

Молекулярные основы D-отрицательного фенотипа (обзор литературы и описание случаев)

Л.Л. Головкина, А.Г. Стремоухова, Т.Д. Пушкина, Б.Б. Хасигова, Г.В. Атрощенко,
М.Н. Васильева, Р.С. Каландаров, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Лариса Леонидовна Головкина largol@mail.ru

В обзоре приводятся молекулярные основы формирования D-отрицательного фенотипа у людей. Описаны причины появления истинного и ложного D-отрицательных фенотипов. Основа истинного D-отрицательного фенотипа — изменения в геноме, следствием которых становятся либо полное отсутствие экспрессии белковой молекулы антигена RhD на поверхности эритроцитов, либо экспрессия неполноценного антигена RhD, не выявляемого серологическими методами исследования. Причина ложного D-отрицательного фенотипа — недостаточная чувствительность рутинных серологических методов исследования. Описаны случаи истинного и ложного D-отрицательных фенотипов, выявленные при обследовании россиян. Нам удалось выявить 1 случай истинного (RHD ψ) и 5 случаев ложного D-отрицательного фенотипа (RHDweak тип 2 — 2 случая, RHDweak тип 15 — 1 случай и RHDweak тип 20 — 2 случая).

Ключевые слова: ген, генотип, фенотип, система Резус, резусный комплекс, аллоиммунизация, истинный D-отрицательный фенотип, ложный D-отрицательный фенотип, аллели, мутации, антигены эритроцитов

DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-3-64-69

Molecular basis of D-negative phenotype (literature review and case reports)

L.L. Golovkina, A.G. Stremouchova, T.D. Pushkina, B.B. Khasigova, G.V. Atroshchenko,
M.N. Vasilyeva, R.S. Kalandarov, E.N. Parovichnikova

Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Novyy Zykovskiy Pr-d, Moscow, 125167, Russia

The molecular basis of the D-negative phenotype formation in humans is presented in this article. Causes of true and false D-negative phenotype appearance are described. The basis of true D-negative phenotype are changes in the genome, that lead to complete lack of RhD antigen expression on the red blood cells surface, or defective expression of RhD antigen, not detectable by serological methods. The reason for the false D-negative phenotype is the insufficient sensitivity of routine serological methods. Cases of true and false D-negative phenotype identified during the examination of the Russia residents are described. We were able to identify one case of true (RHD ψ) and five cases of false D-negative phenotype (RHD weak type 2 — two cases, RHD weak type 15 — one case and RHD weak type 20 — two cases) by molecular method.

Key words: gene, genotype, phenotype, Rhesus, rhesus complex, alloimmunization, true negative D-phenotype, false negative D-phenotype, alleles, mutations, erythrocyte antigens

Введение

Среди выявленных в настоящее время 33 групповых эритроцитарных систем система резус является самой полиморфной. Она состоит из 59 антигенов и более 200 аллелей. Антигены системы Резус кодируются 2 генами — *RHD* и *RHCE*, расположенными на коротком плече хромосомы 1 (1p34.3-1p36.1) и имеющими 10 экзонов [1]. Эти гены расположены на малом расстоянии друг от друга и навстречу друг другу (*RHCE* (5'→3')-(3'←5') *RHD*), имеют высокую степень гомологии — до 98 %, что может приводить к обменам гомологичными участками — генной конверсии, кроссинговеру, способствующим формированию гибридных генов. Ген *RHD* фланкирован 2 «резусными боксами» — повторяющимися последовательностями в 9000 пар оснований и гомологией в 98,6 % [2]. Гены *RHD* и *RHCE* определяют биосинтез полипептидов Rh с молекулярной массой 30–32 кДа [3], состоящих из 417 аминокис-

лот. Гидрофобные белки пронизывают мембрану эритроцита в 12 местах, образуя 6 петель, состоящих из внеклеточной, внутримембранной и внутриклеточной частей [4] и имеющих внутримембранные N- и C-концевые последовательности. Ген *RHD* кодирует синтез антигена D, ген *RHCE* — антигенов C/c и E/e. Лиц, на эритроцитах которых антиген D присутствует, относят к резус-положительным, а тех, кто не имеет данного антигена, — к резус-отрицательным.

Серологические методы фенотипирования эритроцитов, основанные на агглютинации эритроцитов моноклональными антителами, доступны, экономичны, легко воспроизводимы и быстры в исполнении. Они специфичны и обладают достаточной чувствительностью, пригодны для рутинных скрининговых исследований. Однако только сочетание серологических методов с молекулярными методами исследования позволяет понять истинные механизмы формиро-

вания D-отрицательного фенотипа у людей. В зависимости от причин его появления принято различать истинную и ложную D-негативности. Молекулярную основу истинной D-негативности составляют изменения в геномной организации, а ложная D-негативность обусловлена лимитированием возможностей серологических методов исследования.

Причины появления истинного D-отрицательного фенотипа кроются в возникновении изменений в геноме, следствием которых является либо полное отсутствие экспрессии белковой молекулы антигена RhD на поверхности эритроцитов, либо экспрессия неполноценного антигена RhD, не выявляемого серологическими методами исследования.

Белки Rh, в которые интегрированы антигены системы резус, могут экспрессироваться только при условии присутствия на мембране эритроцитов другого белка – Rh-ассоциированного гликопротеина (RhAG, Rh50), являющегося продуктом гена *RHAG*, расположенного на хромосоме 6 (6p11-p21) [5–7]. Вместе они представляют семейство резусных белков, входящих в большой резусный комплекс, включающий дополнительные гликопротеины CD47, гликофорин В и гликопротеины с антигенами систем LW и Fy [8], белок полосы 3 [9]. Доказано, что белковая молекула протеина RhAG представляет собой обязательный посттранскрипционный фактор, влияющий на экспрессию резусных белков [10]. Для транспортировки Rh-белков к эритроцитарной мембране необходим белок RhAG, хотя сам он может интегрироваться в мембрану эритроцита без резусных протеинов. Однако для оптимальной транспортировки и сборки резусного комплекса необходимы сами резусные белки, играющие роль стабилизатора всего комплекса за счет взаимодействия с некоторыми компонентами скелета мембраны эритроцитов. Для нормального взаимодействия белков RhAG и Rh необходимы как С-, так и N-концевые последовательности белков Rh [8, 11]. Нарушение связей между ними приводит к отсутствию синтеза самих резусных протеинов и формированию резус-дефицитных фенотипов. Примером может служить так называемый фенотип Rh_{null}, при котором на эритроцитах отсутствуют все антигены системы Резус. Существуют 2 генетические причины появления данного фенотипа, касающиеся изменений исключительно в генах *RH* и *RHAG*.

Во-первых, аморфный тип Rh_{null} является следствием делеции гена *RHD* и появления гомозиготности по молчащим аллелям в локусе RH из-за мутаций в гене *RHCE* (делеция 2 нуклеотидов в кодонах 322 и 323 7-го экзона и замена нуклеотидов TCA на C), приводящих к разрыву рамки считывания генетического материала. Синтезированный на основе такого транскрипта потенциальный белок состоял из 398 вместо 417 аминокислот и имел 10 вместо 12 трансмембранных цепей [8]. Другой причиной появления аморфного типа Rh_{null} может быть мутация в интроне

4 – замена T на G на границе с 4-м экзоном, которая активирует 3 скрытых сплайсинговых сайта. Из них 2 генерируют транскрипты, присоединяемые к нуклеотидам 16 и 11 интрона 4, после чего обнаруживаются стоп-кодона в 7-м и 5-м экзонах соответственно. Активация 3-го скрытого сплайсингового сайта инициирует появление транскрипта, который способствует делеции последнего, 6-го нуклеотида в 4-м экзоне и формированию стоп-кодона [12]. С.Н. Huang и соавт. также описали мутации, приводящие к делеции 4-го и 5-го экзонов в гене *RHCE* [12]. Феномен Rh_{null} ассоциирован с отсутствием или снижением экспрессии иных гликопротеинов (RhAG, CD47, LW, гликофорин В), входящих в гетерополимерный резусный комплекс [8].

Во-вторых, регуляторный тип фенотипа Rh_{null} встречается наиболее часто и является следствием гомозиготности по супрессорному мутантному аллелю гена *RHAG*, подавляющему синтез антигенов Rh. Все мутации в гене *RHAG*, приводящие к сдвигу рамки считывания (сплайсинговые [13] или бессмысловые мутации [14]), приводят к незавершенной или поздней конечной трансляции белковой молекулы. Такой же эффект имеют и бессмысловые мутации, приводящие к замене единичных аминокислот в протеине RhAG [15, 16]. Иными словами, любые мутации в гене *RHAG* приводят к синтезу неполноценного протеина, неспособного формировать функционирующий комплекс с белковой молекулой системы Резус. Лица с фенотипом Rh_{null} регуляторного типа передают своему потомству нормально функционирующие гены системы резус, поскольку сами гены *RHD* и *RHCE* не повреждены. Описан случай полной делеции гена *RHAG*, которая привела к формированию Rh_{null}-фенотипа [17].

К регуляторному Rh_{null}-фенотипу относят фенотип Rh_{mod}. Первоначально предполагали, что экспрессия антигена D сильно угнетена вследствие гомозиготности по супрессорному гену X^Q, расположенному на аутосомной хромосоме, не связанной с хромосомой 1 [18]. Позже было установлено, что различные нуклеотидные замены в гене *RHAG* ответственны за повреждение белка RhAG. Описан вариант фенотипа Rh_{mod}, при котором в белковой молекуле имеется единственная замена аминокислоты серина на аспаргин в позиции 79 и отмечается снижение количества молекул на эритроците [6]. Сами гены *RHD* и *RHCE* не повреждены, но на эритроцитарной мембране присутствует малое количество протеинов Rh, выявляемых только в методах адсорбции-элюции, не применяемых в рутинной практике (ложный D-отрицательный фенотип).

Гены *RHD* фланкированы 2 фрагментами ДНК, названными резусными боксами (Rhesus boxes). Высокая степень гомологии ДНК резусных боксов способствует неравновесному кроссинговеру между ними, выпадению целого гена *RHD* и появлению 2 гаплотипов *cde* [2, 19, 20]. Описанный D-отри-

цательный фенотип встречается в основном у представителей белой расы и передается по наследству. Его имеют около 17 % россиян [21], а у представителей негроидной расы делеция целого гена *RHD* встречается в 43 % случаев [22]. Описан эпизод полного выпадения гена *RHD* в процессе химиотерапии хронического миелолейкоза (ХМЛ), т. е. приобретенный D-отрицательный фенотип [23].

Этот фенотип может формироваться при возникновении функционально неактивных аллелей гена *RHD* вследствие бессмысловых мутаций (например, *RHD* (Q41X), *RHD* (Y330X) [24]), выпадения каких-либо его нуклеотидов (например, *RHD* (488 del 4), он характеризуется выпадением 4 нуклеотидов в 4-м экзоне [25]) или целых экзонов, приводящих к неспособности измененных генов кодировать синтез белка Rh. Делецию экзонов гена *RHD* чаще встречали у лиц с фенотипами D–Ce и D–cE [26], D–CCee [27], D–CCEE [28].

D-отрицательный фенотип может формироваться вследствие замен единичных нуклеотидов в гене *RHD*, которые способствуют появлению стоп-кодона. Примером может служить появление гена *RHCE*ceHAR*, когда в нормальном гене *RHD* происходит единичная замена С на Т в позиции 121 [24], или замена 5-го экзона гена *RHce* эквивалентным экзоном гена *RHD* [29, 30]. Доказано, что антиген R_0^{HAR} является иммуногенным для резус-отрицательных пациентов [30]. Такой генотип иногда обозначают как *RHD*+D- аллели, или D при обозначении берут в скобки, например (D) Ce/Ce.

Для представителей негроидной расы характерно появление генотипа *RHD*+ с D-отрицательными аллелями (D-отрицательный фенотип) вследствие отсутствия активности гена *RHD*, обусловленного в основном 2 молекулярными механизмами:

- появление псевдогена *RHD* (*RHD ψ*) (43–66 %), возникающего вследствие вставки 37 пар оснований на границе интрона 3 и 4-го экзона, приводящей к сдвигу рамки считывания, появлению стоп-кодона в экзоне 6 [22]. Псевдоген *RHD ψ* у лиц белой расы встречается с частотой 1:14748 [31];

- возникновение гибридных генов *RHD-CE-D* (15 %) вследствие генной конверсии между экзонами генов *RHD* и *RHCE*. Такие гибридные гены не способны кодировать синтез антигена D на поверхности мембраны эритроцитов. Они часто ассоциированы с гаплотипом *Cde^S* [2]. У людей европеоидной расы чаще встречаются гибридные гены *RHD-CE* (2-9)-D [32] и *RHD-CE* (4-7) – D [33].

Причиной ложного D-отрицательного фенотипа могут быть варианты антигена D, не распознаваемые серологическими методами, применяемыми в рутинной практике, например типы weak D или DEL. Появление слабых вариантов антигена D обусловлено аминокислотными заменами в трансмембранной или внутриклеточной частях белковой молекулы, воз-

никающими вследствие нуклеотидных замен в гене *RHD* [34]. В настоящее время выявлен 81 тип антигена weak D [35].

Н. Moussa и соавт. [36] описали случаи расхождения между результатами серологических тестов фенотипирования и молекулярных методов исследования, когда не были выявлены такие варианты слабого антигена D, как weak D типы 11, 29, 4.0 и парциальный D тип DBT-1. P. Gowland и соавт. [37], суммируя сведения из 3 банков крови Швейцарии, показали, что только молекулярные методы позволили идентифицировать *RHD* weak типы 11, 31, 38, аллели *RHD*delEx10.5.4 kb* (weak D), *RHD*DVL-2* (weak D), *RHD*IVS3+5G>A* (weak D) и DEL, не выявленные при рутинном серологическом скрининге.

Вариантом антигена D, не распознаваемым моноклональными анти-D-реактивами, но идентифицируемым методами адсорбции-элюции [37], является фенотип DEL (D_{cl}), часто встречающийся у представителей монголоидной расы [38–40]. Молекулярная основа данного варианта гена *RHD* – делеция 1013 пар оснований между интронами 8 и 9, выпадение почти всего экзона 9 и присутствие аллеля 1227A [41, 42]. Эритроциты с антигеном DEL обычно идентифицируют как RhD-отрицательные при использовании серологических методов. Этот антиген иногда нельзя выявить даже методами адсорбции и элюции [43], хотя азиатский его тип имеет все эпитопы RhD-белка [44]. Антиген RhDEL имеет клиническое значение, так как вызывает аллоиммунизацию у RhD-отрицательных реципиентов [45, 46], и доноры с таким антигеном должны быть отнесены к резус-положительным [28].

Имуногематологи все больше сходятся во мнении, что для предупреждения анти-D-аллоиммунизации резус-отрицательных реципиентов необходимо выполнять генотипирование по локусу *RHD* D-отрицательных доноров. Швейцарский иммуногематолог P. Gowland и соавт. показали, что из 26243 D-отрицательных доноров 65 (0,25 %) имели аллели гена *RHD*, и 31 из них были отнесены к D-положительным после проведения исследования на молекулярном уровне [37], 28 из которых имели фенотип RhCee. Иными словами, проведение генотипирования генов *RHD* особенно актуально при определении у доноров фенотипов с изолированными антигенами С и/или Е (без антигена D) ввиду редкой частоты их в популяции.

Цель нашей работы – изучение молекулярных основ D-отрицательного фенотипа у россиян.

Материалы и методы

Мы выполняли фенотипирование эритроцитов по системе Резус в реакции агглютинации на плоскости Цоликлонами IgM-класса со специфичностями анти-D, анти-С, анти-Сw, анти-с, анти-Е, анти-е производства ООО «Гематолог» (Москва) и в гелевых картах с IgM-антителами фирмы «BioRad», США. При от-

Фенотипы и генотипы D-отрицательных обследованных лиц

№	Обследуемое лицо	Генотип		Фенотип
		RHD	RHCE	
1	З.	D ψ	cc*ee	ccdee
2	Б.	weak D type 2	cc*Ee	ccdEe
3	А.	weak D type 2	cc*Ee	ccdEe
4	Ч.	weak D type 15	CC*ee	CCdee
5	М.	weak D type 20	Cc*ee	Ccdee
6	Л.	weak D type 20	cc*Ee	ccdEe
7	П.	D-	Cc*ee	Ccdee
8	И.	D-	Cc*ee	Ccdee
9	К.	D-	Cc*ee	Ccdee

рицательном результате с моноклональным антителом анти-D проводили: реакцию солевой агглютинации в 96-луночных планшетах для иммунологических реакций с полными моноклональными антителами анти-D (Эритротест™-Цоликлон анти-D Супер производства ООО «Гематолог» (Москва)) 2 серий, непрямой антиглобулиновый тест с неполными моноклональными антителами анти-D 2 серий (Эритротест™-Цоликлон анти-D производства ООО «Гематолог» (Москва)) в пробирках с последующей детекцией агглютинации на плоскости и в геле, содержащем антиглобулиновую сыворотку («Bio-Rad», США). Для выявления фиксирования неполных анти-D-антител на исследуемых и контрольных эритроцитах (D-положительных и D-отрицательных) после проведенной инкубации применяли в реакции на плоскости антиглобулиновую сыворотку 3 серий производства ООО «Гематолог» (Москва).

Геномную ДНК выделяли с помощью реактивов фирмы «BAG» (Германия) по методике производителя. Концентрацию и чистоту ДНК определяли на спектрофотометре. Одна оптическая единица (OD) соответствовала концентрации ДНК 50 нг/мкл. Чистота ДНК, определяемая по отношению показателей при 260 и 280 нм (OD 260/280), составляла 1,6–1,8, концентрация конечной ДНК – 50–100 нг/мкл.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) выполняли с праймерами для выявления генотипов системы резус (RH-Type) и вариантов антигена Dweak (Weak D-Type) производства фирмы «BAG» (Германия). Детекцию полученных результатов осуществляли посредством электрофореза продуктов амплификации в 2 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл) в TBE-буфере при напряженности электрического поля 10–15 В/см. В лунки геля вносили по 10 мкл амплификационной смеси. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете ($\lambda = 310$ нм) при помощи трансиллюмина-

тора в виде полос ярко-оранжевого цвета. Наличие полос амплификации внутреннего положительного контроля свидетельствовало о корректности проведенной ПЦР.

Результаты

В 2014 г. определение фенотипа эритроцитов системы Резус выполнено у 3205 человек, из них D-отрицательный фенотип выявлен у 481 (15 %). Генотипирование для идентификации причины D-отрицательного фенотипа проведено у 9 человек.

По реакции агглютинации на плоскости с анти-D-моноклональным антителом все исследуемые образцы эритроцитов были идентифицированы как D-отрицательные (таблица). Один образец эритроцитов имел фенотип ccdee (№ 1), 4 образца – Ccdee (№ 5, 7, 8, 9), 3 – ccdEe (№ 2, 3, 6) и 1 – CCdee (№ 4). В реакциях солевой агглютинации, в гелевых картах все исследуемые эритроциты не реагировали с анти-D-реактивом, за исключением эритроцитов пациентки А. (№ 3), которые агглютинировались в разведении анти-D-антитела 1:32 (положительный контроль в среднем 1:4000). В непрямой пробе Кумбса с анти-D-моноклональными антителами IgG эритроциты № 1, 5–9 не агглютинировались антиглобулиновой сывороткой, но она агглютинировала эритроциты пациенток Б. (№ 2) и А. (№ 3) после инкубации с неполными анти-D-антителами. Агглютинация была мелкая и формировалась на 2-й и 3-й минуте соответственно, в то время как контрольные D-положительные эритроциты склеивались в течение 10 с. Эритроциты Ч. (№ 4) после проведения непрямой пробы Кумбса показали положительный результат на 4+ только при использовании гелевых карт с антиглобулиновой сывороткой.

Генотипирование позволило выявить у 7 обследованных лиц присутствие гена RHD: у № 1 – RHD ψ , у № 2, 3 – weak D type 2, у № 4 – RHD weak type 15

и у № 5, 6 – *RHD weak type 20*. Пациенты № 7–9 гена *RHD* не имели. Генотип локуса *RHCE* у всех обследованных лиц соответствовал определенному фенотипу.

Заключение

Представительство антигенных детерминант слабых вариантов D на эритроцитах колеблется довольно значительно. При очень низкой их экспрессии они не выявляются серологическими методами. Нам удалось выявить 1 случай истинного (*RHD ψ*) и 5 случаев ложного D-отрицательного фенотипа (*RHD weak type 2* – 2 случая, *RHD weak type 15* – 1 случай и *RHD weak type 20* – 2 случая). Молекулярная основа выявленных вариантов слабого антигена D: для *RHD weak type 2* характерны нуклеотидные замены 1154G>C [34]; для *RHD weak type 15*–845G>A [34]; для *RHD weak type 20* – 1250T>C [47]. У этих лиц фенотип антигенов системы резус был определен как ccdee, Ccdee, CCdee и ccdEe.

Принято считать, что варианты антигена *RHD weak type 2* и *RHD weak type 20* чаще ассоциированы с фенотипом ccdEe [48]. Нам удалось показать, что эритроциты с *RHD weak type 20* могут иметь фенотип Ccdee. В 5 случаях мы подтвердили ассоциацию вариантов слабого антигена D с присутствием антигенов C или E.

На наш взгляд, важно применять молекулярные методы исследования для установления истинной резус-принадлежности у D-отрицательных лиц, особенно доноров эритроцитов с фенотипами, содержащими

антигены C и/или E. Особенно это важно для доноров крови в целях предупреждения аллоиммунизации резус-отрицательных больных, поскольку иммуногенность вариантов антигена D изучена недостаточно полно. Для больных эта же проблема актуальна в свете возможности переливания эритроцитсодержащих сред от резус-положительных доноров с целью более бережного использования донорских резус-отрицательных эритроцитов. Моноклональные анти-D-антитела должны распознавать наиболее часто встречающиеся варианты антигена D, так же как и антиглобулиновая сыворотка должна выявлять адсорбированные на эритроцитах антитела при постановке непрямой пробы Кумбса. Непрямой антиглобулиновый тест, применяемый для идентификации слабых вариантов антигена D, должен быть дополнен молекулярными методами исследования. Особенно актуально данное предложение для специалистов станций переливания крови Российской Федерации, которые отходят от классических иммуногематологических методов, заменяя их гелевыми технологиями. Как показали наши исследования, в гелевых картах не всегда можно определить слабые варианты антигена D. Некоторые антигены weak D мы выявили только с помощью классической непрямой пробы Кумбса с идентификацией фиксации неполных анти-D антител в гелевых картах с антиглобулином, в то время как агглютинация эритроцитов, нагруженных неполными анти-D-антителами, при использовании обычной антиглобулиновой сыворотки на плоскости отсутствовала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cherif-Zahar B., Mattei M.G., Le van Kim C. et al. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by *in situ* hybridization. *Hum Genet* 1991;86:398–400.
2. Wagner F.F., Flegel W.A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000;95:3662–8.
3. Agre P., Saboori A.M., Asimos A. et al. Purification and partial characterization of the M, 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. *J Biol Chem* 1987;262:17497–503.
4. Hermand P., Mouro I., Huet M. et al. Immunochemical characterization of Rhesus proteins with antibodies raised against synthetic peptides. *Blood* 1993;82:669–76.
5. Gahmberg C.G. Molecular characterization of the human red cell Rh0(D) antigen. *EMBO J* 1983;2:223–7.
6. Cherif-Zahar B., Raynal V., Mattei M.G. et al. Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. *Nat Genet* 1996;12:168–73.
7. Chou S.T., Westhoff C.M. The Rh and RhAG blood group systems. *Immunohematology* 2010;26(4):178–86.
8. Cherif-Zahar B., Matassi G., Raynal V. et al. Molecular defects of the RHCE gene in Rh-deficient individuals of the amorph type. *Blood* 1998;92:639–46.
9. Avent N.D. New insight into the Rh system: structure and function. *ISBT Science Series* 2007;2:35–43.
10. Mouro-Chanteloup I., D'Ambrosio A.M., Gane P. et al. Cell-surface expression of RhD group polypeptide is posttranscriptionally regulated by the RhAG glycoprotein. *Blood* 2002;100:1038–47.
11. Eyers S.A., Ridgwell K., Mawby W.J. et al. Topology and organization of human Rh (rhesus) blood group-related polypeptides. *J Biol Chem* 1994;269:6417–23.
12. Huang C.H., Chen Y., Reid M.E. et al. Rhnull disease: the amorph type results from a novel double mutation in RhCe gene on D-negative background. *Blood* 1988;92:664–71.
13. Cherif-Zahar B., Matassi G., Raynal V. et al. Rh-deficiency of the regulator type caused by splicing mutation in the human RH50 gene. *Blood* 1998;92:2535–40.
14. Hyland C.A., Cherif-Zahar B., Cowley N. et al. A novel single missense mutation identified along the RH50 gene in a composite heterozygous Rh_{null} blood donor of the regulatory type. *Blood* 1998;91:1458–63.
15. Carton J.P. Rh blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999;12:655–89.
16. Huang C.H., Liu P.Z., Cheng J.G. Molecular genetics of the Rh blood group system. *Semin Hematol* 2000;37:150–65.
17. Gomez-Torreiro E., Eiras-Martinez A., Rodriguez-Calvo M.I. et al. Rh-null phenotype caused by a complete RHAG deletion. *Transfusion* 2015;55:197–8.
18. Cherif-Zahar B., Raynal V., Kim L.V. et al. Structure and expression of the RH locus in the Rh-deficiency syndrome. *Blood* 1993;82(2):656–62.

19. Arce M.A., Thompson E.S., Wagner S. et al. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. *Blood* 1993;82: 651–5.
20. Carton J.P. Defining the Rh blood group antigen. *Blood Rev* 1999;8:199–212 (abstract).
21. Дашкова Н.Г. Система обеспечения иммунологической безопасности гемотранфузионной терапии. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2006. [Dashkova N.G. System providing immunological safety of blood transfusion. Dissert. D. Sci. M., 2006 (In Russ)].
22. Singleton B.K., Green C.A., Avent N.D. The presence of an RHD pseudogene containing 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95:12–8.
23. Murdock A., Assip D., Hur-Rove K. et al. RHD deletion in a patient with chronic myeloid leukemia. *Immunohematology* 2008;24(4):160–4.
24. Avent N.D., Martin P.G., Armstrong-Fisher S.S. et al. Evidence of genetic diversity underlying RhD, weak D (Du), and partial D phenotypes as determined by multiplex polymerase chain reaction analysis of the RHD gene. *Blood* 1997;89: 2568–77.
25. Andrews K.T., Wolter L.C., Saul A. et al. The RhD trait in a white patient with the RhCce phenotype attributed to a four-nucleotide deletion in the RHD gene. *Blood* 1998;92:1839–40.
26. Okuda H., Kawano M., Iwamoto S. et al. The RHD gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. *J Clin Invest* 1997;100:373–9.
27. Hyland C.A., Wolter L.C., Saul A. Three unrelated RhD gene polymorphisms identified among blood donors with Rhesus CCee (r'r') phenotypes. *Blood* 1994;84:321.
28. Londero D., Florino M., Miotti et al. Molecular RH blood group typing of serologically D-/CE+ donors: the use of a polymerase chain reaction—sequence-specific primer test kit with pooled samples. *Immunohematology* 2011;27(1):25–8.
29. Beckers E.A.M., Faas B.H.W., von dem Borne A.E.G.K. et al. The R0Har Rh:33 phenotype results from substitution of exon 5 of the RHCE gene by the corresponding exon of the RHD gene. *Br J Hematol* 1996;92:751–7.
30. Beckers E.A.M., Porcelijn L., Ligthart P. et al. The R0Har antigenic complex is associated with a limited number of D epitopes and alloanti-D production: a study of three unrelated persons and their families. *Transfusion* 1996;36:104–8.
31. Wagner F.F., Frohmajer A., Flegel W.A. et al. RHD positive haplotypes in D-negative Europeans. *BMC Genet* 2001;10: 471–86.
32. Huang C.H. Alteration of RH gene structure and expression in human dCCee and DCW- red blood cells: phenotypic homozygosity versus genotypic heterozygosity. *Blood* 1996;8:2326.
33. Faas B.H.W., Beckers E.A.M., Simsek S. et al. Involvement of Ser103 of the Rh polypeptides in G epitope formation. *Transfusion* 1996;36:506.
34. Wagner F.F., Gassner C., Muller T.H. et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93(1):385–93.
35. http://uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB2/P_RHDweakDtype.htm.
36. Moussa H., Tsochandaridis M., Chakroun T. et al. Molecular background of D-negative phenotype in the Tunisian population. *Transfus Med* 2012;22:192–8.
37. Gowland P., Gassner C., Hustinx H. et al. Molecular RHD screening of RhD negative donors can replace standard serological testing for RhD negative donors. *Transfus Apher Sci* 2014;50:163–8.
38. Okubo Y., Yamaduchi H., Tomita T. et al. A D variant, Del? *Transfusion* 1984;24:542.
39. Fukumori Y., Hori Y., Ohnoki S. et al. Further analysis of Del (D-elute) using polymerase chain reaction (PCR) with RHD gene-specific primers. *Transfus Med* 1997;7(3):227–31.
40. Daniels G. Variants of RhD—current testing and clinical consequences. *Br J Haematol* 2013;161:461–70.
41. Chang J.G., Wang J.C., Yang T.Y. et al. Human Rh-del is caused by a deletion of 1,013 bp between introns 8 and 9 including exon 9 of RHD gene. *Blood* 1998;92:2602–4.
42. Chen J.C., Lin T.M., Chen Y.L. et al. RHD 1227A is an important genetic marker for RhD(el) individuals. *Am J Clin Pathol* 2004;122(2):193–8.
43. Shao C.P., Maas J.H., Su Y.Q. et al. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang* 2002;83:156–61.
44. Gu J., Wang D.X., Shao C.P. et al. Molecular basis of DEL phenotype in the Chinese population. *BMC Med Genet* 2014;15:54.
45. Wagner T., Kormoczi G.F., Buchta C. et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45:520–6.
46. Yasuda H., Ohto H., Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45:1581–4.
47. Witter B. <http://vts.uni-ulm.de/doc.asp?id=765>.
48. Van Kim C.L., Colin Y., Carton J.P. Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev* 2006;20:93–110.