšího původu), které jsou schopny vyvolat patologickou imunitní reakci u predisponovaných jedinců.

Autoantigeny jsou antigeny vlastní organismu; imunitní odpověď vyvolávají u daného jedince pouze v abnormálních patologických situacích.

Aloantigeny navzájem rozlišují jedince téhož druhu (více viz Genetika transplantací – transplantační zákony).

Xenoantigeny rozlišují příslušníky různých druhů.

12.2.3 Krevně skupinové antigenní systémy

Krevní skupina každého jedince závisí na přítomnosti specifických antigenů. Stanovuje se na povrchu erytrocytů a je určována reakcí erytrocytů se známými (testovacími) antiséry. Dnes se namísto antisér ponejvíce používají reagenty s monoklonálními protilátkami (viz dále).

U člověka je známo více než 20 krevně skupinových systémů. Mezi nejvýznamnější patří AB0, Rh a MN, Ss systém.

Znalosti o dědičnosti krevních skupin se dříve mimo jiné využívalo ve sporech o otcovství. V současnosti jsou v paternitních sporech serologické hematologické metody (v kombinaci s metodami antropologickými) plně nahrazeny molekulárně genetickými postupy.

12.2.3.1 AB0

Podle přítomnosti antigenů A a B na plazmatické membráně erytrocytů lze rozlišit 4 základní **krevní skupiny A, B, AB a 0**. Antigeny systému AB0 se vyskytují nejen na erytrocytech a erytroidních tkáních, **ale jsou přítomny i** na většině epiteliálních a endoteliálních buněk. Exprese se mění během vývoje, diferenciaci a zrání. Změny v expresi bývají **často pozorovány v lidských premaligních a maligních buňkách**.

Pro fenotyp (příslušnost k určité krevní skupině) systému AB0 je **charakteristická přítomnost protilátek typu IgM a IgG v séru**. Tyto přirozené protilátky jsou v séru přítomné trvale, aniž došlo k předchozí imunizaci erytrocyty s odlišnou antigenní výbavou. Pravděpodobně vznikají jako následek imunizace (již od časného postnatálního období) mikroorganismy, které jsou vybaveny antigenními determinanty velmi podobnými antigenům A a B.

Antigeny AB0 systému jsou tvořeny oligosacharidy, které vyčnívají z povrchu buněčné membrány a jsou napojeny na polylaktosaminové řetězce přichycené ponejvíce k transportním proteinům (např. band 3 proteinu; zodpovědnému za zprostředkování výměny chloridových a bikarbonátových iontů napříč buněčnou membránou), zčásti pak k lipidovým molekulám (neutrálním glykosfingolipidům, ceramidům) uloženým v plazmatické membráně. Molekuly A a B jsou skoro identické, liší se v cukerném zbytku na větveném konci řetězce. U antigenu A je posledním připojeným N-acetyl-galaktosamin, u antigenu B je to galaktosa. Konce řetězců tak podle připojeného cukerného zbytku představují různé epitopy a jsou příčinou toho, že jsou obě molekuly rozpoznávány jako různé antigeny.

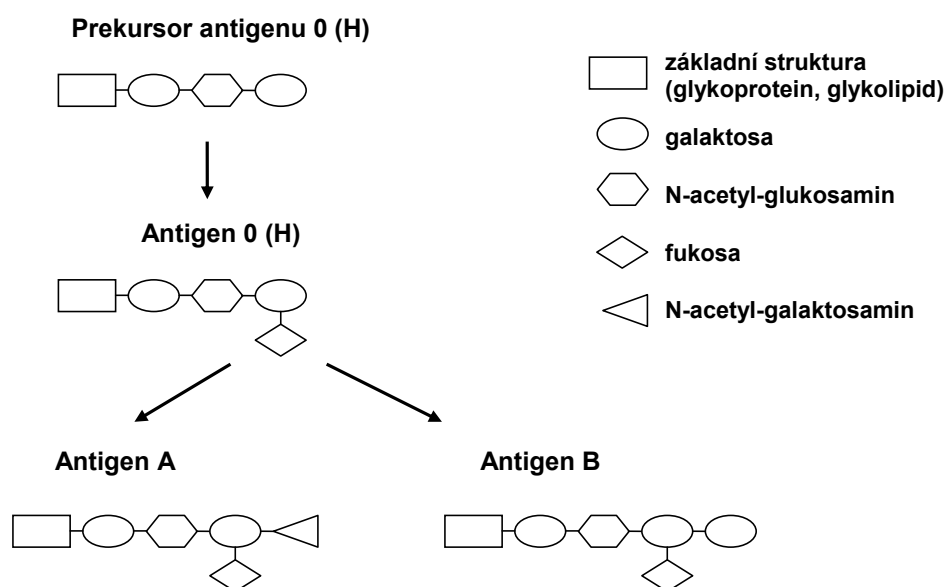
12.2.3.1.1 Genetická determinace AB0

Pro expresi antigenů systému AB0 je nutná souhra několika genů, které mají své lokusy na různých chromosomech. Především jsou to dva na sobě nezávislé lokusy, **lokus AB0** (chromosom 9) a **H lokus** (chromosom 19). Primárními produkty obou genů jsou enzymy – glykosyltransferasy. Protože v případě lokusu *H* je to fukosyltransferasa, dostal postupně synonymní označení *FUT1* (současná nomenklatura viz Tab. 12.2.1).

Tab. 12.2.1 Geny účastníci se produkce antigenů AB0 (*FUT1* dříve jako *H* lokus, *FUT2* určuje tzv. sekretorství antigenů a *FUT3* určuje krevní skupinu Lewis – více dále v textu)

Lokus	Chr.	Alela	Glykosyltransferasa
<i>FUT1</i>	19q13.3	<i>H</i>	α -2-L-fukosyltransferasa
		<i>h</i>	Žádná
<i>FUT2</i>	19q13.3	<i>Se</i>	α -2-L-fukosyltransferasa
		<i>se</i>	Žádná
<i>FUT3</i>	19q13.3	<i>Le</i>	α -3/4-L-fukosyltransferasa
		<i>le</i>	Žádná
<i>AB0</i>	9q34	<i>A1</i>	α -3-N-acetyl-D-galaktosaminyltransferasa
		<i>A2</i>	α -3-N-acetyl-D-galaktosaminyltransferasa
		<i>B</i>	α -3-D-galaktosyltransferasa
		<i>0</i>	Žádná

V lokusu *H* (*FUT1*) se vyskytují **alely *H*, *h***. Dominantní alela *H* kóduje enzym fukosyltransferasu, který přenáší cukr fukosu na konec prekursorového oligosacharidového řetězce tvořeného 4 cukernými zbytky. Fukosa tak kompletuje kmenový pěticukerný řetězec, tzv. substanci či antigen H nebo též 0. Tento antigen může být dále přeměňován enzymy produkovanými alelami lokusu AB0; **antigen 0 (H)** je tedy **prekursor antigenů A a B** (Obr. 12.2.1).



Obr. 12.2.1 Postupná syntéza antigenů systému AB0 (Schéma genové kontroly antigenů AB0 a struktury antigenů A, B, 0)

Lokus AB0 lze zjednodušeně definovat jako **trialelní** systém s alelami **A, B, 0**. Alely **A** a **B** jsou vůči sobě kodominantní a obě jsou dominantní vůči alele **0**. Alela **A** kóduje enzym transferasu A (chemicky správně $\alpha 1 \rightarrow 3$ -N-acetyl-D-galaktosaminyltransferasu), která připojuje k 0 (H) substanci N-acetyl-galaktosamin a vytváří tak větvený hexasacharid – antigen A. Produktem alely **B** je enzym transferasa B ($\alpha 1 \rightarrow 3$ galaktosyltransferasa), která připojuje k prekurzor 0 (H) koncovou galaktózu a vytváří tak antigen B. Produktem alely **0** genu AB0 je inaktivní krátký protein, který není schopen přenášet žádný cukerný zbytek. Proto mají jedinci krevní skupiny 0 na membránách buněk pouze pentasacharidovou 0 (H) substanci. Fenotyp (krevní skupina) A je pak určován přítomností antigenu A, krevní skupina B přítomností antigenu B a krevní skupina AB pak přítomností obou typů hexasacharidů současně na těže buněčné membráně.

Molekulárně genetické studie prokázaly, že alely **A** a **B** se liší v několika málo nukleotidových substitucích, které znamenají záměnu 4 aminokyselin (AMK) v enzymatickém řetězci. To způsobuje různou specifitu A a B transferas. Sekvence počátečních 260 nukleotidů alely **0** je identická s alelou **A**, ale v pozici 261 byla prokázána delece jednoho nukleotidu (guanin), která má za následek posun čtecího rámce (*frameshift*) genetického kódu. Výsledkem je zkrácený protein bez glykosyltransferasové funkce (Tab. 12.2.2).

Při určování krevní skupiny s použitím konvenčních (polyklonálních) testovacích antisér byla zaznamenána u různých osob různě silná serologická (hemaglutinační) reakce. Skupiny A a B tak byly rozděleny do 11 podskupin. Rozdíly mezi nimi jsou kvantitativní, tzn., že podskupiny se liší množstvím antigenu/ů na povrchu erytrocytu. Nejčastější jsou podskupiny A1 a A2, ostatní podskupiny jsou většinou vzácné. Po zavedení monoklonálních typizačních reagensů anti-A nejsou odstupňované reakce, popisované s polyklonálními typizačními séry, již pozorovány. Monoklonální protilátka reaguje dobře nebo vůbec ne v závislosti na specifitě A epitopu.

Tab. 12.2.2 Sekvenční odlišnosti mezi jednotlivými alelami AB0 systému

alela	Nukleotidová a aminokyselinová pozice						
	NT AMK	261	526 amk176	703 amk235	796 amk266	803 amk268	1059-1061
A1		G	C arg	G gly	C leu	G gly	CCC
A2		G	C arg	G gly	C leu	G gly	CC frameshift + 21 AMK
B		G	G gly	A ser	A met	C ala	CCC
0		del frameshift					

Při analýze DNA u podskupin A se ukázalo, že alela **A** má řadu variant, které, ačkoliv stále kódují transferasu A, odlišují se svojí výkonností. Hlavní příčinou, ale nikoli nezbytně jedinou, jsou různé mutace v alele **A**. Např. alela **A2** má v místě přiléhajícím terminačnímu tripletu posunovou (frame-shift) mutaci, stop kodon tak zaniká a výsledný protein je o 21 AMK delší. V důsledku toho je transferasa A enzymaticky méně výkonná a dochází ke kvantitativnímu snížení exprese antigenu A. Vztahy mezi těmito alelami jsou vztahy dominance a recesivity – **A1** je dominantní nad **A2** (Tab. 12.2.2 výše).

12.2.3.1.2 Bombajský fenotyp

Vzácně (např. jako důsledek příbuzenského sňatku) se vyskytují jedinci, kteří nemají dominantní alelu lokusu H (FUT1) – jsou **recesivní homozygoti hh**. V důsledku toho neprodukují enzym fukosyltransferasu 1 a nevytvářejí antigen 0 (H substanci). Na povrchových membránách těchto jedinců tak

zůstává exprimován pouze nezměněný tetrasacharidový prekursorový řetězec. Tento fenotyp se nazývá podle místa prvního zachytu a popisu **bombajský fenotyp** (nebo fenotyp O_h).

Substanci O (H) jsme shora zmínili jako substrát následné reakce zajišťované glykosyltransferasami A nebo B. V situaci, kdy antigen O (H) chybí, tak antigeny A či B nemohou být vytvářeny. A to přesto, že v genotypu konkrétního jedince jsou přítomny alely A nebo B a jejich produkty, příslušné enzymy glykosyltransferasy A a B, jsou v erytroidních buňkách normálně přítomny. Fenotyp těchto osob se jeví jako skupina O , avšak v cirkulaci jsou přítomny přirozené protilátky nejen anti-A a anti-B, ale také anti- O (anti-H). Vztah těchto dvou genů, *ABO* a *FUT1* (H), je příkladem recesivní epistáze u člověka (viz Díl I – Interakce nealelních genů).

12.2.3.1.3 Sekretorství antigenů *ABO* a krevní skupina Lewis

Antigeny A, B a O (H) lze nalézt u většiny jedinců i v tělních tekutinách (sliny, mléko atd.). Zde se však vyskytují ve formě glykoproteinů, které jsou rozpustné ve vodě (srovnej: na membránách přítomny jako glykolipidy). Za **sekreci do tělních tekutin** je zodpovědný další nezávislý gen *Se* (sekretor, nebo též *FUT2*) se dvěma alelami *Se* a *se*. Produktem tohoto genu (leží v blízkosti *FUT1* na 19p13.3) je také α -2-L-fucosyltransferasa. Přibližně u 80 % lidí se vyskytuje dominantní alela *Se* a lze u nich prokázat antigeny A, B a O (H) v tělních tekutinách, u recesivních homozygotů (*se se*) nikoliv.

Oba geny, *FUT1* i *FUT2*, jsou v těsné vazbě a produktem obou je α -2-L-fucosyltransferasa. Rozdíl mezi geny je v tkáňově specifické expresi – fukosyltransferasa v epiteliálních buňkách je produktem genu *Se* (*FUT2*) a byly popsány dvě transkripční varianty téhož proteinu, zatímco enzym v buňkách mesodermálního původu je produktem genu *H* (*FUT1*). Rozdíl je patrně i v typu zpracovávaného přirozeného substrátu.

Na genu *FUT2* (*Se*) je rovněž závislý další krevně skupinový systém, **systém Lewis**. Pro expresi této krevní skupiny Lewis je však nutná i aktivita dalšího genu – *FUT3* (*Lewis*), který se nachází v téže oblasti chromosomu 19 jako *FUT1* a *FUT2*. Produktem aktivní alely *Le* genu *FUT3* je také fukosyltransferasa, avšak tato, na rozdíl od produktu genu *FUT1*, připojuje fukózu k prekursovému oligosacharidu v jiné, nikoliv koncové, ale „boční“ pozici.

Antigeny Lewis jsou sice exprimovány na červených krvinkách, avšak nejsou jimi produkovány. Jsou exokrině secernovány epitelii a až následně adsorbovány na povrchu erytrocytů. K adsorpci však dochází jen u těch osob, které mají alespoň jednu alelu *Se* genu *FUT2*. Dva hlavní typy antigenů Lewis se označují Lewis a, Lewis b, zkráceně Le(a) či Le(b). Ve fenotypu mohou být přítomny jeden či druhý, oba nebo ani jeden; nejběžnější fenotyp je Lewis a negativní Lewis b pozitivní, tedy Le(a–b+). **Vztah mezi skupinou Lewis a sekretorstvím antigenů systému *ABO*** byl jeden z prvních příkladů pleiotropního efektu některého genu u člověka. Stejná fukosyltransferasa, která konvertuje membránově vázané antigeny A, B či O (H) na antigeny rozpustné (a tedy secernované do tělních tekutin), konvertuje antigen Lewis a na Lewis b. Proto jedinci Lewis a pozitivní nesecernují antigeny A, B či H (označují se jako ABH **non-sekretori**). Antigen Lewis b je přítomen pouze u **sekretorů**. Lewis negativní jedinci Le(a–b–) pak mohou být jak sekretory, tak nonsekretory.

12.2.3.1.4 Význam *ABO*

Funkce antigenů A, B, O zůstává neznámá. Zjevně však absence antigenů A a B, tedy krevní skupina O , není spojena s žádnou patologií ani není jako nevýhodná předmětem selekce, když je její zastoupení v populacích tak vysoké. V evropské populaci se vyskytuje krevní skupina A přibližně s četností 0,42; B 0,12; AB 0,08 a skupina O s četností 0,38.

Nicméně mezi jednotlivými evropskými státy (národy) existují ve výskytu jednotlivých krevních skupin výrazné rozdíly. Ještě výraznější rozdíly byly zaznamenány mezi jednotlivými etniky; obecně lze říci, že u Asiatů a Afričanů přibývá ve srovnání s Kavkazany skupiny B a poklesá zastoupení skupiny A nebo O . Ještě přesněji lze rozdíly mezi národy a etniky demonstrovat na rozdílech v zastoupení jednotlivých alel (viz dále populační genetika).

Rozdíly v zastoupení alel systému *ABO* podnítily i úvahy o evoluci tohoto systému a obecně o evoluci člověka v období posledních 50 000 let. Alela B se podle těchto závěrů považuje za nejmladší. A pokud jsme výše zmínili pojem selekce, pak

dodejme, že o diverzifikující (frekvenčně závislé) selekci se spekuluje jako o faktor, který by mohl ovlivňovat zastoupení jednotlivých alel systému ABO prostřednictvím komplexního fenotypu (antigeny na membránách a přirozené protilátky v séru). Např. přítomnost preformovaných protilátek anti-A (u jedinců se skupinou B, příp. 0) by měla zlepšovat první linii imunitní odpovědi proti bakteriím s antigenem A a zároveň tyto bakterie by nebyly pod velkým selekčním tlakem odstranit antigen A ze své výbavy, když část populace (krevní skupiny A a AB) tyto protilátky anti-A nemá. Tedy něco podobného i když ne tak účinného jako polymorfismus v HLA (viz dále).

Typizace antigenů systému ABO má zásadní význam pro úspěšnou transfúzi krve. Pro potřeby klinických transfúzí se také běžně testují podskupiny A1 a A2. Základní podmínkou při převodu krve je shodná krevní skupina dárce a příjemce. Inkompatibilní transfúze má za následek shlukování krevních buněk, ucpání menších cév vyúsťující v těžké onemocnění až smrt. Dalším opatřením, které snižuje výskyt nežádoucích transfúzních příhod, je převod tzv. erymasy (tj. erytrocytárního náplavu, promytých erytrocytů bez krevní plasmy) namísto plné krve. Vzhledem k širokému výskytu antigenů systému ABO i na jiných tělních buňkách, je nutné zachovat shodu i při transplantacích tkání a orgánů.

Poměrně často dochází k **ABO inkompatibilitám matky a plodu**, zejména v kombinacích, kdy matka má krevní skupinu 0 a plod A nebo B. Větší část přirozených protilátek ABO jsou třídy IgM, tedy „velké“ molekuly běžně nepřecházející přes placentu. Ale ani tzv. fetoplacentární bariéra, pokud se vysloveně nejedná o nějakou patologii placenty, není absolutní; buňky plodu mohou přestupovat do oběhu matky. Matčiny protilátky anti-A, anti-B (typu IgG) procházejí placentární bariérou a mohou způsobit hemolytické poškození plodu. Navíc může být hladina protilátek matky v průběhu inkompatibilního těhotenství zvýšena imunizací antigeny ABO systému na krvinkách plodu. Imunizace ABO antigeny se během těhotenství vyskytují častěji než imunizace antigeny Rh systému, ale **většinou nezpůsobují závažnější problémy**. Mateřské protilátky jsou běžně neutralizovány dříve, než poškodí erytrocyty plodu. Jsou vyvázány substancemi A a B přítomnými na placentárním endotelu nebo solubilními substancemi A a B v případě, že se plod chová jako sekretor.

12.2.3.2 Rh systém

Landsteiner a Wiener (1940) zjistili, že králičí imunní sérum po imunizaci králíka krví opice *Macacus rhesus* shlukuje kromě krvinek opice i krvinky řady lidí; sérum reagovalo s erytrocyty až s 85 % jedinců. Antigen, který indukoval tuto imunizaci, nazvali Rh faktor. Na tomto základě byli lidé původně rozděleni do dvou fenotypových skupin: na osoby Rh pozitivní (Rh+) a Rh negativní (Rh-). Rh negativní lidé jsou recesivní homozygoti. Antigeny Rh+ tohoto systému jsou přítomny pouze na erytrocytech, přirozené protilátky se nevyskytují.

Později se ukázalo, že lidská anti-Rh antiséra získaná od matek při těžkých hemolytických nemocích novorozenců či potransfúzních příhodách reagují odlišně od králičího anti-opičího séra. Protože se však název Rh u člověka mezitím vžil, byl opičí antigen nazván LW na počest objevitelů (antigenní systém Landsteinerův-Wienerův).

Pozdější výzkum objevil další geny, které utvářejí Rh krevně skupinový systém. V současnosti se používá model, který předpokládá 2 geny ve velmi těsné vazbě. Geny jsou označovány *RHD* a *RHCE*.

Ve zjednodušeném modelu má **gen RHD** dvě alely, kdy alela *D* je dominantní nad *d*. Dominantní alela *D* kóduje expresi antigenu D, recesivní alela *d* neprodukuje žádný antigen. Jedinci **Rh+** jsou buď **homozygoti DD** nebo **heterozygoti Dd**. Jedinci **Rh-** jsou **recesivní homozygoti dd**. Tento formálně genetický pohled upřesníme hned v následujícím oddíle s využitím poznatků z molekulární genetiky.

Gen RHCE kóduje vznik antigenů C, c, E a e, které na plazmatické membráně erytrocytů vystupují jako samostatné antigenní epitopy. Mohou se tedy vyskytovat ve čtyřech kombinacích CE, Ce, cE a ce, což formálně geneticky odpovídá vztahu kodominance (více o molekulárně genetických podrobnostech v následujícím oddíle).

Z pěti základních antigenů Rh systému D, C, c, E, e je klinicky nejdůležitější antigen D. Antigen D je nejsilnější krevněskupinový imunogen. V systému Rh neexistují, na rozdíl od systému ABO, přirozeně se vyskytující protilátky. Protilátky anti-Rh se vytvářejí v případech inkompatibilit mezi jedinci Rh- a Rh+,

např. při opakovaných transfúzích krve nebo po opakovaných inkompatibilních těhotenstvích (viz dále). V evropské populaci je přibližně 17 % jedinců Rh⁻ a v ČR je podíl Rh⁻ asi 13,4 %; mezi Afričany je Rh negativních přibližně 1 %, u Asiatů je to ještě méně. Antigeny C, c, E, e nejsou tak silné a významné jako antigen D, přesto vzácně mohou v případě inkompatibility vyprovokovat tvorbu protilátek.

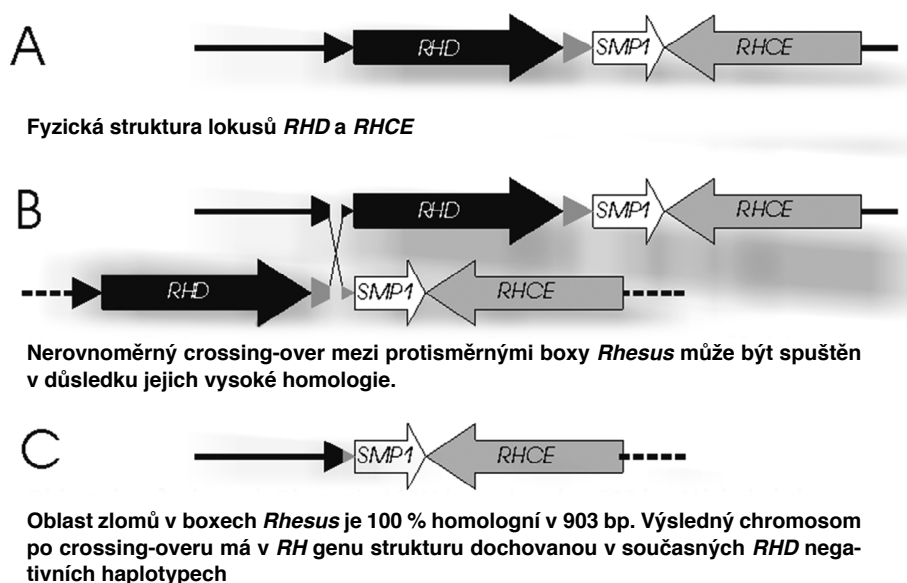
12.2.3.2.1 Genetická determinace Rh systému

Antigeny krevně skupinového systému Rh jsou produkty dvou úzce vázaných a **vysoce homologních genů RHD a RHCE** (uváděné společně jako lokus *RHCE* či *RH30*, podobně jsou antigeny zmiňovány jako skupina RhCED nebo Rh30). Oba geny, *RHD* i *RHCE*, obsahují 10 exonů a sekvence se rozkládá na ~75 kb DNA na chromosomu 1p34–36.2.

Otevřené čtecí rámce obou genů jsou orientovány protisměrně (Obr. 12.2.2 A). Jejich 3' konce jsou u sebe a jsou odděleny oblastí dlouhou přibližně 30 kb. Tato oblast obsahuje vysoce evolučně konservovaný gen *SMP1*, který pravděpodobně kóduje 18-kD peptid patřící do rodiny malých membránových proteinů. Funkce tohoto proteinu je zatím neznámá, avšak sekvence genu *SMP1* se uplatňuje v genetických přestavbách celé oblasti.

Dosud bylo zjištěno více než 40 serologicky odlišných RhD antigenů. U relativně nezanedbatelné části populace je antigen RhD nepřítomen (tj. u jedinců s fenotypem Rh⁻ negativním), jako důsledek různě dlouhých delecí, přestaveb, bodových mutací a jiných alterací genu *RHD*. **Molekulárně geneticky** tak bylo **charakterizováno několik desítek** alel genu *RHD*, jak **dominantních alel D**, tak **recesivních (ztrátových) alel d**. Delece různého rozsahu v genu *RHD*, které jsou často pozorovány v populaci, mohou být důsledkem nerovnoměrné homologní rekombinace v důsledku značné homologie oblastí *RHD* a *RHCE* (a jejich blízkého okolí včetně genu *SMP1*) – Obr. 12.2.2.

Model navrhovaného mechanismu způsobujícího převážnou část RHD negativních haplotypů u kavkazského plemene



Obr. 12.2.2 Jeden z možných mechanismů, které vedou ke vzniku RHD negativních haplotypů

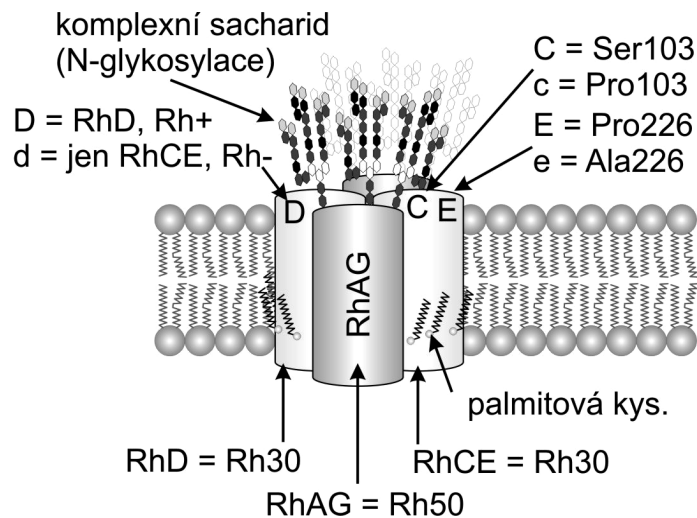
Zatímco vznik některých *RHD*⁻ haplotypů při tomto molekulárním mechanismu je zjevný, je méně jasné, proč duplikace, která při tomto mechanismu „musí“ vzniknout ve druhé buňce, není pravděpodobně funkční. Neboť, alespoň v současné chromosomální pozici *RH*, není dochována/doložena u lidského druhu. Vznik některých dalších alel *RHD* lze zřejmě vysvětlit genovou konverzí mezi oběma lokusy.

Pro gen *RHCE* existují 4 alely a každá alela určuje expresi dvou antigenů v kombinacích Ce, ce, cE nebo CE. Alely *E* a *e* se liší substitucí 1 nukleotidu, což má za následek substituci 1 AMK v proteinovém řetězci. Pro alely *C* a *c* byly nalezeny substituce nukleotidu na 6 místech kódující oblasti a ty způsobují záměnu čtyř AMK v konečném produktu. Jiný výklad uvádí, že exprese antigenů C, c a E, e je výsledkem alternativního sestřihu primárního transkriptu genu *RHCE*.

Vazba mezi oběma geny *RHD* a *RHCE* je tak silná, že jen vzácně dochází k rekombinaci. V důsledku toho se určitá kombinace alel obou genů přenáší z generace na generaci v bloku – jako tzv. haplotyp (*dce*, *dCe*, *dcE*, *dCE*, *Dce*, *DCE*, *DcE*, *DCE*). Některé haplotypy se v populaci vyskytují častěji než druhé a jejich frekvence jsou v různých populacích odlišné.

Molekuly produkované geny *RHD* a *RHCE* (skupina Rh30) jsou na membráně erytrocytu asociovány v složitějším celku s dalšími glykosylovanými proteiny (tzv. Rh50) kódovanými genem *RHAG*. Model tohoto komplexu Rh předpokládá účast dvou molekul podjednotky Rh30 (nejčastěji RhD nebo RhCE) a dvou molekul proteinu Rh50 (Obr. 12.2.3). Celý komplex pravděpodobně funguje jako přenašeč amoniových iontů. Struktura je v evoluci silně konzervována – komparativní (fylogenetické) studie ukázaly, že podobné Rh proteiny jsou přítomny i na řasách (zde by však mohly fungovat jako kanál pro přenos plynného CO₂).

RHAG (lokus na 6p21.1–p11) je podobně jako geny *RHD* a *RHCE* organizován do 10 exonů a jeho sekvence je ze 36 % identická s *RHCE*. Alterace lokusu *RHAG* jsou relativně vzácné. Produkt genu *RHAG* (protein Rh50) je alespoň v jediné kopii nezbytný pro prezentaci antigenní aktivity proteinu RhD.

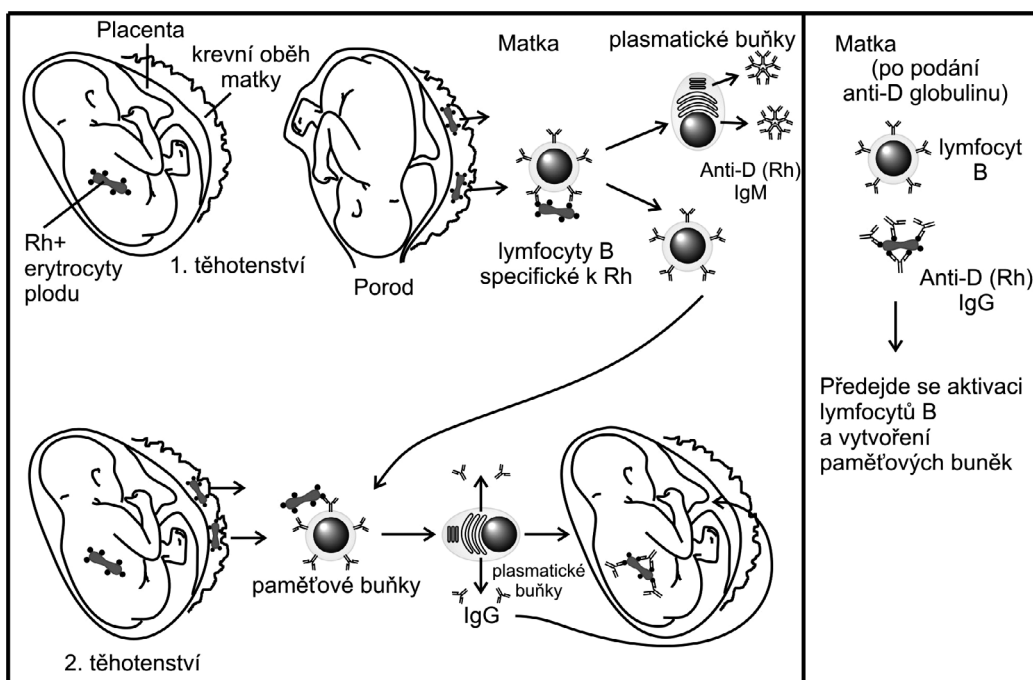


Obr. 12.2.3 Model Rh komplexu v membráně erytrocytu

12.2.3.2.2 Inkompatibilita matky a plodu v Rh systému

Tato situace nastává, jestliže matka je Rh⁻ a plod Rh⁺, tedy když plod zdědil alelu D od Rh⁺ otce. Takové těhotenství je považováno za rizikové. Jestliže se totiž erytrocyty plodu dostanou do mateřského oběhu, stimulují antigeny D imunitní systém matky k tvorbě protilátek anti-D. Mateřské protilátky (IgG) prostupují placentou a způsobí hemolýzu erytrocytů plodu.

Senzibilizace Rh⁻ matek nastává většinou po porodu. Ve třetí době porodní dochází při odlučování placenty ke krvácení a mísení fetální a mateřské krve a určité množství fetální krve tak proniká do oběhu matky. Proto ve většině případů nebývá první dítě postižené, ale riziko stoupá s počtem dalších inkompatibilních těhotenství (Obr. 12.2.4). Je však třeba počítat s tím, že malé množství fetální krve může proniknout do mateřského oběhu již během těhotenství v důsledku porušené placentární bariéry. Toto množství je však většinou příliš malé, takže stimulace matky nemusí představovat velké nebezpečí pro plod. Matka může být senzibilizována i při předchozích potratech Rh⁺ plodu nebo transfúzích Rh⁺ krve. V takových případech může být poškozeno již první dítě.



Obr. 12.2.4 Imunizace Rh- matky antigeny Rh+ plodu a její prevence podáním anti-D(Rh) protilátek

Příznaky poškození plodu jsou hemolytická anémie a rozvoj žloutenky. V krvi se hromadí bilirubin, který při překročení určité koncentrace poškozuje centrální nervový systém (mozková jádra). Odpovědí na rozpad erytrocytů je zvýšená krvetvorba při níž dochází k vyplavování nezralých erytoblastů. Proto toto poškození a onemocnění plodu nese název **fetální erytoblastóza**. V těžkých případech plod umírá *in utero*. Poškození plodu v následujících těhotenstvích lze předejít pasivním podáním anti-D protilátek matce do 72 hodin po senzitivizační dávce Rh+ erytrocytů, tj. typicky při odlučování placenty při porodu Rh+ dítěte (Obr. 12.2.4).

V současnosti je klinická praxe zhruba takováto: v I. trimestru se stanoví krevní skupina všem těhotným. U těch, které jsou Rh negativní, se sledují titry anti-D imoglobulinů ve třech odběrech během těhotenství. Nedojde-li k nárůstu koncentrace protilátek v séru těchto matek, je hned po porodu testována krevní skupina novorozence. Pokud je dítě Rh pozitivní, podává se rodičce vždy přípravek s koncentrovanými anti-D protilátkami. Zaznamená-li gynekolog již v průběhu gravidity vzestup protilátek anti-D, jsou neprodleně zavedena léčebná opatření k jejich snížení, např. jejich vychytávání z oběhu matky, tzv. plasmaferéza. Vrcholem terapeutického úsilí v závažných případech je výměnná transfúze krve u plodu.

V posledním desetiletí byla zavedena do praxe molekulárně genetická metoda genotypizace plodů matek Rh-, a to s využitím mikrokvant DNA plodu cirkulující v periferní krvi ženy již od 9. týdne těhotenství. Včasná informace o Rh krevní skupině plodu, a tedy o případné inkompatibilitě Rh- matky a Rh+ plodu, umožňuje lépe předcházet či léčit možné závažné projevy inkompatibility.

Současná inkompatibilita v ABO a Rh systému může v určitých situacích zabránit negativním důsledkům Rh imunizace. Matka krevní skupiny 0, Rh- bude svými přirozenými protilátkami anti-A, anti-B destruovat erytrocyty plodu Rh+A nebo B, které se eventuálně dostanou do jejího oběhu. V důsledku toho nedojde k senzibilizaci matky v systému Rh.

12.2.3.3 Krátce o dalších krevně skupinových systémech člověka

12.2.3.3.1 MNS

Tento krevněskupinový systém člověka je založen na skupině tří genů – *GYP A*, *GYP B* a *GYP E*, které jsou (v tomto pořadí) lokalizovány v oblasti asi 350 kb velké na 4. chromosomu (4q28–q31). Všechny tři geny (přibližný rozsah ~30 kb) vykazují vysoký stupeň sekvenční homologie a pravděpodobně vznikly

genovou duplikací. Vzhledem k úzké vazbě lokusů se jednotlivé alely dědí jako haplotyp (o pojmu haplotyp viz dále též u HLA; více např. v kapitole 14. Evoluce).

Geny *GYP A* a *GYP B* produkují integrální transmembránové proteiny erytrocytů – glykoforin A a glykoforin B. Glykoforin A je hlavní sialoglykoprotein erytrocytární membrány (na jedné buňce je přítomno okolo miliónu kopií), densita glykoproteinu glykoforin B je více než 10× menší. Proteiny jsou exprimovány pouze na erytroidních buňkách a tkáních a jejich funkce není dosud vyjasněná. Pravděpodobně poskytují erytrocytům glykanový povlak a slouží jako receptory komplementu, cytokinů, ale též patogenů (bakterie, viry, *P. falciparum*); mohou se též účastnit regulace integrity membrány ve spolupráci s proteiny cytoskeletu.

Další člen této genové rodiny, *GYPE*, není patrně za normálních fyziologických podmínek exprimován; nicméně je zřejmé, že se účastní přestaveb genů (*gene rearrangements*), kterými vznikají variantní alely. Mechanismy jsou vzhledem k vysoké homologii genů této skupiny podobné jako v systému Rh, tj. nerovnoměrné homologní rekombinace a genové koverze.

V systému je dosud známo 46 antigenů, avšak 5 nejdůležitějších jsou: M, N, S, s a U. Epitopy M a N jsou kódovány z lokusu *GYP A*, epitopy S, s a U z druhého lokusu, *GYP B*. Antigeny M a N patří k nejstarším známým krevněskupinovým antigenům, byly objeveny v r. 1927. Alely M a N jsou kodominantní a oba antigeny jsou na erythrocytech běžně exprimovány. V populaci nejběžnějším fenotypem je MN (50 %).

Zastoupení krevních skupin systému MN v ČR se odhaduje takto: M 28 %, MN 50 % a N 22 %. V Evropě, Asii, Africe je M okolo 35 %. Ale např. většina Eskymáků jsou homozygoté MM, u původního obyvatelstva ve střední Americe je skupina M až u 95 %, zatímco u Australců je skupina M vzácná a většina má naopak genotyp NN. Protilátky anti-M a anti-N jsou obvykle třídy IgM a jen zřídka jsou zodpovědné za posttransfúzní reakce.

Antigen S je relativně častý (až u ~55 % populace) a antigen s je ještě častější (~89 % populace). Antigen U dostal své jméno jako zkratku z univerzální, jeho incidence v populaci se blíží 100 %. Antigen U negativní mohou být někteří jedinci původem z Afriky. Je to způsobeno mutací, velkou delecí, která zároveň vede k absenci antigenů S a s na erythrocytech. Protilátky anti-S, anti-s a anti-U mohou být příčinou hemolytických potransfúzních reakcí a hemolytické nemoci novorozenců.

Dalších 41 identifikovaných antigenů v systému MNS má incidenci buď velmi nízkou (antigen He u 0.8 % populace) nebo velmi vysokou (antigen ENa je přítomen u >99.9 % jedinců v populaci).

12.2.3.3.2 Diego, Duffy a další

Do současnosti bylo popsáno několik desítek krevněskupinových systémů. Obecně byly další systémy (tedy jiné než AB0 a Rh) objevovány vždy na základě těžkých transfúzních komplikací a hemolytických nemocí novorozenců, které nebylo možno vysvětlit inkompatibilitou a protilátkovou reakcí proti stávajícím, dosud známým antigenům/epitopům. Typickou situací jsou hemolytické krize plodů či dětí ze smíšených (interetnických) svazků, např. bělocha původem z Evropy a původní obyvatelky jižní Ameriky či naopak. Zároveň to odkazuje na druhou charakteristiku, totiž, že pro antigeny (epitopy) těchto systémů je typická velká variabilita v incidenci mezi jednotlivými etniky na Zemi.

Výše uvedeným způsobem byl např. objeven systém **Diego**. V současnosti je známo 21 antigenů tohoto systému; k nejvýznamnějším patří antigeny Di^a , Di^b a Wr^a . Di^a se vyskytuje hlavně v populacích mongoloidního původu (u 36 % jihoamerických Indiánů, 12 % Japonců a 12 % Číňanů), vzácný je u Kavkazoidů a Afričanů (0,01 %). Di^b je všeobecně přítomen ve většině populací (Tab. 12.2.3).

Antigeny Diego kóduje gen *SLC4A1*. Tento gen se nachází na 17q21–22 a obsahuje 20 exonů, celá oblast zaujímá více než 18 kb. Alely Di^b a Di^a jsou výsledkem jednonukleotidové záměny (2561C→T) a odpovídající antigeny Di^b a Di^a se liší jedinou aminokyselinou (P854L). Molekula, která nese antigen, je glykoprotein, který transportuje anionty. Je to transmembránová integrovaná bílkovina a několikanásobně prochází erytrocytární membránou. Funguje jako protisměrný přenašeč aniontů, který vyměňuje Cl^- a HCO_3^- napříč membránou. Exprese antigenů Diego je omezena na erythrocyty a buňky distálních a sběrných kanálků ledviny.

Tab. 12.2.3 Zastoupení kombinovaných fenotypů systému Diego (v %)

Fenotyp	Kavkazané	Afričané	Asiaté
Di ^a -Di ^b +	> 99.9	> 99.9	> 90
Di ^a +Di ^b +	< 0.1	< 0.1	< 10
Di ^a +Di ^b -	< 0.01	< 0.01	< 0.01

Pozn.: fenotyp Di⁻ Di^b- byl dosud popsán v jediném případě.

Antigeny dalšího systému – **Duffy** – jsou umístěny na povrchu erytrocytů. Větší densita jeho molekul je na retikulocytech než na zralých erytrocytech. Antigen byl též nalezen na epiteliálních a endoteliálních buňkách některých orgánů. Gen je lokalizován na 1.q22–1.q23. Produktem genu je glykosylovaný membránový protein, který funguje jako nespecifický receptor pro řadu chemokinů (odtud jednotlivé názvy – DARC, gp FY nebo též CD234). Polymorfismus tohoto genu je základem krevněskupinového systému Duffy.

Celkem je známo 6 antigenů, ale pouze tři Fy^a, Fy^b a Fy³ jsou považovány za klinicky významné. Za původní alelu u člověka je považována alela *FYb*. Alely *FYb* a *FYa* odlišuje bodová změna jednoho nukleotidu (A125G), na úrovni produktů je Asp v pozici 42 v antigenu Fy^b nahrazen Gly v antigenu Fy^a. Populační zastoupení běžných fenotypů systému Duffy ukazuje Tab. 12.2.4.

Protein gp FY je zároveň receptorem pro původce malárie u člověka, protozoárních parazitů *Plasmodium vivax* a *Plasmodium knowlesi*. Duffy-negativní jedinci jsou rezistentní k invazi parazitem *P. vivax*. Polymorfismy jsou důležité v oblastech, kde je tato infekce běžná. Jedinci genotypu *FYa/FYb* jsou více susceptibilní k malárii, ale v některých populacích Amazonie (Brazílie) mají heterozygoti s alelou *FYb-33* selektivní výhodu, nižší podíl infikovaných *P. vivax*.

Tab. 12.2.4 Běžné fenotypy systému Duffy a jejich četnosti v populacích (v %)

Fenotyp	Kavkazané	Afričané	Asiaté
Fy(a+b+)	49	1	9
Fy(a-b+)	34	22	<1
Fy(a+b-)	17	9	91

Pozn.: dvojité negativní fenotyp Fy(a-b-) je vzácný.

Antigen (krevní skupina) Kell je vzácný. U Evropanů se vyskytuje do 10 %, u Křováků do 10 %, ale u negroidních populací jinak kolem 1 %, a u mongoloidních populací není přítomen vůbec (0 %). **Krevní skupina Lutheran** má rovněž omezený výskyt: antigen Lu^a má až 17 % obyvatelstva Afriky a Jižní Ameriky, v Evropě pak 2–10 %. U mongoloidního etnika a též původních obyvatel severní Ameriky se nenachází (0 %).

12.2.4 Histokompatibilní antigenní systémy

Histokompatibilní antigeny jsou glykoproteiny exprimované na plazmatických membránách většiny buněk, u člověka s výjimkou erytrocytů. U některých druhů (např. myš, potkan, ptáci) jsou i na erytrocytech. Jako histokompatibilní (histokompatibilita = tkáňová slučivost) byly označeny proto, že tyto molekuly, dříve než byly poznány jejich primární funkce v buňce a v organismu, byly rozpoznány jako příčina odhojení tkáně při inkompatibilních transplantacích (viz dále Genetika transplantací). Odtud pochází též dlouho užívaný synonymní název – transplantační antigeny. Tyto proteiny mají své specifické funkce a jejich antigenicita souvisí s tím, že jsou více či méně (některé vysoce) polymorfní, tedy existují v rámci druhu ve více alelních formách. Dědí se jednoduše mendelovsky a mezi alelami je vztah kodominance.

Histokompatibilní geny lze rozdělit do 2 skupin: