틀이동변이 *RHD* 711delC에 의한 D-변이형 증례 1건

마태오^{1,*} · 유홍비^{2,*} · 전수학¹ · 조 덕³ · 천세종¹ · 신명근¹

전남대학교 의과대학 진단검사의학교실 및 전남대학교병원 진단검사의학과¹, 성균관대학교 삼성융합의과학원 융합의과학과², 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학과³

Case of D-Variant from a Frameshift Mutation *RHD* 711delC

Taeo Ma^{1,*}, Hongbi Yu^{2,*}, Suhak Jeon¹, Duck Cho³, Sejong Chun¹, Myung Geun Shin¹

Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Medical School & Hospital¹, Gwangju, Department of Health Sciences and Technology, SAIHST, Sungkyunkwan University², Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine³, Seoul, Korea

D antigens are clinically significant, and routine tests on the D antigen requires the inclusion of weak D testing, which is performed using indirect antihuman immunoglobulin methods. On the other hand, exact typing of the D type of an individual can be done more precisely with *RHD* genotyping, which is a useful tool in cases where the *RHD* gene is intact. The majority of weak-D or partial-D cases are from single nucleotide changes or hybridization of *RHD* and *RHCE* genes. Nevertheless, frameshift mutations can also result in weak or partial-D. The characteristics of a frameshift mutation is typically a change in protein product after a problematic mutation and early termination of transcription, leading into truncated protein products. This paper reports a D-variant case with *RHD* 711delC along with a review of the relevant literature. In addition, the results of software analysis are reported. (Korean J Blood Transfus 2019;30:168-173)

Key words: RhD, *RHD*, RhCE, *RHCE*, Genotype, Sequencing, Frameshift, D-negative

서론

D 항원은 임상적으로 중요한 혈액형 항원으로, 정확한 D형 혈액형의 판정은 수혈에 있어서 ABO 혈액형 다음으로 중요하다. 전통적으로 D형의 판정은 약-D 검사를 포함한 ‘일반적인 혈청

학’적 방법을 일반적으로 사용한다. 하지만 다양한 D-음성, 약-D 형, 부분-D형, 그리고 일반적인 혈청학적 방법으로는 D-음성이지만 D항원이 존재하는 DEL과 같은 변이형을 정확히 판정하기 위해서는 *RHD* 유전자검사를 유용하게 활용할 수 있다 [1-3]. 국내에 사용되고 있는 *RHD* 유전자

Received on July 9, 2018. Revised on March 17, 2019. Accepted on April 19, 2019

Correspondence to: Sejong Chun

Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Medical School, 42 Jebong-ro, Dong-gu, Gwangju 61469, Korea
Tel: 82-62-220-5387, E-mail: sejongchun79@naver.com, ORCID: http://orcid.org/0000-0001-7462-5802

*Taeo Ma and Hongbi Yu contributed equally as co-first authors.

This study was funded by Chonnam National University Hospital Biomedical Research Institute (grant no. BCRI19019).

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright ©2019 The Korean Society of Blood Transfusion

검사 전략은 서구인과 다른 한국인의 *RHD* 유전자 구조를 활용하여 promoter, intron 4, exon 7 및 exon 10에 대해 *RHD* 유전자 특이적인 시발체를 활용한 중합효소연쇄반응과 exon 9의 직접염기서열분석 혹은 1222T>C와 1227G>A에 특이적인 시발체를 사용한 대립유전자 특이 중합효소연쇄반응이다[4]. 이를 활용하면 *RHD* 유전자의 전체 결손, *RHD*와 *RHCE* 유전자의 교잡(*RHD-CE-D* hybrid), 그리고 1222T>C와 1227G>A의 점돌연변이는 정확하게 감별할 수 있다. 그러나, exon 9번 이외의 돌연변이에 의한 RhD 표현형 변화는

검출할 수 없어, *RHD* 유전자의 exon 10개를 분석해야 할 경우도 있다. 본 증례는 *RHD* 유전자 exon 10개를 분석하여 D-음성의 유전적 원인이 *RHD* 711delC에 의한 틀이동변이임을 국내 최초로 규명한 것이다. 이에 문헌고찰과 함께 소프트웨어 도구로 분석하여 검증한 단백질 수준의 변화도 함께 보고하고자 한다.

증례

76세 남자 환자가 심근염 의심 하에 심근 생검

Fig. 1. Genotyping results of the case. The patient showed an intact *RHD* gene (left) with two single nucleotide changes from the reference sequence NM_016124. c.711delC (middle) was identified to be the causative variant, while c.1154-31 C>T (right) is a frequently observed polymorphism in Caucasians.

을 위해 입원하였다. 일반적인 혈청학적 수혈전 검사는 A형 D-음성이었으며, 약-D형 검사에서 2개의 시약(anti-D, Bioclone, clone MAD2, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA 및 anti-D, Millipore, Livingston, UK) 모두에서 음성 소견을 보였다. C, E형 검사(anti-C, -c, -E 및 -e, Ortho Clinical Diagnostics, High Wycombe UK)는 cEe형으로 판정되었다. D 변이형 감별을 위해 실시한 유전자 검사상 *RHD* 유전자의 promoter, intron 4, exon 7 및 exon 10에 대해 *RHD* 유전자 특이적인 시발체를 이용한 중합효소연쇄반응으로 *RHD* 유전자의 존재를 확인하였고, 이후 exon 9에 대한 중합효소연쇄반응 후 직접염기서열 분석 결과 exon 9는 *RHD* 표준염기서열(NM_016124.4)과 동일하여 *RHD* 1227G>A 및 1222T>C 등 DEL 형이 아님을 확인하였다. 따라서, *RHD* 유전자의 다른 부위에 유전적 변이를 확인하기 위해 *RHD* 유

전자의 exon 1 부터 10까지 중합효소연쇄반응 후 직접염기서열분석을 실시하여 IVS8-31C>T (1154-31 C>T, *RHD**01EL.37) 및 711delC (*RHD**01N.16)를 발견하였다(Fig. 1). 전자는 서양인에서 자주 발견되는 intron 다형성으로 알려져 있다[5,6]. 본 증례와 별개로 진행한 D-양성 환자에서 발견된 바가 있어 이는 D-변이형을 일으키는 변이보다는 일반적으로 관찰되는 다형성으로 보는 것이 타당하다는 판단 하에, 711delC의 영향을 분석하기 위한 *in silico* 실험을 진행하였다. 이를 위해 Mutalyzer sequence variation nomenclature checker (www.mutalyzer.nl/) [7]를 사용하였으며, D-단백질의 적혈구 표면에 대한 2차원적 변화 분석은 Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) [8]로 하였다(Fig. 2). 정상적인 D-단백은 적혈구 표면에서 6개의 고리가 외부로 드러나 있는 것으로 알려져 있는데[9], 본 변이는 4번째 고리 이후에 단백질

Reference protein

```

1  MSSKYPRSVR RCLPLWALT EAALILLYF FTHYDASLED QKGLVASYQV GQDLTVMAAI
61  GLGFLTSSFR RHWSSVAFN LFMLALGVQW AILLDGFLSQ FPSGKVITL FSIRLATMSA
121 LSVLISVDAV LGKVNLQQLV VMVLVEVTAL GNLRMVISNI FNTDYHMNM HIYVFAAYFG
181 LSVANCLPKP LPEGTEDKDQ TATIPSLSAM LGALFLWMFW PSFNSALLRS PIERKNAVFN
241 TTYAVAVSVV TAISGSSLAH PQGKISKITYV HSAVLGGVA VGTSCILIPS PHLAMVGLV
301 AGLISVGGAK YLPGCCNRVL GIPHSIMGY NFSLLGLLGE IYIVLVLLVD TVGAGNGMIG
361 FQVLLSIGEL SLAIVIALTS GLLTGLLNL KIWKAPHEAK YFDDQVFMKF PHLAVGF*
    
```

Protein predicted from variant coding sequence

```

1  MSSKYPRSVR RCLPLWALT EAALILLYF FTHYDASLED QKGLVASYQV GQDLTVMAAI
61  GLGFLTSSFR RHWSSVAFN LFMLALGVQW AILLDGFLSQ FPSGKVITL FSIRLATMSA
121 LSVLISVDAV LGKVNLQQLV VMVLVEVTAL GNLRMVISNI FNTDYHMNM HIYVFAAYFG
181 LSVANCLPKP LPEGTEDKDQ TATIPSLSAM LGALFLWMFW PSFNSALLRS PIERKNACT
241 PTML*
    
```

Fig. 2. Predicted D-protein structure of *RHD* 711delC. Extracellular loops 3 to 6 are known to be crucial to the intact expression of the D-protein. This case shows premature termination at loop 4, which suggests that it is the cause of the D-negative phenotype.

합성이 조기에 종료되어 D-항원을 완전하게 표현하지 못하는 것으로 나타났다.

고 찰

본 증례에서 국내 최초로 발견된 711delC는 혈청학적 검사상 D-음성인 중국인의 0.49~0.76%에서 존재한다고 보고되었다. 기존 보고에서는 711delC가 중국인에서 비교적 흔한 RHD 대립유전자이기 때문에 대립유전자 특이 중합효소연쇄반응으로 검출했다[10,11].

본 증례와 같이 RHD 유전자가 존재하는 경우가 것이 비록 통상적인 혈청학적 검사로는 D-음성으로 분류된다 할지라도, RHD 유전자의 결손과 동일하게 D-항원을 발현하지 않는지에 대한 의문이 있을 수 있다. 이를테면, 일반적인 표현형 검사상 D-음성으로 잘못 분류될 수 있는 아시아형 DEL (c.1227G>A)은 RHD 유전자가 존재하지만 RHD exon 9 부위에 침묵변이로 인해 D-항원 발현이 약해져 혈청학적으로 흡착 및 해리시험을 통해서만 D-항원 발현을 알 수가 있다. 대체로 이런 동의변이가 DEL 형에 이를 정도로 D-항원 표현을 잃기는 쉽지 않은 것으로 알려져 있다[12]. 그러나 점돌연변이로 인한 무의미변이 혹은 틀이동변이 때문에 단백질 산물이 조기에 종결되는 경우에는 기존의 변이 데이터베이스를 조사한 결과 변이의 위치에 따라 D-항원성의 준부가 결정되는 것으로 나타났다. Exon 5부터 exon 7에 있는 틀이동돌연변이 중에서 국제수혈학회(International Society of Blood Transfusion)에 등록된 특이 혈액형 유전형질을 조사한 결과에 의하면, 이로 인하여 D 단백질이 조기 종결되는 경우에는 모두 일반적인 혈청학적 방법에서 D-음성의 표현형을 보였다(Table 1). 보다 구체적으로, D-단백의 구조상 상대적으로 4번째 이후의 고리가 형성되지 못한

경우에는 통상의 혈청학적 방법으로 한 검사 결과에서 D-음성으로 분류되는 것을 알 수 있다(Table 1) [3]. 보다 구체적으로 보자면, 4번째 고리는 exon 5에 의해 전사되므로[14], 본 증례와 같이 4번째 고리 이후에 틀이동변이가 있어 단백질 전사가 조기 종료될 경우에는 정상적인 D-항원성을 발하기 어렵다는 점을 추측할 수 있다. 또한 exon 5부터 7까지 부위의 무의미변이에 대한 분석을 한 결과도 역시 모두 같은 표현형으로 나타남을 알 수 있었다. 이러한 관찰은 D-단백의 구조와 연관 지어서 흥미로운 점을 드러내는데, 이는 D-단백에 있어서 3번째부터 6번째까지의 외부 고리가 D-단백 특이적인 아미노산 서열을 보여야만 제대로 된 D-항원성을 나타내는 것으로 알려져 있기 때문이다[13,14]. D-음성자 중 RHD-CE-D 교잡에 의한 경우 CE 유전자의 삽입이 exon 4부터 7을 포함한다는 점도 이러한 점을 뒷받침한다. D-항원의 세포외막에 표현된 고리 중 3번째는 exon 4에 의해, 4번째는 exon 5에 의해, 그리고 6번째는 exon 7에 의해 전사되는 만큼[14] 이 부위 내에서 틀이동변이나 무의미변이가 있을 경우에는 정상적인 D-항원성을 보이지 않으면서, 부분-D형 표현도 되지 않을 것이라고 추정할 수 있다. 본 증례의 경우처럼 exon 5 다만, 이러한 표현형이 소위 항원 결정기 지도(epitope map)에 의해 D-항원성을 가지는 다양한 단클론성과 다클론성 항-D 시약 모두에서 음성이 나오는지 여부는 추가적인 조사가 진행되어야 할 것이다[15].

본 증례는 국내에서 보고된 바가 없는 RHD 711delC에 대해 보고를 하면서, 틀이동변이나 무의미변이가 exon 5에서 7 사이에 존재할 경우 잠재적으로 D-항원성이 소실될 수 있다는 점을 시사한다. 다만, 이에 표현형의 보다 정확한 분류를 위해서는 흡착 및 해리 검사를 진행하여야 하는바, 이를 진행하지 못한 것은 본 연구의 한계점으

Table 1. Single nucleotide substitutions resulting in frameshift and nonsense mutations in exons 5 to 7 of the *RHD* gene

<i>RHD</i> mutation	ISBT allele designation number	Extended Rh phenotype	Serologic D-phenotype	Affected protein
660delG	<i>RHD</i> *01N.29	Ce	D negative	p.Trp220Cysfs*9
697delG	<i>RHD</i> *01N.82	not reported	D negative	p.Glu233Lysfs*13
702delG	<i>RHD</i> *01N.83	not reported	D negative	p.Lys235Argfs*11
711delC	<i>RHD</i> *01N.16	cE	D negative	p.Val238Cysfs*8
712delG	<i>RHD</i> *01N.33	Ce	D negative	p.Val238Cysfs*8
786delA	<i>RHD</i> *01EL.13	Ce	DEL	p.Lys264Argfs*24
822delG	<i>RHD</i> *01N.48	not reported	D negative	p.Leu275Trpfs*13
915delC	<i>RHD</i> *01N.49	not reported	D negative	p.Val306Serfs*53
950delA	<i>RHD</i> *01N.51	not reported	D negative	p.Asn317Thrfs*42
554G>A	<i>RHD</i> *01N.14	Ce	D negative	p.Trp185*
598C>T	<i>RHD</i> *01N.59	not reported	D negative	p.Gln200*
659delG	<i>RHD</i> *01N.78	not reported	D negative	p.Trp220Cysfs*9
761C>G	<i>RHD</i> *01N.62	Ce	D negative	p.Ser254*
767C>G	<i>RHD</i> *01N.39	Ce	D negative	p.Ser256*
807T>G	<i>RHD</i> *01N.18	Ce	D negative	p.Tyr269*
922G>T	<i>RHD</i> *01N.52	not reported	D negative	p.Gly308Ter
933C>A	<i>RHD</i> *01N.19	Ce	D negative	p.Tyr311*
933C>G	<i>RHD</i> *01N.63	not reported	D negative	p.Tyr311*
952C>T	<i>RHD</i> *01N.61	Ce	D negative	p.Arg318*
990C>G	<i>RHD</i> *01N.21	Ce	D negative	p.Tyr330*
993delC	<i>RHD</i> *01EL.28	not reported	DEL	p.Phe332Serfs*27
1029C>A	<i>RHD</i> *01N.40	cE	D negative	p.Tyr343*

로 볼 수 있다. 하지만 D-단백질 구조의 4번째 고리 이후가 D-항원성에 결정적인 영향이 있는 것으로 문헌상 보고된 만큼, 이 부위에 대한 염기서열 분석을 통하여 다양한 약-D, 부분-D, 그리고 D-음성에 대한 정확한 판단을 할 수 있을 것이다.

요 약

D 항원은 임상적으로 중요한 항원으로, D-항원에 대한 일반적인 검사는 간접항글로불린 검사를 이용한 약-D 검사를 포함해야 한다. 그러나 보다 정확한 D형의 판정은 *RHD* 유전자의 염기서

열 분석을 이용하여 할 수 있으며, 특히 *RHD* 유전자 결손이 없는 경우에 매우 유용한 방법이다. 다수의 약-D 형이나 부분-D형은 단일 염기의 치환이나 *RHD* 유전자와 *RHCE* 유전자의 부분적인 교잡으로 인한 것이다. 하지만 틀이동변이 또한 약-D형이나 부분-D형을 만들 수 있다. 틀이동변이의 특성상 변이 이후에 전사되는 단백질은 정상적인 D-형과 다르며, 많은 경우 조기 종료코돈에 의해 비정상적으로 짧은 단백질이 생성된다. 따라서 틀이동변이의 경우, 변이의 위치에 따라 D-항원이 정상적으로 발현될 수 있는지가 결정될 것으로 생각된다. 저자들은 *RHD* 유전자의 염기

서열분석을 통하여 일반적인 혈청학적 검사 상 D 음성을 보인 RHD 711delC 을 발견하여 본 증례를 소프트웨어적 분석과 문헌고찰과 함께 보고하고자 하였다.

References

1. Flegel WA, Roseff SD, Tholpady A. Phasing-in RHD genotyping. Arch Pathol Lab Med 2014;138: 585-8
2. Sandler SG, Chen LN, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. Br J Haematol 2017;179:10-9
3. Wagner FF, Flegel WA. The Rhesus Site. Transfus Med Hemother 2014;41:357-63
4. Seo MH, Won EJ, Hong YJ, Chun S, Kwon JR, Choi YS, et al. An effective diagnostic strategy for accurate detection of RhD variants including Asian DEL type in apparently RhD-negative blood donors in Korea. Vox Sang 2016;111: 425-30
5. Wagner FF. RHD PCR of blood donors in northern Germany: use of adsorption/elution to determine D antigen status. Vox Sang 2012;103: Abstract 3C-S8-04
6. The International Society of Blood Transfusion (ISBT). RHD (ISBT 004) weak D and Del alleles v5.0 180207. http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/004_RHD_weak_D_and_Del_alleles_v5.0_180207.pdf [Online] (last visited on 23 September 2018)
7. Wildeman M, van Ophuizen E, den Dunnen JT, Taschner PE. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. Hum Mutat 2008;29:6-13
8. Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. Bioinformatics 2014;30:884-6
9. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood 2000;95:375-87
10. Ye SH, Wu DZ, Wang MN, Wu XY, Xu HG, Xu H, et al. A comprehensive investigation of RHD polymorphisms in the Chinese Han population in Xi'an. Blood Transfus 2014;12:396-404
11. Shao CP, Maas JH, Su YQ, Köhler M, Legler TJ. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. Vox Sang 2002;83:156-61
12. Chun S, Yun JW, Park G, Cho D. The synonymous nucleotide substitution RHD 1056C>G alters mRNA splicing associated with serologically weak D phenotype. J Clin Lab Anal 2018; 32:e22330
13. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. BMC Genet 2001;2:10
14. Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. Immunohematology 2004;20:23-36
15. Cartron JP, Rouillac C, Le Van Kim C, Mouro I, Colin Y. Tentative model for the mapping of D epitopes on the RhD polypeptide. Transfus Clin Biol 1996;3:497-503