

Αναιμίες οφειλόμενες σε κληρονομικές διαταραχές της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Ευάγγελος Πρεμέτης, Αλεξάνδρα Σταμουλακάτου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Η ανθρώπινη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων είναι η πλέον μελετημένη βιολογική μεμβράνη. Αποτελείται από τρία βασικά δομικά στοιχεία: μια λιπιδική διπλοστιβάδα αποτελούμενη κυρίως από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη, διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ενσωματώνονται στην λιπιδική διπλοστιβάδα και τον πρωτεϊνικό κυτταροσκελετό στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης των ερυθρών. Στη μεμβράνη των ερυθρών οφείλονται οι μοναδικές ιδιότητες του ερυθροκυττάρου, που είναι η αντοχή και η μεγάλη παραμορφωσιμότητα κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων περασμάτων μέσα από τους στενούς διαύλους της μικροκυκλοφορίας. Οι κληρονομικές διαταραχές της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης μπορούν να χωριστούν ανάλογα με τη μορφολογία των ερυθροκυττάρων σε τέσσερις ομάδες: την κληρονομική σφαιροκυττάρωση (ΚΣ), την κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση (ΚΕ), την κληρονομική οβαλοκυττάρωση και την κληρονομική στοματοκυττάρωση. Η Κληρονομική Σφαιροκυττάρωση είναι η πιο κοινή μεμβρανοπάθεια με επιπολασμό 1:3000 σε άτομα της Β. Ευρώπης και χαρακτηρίζεται από την παρουσία σφαιροκυττάρων στο περιφερικό αίμα, δικτυοερυθροκυττάρωση και σπληνομεγάλια. Ο τύπος κληρονομικότητας στο 75% των περιπτώσεων είναι αυτοσωμικός επικρατής, ενώ οι υπολειπόμενες μορφές εμφανίζουν πιο σοβαρούς φαινοτύπους. Η κλινική βαρύτητα της κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης ποικίλει από ασυμπτωματικούς ασθενείς έως ασθενείς με σοβαρή αναιμία. Η απώλεια μεμβρανικής επιφάνειας είναι η κυριότερη κυτταρική βλάβη, κατά το πέρασμα μέσα από την σπληνική κυκλοφορία, με αποτέλεσμα το ερυθρό να αποκτήσει σφαιρικό σχήμα και μειωμένη παραμορφωσιμότητα. Σπληνική καταστροφή των σφαιροκυττάρων οδηγεί σε αναιμία. Τα αποτελέσματα της απώλειας μεμβράνης οφείλονται σε βλάβη διαφόρων πρωτεϊνών της μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένης της αγκυρίνης, της ζώνης 3, της α-σπεκτρίνης, της β-σπεκτρίνης και της πρωτεΐνης 4.2. Η Κληρονομική Ελλειπτοκυττάρωση είναι μία αυτοσωμική επικρατής διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ελλειπτοκυττάρων στο αίμα. Η συχνότητά της είναι αυξημένη σε περιοχές που ενδημεί η ελονοσία, υποδεικνύοντας ότι τα ελλειπτοκύτταρα προσφέρουν πλεονέκτημα επιβίωσης σε όλες τις μορφές ελονοσίας. Οι ασθενείς με κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση είναι γενικά ασυμπτωματικοί, αλλά περίπου το 10% έχει μέτρια έως σοβαρή αναιμία. Η σοβαρή παραλλαγή της Κληρονομικής Ελλειπτοκυττάρωσης, η πυροποικιλοκυττάρωση, χαρακτηρίζεται από σημαντικό αριθμό κατακερματισμένων ερυθρών με μειωμένη επιφάνεια της μεμβράνης. Η Κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση οφείλεται σε βλάβες των “οριζόντιων” διασυνδέσεων στο σκελετό της μεμβράνης και αφορούν κυρίως βλάβες στην αυτοσυγκρότηση της σπεκτρίνης σε τετραμερή ή σε ένα ελαττωματικό σύμπλοκο ζεύξης σπεκτρίνης-ακτίνης-πρωτεΐνης 4.1R. Η σπληνεκτομή μειώνει την σοβαρότητα της αναιμίας αυξάνοντας την διάρκεια ζωής των κατακερματισμένων ερυθρών. Η Κληρονομική οβαλοκυττάρωση είναι μία ασθένεια πολύ συχνή στη Νοτιοανατολική Ασία που μεταβιβάζεται με αυτοσωματικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία οβαλοκυττάρων στο αίμα με μία ή δύο εγκάρσιες ή μία διαμήκη σχισμή. Όλοι οι ασθενείς είναι ετεροζυγώτες για μια έλλειψη 27 hr που κωδικοποιεί τα αμινοξέα 400 έως 408 της ζώνης 3. Εντούτοις, ο μηχανισμός που οδηγεί σε σημαντική αύξηση της ακαμνίας της μεμβράνης δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί. Η κληρονομική στοματοκυττάρωση με υδροκυττάρωση και η κληρονομική στοματοκυττάρωση με ξηροκυττάρωση μεταβιβάζονται με αυτοσωματικό επικρατούντα τύπο κληρονομικότητας και χαρακτηρίζονται από την παρουσία στοματοκυττάρων σε επιχρίσματα αίματος. Ενώ η αναιμία είναι ήπια στην ξηροκυττάρωση είναι σοβαρή στην υδροκυττάρωση. Η μοριακή ανάλυση έδειξε δύο μεταλλάξεις που σχετίζονται με την υδροκυττάρωση στην πρωτεΐνη RHAG (Ile61Arg και Ser65Phe). Πρόσφατα βρέθηκαν μεταλλάξεις στο διάλογο ιόντων PIEZO1 στην ξηροκυττάρωση. Η σπληνεκτομή είναι ιδιαίτερα επωφελής για τη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με σφαιροκυττάρωση και αυτών με σοβαρή ελλειπτοκυττάρωση. Αντίθετα αντενδείκνυται σε ασθενείς με διαταραχές διαπερατότητας κατιόντων λόγω φλεβικών θρομβοεμβολικών επιπλοκών που εμφανίστηκαν μετά τη σπληνεκτομή.

Haema 2013; 4(1): 58-65 Copyright EAE

ΔΟΜΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

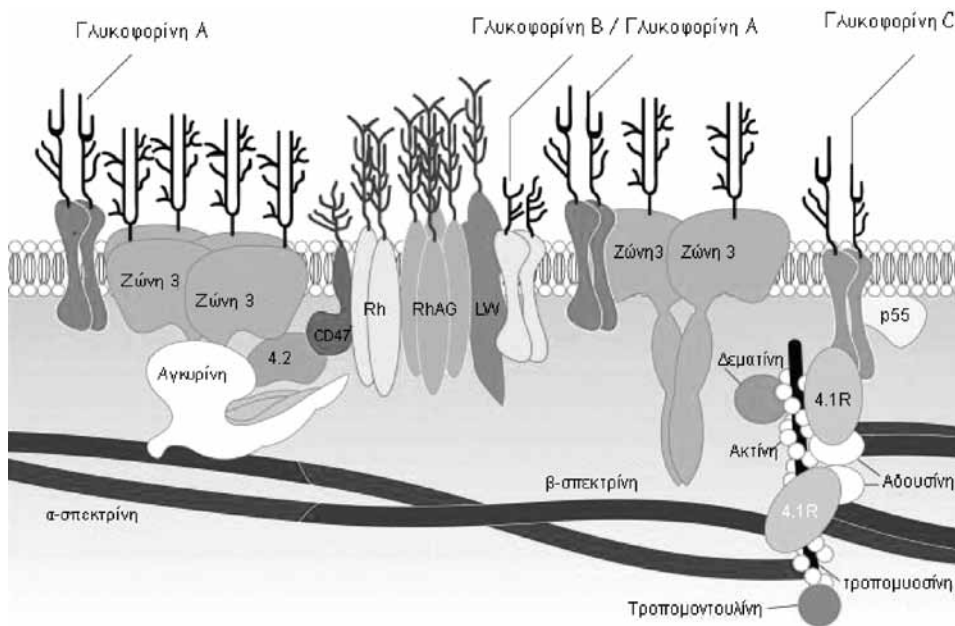
Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη, έχει επιλεγεί ως πρότυπο σύστημα διερεύνησης της οργάνωσης και λειτουργίας, των διαφόρων συστατικών μορίων στις βιολογικές μεμβράνες. Έχει μελετηθεί καλύτερα από κάθε άλλη ευκαρυωτική μεμβράνη και οι λόγοι που εξηγούν αυτή την επιλογή είναι ότι: τα ερυθρά αιμοσφαίρια διατίθενται εύκολα και σε μεγάλους αριθμούς, η πλασματική μεμβράνη είναι η μοναδική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου και καθαρές ερυθροκυτταρικές μεμβράνες, ελεύθερες αιμοσφαιρίνης, είναι δυνατό να απομονωθούν πολύ εύκολα, εκθέτοντας τα ερυθροκύτταρα σε υπότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Αν και η πλασματική μεμβράνη αντιπροσωπεύει μόνο το 1% του βάρους του ερυθρού, παρέχει στο κύτταρο σημαντικές μηχανικές ιδιότητες, όπως η ανθεκτικότητα και η ικανότητα αντιστρεπτής αλλαγής σχήματος (ελαστική παραμόρφωση). Αποτελεί άριστο μοντέλο «ρευστού μωσαϊκού», σύμφωνα με τους Singer και Nicholson¹. Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού υποστηρίζει ότι η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από διάφορα είδη μορίων (φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες) που βρίσκονται σε συνεχή κίνηση, όπως θα έκαναν οι ψηφίδες ενός μωσαϊκού που δεν είναι ενωμένες μεταξύ τους και επιπλέουν πάνω σε ένα ρευστό. Τα μόρια χοληστερόλης παρεμβάλλονται μεταξύ των μορίων των φωσφολιπιδίων, διατηρώντας τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης η οποία έχει μεγάλη σημασία για τις λειτουργίες της².

Τα λιπίδια αποτελούν το 50% του βάρους της μεμβράνης. Κυρίως πρόκειται για φωσφολιπίδια και μη εστεροποιημένα (ελεύθερα), ενώ υπάρχουν και μικρές ποσότητες γλυκολιπιδίων. Η κατανομή των φωσφολιπιδίων στις δύο λιπιδικές μονοστιβάδες είναι ασύμμετρη, σε αντίθεση με τη χοληστερόλη που είναι ισομερώς κατανομημένη.

Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης διακρίνονται σε διαμεμβρανικές και περιφερειακές. Οι διαμεμβρανικές, εισχωρούν ή διαπερνούν τη διπλοστιβάδα των λιπιδίων και αλληλεπιδρούν με τον υδρόφοβο λιπιδικό πυρήνα. Οι περισσότερες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες εμφανίζουν μεγάλη λειτουργική ετερογένεια. Χρησιμεύουν ως μεταφορείς, συνδέτες με άλλα κύτταρα του αίματος και του ενδοθηλίου, καθώς και ως υποδοχείς σημάτων. Στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες συγκαταλέγονται η ζώνη 3 (ο διάυλος ανταλλαγής ανιόντων, AE1), η υδατοπορίνη 1 (AQP1), ο μεταφορέας γλυκόζης 1 (Glut1), διάφορα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα, η Rhesus-σχετιζόμενη γλυκοπρωτεΐνη (Rh-AG), οι αντλίες K⁺, Na⁺ κ.α. Στις πρωτεΐνες με λειτουργίες πρόσδεσης περιλαμβάνεται η ICAM-4 η οποία αντιδρά με ιντεγκρίνες και με το αντιγονικό σύστημα Lu³. Σημαντικές επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι οι γλυκοφορίνες A, B, C, D.

Οι περιφερειακές ή σκελετικές πρωτεΐνες, αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και λιπίδια στη μεμβρανική επιφάνεια, αλλά δεν εισχωρούν στο λιπιδικό πυρήνα και σε αυτές περιλαμβάνονται η σπεκτρίνη, η αγκυρίνη, η ακτίνη, η πρωτεΐνη 4.1R και 4.2, η αδουσίνη, η τροπομουσίνη, η δεματίνη και η τροπομοντουλίνη (Σχήμα 1).

Η Σπεκτρίνη (Sp) είναι το κύριο σκελετικό συστατικό, αντιπροσωπεύοντας το 50-70% της σκελετικής μάζας. Αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες αν και έχουν ομοιότητες είναι δομικά διακριτές: την α, (α-Sp, 240Kd) και τη β (β-Sp, 220Kd). Υπάρχουν περίπου 2×10⁵ αντίγραφα ανά κύτταρο. Οι δύο αλυσίδες συνδέονται πλευρά με πλευρά (side to side), αλλά αντιπαράλληλα για το σχηματισμό του ετεροδιμερούς. Τα ετεροδιμερή με τη σειρά τους συνδέονται κεφαλή με κεφαλή (head to head)



Σχήμα 1. Σχηματική παράσταση της δομικής οργάνωσης της μεμβράνης.

δημιουργώντας τετραμερή και ακολούθως ανώτερης τάξης ολιγομερή^{4,5}. Η α-Sp και η β-Sp κωδικοποιούνται από τα γονίδια SPTA1 και SPTB στα χρωμοσώματα 1q22-q23⁶ και 14q23-q24.²⁷ αντίστοιχα. Η α-Sp έχει 22 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, ενώ η β-Sp 17. Κάθε επαναλαμβανόμενη αλληλουχία περιέχει 106 αμινοξέα (12Kd), σχηματίζοντας ένα άκαμπτο ελικοειδές αποτελούμενο από 3 α-έλικες (A, B, C με κατεύθυνση NH₃⁺ → COO⁻). Κάθε ελικοειδές ενώνεται με το επόμενο με μια γραμμική αλληλουχία 26 αμινοξέων. Η έναρξη της σύνδεσης μεταξύ της α και β σπεκτρίνης πραγματοποιείται στην περιοχή πυρήνωσης (nucleation site), που σχηματίζεται από τα επαναλαμβανόμενα τμήματα α 19 έως α 22 (C-τελική περιοχή της α-αλυσίδας) και β1 ως β5 (N-τελική περιοχή της β-αλυσίδας). Η θέση που συνδέεται η αγκυρίνη βρίσκεται σ' ένα πεπτίδιο το οποίο περιέχει τη 14ⁿ και τη 15ⁿ επαναλαμβανόμενη αλληλουχία της β-Sp⁸. Η β-αλυσίδα είναι φωσφορυλιωμένη πλησίον του C-τελικού άκρου. Η φωσφορυλίωση παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της α και β αλυσίδας. Στη σύνδεση για το σχηματισμό τετραμερούς, συμμετέχουν ένα μεγάλο τμήμα του N-τελικού άκρου της α αλυσίδας, του ενός ετεροδιμερούς και η β17 επαναλαμβανόμενη αλληλουχία του άλλου ετεροδιμερούς, η οποία βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της β αλυσίδας. Σχηματίζεται έτσι ένα τυπικό ελικοειδές σπεκτρίνης, το οποίο σταθεροποιεί το τετραμερές. Η σύνθεση της σπεκτρίνης αρχίζει πριν το στάδιο των ερυθροκυτταρικών προβαθμίδων CFU-E, η δε λειτουργία της είναι να διατηρεί το κυτταρικό σχήμα, να ρυθμίζει την πλευρική κινητικότητα των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και να παρέχει δομική υποστήριξη στη λιπιδική στιβάδα.

Για τη δομική οργάνωσή της μεμβράνης, τα διμερή σπεκτρίνης συνδέονται στις κεφαλές τους (heads) προς σχηματισμό τετραμερών, όπως προαναφέρθηκε (Σχήμα 1). Στις ουρές τους (tails), τα διμερή συνδέονται με πρωτοϊνίδια ακτίνης με τη βοήθεια της πρωτεΐνης 4.1R η οποία συνδέεται με τη γλυκοφορίνη C παρέχοντας έτσι μία θέση σύνδεσης της πλασματικής μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό. Η αδουσίνη και η δεματίνη συνδέονται ανεξάρτητα με την Glut 1 προσφέροντας έτσι μία δεύτερη κάθετη σύνδεση του συμπλόκου ζεύξης (σπεκτρίνη-ακτινη-πρωτεΐνη 4.1) με την πλασματική μεμβράνη (Σχήμα 1)⁹.

Τετραμερή ζώνης 3 συνδέονται με τη σπεκτρίνη μέσω της αγκυρίνης. Η πρωτεΐνη 4.2 συνδέει την αγκυρίνη, τη ζώνη 3 και τη CD47. Η CD47 και τα αντιγόνα LW αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Rh (Rh και RhAG). Τα τετραμερή Rh συνδέονται με τη ζώνη 3 και τη γλυκοφορίνη A (GPA)¹⁰ (Σχήμα 1).

Με την κυτταρική μεμβράνη το ερυθρό εξασφαλίζει: μηχανική σταθερότητα, επικοινωνία με το εξωτερικό περιβάλλον και έλεγχο του είδους των ουσιών που εισέρχονται και εξέρχονται από το κύτταρο. Τα χαρακτη-

ριστικά που αποτελούν τους ρυθμιστές της ικανότητας του κυττάρου να υποστεί τις αναγκαίες παραμορφώσεις είναι: (α) η γεωμετρία του κυττάρου και ιδιαίτερα ο λόγος επιφανείας (surface area) προς όγκο, (β) η κυτταροπλασματική γλοιότητα (viscosity), η οποία καθορίζεται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης και (γ) η ικανότητα αντιστρεπτής αλλαγής σχήματος της μεμβράνης. Η διατήρηση της επιφανείας του κυττάρου επιτυγχάνεται από την ισχυρή σύνδεση της πλασματικής μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό, αλλά και τη μηχανική σταθερότητα του σκελετού η οποία εξαρτάται από τις «οριζόντιες» πρωτεϊνικές συνδέσεις. Η εξασφάλιση σταθερού κυτταρικού όγκου είναι συνάρτηση της λειτουργίας των μεμβρανικών μεταφορέων ιόντων.

ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΣΦΑΙΡΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ Η ΣΦΑΙΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΙΚΤΕΡΟΣ

Η Κληρονομική Σφαιροκυττάρωση (ΚΣ) αποτελεί μια ετερογενή ομάδα αιμολυτικών αναιμιών η οποία χαρακτηρίζεται από ασυμπτωματικούς φορείς έως ασθενείς με βαριά αναιμία και χαρακτηριστική μορφολογία ερυθρών με σφαιροκύτταρα. Εμφανίζεται σε όλες τις φυλετικές ομάδες και είναι ιδιαίτερα συχνή σε λαούς της Β. Ευρώπης. Η συχνότητα σε αυτόν τον πληθυσμό είναι 1:3000¹¹. Στα 2/3 των περιπτώσεων η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα και λιγότερο συχνά με αυτοσωμικό υπολειπόμενο. Το γεγονός ότι δεν έχουν βρεθεί ομοζυγώτες για τυπική επικρατούσα ΚΣ, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ομοζυγωτία δεν είναι συμβατή με τη ζωή.

Η ΚΣ ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου διαίρεται στους εξής κλινικούς τύπους.

Σιωπηλός Φορέας: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν γονείς παιδιών με ΚΣ υπολειπόμενου τύπου. Οι σιωπηλοί φορείς δεν έχουν κάποια σημαντική διαταραχή ή έχουν πολύ ήπιες αλλαγές, όπως ελαφρά δικτυοερυθροκυττάρωση, σπάνια σφαιροκύτταρα στο περιφερικό αίμα ή επιρρεασμένη ωσμωτική αντίσταση μετά από επώαση. Δεν πρέπει να αγνοούμε το γεγονός ότι μπορεί να έχει συμβεί μια *de novo* μετάλλαξη σε μια οικογένεια, που να μιμείται έναν υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η εξέταση του οικογενειακού δέντρου, μπορεί να είναι ο μόνος τρόπος εξακρίβωσης του τύπου μεταβίβασης.

Ήπια ΚΣ: Το 20 - 30 % των ασθενών με ΚΣ εμφανίζει αντιρροπούμενη αιμόλυση. Τα άτομα αυτά δεν έχουν αναιμία και είναι συνήθως ασυμπτωματικά. Η διάγνωση αυτών των ασθενών μπορεί να είναι δύσκολη, επειδή η αιμόλυση, η σπληνομεγαλία και η σφαιροκυττάρωση είναι ασυνήθιστα ήπιες. Οι ασθενείς αυτοί έχουν δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ)<6% και μόνο το 60% των περιπτώσεων έχουν σημαντική σφαιροκυττάρωση στο

επίχρισμα του αίματος. Η περιφερική αιμόλυση αντιρροπείται πλήρως, εκτός αν ο ασθενής υποβληθεί σε επιπλέον stress όπως προσβολή από κυτταρομεγαλοϊό, εγκυμοσύνη, άσκηση ή αιμορραγία. Σε πολλούς από αυτούς τους ασθενείς η διάγνωση γίνεται μετά από εξέταση της οικογένειας ή στην ενήλικη ζωή, όταν εμφανίσουν σπληνομεγαλία ή χολολιθίαση.

Τυπική ΚΣ: Η Τυπική ΚΣ συνδυάζει στοιχεία αιμόλυσης με αναιμία, ίκτερο, δικτυοερυθροκυττάρωση και σπληνομεγαλία, σφαιροκύτταρα στα επίχρισματα αίματος, αυξημένη ωσμωτική ευθραυστότητα και ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό στις περισσότερες περιπτώσεις. Η νόσος συνήθως εκδηλώνεται στην πρώιμη παιδική ηλικία, με εμφάνιση ικτέρου, αναιμίας και σπληνομεγαλίας. Παρ'όλα αυτά η διάγνωση πιθανόν να γίνει σε μεγαλύτερη ηλικία, γιατί κάποιο παροδικό επεισόδιο αναιμίας μπορεί να διαφύγει. Η υποψία της νόσου κατά τη διάρκεια της νεογνικής ηλικίας μπορεί να τεθεί από την παρουσία ικτέρου, αναιμίας και δικτυοερυθροκυττάρωσης.

Μέτρια και Σοβαρή ΚΣ: Ένα μικρό ποσοστό ασθενών με ΚΣ (5-10% περίπου) έχουν μετρίως σοβαρή έως σοβαρή αναιμία. Ασθενείς με μετρίως σοβαρή² σφαιροκυττάρωση έχουν επίπεδα αιμοσφαιρίνης 6.0-8.0g/dL, ποσοστό ΔΕΚ περίπου 10% και χολερυθρίνη 2-3mg/dL. Ασθενείς με σοβαρή² σφαιροκυττάρωση έχουν βαριά αναιμία, που εξαρτάται από τακτικές μεταγγίσεις. Όλες σχεδόν οι περιπτώσεις αυτές, είναι υπολειπόμενου τύπου. Επιπλέον του κινδύνου από τις μεταγγίσεις, οι ασθενείς υποφέρουν και από απλαστικές κρίσεις. Εμφανίζουν καθυστέρηση

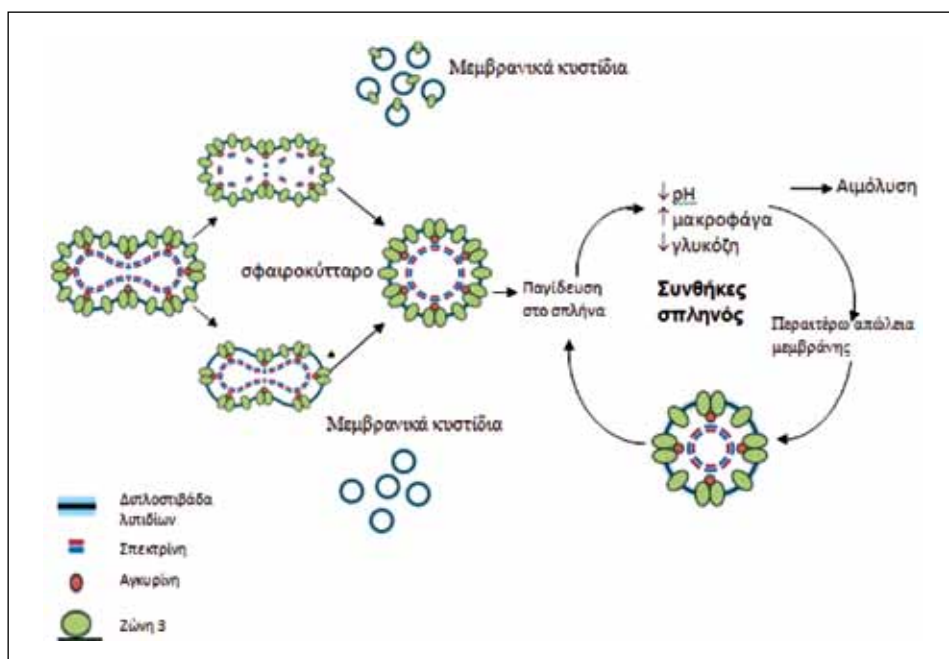
στην ανάπτυξη, τη σεξουαλική ωρίμανση και προσωπείο Μεσογειακής αναιμίας.

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μορφών της ΚΣ είναι η απώλεια μεμβρανικής επιφάνειας, υπό μορφή μεμβρανικού κυστιδίου, με αποτέλεσμα το ερυθρό από δισκοειδές να γίνεται σφαιροκύτταρο. Τα σφαιροκύτταρα δεν μπορούν να διασχίζουν τον σπλήνα, παγιδεύονται και απομακρύνονται από την κυκλοφορία με αποτέλεσμα τη μειωμένη διάρκεια ζωής τους. Η σπληνεκτομή μειώνει σημαντικά τη σοβαρότητα της αναιμίας, γιατί αυξάνει την διάρκεια ζωής των σφαιροκυττάρων.

Η απώλεια τμήματος της μεμβράνης στην ΚΣ, οφείλεται στην ελαττωματική σύνδεση του υπομεμβρανικού σκελετού στην πλασματική μεμβράνη, λόγω ελλείμματος είτε διαμεμβρανικών είτε περιφερειακών πρωτεϊνών (Σχήμα 2). Το πρωτεϊνικό έλλειμμα έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη συνοχή της μεμβράνης και συνεπώς απώλεια τμήματός της. Έτσι, η ΚΣ είναι το αποτέλεσμα των βλαβών σε οποιοδήποτε από τα πρωτεϊνικά συστατικά, που συμμετέχουν στις κάθετες διασυνδέσεις μεταξύ του κυτταροσκελετού και της μεμβράνης.

Το 30-60% των σφαιροκυτταρικών ασθενών στην Αμερική και την Ευρώπη και το 5-15% στην Ιαπωνία, έχουν έλλειμμα (15-50%) αγκυρίνης^{13,14}. Ο τύπος κληρονομικότητας είναι είτε αυτοσωμικός επικρατούς είτε υπολειπόμενος. Δεδομένου ότι η αγκυρίνη συνδέει τη β-σπεκτρίνη στη ζώνη 3, το έλλειμμα αγκυρίνης οδηγεί σε ανάλογο έλλειμμα σπεκτρίνης στη μεμβράνη, παρά τη φυσιολογική σύνθεση της σπεκτρίνης. Οι ασθενείς με βλάβες της αγκυρίνης έχουν σημαντικό αριθμό σφαιροκυττάρων στην περιφέρεια χωρίς άλλες μορφολογικές παραλλαγές και η κλινική τους βαρύτητα κυμαίνεται από ήπια έως μετρίως σοβαρή.

Λιγότερο από το 5% των περιπτώσεων με ΚΣ έχουν 50-75% έλλειμμα σπεκτρίνης, υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας και σοβαρή μεταγγισιοεξαρτώμενη αιμολυτική αναιμία. Το 15-20% περίπου των ασθενών με ΚΣ¹⁴ φέρουν μεταλλάξεις στο SPTB με αποτέλεσμα να έχουν 15-40% έλλειμμα σπεκτρίνης. Στους ασθενείς αυτούς η αναιμία



Σχήμα 2. Παθοφυσιολογία της Κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης (τροποποιημένο από¹²).

είναι ήπια έως μέτρια και στα επιχρίσματα αίματος παρατηρούνται εκτός από σφαιροκύτταρα και 5-10% ακανθοκύτταρα.

Έλλειμμα 15-40% της ζώνης 3 με συνακόλουθο ανάλογο έλλειμμα της πρωτεΐνης 4.2 βρίσκεται στο 15-20% περίπου των σφαιροκυτταρικών ασθενών με επικρατούντα τύπο κληρονομικότητας. Οι πάσχοντες εμφανίζουν ήπια έως μέτριας βαρύτητας αναιμία, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει επίσης αναφερθεί και σοβαρή ΚΣ^{15,16}. Σε μη σπληνεκτομηθέντες ασθενείς με έλλειμμα ζώνης 3, παρατηρούνται πέραν των σφαιροκυττάρων και ερυθρά που έχουν σχήμα ‘‘μανιταριού’’ (pincerred red blood cells).

Η πλειονότητα των ασθενών με ΚΣ στην Ιαπωνία είναι ομοζυγώτες για μεταλλάξεις του γονιδίου EPB42, ενώ αντίθετα σε άλλους πληθυσμούς η συχνότητα των μεταλλάξεων του EPB42 είναι μικρότερη από 5% των περιπτώσεων^{17,18}. Σ’ αυτές τις περιπτώσεις σημειώνεται σχεδόν πλήρης έλλειψη της πρωτεΐνης 4.2. Στο επιχρίσμα του αίματος κυριαρχούν τα οβαλοκύτταρα και τα στοματοκύτταρα, ενώ τα σφαιροκύτταρα είναι σπανιότερα.

Στο 5-10% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων με ΚΣ, η μοριακή βλάβη παραμένει άγνωστη.

Κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση

Η Κληρονομική Ελλειπτοκυττάρωση (ΚΕ) είναι μία κοινή, αλλά κλινικά και γενετικά ετερογενής διαταραχή της μεμβράνης των ερυθρών. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία ελλειπτοκυττάρων ή οβαλοκυττάρων στο αίμα¹⁹. Η συχνότητα της ΚΕ στις Ηνωμένες Πολιτείες δεν είναι μεγαλύτερη από 2.5-5/10.000 άτομα. Ωστόσο, στις περιοχές της Αφρικής και της Νοτιοανατολικής Ασίας, όπου είναι ενδημική η ελονοσία, η συχνότητα της νόσου είναι πολύ μεγαλύτερη, γιατί τα ελλειπτοκύτταρα προσφέρουν κάποια προστασία έναντι του παρασίτου. Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα και το σύνολο σχεδόν των ασθενών κατατάσσεται σε έναν από τους 3 κλινικούς φαινοτύπους: κοινή ελλειπτοκυττάρωση, πυροποικιλοκυττάρωση, και οβαλοκυττάρωση της Νοτιοανατολικής Ασίας. Η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών έχουν κοινή ελλειπτοκυττάρωση, είναι ασυμπτωματικοί και μόνο το 10% περίπου εξ αυτών έχουν μέτρια έως σοβαρή αναιμία. Κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των μορφών ελλειπτοκυττάρωσης είναι η μηχανικά ασταθής ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Η μειωμένη μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης είναι το αποτέλεσμα των αποδυναμωμένων πλευρικών συνδέσεων στο μεμβρανικό σκελετό είτε λόγω ασταθούς σύνδεσης διμερών-διμερών σπεκτρίνης είτε λόγω ασταθούς σύνδεσης σπεκτρίνης/ακτίνης/πρωτεΐνης 4.1 στο σύμπλοκο ζεύξης του μεμβρανικού σκελετού. Οι ασθενείς πλευρικές συνδέσεις των πρωτεϊνών του μεμβρανικού σκελετού οφείλονται σε βλάβες της α-σπεκτρίνης, της β-σπεκτρίνης

ή της πρωτεΐνης 4.1R. Οι μεταλλάξεις της α-σπεκτρίνης είναι η πιο κοινή αιτία της ΚΕ, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 65% των περιπτώσεων. Παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στην Ν-τελική περιοχή της α-σπεκτρίνης, που συμμετέχει στο σχηματισμό τετραμερούς, είναι οι πιο συχνές μεταλλάξεις. Έχουν εντοπιστεί όμως και μεταλλάξεις της α-σπεκτρίνης σε περιοχές του μορίου που δεν συμμετέχουν στην αυτοσυγκρότηση της σπεκτρίνης^{19,20}. Η πιο κοινή μετάλλαξη της α-σπεκτρίνης είναι η Arg28His και ασθενείς ομόζυγοι για αυτή τη μετάλλαξη έχουν σοβαρή αιμολυτική αναιμία²¹. Οι μεταλλάξεις της β-σπεκτρίνης αντιπροσωπεύουν το 30% των περιπτώσεων με ΚΕ¹⁹. Έχουν ταυτοποιηθεί σημειακές μεταλλάξεις, καθώς επίσης και «βραχύνσεις» (truncations) στην C-τελική περιοχή της β-σπεκτρίνης, που έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη αυτοσυγκρότηση της σπεκτρίνης. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις με ΚΕ, ο βαθμός διαταραχής στην αυτοσυγκρότηση της σπεκτρίνης συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της κλινικής εικόνας: όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός της διαταραχής τόσο πιο σοβαρός είναι ο κλινικός φαινότυπος. Έλλειμμα της πρωτεΐνης 4.1R, καθώς και ποιοτικές βλάβες της 4.1R αντιπροσωπεύουν το 5% των περιπτώσεων με ΚΕ^{19,22,23}. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις που αφορούν την πρωτεΐνη 4.1R, η βλάβη οδηγεί σ’ ένα εξασθενημένο σύμπλοκο ζεύξης του μεμβρανικού σκελετού, με αποτέλεσμα τη μειωμένη μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης. Η σπληνεκτομή μειώνει σημαντικά τη βαρύτητα της αναιμίας με την αύξηση της διάρκειας ζωής των ερυθρών.

Η Κληρονομική Πυροποικιλοκυττάρωση (HPP) είναι υποσύνολο της ΚΕ. Στην αρχή θεωρήθηκε ως μία ξεχωριστή οντότητα λόγω της αυξημένης θερμικής ευαισθησίας των ερυθροκυττάρων και των μορφολογικά ασυνήθιστων ερυθρών, που έμοιαζαν με εκείνων σε ασθενείς που είχαν υποστεί σοβαρά θερμικά εγκαύματα²³. Εμφανίζεται συνήθως στη βρεφική ηλικία ως βαριά αιμολυτική αναιμία (Hb 4.0-8.0g/dl) με χαρακτηριστική μορφολογία των ερυθρών με ποικιλοκύτταρα, σπασμένα ερυθρά, κάποια σφαιροκύτταρα και λίγα ή καθόλου ελλειπτοκύτταρα. Μοιάζει πολύ με την ομόζυγο κοινή ελλειπτοκυττάρωση. Τα ερυθροκύτταρα είναι ωσμωτικά εύθραυστα, ιδιαίτερα μετά από επώαση. Οι περισσότεροι ασθενείς με HPP είναι είτε ομοζυγώτες δομικών παραλλαγών της σπεκτρίνης στην περιοχή που γίνεται η αυτοσυγκρότησή της σε τετραμερή, είτε διπλοί ετεροζυγώτες δομικών ελλειπτοκυτταρικών μεταλλάξεων της σπεκτρίνης²¹.

ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΟΒΑΛΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ

Η Οβαλοκυττάρωση της Νοτιοανατολικής Ασίας είναι πολύ συχνή στη Μελανησία, τη Μαλαισία, τις Φιλιππίνες, την Ινδονησία και τη Ν. Ταϊλάνδη. Στις περιοχές αυτές όπου ενδημεί η ελονοσία ο επιπολασμός της νό-

σου κυμαίνεται από 5-25%²⁵. Η οβαλοκυττάρωση χαρακτηρίζεται από την παρουσία ερυθροκυττάρων ωοειδούς σχήματος, με μία ή δύο εγκάρσιες λωρίδες ή μία διαμήκη σχισμή. Η μεμβράνη των οβαλοκυττάρων της Νοτιοανατολικής Ασίας είναι άκαμπτη και μηχανικά πιο σταθερή²⁶. Η αυξημένη ακαμψία της μεμβράνης των οβαλοκυττάρων παρεμποδίζει την ικανότητα του παρασίτου της ελονοσίας να προσβάλλει αποτελεσματικά αυτά τα ερυθρά αιμοσφαίρια²⁷, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός. Μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό επικρατούντα τύπο κληρονομικότητας και όλα τα άτομα είναι ετεροζυγώτες ενός γονιδιακού ελλείμματος 27 bp που κωδικοποιεί τα αμινοξέα 400-408, που βρίσκονται στο όριο της κυτταροπλασματικής και της πρώτης διαμεμβρανικής περιοχής της ζώνης 3^{26,28,29}. Παρά την αυξημένη μεμβρανική ακαμψία, οι περισσότεροι φορείς δεν παρουσιάζουν καθόλου ή έχουν ελάχιστη αιμόλυση. Το μοντέλο που προτείνεται για να εξηγήσει την ακαμψία της μεμβράνης υποθέτει ότι το έλλειμμα των 9 αμινοξέων αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση του μορίου της ζώνης 3, με αποτέλεσμα η κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης να σχηματίζει επιπλέον δεσμούς με τον υποκείμενο μεμβρανικό σκελετό, αναδιατάσσοντας το δίκτυο της σπεκτρίνης που είναι υπεύθυνο για την παραμόρφωση της μεμβράνης. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός για την αυξημένη ακαμψία της μεμβράνης των οβαλοκυττάρων δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί.

ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΣΤΟΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ

Φυσιολογικά η ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι σχεδόν αδιαπέραστη στα μονοσθενή (K^+ , Na^+) και δισθενή (Ca^{2+}) κατιόντα εν αντιθέσει με τα ανιόντα και το νερό που είναι πολύ διαπερατή. Έτσι η διατήρηση της υψηλής περιεκτικότητας σε κάλιο, χαμηλής σε νάτριο και πολύ χαμηλής περιεκτικότητας σε ασβέστιο στο ερυθρό αιμοσφαίριο, επιτυγχάνεται από πρωτεΐνες όπως οι Na^+-K^+ ATPase, Ca^{2+} ATPase κ.α. Επιπροσθέτως το κανάλι SK1-Gardos και η υδατοπορίνη (AQP1) συμμετέχουν στη ρύθμιση του όγκου του ερυθρού. Η αύξηση της συγκέντρωσης των κατιόντων έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο H_2O στο ερυθροκύτταρο, ενώ αντίθετα η μείωση των κατιόντων οδηγεί σε απώλεια νερού. Έτσι οι φαινότυποι που αφορούν τις κληρονομικές διαταραχές στη διαπερατότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι: η

κληρονομική στοματοκυττάρωση με αφυδατωμένα ερυθρά (ξηροκυττάρωση) και η κληρονομική στοματοκυττάρωση συνοδευόμενη από υδροκυττάρωση³⁰. Το μοτίβο κληρονομικότητας της και για τις δύο καταστάσεις είναι αυτοσωμικό επικρατές. Η ξηροκυττάρωση μπορεί να εμφανίζεται μόνη ή σε συνδυασμό με άλλες κλινικές εκδηλώσεις συμπεριλαμβανομένης της ψευδοϋπερκαλιαιμίας και /ή περιγεννητικής συλλογής υγρού. Χαρακτηρίζεται από αντιρροπούμενη αναιμία, οριακή μακροκυττάρωση και ήπια έως μέτρια σπληνομεγαλία. Το ποσοστό των στοματοκυττάρων στο αίμα είναι συνήθως λιγότερο από 10%. Το χαρακτηριστικό της ξηροκυττάρωσης είναι η αφυδάτωση των ερυθροκυττάρων με αποτέλεσμα την αύξηση του MCHC και τη μειωμένη ωσμωτική αντίσταση. Η κληρονομική στοματοκυττάρωση με υδροκυττάρωση συνδέεται με μη αντιρροπούμενη αιμολυτική αναιμία, με σαφή μακροκυττάρωση και δικτυοερυθροκυττάρωση. Σε αντίθεση με την ξηροκυττάρωση, τα στοματοκύτταρα αποτελούν κύριο χαρακτηριστικό της μορφολογίας των ερυθρών στην υδροκυττάρωση. Το χαρακτηριστικό της υδροκυττάρωσης είναι η αυξημένη ενυδάτωση των κυττάρων με αποτέλεσμα την αύξηση του MCV, μείωση του MCHC και αύξηση της ωσμωτικής ευθραυστότητας. Σε αντίθεση με την κληρονομική σφαιροκυττάρωση, η αυξημένη ωσμωτική ευθραυστότητα δεν είναι το αποτέλεσμα της μειωμένης κυτταρικής επιφανείας, αλλά η αύξηση του όγκου των κυττάρων με φυσιολογικό εμβαδόν επιφανείας. Ο φαινότυπος αυτός συνοδεύεται από δραματική μείωση ή απουσία της στοματινής ή πρωτεΐνης 7.2b. Ενώ η σπληνεκτομή είναι η θεραπεία εκλογής για ασθενείς με κληρονομική σφαιροκυττάρωση και ελλειπτοκυττάρωση, αυτή αντενδείκνυται στους ασθενείς με κληρονομική στοματοκυττάρωση που εμφανίζουν μετρίως σοβαρή έως σοβαρή αναιμία, λόγω φλεβικών θρομβοεμβολικών επιπλοκών που εμφανίζονται μετά τη σπληνεκτομή³¹. Ο ακριβής μηχανισμός για αυτή την επιπλοκή δεν έχει ακόμη καθοριστεί.

Πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν γονιδιακές βλάβες που είναι υπεύθυνες για μερικές από τις περιπτώσεις ασθενών με κληρονομική στοματοκυττάρωση. Αυτές αφορούν τις αμινοξικές αντικαταστάσεις Phe65Ser, ή την Ile61Arg στην πρωτεΐνη RhAG³² (αφορούν στοματοκυττάρωση με υδροκύττωση), και μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη PIEZO1³³ που είναι υπεύθυνες για πολλές κλινικές μορφές της κληρονομικής ξηροκυττάρωσης

Anemias due to hereditary red cell membrane defects

by Evangelos Premetis, Alexandra Stamoulakatou

Hematology Laboratory, Children's Hospital «Agia Sophia», Athens, Greece

ABSTRACT: The human erythrocyte membrane is the most thoroughly studied biologic membrane. It is composed of three major structural elements: a lipid bilayer mainly composed of phospholipids and cholesterol; integral proteins incorporated in the lipid bilayer; and a protein cytoskeleton on the internal side of the red cell membrane. The erythrocyte membrane provides the erythrocyte with its unique deformability, durability, and tensile strength to undergo large deformations during repeated passages through narrow microcirculatory channels. Red cell membrane disorders can be divided according to red cell morphology into four groups: hereditary spherocytosis (HS), hereditary elliptocytosis (HE), hereditary ovalocytosis and hereditary stomatocytosis. Hereditary spherocytosis is the most common red cell membranopathy with a prevalence of one in 3,000 in people of northern European origin and characterized by spherically shaped erythrocytes on the blood film, reticulocytosis, and splenomegaly. Autosomal dominant mutations predominate (75%), with recessive forms leading to more severe phenotypes. The clinical severity of hereditary spherocytosis is heterogeneous, from extremely mild to severe haemolysis. The principal cellular defect is the propensity to lose membrane surface area during passage through the splenic circulation, leading to spherical shape and decreased deformability. Splenic destruction of nondeformable spherocytes leads to anemia. Membrane loss results from defects in several membrane proteins, including ankyrin, band 3, α -spectrin, β -spectrin, and protein 4.2. Hereditary elliptocytosis is an autosomal-dominant disorder characterized by the presence of elliptical (cigar-shaped) erythrocytes on the blood film. Its distribution mirrors that of malaria, indicating that elliptocytes confer a survival advantage in the form of malarial resistance. Patients with hereditary elliptocytosis are generally asymptomatic, but approximately 10% have moderate to severe anemia including a few reported cases of hydrops foetalis and the severe variant hereditary pyropoikilocytosis, characterized by important membrane fragmentation and reduced membrane surface area. Hereditary elliptocytosis is caused by weakened "horizontal" linkages in membrane skeleton due either to a defective spectrin dimer-dimer interaction or a defective spectrin-actin-protein 4.1R junctional complex. Splenectomy reduces the severity of anemia by increasing the circulatory life span of fragmented red cells. Hereditary ovalocytosis is an autosomal dominant disease very common in Southeast Asia. It is characterized by the presence of oval-shaped red cells with one or two transverse ridges or a longitudinal slit on a blood smear. A genomic deletion of 27 bp encoding amino acids 400 to 408 of band 3 has been identified, however the mechanism that leads to a marked increase in membrane rigidity has yet to be established. Overhydrated hereditary stomatocytosis (OHS) and dehydrated hereditary stomatocytosis (xerocytosis) (DHS) are autosomal dominant disorders characterized by the presence of stomatocytes on blood smears. While anemia is mild in DHS, it is severe in OHS. Molecular analysis showed two mutations associated with OHS in RHAG (Ile61Arg and Ser65Phe). Recent studies showed mutations in the mechanosensitive ion channel, PIEZO1 in dehydrated hereditary stomatocytosis. While splenectomy is highly beneficial in the management of HS and HE, it is contraindicated in hereditary stomatocytosis since venous thromboembolic complications occur following splenectomy.

Βιβλιογραφία

1. Singer SJ, Nicholson GL. The fluid-mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972;175:720-731.
2. Verkleij AJ, Zwaal RF, Roelofs B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LL. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*. 1973;323:178-193.
3. Reid ME, Mohandas N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin Hematol*. 2004;41:93-117.
4. Speicher DW, Morrow JS, Knowels WJ, Marchesi VT. A structural model of human erythrocyte spectrin. Alignment of chemical and functional domains. *J Biol Chem*. 1982;257:9093-9101.
5. Speicher DW, DeSilva TM, Speicher KD, Ursitti JA, Hembach P, Weglarz L. Location of the human red cell spectrin tetramer binding site and detection of a related "closed" hairpin loop dimer using proteolytic footprinting. *J Biol Chem*. 1993;268:4227-4235.

6. Kotula L, Laury-Kleintrop LD, Showe L, et al. The exon-intron organization of the human erythrocyte α -spectrin gene. *Genomics*. 1991;9:131-140.
7. Winkelmann JC, Chang JG, Tse TW, Scarpa AL, Marchesi VT, Forget BG. Full length sequence of the cDNA for human erythroid β -spectrin. *J Biol Chem*. 1990;265:11827-11832.
8. Ipsaro JJ, Huang L, Mondragon A. Structures of the spectrin-ankyrin interaction binding domains. *Blood*. 2009;113:5385-5393.
9. Khan AA, Hanada T, Mohseni M, et al. Dematin and Adducin Provide a Novel Link between the Spectrin Cytoskeleton and Human Erythrocyte Membrane by Directly Interacting with Glucose Transporter-1. *J Biol Chem*. 2008;283:14600-14609.
10. Narla Mohandas, Patrick G. Gallagher (2008) Red cell membrane: past, present and future. *Blood*. 2008;112:3939-3948.
11. Gallagher PG, Lux SE. Disorders of the erythrocyte membrane. In: *Hematology of Infancy and Children* (ed. by D. Nathan, S.H. Orkin & F.A. Oski), 2003 pp. 560-684. Mosby Elsevier-Saunders, Philadelphia, PA.
12. Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet* 2008;372:1411-1426
13. Eber SW, Gonzalez JM, Lux ML, et al. Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis. *Nat Genet*. 1996;13:214-218.
14. Eber S, Lux SE. Hereditary spherocytosis—defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Semin Hematol*. 2004;41:118-141.
15. Jarolim P, Murray JL, Rubin HL, et al. Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. *Blood*. 1996;88:4366-4374.
16. Dhermy D, Galand C, Bourmier O, Boulanger L, Cynober T, Schismanoff PO, Bursaux E, Tchernia G, Boivin P, Garbarz M. Heterogenous band 3 deficiency in hereditary spherocytosis related to different band 3 gene defects. *Br J Haematol*. 1997;98:32-40.
17. Bouhassira EE, Schwartz RS, Yawata Y, et al. An alanine-to-threonine substitution in protein 4.2 cDNA is associated with a Japanese form of hereditary hemolytic anaemia (protein 4.2NIPPON). *Blood*. 1992;79:1846-1854.
18. Yawata Y, Kanzaki A, Yawata A, Doerfler W, Ozcan R, Eber SW. Characteristic features of the genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population. *Int J Hematol*. 2000;71:118-135.
19. Gallagher PG. Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R. *Semin Hematol*. 2004;41:142-164.
20. Delaunay J, Dhermy D. Mutations involving the spectrin heterodimer contact site: clinical expression and alterations in specific function. *Semin Hematol*. 1993;30:21-33.
21. Coetzer TL, Palek J. Partial spectrin deficiency in hereditary pyropoikilocytosis. *Blood*. 1986;67:919-924.
22. Tchernia G, Mohandas N, Shohet S. Deficiency of skeletal membrane protein band 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosis. Implications for erythrocyte membrane stability. *J Clin Invest*. 1981;68:454-460.
23. Marchesi SL, Conboy J, Agre P, et al. Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 in elliptocytosis. I. Biochemical identification of rearrangements in the spectrin/actin binding domain and functional characterizations. *J Clin Invest*. 1990;86:516-523.
24. Zarkowsky HS, Mohandas N, Speaker CB, Shohet SB. A congenital haemolytic anaemia with thermal sensitivity of the erythrocyte membrane. *Br J Haematol*. 1975;29:537-543.
25. Amato D, Booth PB. Hereditary ovalocytosis in Melanesians. *Papua New Guinea Med Journal*. 1997;20:26-32.
26. Mohandas N, Winardi R, Knowles D, et al. Molecular basis for membrane rigidity of hereditary ovalocytosis. A novel mechanism involving the cytoplasmic domain of band 3. *J Clin Invest*. 1992;89:686-692.
27. Mohandas N, Lie-Injo LE, Friedman M, Mak JW. Rigid membranes of Malayan ovalocytes: a likely genetic barrier against malaria. *Blood*. 1984;63:1385-1392.
28. Jarolim P, Palek J, Amato D, et al. Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:11022-11026.
29. Schofield AE, Tanner MJ, Pinder JC, et al. Basis of unique red cell membrane properties in hereditary ovalocytosis. *J Mol Biol*. 1992;223:949-958.
30. Delaunay J. The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations. *Semin Hematol*. 2004;41:165-172.
31. Jais X, Till SJ, Cynober T, et al. An extreme consequence of splenectomy in dehydrated hereditary stomatocytosis: gradual thrombo-embolic pulmonary hypertension and lung-heart transplantation. *Haemoglobin*. 2003;27:139-147.
32. Bruce LJ, Guizouarn H, Burton NM, et al. The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Blood*. 2009;113:1350-1357
33. Bae C, Gnanasambandam R, Nicolai C, Sachs F, Gottlieb PA. Xerocytosis is caused by mutations that alter the kinetics of the mechanosensitive channel PIEZO1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013.19;110:1162-1168