

Okänd blodbroms med cancerkoppling

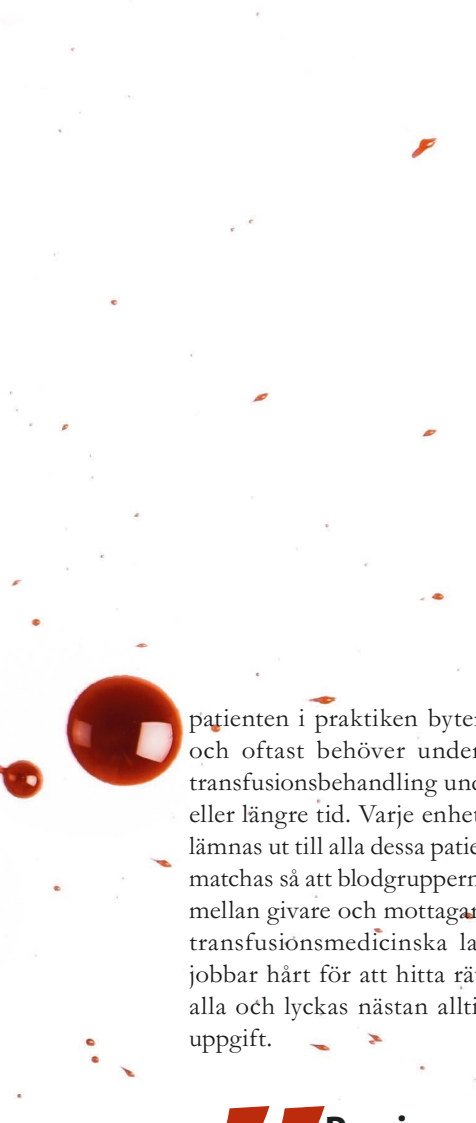
– **EMP3 är proteinet bakom världens ovanligaste blodgrupp**

Forskare i Lund och Bristol har löst gåtan om en blodgrupp så sällsynt att man bara känner till ett tiotal människor som har den, varav en enda är blodgivare. När det cancerrelaterade proteinet EMP3 saknas på röda blodkroppar och blodplättar resulterar det i blodgruppen MAM-negativ. Studien där forskarna samtidigt kom på att EMP3 är en hittills okänd bromsmolekyl i blodbildningen publicerades nyligen i *Nature Communications*. Här beskriver professor **Martin L Olsson** och docent **Jill Storry** senaste nytt från det högintressanta forskningsområdet.

Varje år bidrar blodgivare med ungefär 400 000 påsar blod för att den svenska sjukvården ska kunna fungera¹. Det är många olika patientkategorier som blir mottagare av dessa gåvor, sedan blodet delats upp i sina tre terapeutiska huvudkomponenter: röda blodkroppar, blodplättar och plasma. Blodtransfusioner ges dels på grund av akuta, kortvariga behov som efter stora trauman, större operationer, eller i samband med stora blödningar

vid förlösning. Men de största blodkonsumenterna har ofta kroniska, kanske till och med livslånga, behov av transfusionsbehandling. I denna kategori finner vi benigna hematologiska tillstånd som hemoglobinopatier och andra ärftliga sjukdomar som påverkar blodbildningen. En annan stor och viktig kategori av transfusionskrävande patienter har maligna sjukdomar, både hematologiska och andra typer av cancer. Många typer av cancerbehandling

hämmar benmärgens kapacitet att tillgodose patientens behov av röda och vita blodkroppar samt blodplättar. Därför går en stor andel av alla blodkomponenter till patienter av just denna kategori, så att de ska kunna klara sig genom tuffa, benmärgshämmande försök till bot. Blod kan också bidra till goda effekter i den palliativa vården så att patienten orkar mer. En alldeles särskild kategori då blod är livsnödvändigt är stamcellstransplantationen, varvid



patienten i praktiken byter benmärg och oftast behöver understöd med transfusionsbehandling under kortare eller längre tid. Varje enhet blod som lämnas ut till alla dessa patienter måste matchas så att blodgrupperna stämmer mellan givare och mottagare. Landets transfusionsmedicinska laboratorier jobbar hårt för att hitta rätt blod för alla och lyckas nästan alltid med sin uppgift.

/// Precis som vi människor ser olika ut på utsidan, är våra röda blodkroppar nämligen också olika på cellytan där det sitter en mängd proteiner och kolhydrater som har olika funktioner.

PASSANDE BLODGIVARE SAKNAS

Då och då dyker det dock upp patienter som behöver en blodtransfusion, men som har en så sällsynt blodgrupp att det inte finns någon blodgivare som passar. Blodprovet skickas då till ett referenslaboratorium som det i Lund, eller i de få fall det inte heller hjälper, till International Blood Group Reference Laboratory (IBGRL) i Bristol för att avgöra patientens blodgrupp och för att hitta rätt blod till patienten. Precis som vi människor ser olika ut på utsidan, är våra röda blodkroppar nämligen också olika på cellytan där det sitter en mängd proteiner och kolhydrater som har olika funktioner. Små ärftliga skillnader i dessa molekyler avgör vilken blodgrupp individen får. Många känner till blodgruppssystemen ABO (av kolhydrattyp) och Rh (av protein-

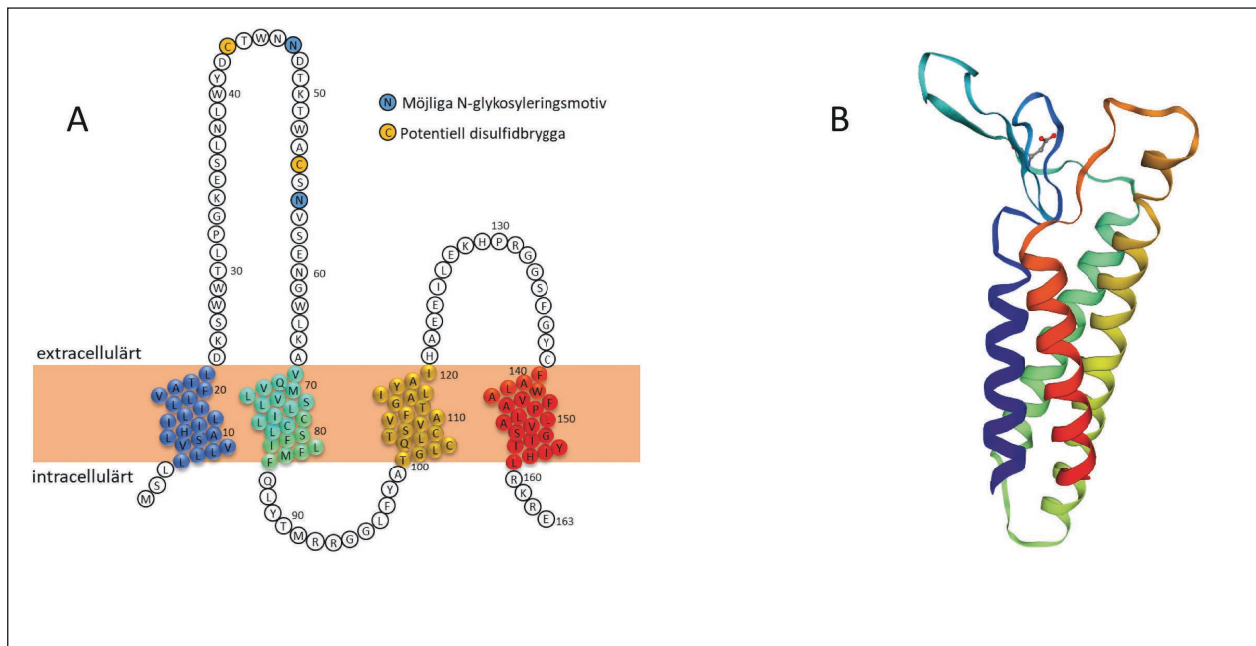
typ) som alla blodtransfusioner matchas för. Eftersom bakterier i framför allt tjocktarmen bär på ABO-lik ytstrukturer har alla över ett halvårs ålder antikroppar mot de ABO-antigen man själv saknar. Därför måste ABO-grupperna vara kompatibla vid transfusion och organtransplantation. Rh-negativa individer saknar RhD-proteinet på sina röda blodkroppar och får därför blod från RhD-negativa givare.

visa sig utgöra grunden till en helt ny, tidigare okänd blodgrupp, som senare döptes efter den första, amerikanska patientens initialer, M.A.M.³. Tio år senare rekryterades Jill Storry till Lund från en tjänst på referenslaboratoriet vid en av världens största blodorganisationer, New York Blood Center, där ytterligare MAM-negativa fall har upptäckts.

INTE HITTAT GENETISKT HEM

Ett 40-tal av alla blodgrupper är vad som benämns "orphan blood groups", det vill säga att vi inte har hittat ett genetiskt hem (locus) för dem och vi vet ofta därmed inte heller vilken molekyl som bär dem på den röda blodkroppens yta. Båda författarna till denna artikel har arbetat i Bristol och blev så småningom handledare till en masteruppsats av Nicole Thornton, som idag leder arbetet vid världsreferenslaboratoriet IBGRL där⁴. Genom att engagera internationella kollegor samlades blodprover i Bristol från alla nu kända fall med MAM-negativ blodgrupp, totalt tio individer. Next-generation sequencing (NGS) av alla exoner i genomet användes för att ta reda på vilken gen som ligger bakom MAM-blodgruppen. Initialt misstänktes MAM ha något med CD44-molekylen att göra eftersom uttrycket av Indian-blodgruppens antigener (som bärs av CD44) var försvagade på MAM-negativa celler. CD44-genen visade sig dock vara intakt hos MAM-negativa individer. Forskarlaget upptäckte då att dessa individer istället saknar ett annat protein, Epithelial Membrane Protein 3 (EMP3), som normalt sitter på de röda blodkropparnas och andra cellers yta

••• sällsynta blodgrupper



Figur 1: A) Schematisk representation av EMP3-proteinet i erythrocytens membran. Aminosyrornas färgkodning i transmembranregionerna reflekterar α -helix-domänerna i B. B) SWISS-Model av mus EMP3 (O35912; <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/O35912>).

(Fig. 1). I samtliga fall var EMP3-genen muterad eller deleterad på ett antal olika sätt på båda kromosomerna⁵. Den ”vanligaste” avvikelser i kohorten, homozygoti för en prematur stoppkod i EMP3-genen, c.123C>G (p.Tyr41Ter), visades vara mycket sällsynt i stora databaser över mänsklig genvariation (endast 43 av 251 000 alleler kodade för den, 0,017 % genfrekvens). Genom att sedan slå ut denna gen med CRISPR/Cas9-teknik i modellceller och även överuttrycka genen rekombinant i ett annat modellsystem kunde vi slå fast att MAM-blodgruppen styrs av uttrycket av EMP3. Dessa fynd ger nu upphov till ett nytt blodgruppssystem, MAM. I hela världen finns så vitt känt bara en enda blodgivare med denna, extremt sällsynta, blodgrupp och det är en av de ursprungliga patienterna som har börjat lämna blod. Tack vare att genen bakom MAM nu har klarlagts kan blodcentraler runt om i världen nu börja leta efter fler MAM-negativa blodgivare med ”high-throughput” DNA-teknik som redan är implementerad för andra blodgruppsgener. Men historien slutar inte där.

VISION OM ATT KUNNA ODLA BLOD

Vårt forskarlag upptäckte också att CD34-positiva blodprogenitorceller

från MAM-negativa personer producerar betydligt fler retikulocyter än normalt när de odlas i laboratoriet (Fig. 2)⁵. Detta är av stort intresse för framtidens transfusioner då en vision är att kunna odla blod på konstgjord väg, särskilt till patienter med behov av sällsynt blod eller vid livslång transfusion då transfusionsintervallet skulle kunna minskas, och därmed järnbelastningen på kroppen, vilket är ett av de största problemen vid kronisk transfusionsbehandling. Om man kan öka utfallet cirka fem gånger i odlingarna, vilket de preliminära resultaten indikerar, skulle mer röda blodkroppar kunna produceras till betydligt lägre pris. En stor del av dagens blodgruppsforskning handlar om vilka okända funktioner de proteiner som sitter på blodkroppens yta har. Eftersom det tidigare inte var känt att EMP3 finns på röda blodkroppar har ingen ägnat en tanke på vad det gör där. Med ledning av ovanstående resultat började vi och våra samarbetspartners inse att EMP3 skulle kunna vara en typ av bromsmolekyl för blodbildningen.

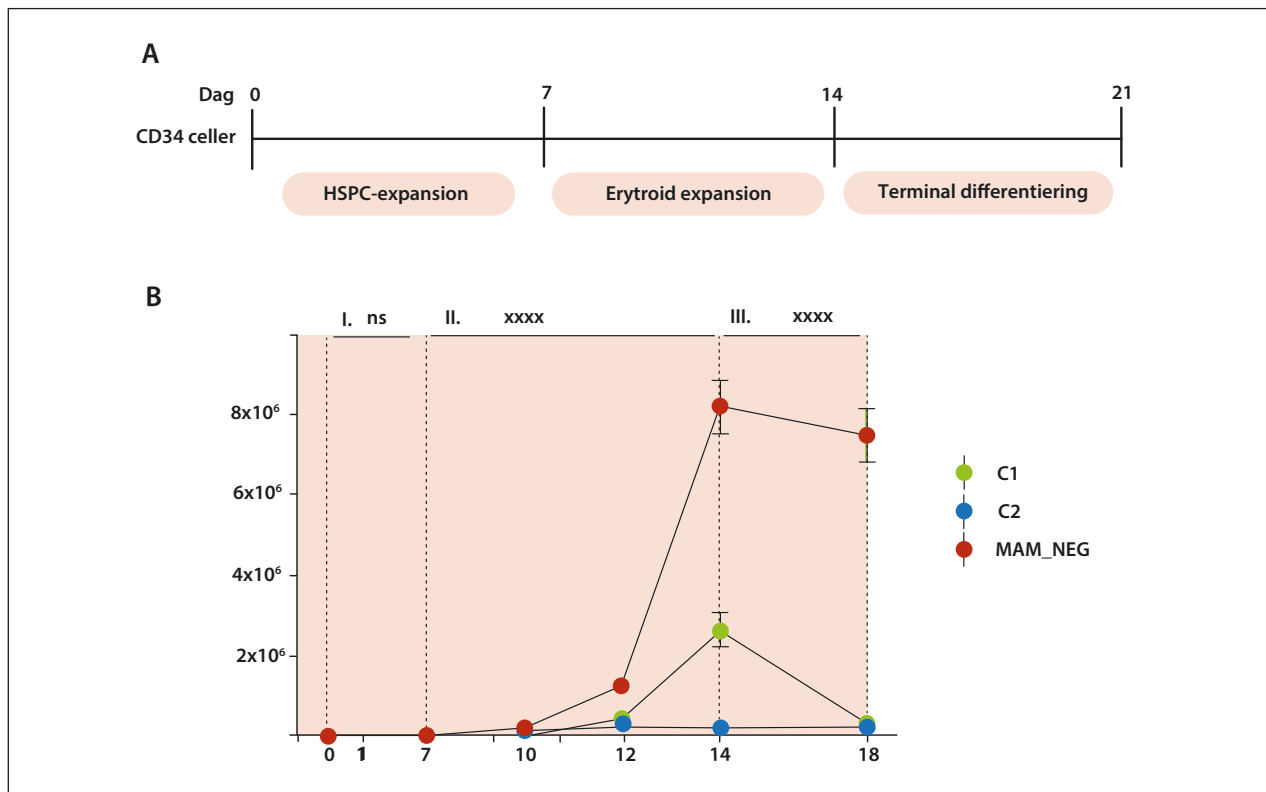
Över 80 procent (!) av människans egna celler består av röda blodkroppar⁶ och varje sekund bildas ett par miljoner nya blodkroppar. Minsta obalans kan resultera i överproduktion eller blod-

brist, anemi. Ändå känner forskare inte till så mycket om hur den tidiga bildningen av röda blodkroppar styrs. Bortsett från det av njurarna producerade hormonet erythropoietin (EPO), är inte mycket klarlagt om regleringen av bildningen av vår vanligaste cell. Där finns en stor kunskapslucka som behöver fyllas för att ge utrymme för nya möjligheter.

Även om EMP3 är okänt i blodkretsar så är det en välkarakteriserad storhet inom cancerfältet, dock med till synes motsägande funktioner i olika tumörformer. Märkligt nog förefaller detta protein kunna agera både i en roll som tumörsuppressorer i vissa cancerformer och med onkogen egenskaper i andra (Tabell 1 och figur 3)⁵. Vad som avgör detta är inte klarlagt. Vad som däremot är intressant är att vår studie också fann bevis för direkta interaktioner mellan EMP3 och CD44⁵, en annan molekyl av stort intresse inom onkologisk forskning.

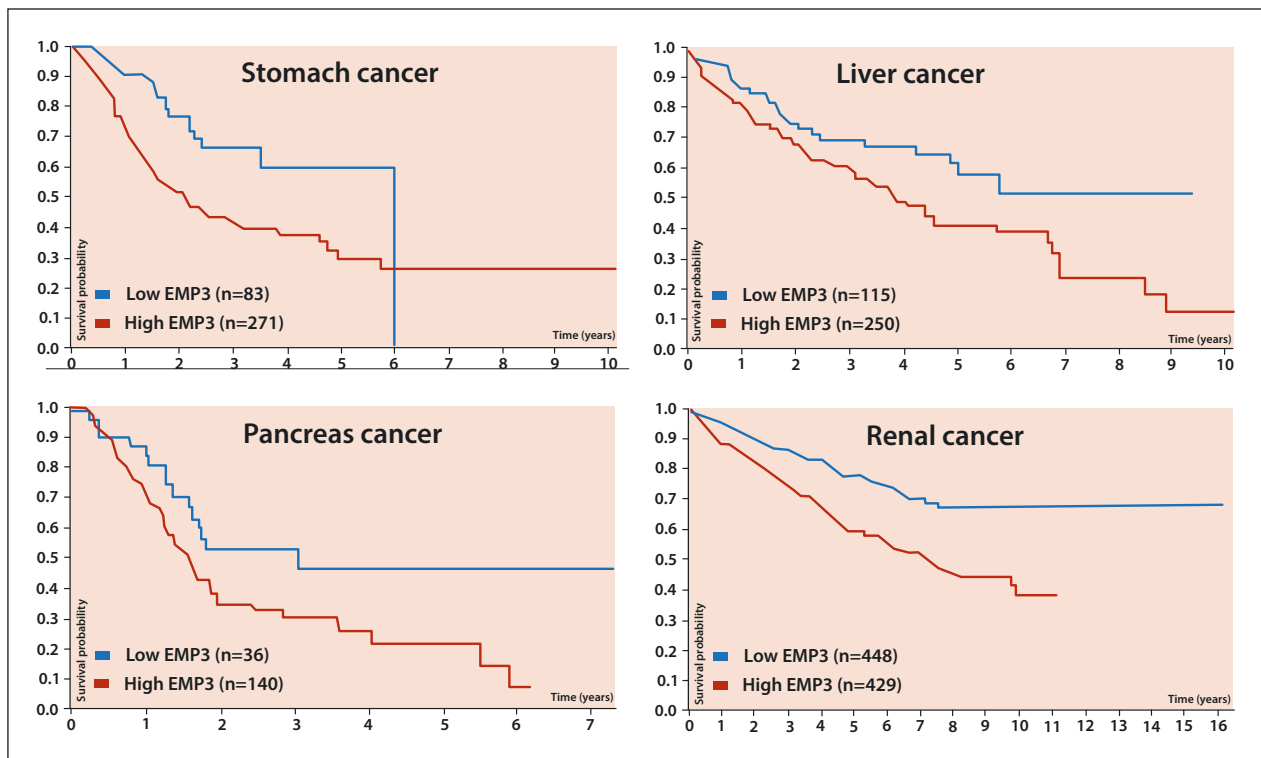
Sammanfattningsvis blir det spännande att framgent se vilka nya rön som framkommer avseende EMP3:s roller inom blodbildningsreglering och tumörbiologi. Den här historien är också en liten påminnelse om några av de egenskaper som kan vara bra att ha om man sysslar med forskning. Tack

••• sällsynta blodgrupper



Figur 2: A) Tidslinje och beskrivning av tre olika faser för erytroid odling av CD34+ progenitorceller (HSPC = Hematopoietic Stem and Progenitor Cells);

B) Cell-odling av CD34+ celler från en EMP3-negativ individ (MAM_NEG) jämfört med två EMP3-positiva kontrollprover (C1 och C2). EMP3-negativa celler visar signifikant snabbare tillväxt under expansionsfas och större cellantal mot slutet av odlingen. Denna graf motsvarar Suppl. Fig. 6 i ref. 5 men utan logaritmisk skala på y-axeln. Experimentet utfördes av doktoranden/läkaren Abdul Ghani Alattar (medförfattare i ref. 5), som också bistått oss med denna graf.



Figur 3. Högt uttryck av EMP3 kan vara en negativ prognostisk markör i flera maligniteter.

Några exempel visualiserade med data från <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000142227-EMP3/pathology>.

••• sällsynta blodgrupper

Vävnad	EMP3-nivå	Mätmetoder
Uvealt melanom	▲	Transcriptomics, gensuppression
Gliom	▲	Mikroarray, RT-qPCR
Primärt bröstcancerin	▲	miRNA, RT-PCR, metyleringsanalys
Hepatocellulärt cancerin	▲	EMP3-nedreglering
SKOV3 ovariecancer (cellinje)	▲	siRNA
Urotelialt carcinoma från övre urinvägarna	▲	siRNA, metyleringsanalys
Primärt glioblastom	▲	Mikroarray, RT-qPCR
Icke-småcellig lungcancer	▼	Immunhistokemi
Oligodendrogliom	▼	Metyleringsanalys
Esofageal skivepitelcellscancer (cellinje)	▼	Mikroarray, metyleringsanalys
Gliom	▼	Mikroarray, metyleringsanalys
Gliom och neuroblastom	▼	Mikroarray, metyleringsanalys

Tabell 1. EMP3-uttrycket har visat sig att variera mycket i olika cancerformer, varav vissa till och med uppvisar beroende av EMP3. Ibland kan EMP3 betraktas som en onkogen och ibland som en tumörsuppressör. För referenser och mer detaljer, se Supplementtabell 11 i ref. 5.

vare en stor portion envishet, internationella samarbetspartners och uthållig finansiering från bland annat Vetenskapsrådet, Knut och Alice Wallenbergs stiftelse och ALF-anslag, kunde vi låta vår nyfikenhet på några enstaka patientfall för nästan 30 år sedan leda oss fram till en upptäckt inom blodgruppsfältet med kliniska implikationer. Detta öppnade i sin tur dörren för ett överraskande fynd inom erythropoesreglering, som kan leda vidare till studier av mekanismerna kring hur EMP3 är involverat i styrningen av såväl blodbildningen som cancercellers tillväxt.

REFERENSER

1. Auvinen M-K. Blodverksamheten i Sverige 2019 [internet]: Swedish Blood Alliance (SweBA). Available from: <http://www.sweba.se/filedepot?cid=7&fid=1200> (2020-09-13).

2. Storry JR, Clausen FB, Castilho L, Chen Q, Daniels G, Denomme G, Flegel WA, Gasner C, de Haas M, Hyland C, Yanli J, Keller M, Lomas-Francis C, Nogues N, Olsson ML, Peyrard T, van der Schoot E, Tani Y, Thornton N, Wagner F, Weinstock C, Wendel S, Westhoff C, Yahalom V. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. *Vox Sanguinis* 2019;114(1):95-102.

3. Montgomery WM Jr, Nance SJ, Donnelly SF, Brady TW, Anderson G, Mintz PD, Moulds MK, Daniels GL, Spring FA, Molina N, de Asis EA, Olivares E. MAM: a "new" high-incidence antigen found on multiple cell lines. *Transfusion* 2000;40(9):1132-9.

4. Thornton N. Investigation of the High Frequency Blood Group Antigen MAM. M.Sc. project. University of Ulster 2014.

5. Thornton N*, Karamatic-Crew V*, Tilley L*, Green CA, Tay CL, Griffiths RE, Singleton BK, Walser P, Spring FA, Alattar AG, Jones B, Laundry R, Storry JR, Möller M, Wall L, Charleston R, Westhoff CM, Lomas-Francis C, Yahalom V, Dressler H, Seltsam A, Mayer M, Olsson ML**, Anstee DJ**. Disruption of the cancer-associated EMP3 gene enhances erythroid proliferation and causes the MAM-negative phenotype. *Nature Communications* 2020; 11(1):3569 (11 electronic pages + online supplement with 11 Figures and 11 Tables). <https://www.nature.com/articles/s41467-020-17060-4>.

*/** Indikerar delat förste- resp. sisteförfattarskap.

6. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 2016;164(3):337-40.

MARTIN L OLSSON, PROFESSOR I TRANSFUSIONSMEDICIN VID INSTITUTIONEN FÖR LABORATORIEMEDICIN VID LUNDS UNIVERSITET OCH ÖVERLÄKARE VID AVD. FÖR KLINISK IMMUNOLOGI OCH TRANSFUSIONSMEDICIN, MEDICINSK SERVICE, REGION SKÅNE, MARTIN_L.OLSSON@MED.LU.SE, WWW.MED.LU.SE/MARTINLOLSSON



JILL STORRY, DOCENT I EXPERIMENTELL TRANSFUSIONSMEDICIN VID INSTITUTIONEN FÖR LABORATORIEMEDICIN VID LUNDS UNIVERSITET OCH PROCESSLEDARE VID AVD. FÖR KLINISK IMMUNOLOGI OCH TRANSFUSIONSMEDICIN, MEDICINSK SERVICE, REGION SKÅNE, JILL.STORRY@MED.LU.SE, WWW.MED.LU.SE/TRANSFUSION-MEDICINE

