

BEATA HANUS-LORENZ¹, MICHAŁ LORENZ¹, DŻAMILA BOGUSŁAWSKA²,
ELŻBIETA HEGER², ANITA HRYNIEWICZ¹, ALEKSANDER F. SIKORSKI¹

¹Institut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski
Przybyszewskiego 63-77, 51-148 Wrocław

²Institut Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Zielonogórski
Monte Cassino 21b, 65-561 Zielona Góra

MUTACJE W GENACH KODUJĄCYCH BIAŁKA BŁONY ERYTROCYTU PRZYCZYNA DZIEDZICZNYCH ANEMII HEMOLITYCZNYCH

Już na początku badań nad spektryną i szkieletem błony erytrocytów zaobserwowano, że zmiana siły oddziaływań pomiędzy białkami cytoszkieletu, lub niedobór bądź brak jednego z jego elementów, towarzyszy poważnym dziedzicznym schorzeniom z grupy anemii hemolitycznych, takim jak sferocytoza — żółtaczką konstytucyjną (HS), eliptycytoza (HE) i poikilocytoza (HP), którą obecnie uważa się za ciężką odmianę HE. Schorzenia te opisano około 100 lat temu na podstawie kryteriów morfologicznych. W pierwszych pracach dotyczących molekularnych podstaw anemii, zmiany w erytrocytach diagnozowano metodami biochemicznymi. Anemie hemolityczne mają podłoże w mutacjach genów i powodowane są nie tylko defektem, niedoborem lub brakiem spektryny, ale zmiany takie mogą także dotyczyć innych białek

cytoszkieletu błony: ankiryny, białka 4.1, BPA, białka 4.2 (patrz: DELAUNAY i współaut. 1996b, YAWATA i współaut. 2000). Stopień nasilenia schorzenia zależy często również od tego, czy mamy do czynienia z homo-, czy heterozygotą pod względem obecności zmutowanego genu. Najcięższe przypadki anemii są letalne. Obecnie uważa się (patrz: DELAUNAY 1995, IOLASCON i współaut. 1998), że u podłoża anemii leży mutacja w jednym z sześciu genów kodujących białka błony erytrocytu: *SPTA1* — spektrynę alfa, *SPTB* — spektrynę beta, *ANK1* — ankirynę (GALLAGHER i współaut. 1997a, LUX i współaut. 1990), *EPB3* — BPA (SAHR i współaut. 1994), *EL1* — białko 4.1 (DALLA VENEZIA i współaut. 1992) i *ELB42* — białko 4.2 (KORSGREN i COHEN 1991, KORSGREN i współaut. 1990).

DZIEDZICZNA SFEROCYTOZA (ŻÓLTACZKA KONSTYTUCYJNA) (HS)

Dziedziczna sferocytoza jest najczęściej występującym schorzeniem charakteryzującym się występowaniem krwinek o zmienionym kształcie: zamiast kształtu dwuwklęsłego dysku (zapewniającego względnie dużą powierzchnię komórki), charakterystycznego dla krwinek normalnych, komórki te przyjmują kształt sferyczny. Jednocześnie posiadają one zmniejszoną średnicę, co wiąże się z „utrata” powierzchni. Schorzenie to u ludzi pochodzenia północnoeuropejskiego występuje z częstotliwością 1 na 2000. Krwinki tych pacjentów są mniej odporne na ciśnienie osmotyczne oraz pod względem mechanicznym; wykazują również mniejszą elastyczność, co powoduje ich wcześniejsze usuwanie z krążenia. Obraz kliniczny jest zdominowany przez anemię, będącą skutkiem tzw.

„hiperhemolizy”, żółtaczkę i splenomegalię. Nasilenie schorzenia jest zróżnicowane — od braku objawów do *hydrops fetalis* (obrzęk płodowy). Niektórzy pacjenci wymagają okazjonalnych lub regularnych transfuzji. Znakomitą poprawę stanu pacjenta powoduje splenektomia (usunięcie śledziony). Wśród komplikacji wyróżnić można: kryzysy aplastyczne związane z parwowirusem B19, kamienie żółciowe oraz guzy hematopoetyczne. Do głównych objawów, które można analizować, należy zmniejszenie oporności osmotycznej. Obserwuje się występowanie wolnych od białek szkieletu błony pęcherzyków o średnicy 50–80 nm, których uwalnianie jest przyczyną przechodzenia dyskocytów (krwinek normalnych) w sferocyty (krwinki zmienione patologicznie). Około 75% przypad-

ków charakteryzuje się autosomalnym dziedziczeniem dominującym. Z pozostałych 25%, połowę stanowią recesywne formy HS, a resztę powodują nowe mutacje spontaniczne (EBER i współaut. 1996, MIRAGLIA DEL GIUDICE i współaut. 1998).

Mutacje leżące u podstaw molekularnych dziedzicznej sferocytozy (HS) dotyczą, jak to udowodniono w wielu przypadkach, genów kodujących głównie białka cytoszkieletu podobnego erytrocytów (spektrynę alfa, spektrynę beta, ankiryne oraz białko 4.2, a także białko przenoszące aniony (BPA) (strukturę cytoszkieletu podobnego szczegółowo przedstawiono w art. B. HANUS-LORENZ i współaut. w tym numerze KOSMOSU). Uważa się, że u podstaw tej anemii leżą zaburzenia oddziaływań „pionowych” cytoszkieletu z dwuwarstwą lipidową zawierającą białka integralne błony, najczęściej oddziaływania spektryny z białkiem przenoszącym aniony za pośrednictwem ankiryny.

Najwięcej przypadków (przynajmniej 80% u osobników rasy białej) dziedzicznej sferocytozy powodują mutacje genu *ANK1*. Często towarzyszące tym mutacjom zmniejszenie ilości spektryny, odgrywające, jak się uważa, kluczową rolę w patogenezie HS, jest zjawiskiem wtórnym. Obecnie znanych jest wiele mutacji tego genu w różnych jego regionach (LEITE i współaut. 2000), objawiających się często zmianami ramki odczytu i syntezą skróconego mRNA, trudnego do wykrycia metodami RT-PCR (odwrotnej transkrypcji-reakcji łańcuchowej polimerazy). Najistotniejsze jednak są mutacje w domenach funkcjonalnych ankiryny, tzn. w domenie wiązania białka przenoszącego aniony (np. ankiryna Stuttgart Walsrode Einbeck czy Marburg (EBER i współaut. 1996)), w domenie wiązania spektryny beta (znana jedna mutacja — Porta Westfalica; EBER i współaut. 1996) oraz w domenie regulatorowej (znanych jest wiele mutacji, m. in. Bovenden, Dusseldorf, Bocholt; EBER i współaut. 1996, oraz Prague i Rakovník; JAROLIM i współaut. 1990, 1993, 1995).

10 do 15% przypadków HS wiąże się z brakiem lub defektem białka przenoszącego aniony (patrz: BRUCE i TANNER 1999). Wszystkie mutacje tego białka, w wyniku których następuje jego skrócenie na skutek przedwczesnej terminacji translacji, niezależnie od tego, czy dotyczą domeny cytoplazmatycznej, czy transbłonowej, prowadzą do zaburzeń całkowicie lub prawie całkowicie uniemożliwiających jego wbudowanie do błony. Allel typu dzikiego tylko częściowo kompensuje ten defekt. W innych przypadkach, podstawienia pojedynczych reszt aminokwasowych, z reguły w domenie transbłonowej, zaburzają proces wbudowywania tego białka do błony.

Tylko w niektórych przypadkach, np. w mutacji band 3 Coimbra, jego mała ilość może zostać wbudowana do błony (ALLOISIO i współaut. 1993b). Duża grupa mutacji i wariantów polimorficznych dotyczy cytoplazmatycznej domeny tego białka, a zatem jego zdolności wiązania ankiryny (ALLOISIO i współaut. 1993a). Znałe są także przypadki braku jego syntezy (RIBEIRO i współaut. 2000).

Zbliżoną grupą rzadkich przypadków HS są te spowodowane mutacją genu *EPB3*, związane z brakiem białka 4.2. Przypadki te obserwowane są jedynie u osobników homozygotycznych, jako że liczba kopii białka przenoszącego aniony odpowiadająca haploidalnej liczbie normalnego białka zapewnia wystarczającą ilość miejsc wiązania białka 4.2 (patrz: DELAUNAY i współaut. 1996a). Mutacje genu kodującego białko 4.2 (*ELP42*) stanowią przyczynę rzadkich przypadków HS, obserwowanych również tylko u osobników homozygotycznych. Heterozygoty pozostają niewykrywalne. Jak dotąd znanych jest kilka mutacji, które odpowiadają za podstawienia pojedynczych reszt aminokwasowych (np. BOUHASSIRA i współaut. 1992, KANZAKI i współaut. 1995, HAYETTE i współaut. 1995a), oraz kilka takich, które wprowadzają przedwczesny kodon stop (TAKAOKA i współaut. 1994, HAYETTE i współaut. 1995b).

Znanych jest stosunkowo niewiele przypadków dziedzicznej sferocytozy, w przeciwieństwie do dziedzicznej eliptycytozy (por. następna część), których podłożem są mutacje w genach kodujących spektrynę. Zmutowany gen *SPTB*, kodujący w pozycji 202 resztę argininy zamiast reszty tryptofanu, znaleziono w wariantcie zwanym Kissimmee. Mutacja ta dotyczy regionu końca aminowego, zawierającego miejsca wiązania aktyny i białka 4.1. Zmiana ta rzeczywiście prowadzi do zaniku zdolności wiązania białka 4.1 przez spektrynę (BECKER i współaut. 1993). Inne mutacje, np. spektryna Guemene-Penfao (GARBARZ i współaut. 1998), Durham (HASSOUN i współaut. 1995), Winston-Salem (HASSOUN i współaut. 1995) i Tabor (HASSOUN i współaut. 1994), objawiają się zmniejszoną ilością spektryny, obserwowaną nawet w stanie heterozygotycznym (Tabela 1). Jeśli chodzi o podjednostkę α spektryny, jest ona syntetyzowana w 3–4 krotnym nadmiarze w stosunku do ilości tego polipeptydu inkorporowanego do błony erytrocytu, a zatem heterozygoty nie powinny wykazywać objawów chorobowych. Mimo tego, w kilku przypadkach zaobserwowano ubytek spektryny. Jednakże, jak dotąd, zidentyfikowano tylko nieliczne mutacje na poziomie genu, np. *spLEPRA*, charakteryzującą się zmianą w intronie 30, powodującą w efekcie błąd

Tabela 1. Przykłady mutacji spektryny prowadzące do powstania defektów cytoszkieletu podbłonowego.

Anemia hemolityczna	Typ	Defekt genetyczny	Literatura
Sp α _{LEPRA}	HS	intron 30, delecja 18 reszt aminokwasowych, defekt składania eksonów, ↓Sp	WICHTERLE i współaut. 1995
Sp α _{Prague}	HS	intron 36, mutacja A→G, defekt składania eksonów, mRNA bez eksonu 37 koduje zmutowaną podjednostkę alfa, ↓SpT	WICHTERLE i współaut. 1995
Sp α _{Aleksandria}	HE	wariant α I/50, ekson 11, delecja CAT (H ₄₆₉), ↓SpD, ↓SpT	GALLAGHER i współaut. 1993
Sp α _{Saint-Louis}	HE	wariant α I/46-50a, podstawienie T→C (L ₂₀₇ →P), ↓SpT	GALLAGHER i współaut. 1992
Sp α _{Anastasia}	HE	wariant α I/78, ekson 2, podstawienie G→C (R ₄₅ →T), ↓SpT	PERROTTA i współaut. 1995
Sp α _{Culoz}	HE	wariant α I/74, ekson 2, podstawienie G→T (G ₄₆ →V), ↓SpT	MORLE i współaut. 1990
Sp α _{Lyon}	HE	wariant α I/74, ekson 2, podstawienie C→T (L ₄₉ →F), ↓SpT	MORLE i współaut. 1990
Sp α	HE	wariant α /74, podstawienie A→G (R ₂₈ →H)	BASSERES i współaut. 2000
Sp α _{Tunis}	HE	wariant α I/78, ekson 2, podstawienie C→T (R ₄₁ →W), ↓SpT	MORLE i współaut. 1989
Sp α	HE	wariant α I/65, ekson 4, insercja TTG (L ₁₅₃), ↓SpT,	ROUX i współaut. 1989
Sp α _{Oran}	HE	wariant α II/21, intron 17, podstawienie G→A (nowy kodon stop), mRNA bez eksonu 18 - brak 41 reszt aminokwasowych	ALLOISIO i współaut. 1993b
Sp α	HE	intron 45, podstawienie C→T, brak eksonu 46, niedobór spektryny, ↓SpD	WILMOTTE i współaut. 1999
Sp α _{Barcelona}	HE, HPP	wariant α I/50, ekson 11, podstawienie A→C (H ₄₆₉ →P), ↓SpT	DALLA VENEZIA i współaut. 1993
Sp α _{Nigerian}	HE, HPP	wariant α I/50a, ekson 6, podstawienie T→C (L ₂₆₀ →P), niedobór spektryny, ↓SpT	GALLAGHER i współaut. 1997b
Sp α _{Genoa}	HE, HPP	wariant α I/74, ekson 2, podstawienie C→T (R ₃₄ →W), niedobór spektryny, ↓SpD	BASSERES i współaut. 1998
Sp α	HE, HPP	wariant α I/74, podstawienie A→G (K ₄₈ →R), niedobór spektryny alfa, ↓SpT	FLOYD i współaut. 1991
Sp α _{Corbeil}	HE, HPP	wariant α I/74, ekson 2, podstawienie CGT→GAT (R ₂₈ →H), ↓SpT	GARBARZ i współaut. 1990
Sp α _{StClaude}	HPP	ekson 20, T→A (L ₂₀₇ →P), nowy mRNA zawiera fragment intronu - koduje zmutowane białko α 108 kDa	FOURNIER i współaut. 1997
Sp α /β _{Cosenza}	HE, HS	wariant Sp α I/74 -HE oraz podstawienie C→G w genie SPTB (R ₂₀₆₄ →P) prowadzi dodatkowo do defektu HS	QUALTIERI i współaut. 1997
Spβ _{Guemene-Penfao}	HS	ekson 3, mutacja CTG→CTC (L ₁₀₀), defekt składania eksonów, zachowany intron 3, obniżony poziom mRNA	GARBARZ i współaut. 1998
Spβ _{Durham}	HS	delecja eksonów 22 i 23 - brak segmentu 12 i części 13 w podjednostce beta	HASSOUN i współaut. 1995
Spβ _{Winston Salem}	HS	intron 17, mutacja G→A, zmieniona ramka odczytu, mRNA bez eksonu 16 i 17, ↓Sp	HASSOUN i współaut. 1996

Sp β _{Kissimme}	HS	ekson 6; podstawienie T→C (W ₂₀₂ →R), ↓ poziom wiązania białka 4.1	BECKER i współaut. 1993
Sp β _{Napoli}	HE	ekson 30, delecja 8 bp, zmieniona ramka odczytu, skrócona podjednostka beta o masie 216 kDa, ↓SpD	WILMOTTE i współaut. 1994
Sp β _{Providence}	HE	ekson 30, podstawienie T→C (S ₂₀₁₉ →P), letalna w przypadku homozygoty	GALLAGHER i współaut. 1995
Sp β _{Linguese}	HE	podstawienie T→A (W ₂₀₂₄ →R), zmiany w oddziaływaniu helis A,B i C, ↓SpD	NICOLAS i współaut. 1998
Sp β _{Campinas}	HE	intron 30, podstawienie G→A, nowy kodon stop, delecja C-końcowych 129 aminokwasów, ↓SpD	BASSERES i współaut. 1997
Sp β - 220/218 _{Rouen}	HE	skrócenie podjednostki beta w części C-końcowej, brak jednego z miejsc fosforylacji, ↓SpD	LECOMTE i współaut. 1992
Sp β _{Detroit}	HE	elongacja podjednostki beta (330 kDa), ↓SpD	JOHNSON i współaut. 1992
Sp β _{Tabor}	HS	ekson 28, podstawienie 5931 C→T, mutacja nonsensowna, obniżona zawartość spektryny.	HASSOUN i współaut. 1994
Sp β _{Tokyo}	HE	ekson 30, delecja GCCAGC→GCAGCT (AS ₂₀₆₀ →AA), zmiana ramki odczytu, ↓SpD	KANZAKI i współaut. 1992

oznaczenia: → — zamiana ↓ — obniżenie poziomu; SpD — spektryna dimeryczna; SpT — spektryna tetrameryczna

składania eksonów. Błąd ten przejawia się delecją odcinka 18 reszt aminokwasowych i znacznym zmniejszeniem ilości spektryny. Mutacja sp α Prague, polegająca na zamianie A→G w intronie 37, daje w efekcie mRNA bez eksonu 37, kodujący zmutowaną podjednostkę α . Taka spektryna nie ma zdolności tworzenia tetramerów (WICHTERLE i współaut. 1995). Do najczęstszych należy zamiana Ala970→Asp, spowodowana podstawieniem GCT→GAT w genie *SPTA1* (MARCHESI i współaut. 1989).

Przeprowadzono już pierwsze, eksperymentalne próby terapii genowej. DOONER i współaut. (2000) dokonali transdukcji komórek szpiku myszy *nb/nb* (ang. normoblastosis) mysim cDNA kodującym ankiryne1, połączonym z ludzkim promotorem genu ANK1 i domeną regulatorową „2.2” ludzkiej ankiryiny w wektorze retrowirusowym pG1. Myszy *nb/nb* (BODINE i

współaut. 1984) charakteryzują się sferocytozą spowodowaną dziedzicznym recesywnie defektem polegającym na syntezie skróconej ankiryiny. Wtórny defektem jest ubytek około 50% spektryny. W wyniku transfekcji komórek prekursorowych erytrocytów myszy normalnych oraz mutantów *nb/nb* otrzymano w wyniku stabilną, zależną od erytropoetyny (obecność ludzkiego promotora ANK1) ekspresję ankiryiny. Co więcej, morfologia hodowanych *in vitro* transdukowanych komórek prekursorowych wskazuje na to, że po enukleacji osiągają one kształt komórek normalnych. Komórki nie-transdukowane po enukleacji przyjmują kształty sferocytów i mikrocytów. Przedstawiony powyżej szereg doświadczeń stwarza szansę opracowania metod korekcji wad genetycznych, prowadzących do anemii hemolitycznych u ludzi. poprzez terapię genową.

DZIEDZICZNA ELIPTOCYTOZA (HE) I POIKILOCYTOZA (HP)

Dziedziczna eliptycytoza (HE) i jej ostra odmiana dziedziczna, poikilocytoza (HP) lub pyropoikilocytoza (HPP), są heterogenną grupą schorzeń krwinek czerwonych występującą u osób rasy białej z częstotliwością 1 na 5000, a w niektórych populacjach rasy czarnej osiąga nawet częstotliwość 1 na 100. Obraz kliniczny jest zróżnicowany: od braku objawów aż do śmierci płodu. Erytrocyty pacjentów z dziedziczną eliptycytozą mają kształt wydłużony, eliptyczny, a w przypadkach HP dominujące stają się poikilocyty (erytrocyty o nieregularnych

kształtach i obniżonej odporności termicznej). Większość przypadków HE jest schorzeniem umiarkowanym, ale pacjenci mogą wymagać splenektomii. Wzór dziedziczenia tej anemii jest skomplikowany: od czysto dominującego do zdecydowanie recesywnego. Wśród członków rodzin pacjentów z HP spotyka się osoby z HE. Obecnie wiadomo, że pacjenci z HP są często homozygotami pod względem allelu HE, złożonymi heterozygotami względem 2 alleli HE lub mają jeden allel HE i jeden allel o niskiej ekspresji (ang. low expression; wyjaśnienie poni-

zej). Większość tych anemii związana jest z upośledzonymi oddziaływaniami „horyzontalnymi” białek cytoszkieletu. Najczęściej dotyczą one miejsc w obu podjednostkach odpowiedzialnych za asocjację dimerów spektryny, w wyniku czego nie powstają tetramery spektryny. Oprócz tego, przyczyną eliptycytozy mogą być również mutacje w genie kodującym białko 4.1.

Zawartość spektryny dimerycznej w erytrocytach osób zdrowych nie sięga 5% (LECOMTE i współaut. 1993, SILVEIRA i współaut. 1997), podczas gdy w erytrocytach pacjentów z HE/HP może ona osiągać 60–80% i jest ściśle związana z natężeniem objawów schorzenia. Erytrocyty pacjentów z HP często charakteryzuje też obniżona zawartość spektryny (HANSPAL i współaut. 1993).

W wielu wykrytych przypadkach eliptycytozy związanej z defektami podjednostki α spektryny określono rodzaj mutacji: powodem może być zarówno podstawienie w genie podjednostki alfa Leu49→Phe (MORLE i współaut. 1990), delecja pojedynczego kodonu, np. kodonu CAT kodującego His469 (GALLAGHER i współaut. 1993), delecja wielu reszt aminokwasowych, przykładem której jest utrata dziewięciu reszt w czwartym segmencie podjednostki α (BACKLOUTI i współaut. 1992), jak i insercja pojedynczego kodonu (ROUX i współaut. 1989). Mutacje te obniżają zdolność spektryny do tworzenia tetramerów. Jak widać z przedstawionych w Tabeli 1 przykładów mutacji podjednostki α , 14 z 16 przypadków mutacji dotyczy pierwszych 300 reszt aminokwasowych, co wyjaśnia utratę zdolności spektryny do tworzenia tetramerów (por. Ryc. 2 art. B. HANUS-LORENZ i współaut. w tym numerze KOSMOSU). Ciekawym zjawiskiem, opisanym przez WILMOTTE i współaut. (1993), jest występowanie tzw. allelu o niskiej ekspresji, w tym przypadku tzw. LELY (Low expression Lyon). Wszystkie lub prawie wszystkie rodziny z HE, u podstaw której leżą mutacje w genie kodującym podjednostkę α spektryny erytrocytarnej, charakteryzują się występowaniem osób z anemią łagodną, prawie bezobjawową, oraz anemią ostrą, często HP. Mechanizm tego zjawiska autorzy przedstawili następująco: zaostrzenie objawów wiąże się z bardzo częstym polimorfizmem (20–25% wszystkich alleli *SPTA1*) występującym we wszystkich, lub prawie wszystkich, grupach etnicznych. Allel ten zawiera kilka mutacji w regionie segmentu 18 podjednostki α . Najważniejszym efektem jest opuszczenie eksonu 46 (18 nukleotydów) w 50% transkryptu na skutek mutacji w intronie 45 u osób z tym wariantem polimorficznym. Ekson 46 koduje fragment łańcucha

polipeptydowego leżący w obrębie tzw. miejsca „nukleacji”, lub inaczej miejsca inicjacji tworzenia dimerów (segmenty $\alpha 18$ – $\alpha 21$), które mocno wiążą segmenty $\beta 1$ – $\beta 4$. Ponieważ spektryna α syntetyzowana jest w nadmiarze w stosunku do podjednostki β , u osobników nie mających innych mutacji w podjednostce α nawet homozygotyczny polimorfizm pozostaje bez skutków klinicznych, ponieważ 50% normalnej spektryny α wystarcza do „zmontowania” normalnej spektryny ($\alpha\beta$)₂. Jeśli natomiast ten allel występuje łącznie z allelem HE w układzie „cis”, np. kodon 28 (RANDON i współaut. 1994), to będzie on obniżał „montowanie” wadliwej podjednostki α do błony (taka podjednostka ulega degradacji). Jeśli natomiast allel ten znajduje się w położeniu „trans” w stosunku do allelu HE, wtedy podjednostka α z mutacją HE tworzy dimery z podjednostką β , ale na skutek mutacji HE nie może tworzyć tetramerów i objawy ulegają zaostrzeniu.

Podjednostka β (jednego heterodimeru) oddziałuje końcem karboksylowym z aminowym końcem podjednostki α innego dimeru, tworząc tetramer (Ryc. 2, art. B. HANUS-LORENZ i współaut. w tym numerze KOSMOSU). Prawie wszystkie mutacje leżące u podstaw HE i HP, a dotyczące podjednostki β spektryny, zlokalizowane są w obrębie miejsca asocjacji dimerów, czyli segmentów 16 i 17 (por. Tabela 1). Mutacje punktowe w tym regionie nie powodują objawów w stanie heterozygotycznym, ale powodują zwykle dramatyczne objawy kliniczne u homozygot.

Wiele mutacji dotyczy granicy intron-ekson eksonu 30. Często powodują one opuszczenie tego eksonu podczas tworzenia transkryptu i syntezy skróconej podjednostki β . Heterozygoty z tymi mutacjami charakteryzują względnie łagodne objawy, choć czasem wymagają splenektomii, natomiast przypadki homozygotyczne są poważnym zagrożeniem dla życia (np. GALLAGHER i współaut. 1997b). Znane są także przypadki elongacji tej podjednostki, tak że jej masa wynosi 330 kDa (JOHNSON i współaut. 1992).

Mutacje leżące poza segmentem 16 w kierunku końca aminowego są prawdopodobnie przyczyną „fenotypu sferocytowego”. Przykładem mutacji z pogranicza obu fenotypów są spektryny β Campinas (BASSERES i współaut. 1997) lub Prague (JAROLIM i współaut. 1995). Erytrocyty tych pacjentów (tzw. sferoeliptycyty) charakteryzują się występowaniem skróconych łańcuchów β , które są zarówno niestabilne, jak i niezdolne do tworzenia tetramerów spektryny.

Eliptycytoza 4.1(-) stanowi osobną grupę przypadków eliptycytozy, w których błonę ery-

trocytów charakteryzuje niedobór białka 4.1. Heterozygoty cechuje eliptycytoza bez objawów hemolizy lub zwiększonej wrażliwości błony erytrocytów. Homozygoty charakteryzuje ostra anemia hemolityczna, eliptycytoza, poikilocytoza lub występowanie pofragmentowanych erytrocytów. Zidentyfikowano kilka mutacji kodującego to białko genu *EL1*. W 4.1 Madrid i Lille, mutacje punktowe w kodonie inicjacji uniemożliwiają jego translację (DALLA-VENEZIA i współaut. 1992, GARBARZ i współaut. 1995). Podobnie, delecja 318 nukleotydów w 4.1 Algeria eliminuje ten kodon (CONBOY i współaut. 1993). Z kolei, delecja pojedynczej reszty w domenie wiązania spektryny (4.1 Aravis) wiąże się z utratą zdolności tego białka do wiązania spektryny (LORENZO i współaut. 1994). Całkowity brak białka 4.1 indukuje wtórną redukcję zawartości glikoforyny C i całkowity brak białka p55 (patrz: TSE i LUX 1999).

Ograniczoną liczbę przypadków stanowią osoby z tzw. immunofenotypem „Leach”: błony ich erytrocytów nie zawierają glikoforyny C (homozygoty). Wtórny skutkiem tej mutacji jest obniżenie ilości białka 4.1 i nieobecność białka p55 (DEALUNAY i współaut. 1996a).

Unikalną formą eliptycytozy jest południowoazjatycka owalocytosis (SAO), szeroko rozpowszechniona w Malezji, Indonezji, Papui-Nowej Gwinei oraz na Filipinach. Krwinki tych pacjentów są zaokrąglonymi eliptycytami lub owalocytami, a niektóre z nich wykazują obecność poprzecznych „pałeczek”. Tego typu erytrocyty nie występują w żadnych innych schorzeniach. SAO jest związana ze zwiększoną sztywnością błony erytrocytu. Jednym ze zidentyfikowanych defektów jest delecja dziewięciu reszt aminokwasowych na granicy domeny cytoplazmatycznej i transbłonowej białka przenoszącego aniony (JAROLIM i współaut. 1991). Białko z tą mutacją wykazuje obniżoną aktywność pod względem transportu anionów (SCHOFIELD i

współaut. 1992). Przypuszcza się, że mutacje SAO wiążą się ze zwiększoną odpornością na malarię (TSE i LUX 1999).

Anemia Fanconiego — podobnie jak w przypadkach anemii hemolitycznych, u pacjentów u których rozpoznano anemię Fanconiego, obserwowano zmiany morfologiczne erytrocytów (nieregularny lub gwiazdzisty kształt erytrocytów, zdolność do zlepiania się) (MALORNI i współaut. 2000). Jest to choroba genetyczna charakteryzująca się m. in. stopniowym zanikiem szpiku kostnego, co prowadzi do braku granulocytów i erytrocytów we krwi obwodowej, a w konsekwencji do poważnych zaburzeń rozwoju i śmierci pacjenta. Zmiany genetyczne obserwuje się w trzech grupach genów: *FANCA*, *FANCC*, *FANCG*, które kodują białka tworzące kompleksy związane z chromatyną jąder komórek limfoblastoidalnych. Kompleksy te mogą oddziaływać ze zidentyfikowanym w komórkach normalnych polipeptydem o masie 230 kDa, który okazał się spektryną α II^S* (MCMAHON i współaut. 1999). Zaobserwowano, że w komórkach limfoblastoidalnych pacjentów z anemią Fanconiego poziom spektryny jest znacznie obniżony. Dotychczas nie wiadomo, które z białek kodowanych przez geny *FANC** oddziałuje ze spektryną, ani nie poznano charakteru tych oddziaływań.

Zapewne w najbliższych latach zostanie wykrytych jeszcze wiele mutacji związanych z dziedzicznymi anemiami hemolitycznymi, dotyczących poszczególnych białek cytoszkieletu. Badania te pozwolą z jednej strony na pogłębienie naszej wiedzy w dziedzinie zależności pomiędzy strukturą i funkcją tych białek, a z drugiej umożliwią postępy w diagnostyce tych schorzeń, włącznie z diagnostyką prenatalną, prognozowaniem i wskazaniem terapii. Być może umożliwią one również terapię genową dziedzicznych anemii hemolitycznych.

HEREDITARY HAEMOLYTIC ANAEMIAE ARE CAUSED BY MUTATIONS IN GENES ENCODING MEMBRANE CYTOSKELETON PROTEINS

SUMMARY

Haemolytic anaemias form a group of hereditary diseases that were defined on the basis of morphological criteria about 100 years ago. Hereditary elliptocytosis and its aggravated form, hereditary poikilocytosis, form a group of diseases in which mutations affect the horizontal interactions between membrane cytoskeletal proteins. These mutations are located mostly in spectrin α and β subunit genes, that cause defects in the region of the dimer-dimer interface, or in the *EL1* gene encoding for protein 4.1. Hereditary spherocytosis underlying mutations, on the

other hand, affect the vertical interactions in at least one of the five genes encoding cytoskeletal proteins. Most often these mutations are located in the *ANK1* gene (coding for erythrocyte ankyrin), although mutations in spectrins α and β subunit, an anion exchanger protein as well as in the 4.2 protein encoding gene, can also cause the disease. Transfection of red blood cell progenitors with the normal *ANK1* gene can correct spherocytosis in an experimental system.

LITERATURA

- ALLOISIO N., TEXIER P., FORRISSIER A., RIBEIRO M. L., MORLE L., BOZON M., BURSAX E., MAILLET P., TANNER M. J. A., TAMAGINI G., DELAUNAY J., 1993a. *Band 3 Coimbra: a variant associated with dominant hereditary spherocytosis and band 3 deficiency*. Blood 82 (Suppl. 1), 4a.
- ALLOISIO N., WILMOTTE R., MARECHAL J., TEXIER P., DENOROY L., FEO C., BENHADJI-ZOUAOUI Z., DELAUNAY J., 1993b. *A splice site mutation of alpha-spectrin gene causing skipping of exon 18 in hereditary elliptocytosis*. Blood 81, 2791-2798.
- BAKLOUTI F., MARECHAL J., WILMOTTE R., ALLOISIO N., MORLE L., DUCLUZEAU M., DENOROY L., MRAD A., BEN ARIBA M. H., KASTALLY R., DELAUNAY J., 1992. *Elliptocytogenic alpha 1/36 spectrin sfax lack nine amino acids in helix-3 of repeat-4: Evidence for the activation of a cryptic 5'-splice site in exon 8 of spectrin alpha gene*. Blood 79, 2464-2470.
- BASSERES D. S., PRANKE P. H., SALES T. S., COSTA F.F., SAAD S. T., 1997. *Beta-spectrin Campinas: a novel shortened beta-chain variant associated with skipping of exon 30 and hereditary elliptocytosis*. Br. J. Haematol. 97, 579-585.
- BASSERES D. S., PRANKE P. H., VICENTIM D., COSTA F. F., SAAD S. T., 1998. *Expression of spectrin alpha1/50 hereditary elliptocytosis and its association with the alphaLELY allele*. Acta Haematol. 100, 32-38.
- BASSERES D. S., BORDIN S., COSTA F. F., SAAD S. T., 2000. *Association of the alpha-spectrin R28H mutation with allele alphaLELY and with alpha1/alpha11 domain haplotypes in three Brazilian families*. Eur. J. Haematol. 64, 53-58.
- BECKER P. S., TSE W. T., LUX S. E., FORGET B. G., 1993. *beta-spectrin Kissimmee: a spectrin variant associated with autosomal dominant hereditary spherocytosis and defective binding to protein 4.1*. J. Clin. Invest. 92, 612-616.
- BODINE, D. M., BIRKENMEIER C. S., BARKER J. E., 1984. *Spectrin deficient inherited hemolytic anemias in the mouse: characterized by spectrin synthesis and mRNA in reticulocytes*. Cell 37, 721-728.
- BOUHASSIRA E. E., SCHWARTZ R. S., YAWATA Y., ATA K., KANZAKI A., QIU J. J. H., NAGEL R. L., RYBICKI A. C., 1992. *An alanine to threonine substitution of in protein 4.2 cDNA is associated with a Japanese form of hereditary hemolytic anemia (protein 4.2 Nippon)* Blood 79, 1846-1854.
- BRUCE L. J., TANNER M. J., 1999. *Erythroid band 3 variants and disease*. Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol. 12, 637-654.
- CONBOY J. G., CHASIS J. A., WINARDI R., TCHERNIA G., KAN Y. W., MOHANDAS N., 1993. *An isoform-specific mutation in the protein 4.1 gene results in hereditary elliptocytosis and complete deficiency of protein 4.1 in erythrocyte but not in nonerythroid cells*. J. Clin. Invest. 91, 77-82.
- DALLA VENEZIA N., GILSANZ E., ALLOISIO N., DULCUZEAU M.-T., BENZ E. J., DELAUNAY J., 1992. *Homozygous 4.1(-) hereditary elliptocytosis associated with a point mutation in the downstream initiation codon of protein 4.1 gene*. J. Clin. Invest. 90, 1713-1717.
- DALLA VENEZIA N., ALLOISIO N., FORRISSIER A., DENOROY L., AYMERICH M., VIVES-CORRONS J. L., BESALDUCH J., BESSON I., DELAUNAY J., 1993. *Elliptopoikilocytosis associated with the 469 His->Pro mutation in spectrin Barcelona ($\alpha^{1/50-46b}$)*. Blood 82, 1661-1665.
- DELAUNAY J., 1995. *Red cell membrane. Structure and function*. Blood Cell Biochem. 6, 1-35.
- DELAUNAY J., ALLOISIO N., MORLE L., BAKLOUTI F., DALLA VENEZIA N., MAILLET P. H., WILMOTTE R., 1996a. *Molecular genetics of hereditary elliptocytosis and hereditary spherocytosis*. Ann. Genet. 39, 209-221.
- DELAUNAY J., ALLOISIO N., MORLE L., 1996b. *Molecular genetics of hereditary spherocytosis*. Cell. Mol. Biol. Lett. 1, 49-65.
- DOONER G. J., BARKER J. E., GALLAGHER P. G., DEBATHIS M. E., BROWN A. H., FORGET B. G., BECKER P. S., 2000. *Gene transfer to ankyrin-deficient bone marrow corrects spherocytosis in vitro*. Exp. Hematol. 28, 765-774.
- EBER S. W., GONZALES J. M., LUX M. L., SCARPA A. L., TSE W. T., DORNWELL M., HERBERS J., KUGLER W., OZCAN R., PEKRUN A., GALLAGHER P. G., SCHROTER W., FORGET B. G., LUX S.E., 1996. *Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis*. Nature Genet. 13, 214-218.
- FLOYD P. B., GALLAGHER P. G., VALENTINO L. A., DAVIS M., MARCHESI S. L., FORGET B. G., 1991. *Heterogeneity of the molecular basis of hereditary pyropoikilocytosis and hereditary elliptocytosis associated with increased levels of the spectrin I/74-kilo-dalton tryptic peptide*. Blood 78, 1364-1372.
- FOURNIER C. M., NICOLAS G., GALLAGHER P. G., DHERMY D., GRANDCHAMP B., LECOMTE M. C., 1997. *Spectrin St Claude, a splicing mutation of the human alpha-spectrin gene associated with severe poikilocytic anemia*. Blood 89, 4584-4590.
- GALLAGHER P., TSE W. T., COETZER T., LECOMTE M.-C., GARBARZ M., ZARKOWSKY H. S., BARUCHEL A., BALLAS S. K., DHERMY D., PALEK J., FORGET B. G., 1992. *A common type of the spectrin I 46-50a kD peptide abnormality in hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis is associated with a mutation distant from proteolytic cleavage site*. J. Clin. Invest. 89, 892-898.
- GALLAGHER P. G., ROBERTS W. E., BENOIT L., SPEICHER D. W., MARCHESI S. L., FORGET B. G., 1993. *Poikilocytic hereditary elliptocytosis associated with spectrin Aleksandria: An I/50b kD variant that it caused by a single amino acid deletion*. Blood 82, 2210-2215.
- GALLAGHER P. G., WEED S. A., TSE W. T., BENOIT L., MORROW J. S., MARCHESI S. L., MOHANDAS N., FORGET B. G., 1995. *Recurrent fatal hydrops fetalis associated with a nucleotide substitution in the erythrocyte beta-spectrin gene*. J. Clin. Invest. 95, 1174-1182.
- GALLAGHER P. G., TSE W. T., SCARPA A. L., LUX S. E., FORGET B. G., 1997a. *Structure and organization of the human ankyrin-1 gene*. J. Biol. Chem. 272, 19220-19228.
- GALLAGHER P. G., ROMANA M., WONG C., FORGET B. G., 1997b. *Genetic basis of the polymorphisms of the alpha1 domain of spectrin*. Am. J. Hematol. 56, 107-111.
- GARBARZ M., LECOMTE M. C., FEO C., DEVAUX I., PICAT C., LEFEBRE C., GALIBERT F., GAUTERO H., BOURNIER O., GALAND C., FORGET B. G., BOIVIN P., DHERMY D., 1990. *Hereditary pyropoikilocytosis and elliptocytosis in a white french family with the spectrin α 1/74 variant related to a CGT to GAT codon change (Arg->His) at position 22 of the spectrin I domain*. Blood 75, 1691-1698.
- GARBARZ M., DEVOUX I., BOURNIER O., GRANDCHAMP B., DHERMY D., 1995. *Protein 4.1 Lille, a novel mutation in the downstream initiation codon of protein 4.1 gene associated with heterozygous 4.1 (-) elliptocytosis*. Human Mutation 5, 339-340.
- GARBARZ M., GALAND C., BIBAS D., BOURNIER O., DEVAUX I., HAROUSSEAU J. L., GRANDCHAMP B., DHERMY D., 1998. *A 5' splice region G->C mutation in exon 3 of the human beta-spectrin gene leads to decreased levels of beta-spectrin mRNA and is responsible for dominant hered-*

- itary spherocytosis (spectrin *Guemene-Penfao*). Br. J. Haematol. 100, 90-98.
- HANSPAL M., HANSPAL J. S., SAHR K. E., FIBACH E., NACHMAN J., PALEK J., 1993. Molecular basis of spectrin deficiency in hereditary pyropoikilocytosis. Blood 82, 1652-1660.
- HASSOUN H., VASSILIADIS J. N., MURRAY J., YI S. J., HANSPAL M., WARE R. E., WINTER S. S., CHIOU S. S., PALEK J., 1994. β -spectrin Tabor: a nonsense mutation within β -spectrin gene associated with dominantly inherited spherocytosis and spectrin deficiency. Blood 84, 4a.
- HASSOUN H., VASSILIADIS J. N., MURRAY J., SCOTT J. Y., HANSPAL M., WARE R. E., PALEK J., 1995. Molecular basis of spectrin deficiency in beta spectrin durham — A deletion within beta spectrin adjacent to the ankyrin-binding site precludes spectrin attachment to the membrane in hereditary spherocytosis. J. Clin. Invest. 96, 2623-2629.
- HASSOUN H., VASSILIADIS J. N., MURRAY J., YI S. J., HANSPAL M., JOHNSON C. A., PALEK J., 1996. Hereditary spherocytosis with spectrin deficiency due to an unstable truncated beta spectrin. Blood 87, 2538-2545.
- HAYETTE S., MORLE L., BOZON M., GHANAN A., RISINGER M., KORSGREN C., TANNER M. J. A., FATTOUN S., COHEN C. M., DELAUNAY J., 1995a. A point mutation in the protein 4.2 gene (allele 4.2 Tezeur) associated with hereditary hemolytic anaemia. Brit. J. Haematol. 89, 762-770.
- HAYETTE S., DHERMY D., DOSSANTOS M. E., BOZON M., DRENCHAHN D., ALLOISIO N., TEXIER P., DELAUNAY J., MORLE L., 1995b. A deletional frameshift mutation in protein 4.2 gene (allele 4.2 Lisboa) associated with hereditary hemolytic anemia. Blood 85, 250-256.
- IOLASCON A., DELGIUDICE E. M., PERROTTA S., ALLOISIO N., MORLE L., DELAUNAY J., 1998. Hereditary spherocytosis: from clinical to molecular defects. Haematologica 83, 240-257.
- JAROLIM P., BRABEC V., LAMBERT S., LIU S. C., ZHOU Z., PALEK J., 1990. Ankyrin Prague: a dominantly inherited mutation of the regulatory domain of ankyrin associated with hereditary spherocytosis. Blood 76 (Suppl.) 37a.
- JAROLIM P., PALEK J., AMATO D., HASSAN K., SAPAK P., NURSE G. T., RUBIN H. L., ZHAI S., SAHR K. E., LIU S.-C., 1991. Deletion in band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 15, 11022-11026.
- JAROLIM P., RUBIN H. L., BRABEC V., PALEK J., 1993. Abnormal alternative splicing of erythroid ankyrin mRNA in two kindred with hereditary spherocytosis (Ankyrin^{Prague} and Ankyrin^{Rakounik}). Blood 82 (Suppl.) 5a.
- JAROLIM P., WICHTERLE H., HANSPAL M., MURRAY J., RUBIN H. L., PALEK J., 1995. β spectrin^{FRAGUE}, a truncated β spectrin producing spectrin deficiency, defective heterodimer self-association and a phenotype spherocytic elliptocytosis. Brit. J. Haematol. 91, 502-510.
- JOHNSON R. M., RAVINDRANATH Y., BROHN F., MUKARRAM H., 1992. A large erythroid spectrin β -chain variant. Br. J. Haematol. 80, 6-14.
- KANZAKI A., RABODONIRINA M., YAWATA Y., WILMOTTE R., WADA H., ATA K., YAMADA O., AKATSUKA J., IYORI H., HORIGUCHI M., NAKAMURA H., MISHIMA T., MORLE L., DELAUNAY J., 1992. A deletional frameshift mutation of the β -spectrin gene associated with elliptocytosis in spectrin Tokyo (β 220/216). Blood 80, 2115-2121.
- KANZAKI A., YAWATA Y., YAWATA A., TAKAFUMI I., OKAMOTO N., WADA H., HARANO T., HARANO K., WILMOTTE R., HAYETTE S., NAKAMURA Y., NIKI T., KAWAMURA Y., NAKAMURA S., MATSUDA T., 1995. Band 4.2 Komatsu: 526 GAT->.TAT (175 Asp->Tyr) in exon 4 of the band 4.2 gene associated with total deficiency of band 4.2, hemolytic anemia with ovalostomatocytosis and marked disruption of the cytoskeletal network. Int. J. Hematol. 61, 165-178.
- KORSGREN C., COHEN C. M., 1991. Organization of the gene for human erythrocyte membrane protein 4.2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4840-4844.
- KORSGREN C., LOWLER J., LAMBERT S., SPEICHER D., COHEN C. M., 1990. Complete amino acid sequence and homologies of human erythrocyte membrane protein 4.2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 613-617.
- LECOMTE M. C., GAUTERO H., BOURNIER O., GALAND C., LAHARY A., VANNIER J. P., GARBARZ M., DELAUNAY J., TCHERNIA G., BOVIN P., DHERMY D., 1992. Elliptocytosis-associated spectrin Rouen ($\beta^{220/218}$) has a truncate but still phosphorylatable β chain. Br. J. Haematol. 80, 242-250.
- LECOMTE M.-C., GARBARZ M., GAUTERO H., BOURNIER O., GALAND C., BOVIN P., DHERMY D., 1993. Molecular basis of clinical and morphological heterogeneity in hereditary elliptocytosis with spectrin I variants. Brit. J. Haematol. 85, 584-595.
- LEITE R. C., BASSERES D. S., FERREIRA J. S., ALBERTO F. L., COSTA F. F., SAAD S. T., 2000. Low frequency of ankyrin mutations in hereditary spherocytosis: identification of three novel mutations. Hum. Mutat. 16, 529.
- LORENZO F., DALLA VENEZIA N., MORLE L., BAKLOUTI F., ALLOISIO N., DUCLUZEAU M.-T., RODA L., LEFRANCOIS P., 1994. Protein 4.1 deficiency associated with an altered binding to the spectrin-actin complex of the red cell membrane skeleton. J. Clin. Invest. 94, 1651-1656.
- LUX S. E., TSE W. T., MENNINGER J. C., JOHN K. M., HARRIS P., SHALEV O., CHILCOTE R. R., MARCHESI S. L., WATKINS P. C., BENNETT V., MCINTOSH S., COLLINS F. S., FRANCKE U., WARD D. C., FORGET B. G., 1990. Hereditary spherocytosis associated with deletion of the human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. Nature 345, 736-739.
- MALORNI W., STRAFACE E., PAGANO G., MONTI D., ZATTERALE A., DELPRINCIPE D., DEEVA I. B., FRANCESCHI C., MASELLA R., KORKINA L. G., 2000. Cytoskeleton alterations of erythrocytes from patients with Fanconi anemia. FEBS Lett. 468, 125-128.
- MARCHESI S. L., AGRE P., SPEICHER D. W., TSE W. T., FORGET B. G., 1989. Mutant spectrin II domain in recessively inherited spherocytosis. Blood 74, 182a.
- MCMAHON L. W., WALSH C. E., LAMBERT M. W., 1999. Human spectrin II and the Fanconi anemia proteins FANCA and FANCC interact to form a nuclear complex. J. Biol. Chem. 274, 32904-32908.
- MIRAGLIA DEL GIUDICE E., FRANCESE M., NOBILI B., MORLE L., CUTILLO S., DELAUNAY J., PERROTTA S., 1998. High frequency of de novo mutations in ankyrin gene (ANK1) in children spherocytosis. J. Pediatr. 132, 117-120.
- MORLE L., MORLE F., ROUX A. F., GODET J., FORGET B. G., DENOROY L., GARBARZ M., DHERMY D., KASTALLY D., DELAUNAY J., 1989. Spectrin Tunis (Spa^{1/78}), and elliptocytogenic variant, is due to the CGG->TGG codon change (Arg->Trp) at position 35 of the I domain. Blood 74, 828-832.
- MORLE L., ROUX A.F., ALLOISIO N., POTHIER B., STARCK J., DENOROY L., MORLE F., RUDIGOZ R. C., FORGET B. G., DELAUNAY J., GODET J., 1990. Two elliptocytogenic 1/74 variants of the spectrin α I domain: Spectrin Culoz (GGT->GTT), α I 40 Gly->Val) and spectrin Lyon (CTT->TTT; I 43 Leu->Phe). J. Clin. Invest. 86, 548-555.
- NICOLAS G., PEDRONI S., FOURNIER C., GAUTERO H., CRAESCU C., DHERMY D., LECOMTE M. C., 1998. Spectrin self-association site: characterization and study of beta-spectrin mutations associated with hereditary elliptocytosis. Biochem. J. 332, 81-89.
- PERROTTA S., IOLASCON A., DE ANGELIS F., PAGANO L., COLONNA G., CUTILLO S., MIRAGLIA DEL GIUDICE E., 1995. Spectrin Anastasia (alpha I/78): a new spectrin variant (alpha 45 Arg->Thr) with moderate elliptocytogenic potential. Br. J. Haematol. 89, 933-936.
- QUALTIERI A., PASQUA A., BISCONTE M. G., LEPERA M., BRANCATI C., 1997. Spectrin Cosenza: a novel beta chain variant

- associated with *Sp alpha1/74* hereditary elliptocytosis. *Br. J. Haematol.* 97, 273-278.
- RANDON J., BOULANGER L., MARECHAL J., GARBARZ M., VALLIER A., RIBEIRO L., TAMAGNINI G., DHERMY D., DELAUNAY J., 1994. A variant spectrin low-expression allele *aLELY* carrying a hereditary elliptocytosis mutation in codon 28. *Br. J. Haematol.* 88, 534-540.
- RIBEIRO M. L., ALLOISIO N., ALMEIDA H., GOMES C., TEXIER P., LEMOS C., MIMOSO G., MORLE L., BEY-CABET F., RUDIGOZ R. C., DELAUNAY J., TAMAGNINI G., 2000. Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3. *Blood* 96, 1602-1604.
- ROUX A. F., MORLE F., GUETARNI D., COLONNA P., SAHR K., FORGET B. G., DELAUNAY J., GODET J., 1989. Molecular basis of a *sp alpha1/65* hereditary elliptocytosis in North Africa: Insertion of a TTT triplet between codons 147 and 149 in the α -spectrin gene from five unrelated families. *Blood* 73, 2196-2201.
- SAHR K. E., TAYLOR W. T., DANIELS B. P., LUBIN H. L., JAROMIR P., 1994. The structure and organization of the human erythroid anion exchanger gene. *Genomics* 24, 491-501.
- SCHOFIELD A.E., REARDON D.M., TANNER M.J.A., 1992. Defective anion transport activity of the abnormal band 3 in hereditary ovalocytic red blood cells. *Nature* 355, 836-838.
- SILVEIRA P., CYNOWER T., DHERMY D., MOHANDAS N., TCHERNIA G., 1997. Red cell abnormalities in hereditary elliptocytosis and their relevance to variable clinical expression. *Am. J. Clin. Pathol.* 108, 391-399.
- TAKAOKA Y., IDEGUCHI H., MATSUDA M., SAKAMOTO N., TAKEUCHI T., FUKUMAKI Y., 1994. A novel mutation in the erythrocyte protein 4.2 gene of Japanese patients with hereditary spherocytosis (protein 4.2 Fukuoka). *Br. J. Haematol.* 88, 527-533.
- TSE W. T., LUX S. E., 1999. Red blood cell membrane disorders. *Br. J. Haematol.* 104, 2-13.
- WICHTERLE H., PALEK J., HANSPAL M., SMOCKOVA Y., BRABEC V., JAROLIM P., 1995. Two recessively inherited defects of α -spectrin underlie a severe, spectrin-deficient spherocytic hemolytic anemia. *Blood* 86 (Suppl. 1), 468a.
- WILMOTTE R., MARECHAL J., MORLE L., BAKLOUTI F., PHILIPPE N., KASTALLY R., KOTULA L., DELAUNAY J., ALLOISIO N., 1993. Low expression allele *aLELY* of red cell spectrin is associated with mutations in exon 40 (*aV41* polymorphism) and intron 45 and with partial skipping of exon 46. *J. Clin. Invest.* 91, 2091-2096.
- WILMOTTE R., MIRAGLIA DEL GIUDICE E., MARECHAL J., PERROTTA S., DE MATTIA D., DELAUNAY J., IOLASCON A., 1994. A deletional frameshift mutation in spectrin beta-gene associated with hereditary elliptocytosis in spectrin Napoli. *Br. J. Haematol.* 88, 437-439.
- WILMOTTE R., MARECHAL J., DELAUNAY J., 1999. Mutation at position - 12 of intron 45 (*c→t*) plays a prevelant role in the partial skipping of exon 46 from the transcript of allele *alphaLELY* in erythroid cells. *Br. J. Haematol.* 104, 855-859.
- YAWATA Y., KANZAKI A., YAWATA D., DOERFLER W., OZCAN R., EBER S. W., 2000. Characteristic features of the genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population. *Int. J. Hematol.* 71, 118-135.