

9th International Blood Transfusion Congress



Arusha, Tanzania 2018

SCIENTIFIC DEVELOPEMENT

Clarifying the impact of IN(Lu) associated *KLF1* variants on CR1 (KN blood group system) expression

Clarifier l'impact des variants de *KLF1* associés à IN (Lu) sur l'expression de CR1 (système de groupes sanguins KN)

Fraser N, Schoeman E, Knauth C, Dean M, Moussa A, Walsh T, Perkins A, Hyland C, Flower R

BACKGROUND

A number of variants in red blood cell (RBC) surface proteins are related to resistance to malaria. One of these malaria receptors is Complement Receptor 1 (CR1), which contains the KN blood group system. The 'Inhibitor of Lutheran' or In(Lu) is associated with reduced expression of a number of RBC surface proteins and is the result of variations in the essential erythroid transcription factor *KLF1*. In(Lu) has characteristic reductions of BCAM (LU blood group system) and CD44 (IN blood group system) on RBCs. Other blood group systems have also been reported to be impacted. There is controversy regarding whether the levels of the KN blood group protein are reduced on In(Lu) RBCs. One study reported reduced expression of KN on RBCs with the In(Lu) phenotype¹. A second study reported that CR1 expression was not reduced in several In(Lu) examples despite poor associations between CR1 copy number and high (H) or low (L) CR1 haplotypes^{2,3}.

CONTEXTE

Un certain nombre de variants des protéines de surface des globules rouges (RBC) sont liées à la résistance au paludisme. Un des récepteurs du paludisme est le Complement Receptor 1 (CR1), qui contient le système de groupes sanguins KN. 'L'inhibiteur Lutheran' ou In (Lu) est associé à une expression réduite d'un certain nombre de protéines de surface des globules rouges et il est le résultat de variations du facteur de transcription érythroïde essentiel *KLF1*. In (Lu) présente des réductions caractéristiques du BCAM (système de groupes sanguins LU) et exprime CD44 (système de groupes sanguins IN) sur les globules rouges. D'autres systèmes de groupes sanguins ont également été signalés. Il existe une controverse quant à savoir si les taux de protéines du groupe sanguin KN sont réduits sur les RBC In (Lu). Une étude a rapporté une expression réduite de KN sur les globules rouges avec le phénotype In (Lu)¹. Une seconde étude a montré que l'expression de CR1 n'était pas

This second study attributed to the differences between the two studies to *CR1* variants (including H/L haplotypes), contributions from the condition of the cells before storage, and storage in -30° C glycerol². We hypothesise that genetic variants in both *KLF1* and *CR1* contribute to variations in CR1 expression, and possibly malaria resistance.

AIM

To assess whether genetic variants in *KLF1* and *CR1* contribute to decreased CR1 expression.

METHOD

Lu(a-b-) blood samples were identified and the serological phenotype confirmed using Lutheran-specific typing cards (Lu^a and Lu^b) following the manufacturer's instructions (Bio-Rad). Five Lu(a-b-) samples identified were genotyped by massively parallel sequencing for variants in *KLF1* and other blood group genes including *CR1*. Blood group variants were detected using CLC Genomics Workbench v.9.0.1 and comparison with public databases. CR1/CD35 expression on RBCs was assessed using a BD FACSCanto II flow cytometer with a biotinylated anti-CD35 (Miltenyi) and PE-streptavidin (BD Biosciences).

RESULTS

Genotyping revealed that the five Lu(a-b-) samples had a causative *KLF1* variant and were of the In(Lu) phenotype. RBC from these samples had reduced levels of CR1 positivity (P=0.0011) and reduced relative expression (median fluorescence intensity) of CR1 (P=0.0053) compared to non-In(Lu) controls. There was no evidence that cryopreservation of RBCs impacted CR1 expression. The CR1 HL haplotype was identified in four samples and was associated with reduced CR1 expression. The HH haplotype was identified in one sample with similar levels of CR1 expression as controls.

DISCUSSION

These data suggest a relationship between CR1 H/L haplotypes and CR1 expression. Our findings are consistent with an interpretation that both *CR1* and *KLF1* variants impact on CR1 expression to varying degrees, as suggested by previous studies¹. The relationship between *KLF1* and *CR1* variants and malaria resistance in African populations is yet to be established and requires further study.

REFERENCES

1. Daniels, G.L., *et al.* Transfusion; 1986 26(2):171
2. Moulds, J.M. & Shah, C., Transfusion; 1999 37(7):751
3. Xiang, L., *et al.* Journal of Biological Chemistry; 1999 163(3):4939

réduite dans plusieurs exemples In (Lu) malgré de faibles associations entre le nombre de copies CR1 et les haplotypes CR1 élevés (H) ou faibles^(2,3). Cette deuxième étude a attribué les différences entre les deux études aux variants *CR1* (y compris les haplotypes H / L), à la contribution de l'état des cellules avant stockage et après stockage dans du glycérol -30 ° C². Nous émettons l'hypothèse que les variants génétiques à la fois dans *KLF1* et *CR1* contribuent aux variations de l'expression de CR1, et éventuellement à la résistance au paludisme.

OBJECTIF

Evaluer si les variants génétiques dans *KLF1* et *CR1* contribuent à la diminution de l'expression de CR1.

MÉTHODE

Des échantillons de sang Lu (a - b-) ont été identifiés et le phénotype sérologique confirmé à l'aide de cartes de typage Luthéran spécifiques (Lu^a et Lu^b) en suivant les instructions du fabricant (Bio-Rad). Cinq échantillons de Lu (a - b-) identifiés ont été génotypés par séquençage parallèle massif de variants dans *KLF1* et d'autres gènes de groupes sanguins, y compris *CR1*. Des variants de groupes sanguins ont été détectés à l'aide d'un CLC Genomics Workbench v.9.0.1 et une comparaison avec des bases de données publiques. L'expression de CR1 / CD35 sur les globules rouges a été évaluée en utilisant un cytomètre en flux BD FACSCanto II avec un anti-CD35 (Miltenyi) et une PE-streptavidine biotinylés (BD Biosciences).

RÉSULTATS

Le génotypage a révélé que les cinq échantillons Lu (a - b-) présentaient une variante causale de *KLF1* et étaient du phénotype In (Lu). Les globules rouges de ces échantillons avaient des niveaux réduits de positivité CR1 (P= 0,0011) et une expression relative réduite (intensité de fluorescence médiane) de CR1 (P= 0,0053) par rapport aux témoins non In (Lu). Il n'y avait aucune évidence que la cryoconservation des globules rouges ait affecté l'expression de CR1. L'haplotype CR1 HL a été identifié dans quatre échantillons et associé à une expression réduite de CR1. L'haplotype HH a été identifié dans un échantillon avec des niveaux similaires d'expression de CR1 en tant que témoins.

DISCUSSION

Ces données suggèrent une relation entre les haplotypes CR1 H / L et l'expression de CR1. Nos résultats concordent avec une interprétation selon laquelle les variants *CR1* et *KLF1* ont un impact sur l'expression de CR1 à des degrés divers, comme le suggèrent des études antérieures¹. La relation entre les variants *KLF1* et *CR1* et la résistance au paludisme chez les populations africaines n'a pas encore été établie et nécessite un complément d'étude.

RÉFÉRENCES

1. Daniels, G.L., *et al.* Transfusion; 1986 26(2):171
2. Moulds, J.M. & Shah, C., Transfusion; 1999 37(7):751
3. Xiang, L., *et al.* Journal of Biological Chemistry; 1999 163(3):4939