

Artikelen

Moleculair onderzoek van erythrocytaire cytoskeletafwijkingen

D. ROOS

De stabiliteit van rode bloedcellen berust op de integriteit van het spectrine-actine netwerk en op een goede verbinding van dit cytoskelet met het plasmamembraan. Mutaties die verzwakking van het cytoskelet veroorzaken leiden tot elliptocytvorming en verkorte levensduur van de erythrocyten, een afwijking die bekend staat als *Hereditaire Elliptocytose*. Deze mutaties treden voornamelijk op in α - of β -spectrine, waardoor de koppeling tussen deze twee structurele rode-bloedcel-eiwitten wordt verminderd en permanente celvorming mogelijk wordt. Mutaties die verzwakking van de aanhechting van het membraan aan het cytoskelet veroorzaken leiden tot afsnoeren en verlies van stukjes membraan, waardoor sferocytten ontstaan. De oorzaak van deze vrij veel voorkomende *Hereditaire Sferocytose* is erg heterogeen: mutaties in α - of β -spectrine of in ankyrine kunnen de expressie van spectrine in de cel verminderen en daarmee de afwijking induceren. Bepaling van het spectrinegehalte in de erythrocyten levert een betrouwbare test op voor het vaststellen van *Hereditaire Sferocytose*, waarmee slechts weinig patiënten met deze afwijking worden gemist.

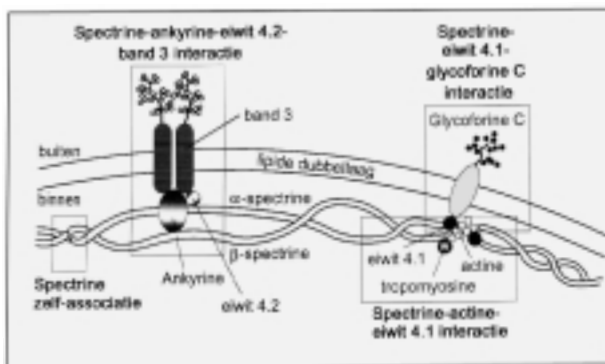
Trefwoorden: Hereditaire Sferocytose; Hereditaire Elliptocytose; Hereditaire Pyropoikilocytose; spectrine; rode bloedcellen; cytoskelet; anemie

Rode bloedcellen (erythrocyten) zijn kernloze cellen, gevuld met hemoglobine, die zuurstof van de longen naar de weefsels vervoeren en kooldioxyde naar de longen retourneren. Om deze functie goed te kunnen vervullen moeten de erythrocyten een grote oppervlakte/inhoud-ratio hebben, voor een goede gasuitwisseling. Dit wordt bereikt door middel van een biconcave vorm, d.w.z. een centraal ingedeukte schijfvorm. Bovendien moeten de erythrocyten vervormbaar zijn, om de grote schuifkrachten in de circulatie te doorstaan en om goed tot in de nauwste haarvaten te kunnen doordringen. Deze laatste eigenschap wordt bereikt door verankering van het spectrine-actine cytoskelet aan een aantal integrale mem-

braaneiwitten. Defecten in het cytoskelet zelf of in de verankering ervan aan het plasmamembraan leiden tot verlies van de biconcave vorm en/of tot verhoogde fragiliteit van de erythrocyten. Als gevolg daarvan lijden patiënten met zulke defecten aan een hemolytische anemie die vaak gekenmerkt wordt door het voorkomen in de circulatie van erythrocyten met een afwijkende vorm. De bekendste erfelijke vormen van deze ziekten zijn *Hereditaire Elliptocytose*, *Hereditaire Pyropoikilocytose* en *Hereditaire Sferocytose*. Dit overzichtartikel beschrijft de moleculaire achtergrond van deze afwijkingen, geeft enkele klinische verschijnselen van de ziekten alsmede de stand van zaken betreffende de laboratoriumdiagnostiek, en besluit met de evaluatie van een zelf ontworpen spectrine-bepaling voor het opsporen van patiënten met *Hereditaire Sferocytose*.

Cytoskelet

Het cytoskelet van de erythrocyt bestaat uit een hexagonaal netwerk van spectrine en actine dat zich dicht onder het membraan van deze cellen bevindt. Spectrine komt in twee vormen voor: α - en β -spectrine, die sterk op elkaar lijken. Het betreft in beide gevallen grote, spiraalvormige moleculen, die om elkaar gewonden zijn tot heterodimere strengen. Deze strengen associëren enerzijds via kop-staartverbindingen met elkaar tot spectrine-tetrameren en anderzijds met actine protofilamenten en tropomyosine tot een zeer stevig en flexibel netwerk (1). Dit netwerk is verbonden met het plasmamembraan via een aantal integrale membraaneiwitten. Figuur 1 laat hiervan



Figuur 1. Schematische voorstelling van de cytoskeletmembraan-interacties binnen de rode bloedcel. Horizontale interacties: spectrine-zelfassociatie tot α - β dimeren en kop-staartkoppeling tot tetrameren, en spectrine-eiwit-4.1-actine-koppeling. Verticale interacties: spectrine-ankyrine-eiwit-4.2-band-3-koppeling, spectrine-eiwit-4.1-glycoforine-C-koppeling en spectrine-fosfolipide-interacties.

Afdeling Experimentele Immunohematologie, Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst van het Nederlandse Rode Kruis, Amsterdam.

Correspondentie: Prof. Dr. D. Roos, Afdeling Experimentele Immunohematologie, Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst van het Nederlandse Rode Kruis, Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam. Ingekomen: 12.12.95

Tabel 1. Structurele rode-bloedcel-membraaneiwwitten

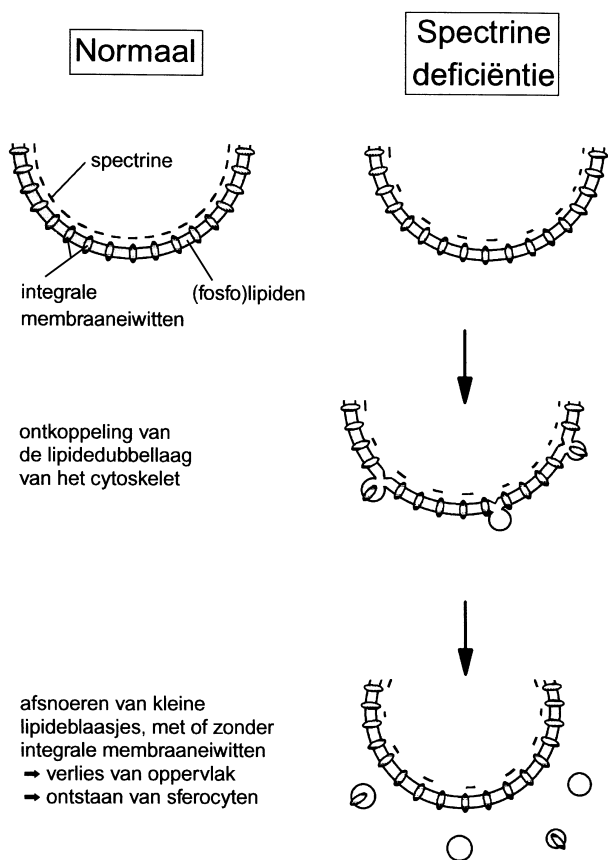
Naam	structuur-eiwit	Mr (kD)	aantal aminozuren per mol	aantal kopieën per cel ($\times 10^3$)
α -spectrine	structuureiwit	240	2429	240
β -spectrine	structuureiwit	220	2137	240
β -actine	structuureiwit	43	375	400-500
Tropomyosine	structuureiwit	27+29	–	100
Ankyrine	koppelingseiwit	210	1881	120
Eiwit-4.1	koppelingseiwit	80	588	200
Eiwit-4.2	koppelingseiwit	72	691	200
Band-3-eiwit	anionuitwisseling	90-100	911	1200
Glycoforine-C	signaaltransductie?	32	128	50-100

een schematisch overzicht zien, en toont tevens dat bij deze interacties een aantal additionele koppelingseiwitten betrokken zijn. Zo koppelt het 4.1-eiwit spectrine aan actine en aan het membraaneiwwit glycoforine-C, en zijn ankyrine en het 4.2-eiwit betrokken bij de koppeling van spectrine aan het membraaneiwwit band 3 (1,2). De namen van de genummerde eiwitten zijn afgeleid van hun positie na SDS-polyacrylamide gelelektroforese van rode-celmembranen. Van de membraaneiwwitten is bekend dat band-3-eiwit als homotetrameer de ionenuitwisseling van chloride

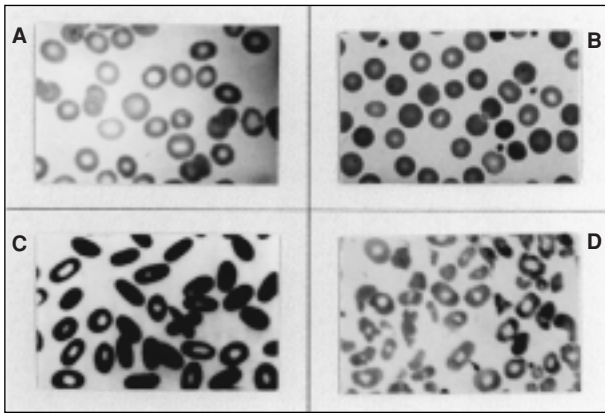
tegen bicarbonaat bevordert, en dat glycoforine-C een sterk geglycosyleerd eiwit is dat mogelijk betrokken is bij het doorgeven van externe signalen naar het inwendige van de cel. Tabel 1 geeft een overzicht van de belangrijkste rode-celeiwwitten die betrokken zijn bij het handhaven van de vorm van deze cellen.

Voor een goed begrip van de gevolgen van structurele afwijkingen in dit netwerk moet onderscheid gemaakt worden in zogenaamde horizontale interacties, d.w.z. interacties binnen het spectrine-actine netwerk zelf, en verticale interacties, d.w.z. interacties tussen het spectrine-actine netwerk en het plasmamembraan (3). De horizontale interacties betreffen de spectrine-zelf-associatie tot α - β dimeren, de kop-staartkoppeling tot tetrameren en de spectrine-eiwit-4.1-associatie die nodig is voor de koppeling aan actine (figuur 1). Deze horizontale interacties (in het vlak van het membraan) zijn van essentieel belang voor de opbouw van het netwerk en het handhaven daarvan tijdens vervorming van de rode cel. De verticale interacties betreffen de associatie van spectrine met ankyrine, het 4.2-eiwit en het band-3-eiwit, de associatie van spectrine met het 4.1-eiwit en glycoforine-C, en de (zwakke) ladingsinteractie tussen spectrine en de fosfolipiden van het plasmamembraan (figuur 1). Deze verticale interacties (loodrecht op het vlak van het membraan) stabiliseren het plasmamembraan en voorkomen dat dit loslaat van het cytoskelet.

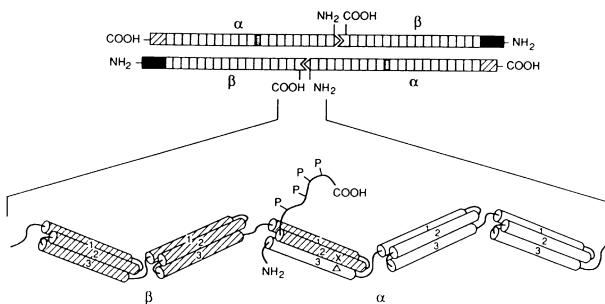
Algemeen wordt thans aangenomen dat Hereditaire Elliptocytose (HE) en het daarmee verwante Hereditaire Pyropoikilocytose (HPP) ontstaan als gevolg van afwijkingen die leiden tot verstoring van de horizontale interacties (3). Deze afwijkingen hebben tot gevolg dat de spectrine-actine verbindingen verstoord worden onder druk van de schuifkrachten in snel stromend bloed, dat nieuwe, afwijkende connecties binnen het netwerk tot stand komen, en dat daardoor permanente celvervorming optreedt. Bij milde uitingen van HE blijft dit beperkt tot het vormen van elliptocytos, bij ernstiger vormen van HE en bij HPP treedt ook fragmentatie van de erythrocyten op. Afwijkingen die leiden tot verstoring van verticale interacties zijn daarentegen oorzaak van Hereditaire Sferocytose (HS). Deze laatste afwijkingen verzwakken de binding van het plasmamembraan aan het cytoskelet



Figuur 2. Het ontstaan van sferocytos bij gestoorde verticale cytoskelet-membraan-interacties. Bij gebrek aan voldoende interacties tussen integrale membraaneiwwitten en het cytoskelet zullen stukjes van de lipidedubbellaag loslaten van het onderliggende cytoskelet en afsnoeren in de vorm van spectrine-vrije blaasjes van 0,2-0,5 micrometer in diameter. Deze blaasjes kunnen integrale membraaneiwwitten bevatten.



Figuur 3. Perifere bloedcelstrijkes, gekleurd volgens May-Grünwald/Giemsa en gefotografeerd bij een 400 x vergroting. A: gezonde donor; B: patiënt met Hereditaire Sferocytose (spectrinegehalte 70% van normaal), het preparaat bevat sferocytten, microsferocytten en normale cellen; C: patiënt met Hereditaire Elliptocytose, vrijwel alle cellen zijn ellipsvormig; D: patiënt met vermoedelijk Hereditaire Pyropoikilocytose (spectrinegehalte 53% van normaal), let op de vele microcyten en bizar gevormde poikilocytten.



Figuur 4. Model voor de interacties tussen de α - en β -spectrineketens. Zowel α - als β -spectrine is opgebouwd uit repeterende domeinen van 106 aminozuren die elk uit drie geassocieerde helices bestaan. De kop-staart-koppeling wordt gevormd door de N-terminale α -spectrine helix met de twee C-terminale helices van β -spectrine. De meeste mutaties die tot verstoring van deze kop-staart-koppeling leiden worden gevonden in het gecombineerde domein of in nabij gelegen α -spectrinedomeinen.

en leiden tot het uitstulpen en afsnoeren van stukjes membraan (1,3), vaak met inbegrip van structurele membraaneiwitten (figuur 2). Als gevolg daarvan vermindert de oppervlakte/inhoud-ratio van de cellen, kan de biconcave vorm van de cellen niet langer gehandhaafd blijven en ontstaan kleine, ronde cellen (sferocytten) die weinig flexibel zijn en daarom in de milt weggevangen worden.

Hereditaire Elliptocytose

Hereditaire Elliptocytose is een ziekte die betrekkelijk weinig voorkomt in de westerse wereld. In West-Afrika is de prevalentie echter aanzienlijk hoger (0,6% of meer), waarschijnlijk omdat HE elliptocytten wat minder vatbaar zijn voor malaria-infectie (4). Aangezien de moleculaire oorzaak van HE zeer divers is (zie onder), is ook de klinische expressie van de ziekte zeer variabel. Echter, ook binnen families met dezelfde genetische afwijking kunnen de rode-celmorfologie en de klinische symptomen aanzienlijk verschillen van persoon tot persoon. Bij de milde vor-

men van HE zijn de patiënten gewoonlijk asymptomatisch of vertonen een lichte, goed gecompenseerde hemolyse, die kan verergeren in combinatie met vitamine-B12-deficiëntie, infecties, transplantaatafstoting, gedissemineerde intravasculaire stolling of trombotische trombocytopenische purpura (5). Bij ernstiger vormen van HE kan een chronische symptomatische hemolyse optreden die splenectomie noodzakelijk maakt. Deze gevallen van HE zijn vaak het gevolg van homozygote of dubbel heterozygote afwijkingen die in geval van enkele heterozygotie onopgemerkt blijven. Milde vormen van HE worden vaak veroorzaakt door heterozygote afwijkingen die in geval van homozygotie of dubbele heterozygotie lethaal zijn.

De diagnose HE is vaak moeilijk te stellen. Wanneer elliptocytten in het bloedbeeld aangetroffen worden (figuur 3), dienen andere oorzaken daarvan dan HE uitgesloten te worden, zoals ijzer-, foliumzuur- of vitamine-B12-deficiënties, myelodysplasie, myelofibroze en thalassemie (5). Onder Zuidoost-Aziaten komt bovendien een erfelijke afwijking voor die gekenmerkt wordt door het optreden van stabiele ovalocytten, minder uitgerekt dan elliptocytten, en zonder hemolyse (6). Bij de ernstige vormen van HE worden in het bloedbeeld ook erythrocyten met onregelmatige vormen (poikilocytten) en rode-celfragmenten gevonden. In deze gevallen is de osmotische resistentie van de erythrocyten verminderd.

De meest voorkomende oorzaken van HE zijn defecten in de kop-staartkoppeling van α - β -spectrinedimeren ten gevolge van mutaties in het aminoterminele gedeelte van α -spectrine of in het carboxyterminale gedeelte van β -spectrine (figuur 4) (7). Soms beïnvloeden mutaties in dit gebied ook de heterodimeervorming van spectrine. Ook zijn enkele mutaties gevonden in andere domeinen van α -spectrine, met soortgelijke gevolgen. In zeldzame gevallen blijken mutaties die de synthese of het spectrine-bindingsdomein van het 4.1-eiwit beïnvloeden oorzaak van HE te zijn (tabel 2) (2). Als gevolg hiervan wordt bij deze patiënten tevens een partiële spectrine-deficiëntie gevonden. Tenslotte zijn HE-patiënten beschreven waarbij glycoforine-C verminderd aanwezig is (8). In dit laatste geval beperkt de afwijking zich tot de vorming van stabiele elliptocytten, zonder fragmentvorming of hemolyse. Eigenlijk kan deze afwijking ook gezien worden als een verstoring van verticale interacties, omdat glycoforine-C dient als aanhechtingsplaats van het 4.1-eiwit aan de membraan.

Tabel 2. Moleculaire oorzaken van Hereditaire Elliptocytose

- | | |
|----|--|
| 1. | Gestoorde α - β -spectrine-kop-staart-interacties
t.g.v. mutaties in de N-terminus van α -spectrine of
t.g.v. mutaties in de C-terminus van β -spectrine |
| 2. | Gestoorde α - β -spectrine-dimeervorming
t.g.v. mutaties in bovenstaande en andere regio's van
α -spectrine |
| 3. | Eiwit-4.1-mutaties die spectrinebinding beïnvloeden
(zeldzaam, leiden tot partiële spectrinedeficiëntie) |
| 4. | Glycoforine-C-mutaties die eiwit-4.1-binding beïnvloeden
(zeldzaam, leiden alleen tot defect in morfologie,
niet tot defect in erythrocytenstabiliteit) |

Een goede screeningstest voor de diagnostiek van HE is een SDS-PAGE van rode-celmembranen (2,7). Soms worden hierbij abnormale eiwitbanden gevonden die met behulp van specifieke antistoffen op blots geïdentificeerd kunnen worden als verkorte vormen van α - of β -spectrine, of als een abnormale vorm van eiwit-4.1. Met behulp van perijoodzuur Schiff-reagens kan een eventuele afwezigheid van glycoforine-C gedetecteerd worden. Nader onderzoek vindt plaats door de ratio dimeer/tetrameer-spectrine te bepalen (7). Hiertoe wordt bij 0°C een ruw spectrine-extract van erythrocytenmembranen in een buffer met lage ionsterkte gemaakt en geanalyseerd middels niet-denaturerende gelelektroforese. Afwijkingen in de kop-staartkoppeling leiden tot een verhoogd percentage spectrine-dimeren (normaal circa 5%). Tenslotte kan op eiwitniveau onderzocht worden of mutaties in α - of β -spectrine de oorzaak zijn van de verminderde tetrameervorming. Gebleken is namelijk dat praktisch al zulke mutaties aanleiding geven tot abnormale splitsingsplaatsen voor trypsine (7). Met behulp van twee-dimensionale scheiding van de trypsinefragmenten kan direct gezien worden of het normale 80-kD α -I fragment van α -spectrine veranderd is. Is dat zo, dan kan met behulp van moleculair-biologische methoden nadere specificatie van de mutatie plaatsvinden.

Hereditaire Pyropoikilocytose

Hereditaire Pyropoikilocytose (HPP) is een zeldzame afwijking die nauw verwant is met HE (3). Patiënten met HPP lijden aan ernstige hemolytische anemie met opvallend kleine, ronde of onregelmatig gevormde en gefragmenteerde erythrocyten (figuur 3) die osmotisch instabiel zijn. De naam van de ziekte is afgeleid van de verhoogde thermische instabiliteit van deze cellen (9). Genetisch gezien zijn patiënten met HPP te beschouwen als dubbel heterozygoten voor een α -spectrine-mutatie die (in de homozygote vorm) tot HE leidt en een tweede HE spectrinemutatie of een synthesesdefect van α -spectrine (3). Elk van deze mutaties afzonderlijk levert in de heterozygote vorm geen of nauwelijks problemen op, omdat α -spectrine normaliter in drie- tot viervoudige overmaat over β -spectrine wordt aangemaakt. Aangezien gemuteerd α -spectrine gewoonlijk instabiel is, ontstaat in combinatie een partiële spectrinedeficiëntie en een spectrine-kop-staart koppelingsdefect, met ernstige klinische consequenties.

Hereditaire Sferocytose

Hereditaire Sferocytose (HS) is een veelvoorkomende erfelijke hemolytische anemie met een prevalentie in de Noordepartse bevolking van tenminste 1:5000 (3,10). Evenals HE is ook HS een zeer heterogeen syndroom voor wat betreft klinische expressie, rode-celmorfologie en oorzakelijke afwijkingen. In ongeveer de helft van de individuen met bewezen HS mutaties worden tekenen van hemolytische anemie gezien, variërend van nauwelijks waarneembaar tot duidelijk verlaagde hematocriet en haptoglobine en verhoogde reticulocytengetallen, met aanvallen van geelzucht, splenomegalie, galstenen en been-

zweren als complicaties (11). Ter beteugeling van de anemie wordt soms splenectomie toegepast. Binnen families met HS is de klinische expressie van de ziekte vrij homogeen, maar tussen families zeer variabel.

De kenmerkende kleine, ronde erythrocyten (figuur 3) worden lang niet altijd waargenomen en kunnen ook het gevolg zijn van "Heinz Body"-anemie of van immunhemolytische anemie ten gevolge van "warme" IgG antistoffen (3). In het eerste geval treedt "Heinz Body"-binding aan band-3-moleculen op, waardoor de band-3-eiwitten geconcentreerd worden op het celoppervlak en autologe IgG-antistoffen gaan binden. In beide gevallen worden vervolgens de antistoffen aan Fc-receptoren van miltmacrofagen gebonden, waarna verwijdering van erythrocytaire membraaneiwitten en lipiden volgt.

De osmotische stabiliteit van HS erythrocyten is altijd verminderd, ten gevolge van de afgenomen oppervlakte/inhoud-ratio van deze cellen. Helaas is ook deze test niet specifiek voor HS, omdat verminderde osmotische resistentie ook voorkomt bij patiënten met immunhemolytische anemie, "Heinz Body"-anemie, ijzerebreksanemie, chronische leukemie of chronische hemodialyse en bij zwangeren (11). De gevoeligheid van de osmotische resistentiebepaling is verbeterd door gebruik te maken van erythrocyten die geïncubeerd zijn onder condities van glucosegebrek, waardoor het membraanverlies versterkt wordt. Ook andere verbeteringen in de gevoeligheid zijn toegepast, zoals de bepaling van de zure-glycerol-lystijd (12). Niettemin blijft het probleem bestaan dat geen van deze testen echt specifiek is voor HS.

De moleculaire defecten die tot HS leiden zijn zeer divers, met als enig gemeenschappelijk kenmerk dat zij alle een verminderde membraanstabieliteit tot gevolg hebben. In bijna alle gevallen wordt dit veroorzaakt door een verminderde hoeveelheid spectrine in de cellen, via een direct synthesesdefect of een verlaagde intrinsieke stabiliteit van gemuteerd spectrine. Ook kan een lage spectrine-expressie het gevolg zijn van verminderde aanhechting van spectrine aan andere erythrocyteneiwitten, hetzij omdat spectrine gemuteerd is, hetzij omdat andere eiwitten (ankyrine, eiwit-4.2, band-3) gemuteerd zijn (tabel 3). Ongekopeld spectrine wordt versneld afgebroken.

Tabel 3. Moleculaire oorzaken van Hereditaire Sferocytose

1. α -spectrine-deficiëntie:	recessief, zeldzaam, nog niet gedefinieerd
2. β -spectrine-deficiëntie:	dominant, veel voorkomend, nog niet gedefinieerd
3. Ankyrine-deficiëntie:	dominant (nonsense, frameshift) of recessief (promotormutaties), veel voorkomend
4. Band-3-deficiëntie	dominant, zeldzaam, ten dele gedefinieerd
5. Eiwit-4.2-deficiëntie	recessief, zeldzaam buiten Japan, ten dele gedefinieerd

In enkele patiënten is een geïsoleerde partiële spectrinedeficiëntie gevonden waarvan is vastgesteld dat dit het gevolg is van verminderde synthese of verminderde stabiliteit van α -spectrine (3). Het gaat hierbij altijd om een recessieve aandoening, omdat - zoals bovenvermeld - α -spectrine in overmaat wordt aangemaakt. In de homozygote of dubbel heterozygote toestand leidt dit natuurlijk tot een sterk verminderde expressie van α -spectrine, en - wegens gebrek aan mogelijkheid tot heterodimeervorming - ook van β -spectrine. In vele andere HS-patiënten lijkt de geïsoleerde partiële spectrine-deficiëntie het gevolg te zijn van een mutatie in het β -spectrine, wegens het dominante karakter van de aandoening (3).

Veelvuldig wordt een partiële spectrinedeficiëntie in combinatie met een partiële ankyrinedeficiëntie gevonden (3,13). In enkele gevallen is daarbij het primaire defect geïdentificeerd in het ankyrine-gen (13). Omdat ankyrine het belangrijkste aanhechtingseiwit voor spectrine aan het membraan is, leidt deficiëntie van ankyrine tot een proportionele vermindering van spectrine-expressie in de cel, ondanks een normale synthese van spectrine. Deze afwijking kan zowel dominant (in geval van "nonsense"- of "frameshift"-mutaties) als recessief (in geval van promotormutaties) tot expressie komen (S.W. Eber, pers. med.). In het eerste geval is alle ankyrine gecodeerd door het gemuteerde allel instabiel of inactief, in het tweede geval levert het gemuteerde allel nog enig normaal ankyrine.

In sommige gevallen van HS worden nog andere partiële eiwitdeficiënties gevonden, namelijk van band-3 of van eiwit-4.2. Het primaire defect en het oorzakelijk verband met HS is daarbij vaak onduidelijk. In geval van band-3-deficiëntie zijn er aanwijzingen dat dit eiwit versneld losgelaten wordt door de HS-erythrocyten, mogelijk als gevolg van verminderde binding van band-3 aan ankyrine of als gevolg van verminderde band-3-tetrameervorming (14). In Japan wordt veelvuldig eiwit-4.2-deficiëntie bij HS gevonden, waarbij het primaire defect in het 4.2-gen is gelegen (15). Buiten Japan komt dit fenotype slechts sporadisch voor, mogelijk dan als gevolg van mutaties in het band-3-gen. Aangezien zowel bij band-3-deficiëntie als bij eiwit-4.2-deficiëntie de expressie van spectrine normaal is, wordt aangenomen dat de koppeling van het membraan aan spectrine in deze gevallen onvoldoende is om lipideverlies te voorkomen.

Ook bij HS vormt SDS-PAGE van erythrocytenmembraaneiwwitten een screeningstest voor het vaststellen van HS en van het primaire defect (3). Kwantificering van de eiwwitten is echter lastig, omdat normalisering op band-3-gehalte tot onjuiste conclusies kan leiden daar band-3 met de membraanblaasjes mee afgesnoerd kan worden. Bovendien is ankyrine slechts in vrij geringe hoeveelheden aanwezig. Beter is daarom de gehalten aan deze eiwwitten rechtstreeks met behulp van specifieke immunologische bepalingen te meten. Verder onderzoek naar de oorzakelijke mutaties wordt bemoeilijkt door de grootte van de betrokken genen, en vergt daarom zowel RFLP-linkage- als SSCP- of DGGE-screeningstechnieken.

Immunologische spectrinebepaling

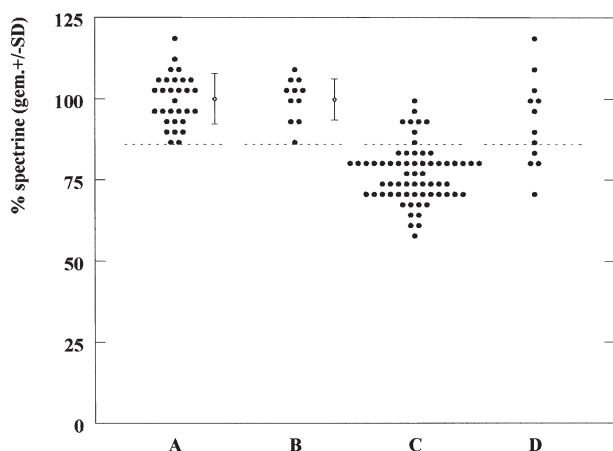
Gezien de hoge incidentie van Hereditaire Sferocytose en de problemen bij het eenduidig stellen van de diagnose op grond van klinische of hematologische waarnemingen, hebben wij besloten op het CLB in Amsterdam een specifieke bepaling voor spectrine op te zetten. Op basis van literatuurgegevens moet verwacht worden dat hiermee bij ongeveer 90% van de patiënten met HS, bij patiënten met HE ten gevolge van een eiwit-4.1-deficiëntie en bij patiënten met HPP een verlaagde waarde gevonden zal worden (3). Aangezien deze laatste twee afwijkingen zeer zeldzaam zijn kan deze test dus toch grote waarde hebben in de differentiaaldiagnose van erythrocytaire cytoskeletafwijkingen. In samenwerking met de Afdeling Kindergeneeskunde van de Vrije Universiteit en het Laboratorium van het Catharina Ziekenhuis te Eindhoven is deze test gevalideerd bij een aantal patiënten met verschillende erythrocytaire afwijkingen.

Begonnen werd met het isoleren van spectrine door extractie van erythrocytenmembranen met EDTA in een buffer met lage ionsterkte en zuivering van spectrinedimeren met behulp van gelfiltratie. Vervolgens werden hiertegen polyclonale antistoffen opgewekt in een konijn, die gezuiverd werden door middel van affiniteitschromatografie over geïmmobiliseerd spectrine en elutie bij lage pH. Het antiserum werd getest op een eiwitblot van erythrocytenlysaat na SDS-PAGE. Hieruit bleek dat de antistoffen specifiek reageerden met eiwwitten van 220 en 240 kD, overeenkomend met de schijnbare molecuulmassa's van respectievelijk β - en α -spectrine (16). De antistoffen werden gelabeld met 125 Jodium.

Voor de bepaling van spectrine werd erythrocytenlysaat in verschillende verdunningen op nitrocellulose geblot. De blot werd vervolgens verzadigd met caseïne en daarna overnacht geïncubeerd met het gelabelde antiserum. Vrij en aspecifiek gebonden antistoffen werden verwijderd door wassen, en de spotjes werden uitgestanst en geteld.

Er werd een lineair verband gevonden tussen de hoeveelheid erythrocytenlysaat en de radioactiviteit die werd gebonden, tot tien maal de hoeveelheid erythrocyten die gewoonlijk werd gebruikt (16). Plasma-eiwwitten en leukocyten gaven geen verhoging van de achtergrondwaarden. Zuiver spectrine, ingevroren bewaard, kon niet als standaard worden gebruikt, omdat het aantal antigene determinanten daarvan terugliep in de tijd. Dit werd ook waargenomen bij ingevroren erythrocytenextracten. Wij besloten daarom bij elke spectrinebepaling in patiëntenmonsters ook monsters van gezonde mensen mee te nemen, en de hoeveelheid spectrine uit te drukken per erythrocyt.

Figuur 5B laat zien dat de intra-donorvariatie een SD had van 6,3% (n=11); de SD van de inter-donorvariatie was 6,8% (n=12). De gemeten variatie wordt dus voornamelijk veroorzaakt door de techniek van de bepaling, en de hoeveelheid spectrine per erythrocyt kan als relatief constant verondersteld worden. Patiënten met minder dan 86% (ruim twee maal de SD) van de spectrinewaarden van gezonde donors op dezelfde blot werden afwijkend genoemd.



Figuur 5. Spectrinegehalten in erythrocyten van verschillende groepen donors. De resultaten zijn uitgedrukt als percentage van de gemiddelde waarde gevonden bij 30 gezonde bloed-donors. A: 30 gezonde donors (met gemiddelde \pm standaarddeviatie); B: één (gezonde) donor, in elfvoud gemeten in één test (met gemiddelde \pm standaarddeviatie); C: 64 patiënten verdacht van HS; D: 12 patiënten met hemolytische anemie en verlaagde osmotische resistentie. Te zien is dat het grootste deel van de HS-patiënten duidelijk is te onderscheiden van gezonde personen. De niet-gedefinieerde groep anemische patiënten vertoont - ondanks de verlaagde osmotische resistentie - grote overlap met zowel de groep gezonde donors als met de groep HS-patiënten. Overgenomen uit ref. 16, met toestemming van het Ned Tijdschr Geneesk.

Bij 64 klinisch gediagnostiseerde HS-patiënten werd met deze test het spectrinegehalte in de erythrocyten gemeten (figuur 5C). HS werd vastgesteld op basis van congenitale, vaak familiale anemie, verlaagde osmotische resistentie, verhoogd aantal reticulocyten, en soms splenomegalie en aanvallen van geelzucht. Sferocyten waren vaak niet waarneembaar. Bij 56 (88%) patiënten werd een verlaagd gehalte aan spectrine gevonden; 10 van deze mensen hadden een milt-extirpatie ondergaan. Bij 8 patiënten (12%) werd een normaal spectrinegehalte gevonden; dit kan patiënten betreffen die ten onrechte van HS werden verdacht of het kan HS-patiënten betreffen met mutaties die niet tot een spectrinedeficiëntie leiden.

In een groep willekeurige patiënten ($n=12$) met hemolytische anemie en verlaagde osmotische resistentie van de erythrocyten (niet a priori verdacht van HS) werd bij slechts 4 individuen (33%) een verlaagd spectrinegehalte gevonden (fig. 5). Dit benadrukt dat de osmotische resistentiebepaling geen goed criterium is voor het onderscheiden van HS-patiënten. Omgekeerd kan de osmotische resistentiebepaling ook HS-patiënten missen, bijvoorbeeld bij pasgeborenen of bij patiënten met een combinatie van HS en thalassemie, omdat daarbij de verlaging in de osmotische resistentie door HS gecompenseerd wordt door een verhoging die altijd gevonden wordt in jonge of in thalassemische cellen. Deze bezwaren gelden niet voor de spectrinebepaling: wij vonden normale spectrinewaarden in de erythrocyten van thalassemiepatiënten, normale tot licht-verhoogde waarden bij gezonde pasgeborenen en een verlaagde waarde bij een pasgeboren kind van een moeder met HS (16).

In de literatuur wordt een directe correlatie gelegd

tussen de hoeveelheid spectrine in de erythrocyten en de ernst van het klinische beeld (17,18). Inderdaad kunnen groepen HS-patiënten met een mild of ernstig klinisch beeld op grond van de gemiddelde hoeveelheid spectrine van elkaar worden onderscheiden. Voor individuele patiënten is dit echter niet mogelijk. Uit onze eigen waarnemingen blijkt dat een zeer laag spectrinegehalte ($<70\%$ van normaal) overeenkomt met ernstige klinische klachten. Bij de lichtere spectrineverlagingen was het klinisch beeld echter wisselend.

Resumerend kunnen wij stellen dat de spectrinebepaling een belangrijk hulpmiddel is voor het vaststellen van Hereditaire Sferocytose. Bij patiënten die op klinische gronden worden verdacht van HS maar waarbij geen afwijking in de osmotische resistentiebepaling wordt gevonden, kan de spectrinebepaling vaak uitsluitel geven. Is het spectrinegehalte verlaagd, dan lijdt de patiënt aan HS of aan een zeldzame andere cytoskeletafwijking in de erythrocyt; is het spectrinegehalte normaal, dan bestaat theoretisch nog de mogelijkheid dat het een HS-patiënt betreft met een mutatie die spectrine niet beïnvloedt en waarbij de osmotische resistentieverlaging door HS gecompenseerd wordt door andere oorzaken. Omgekeerd, als de osmotische resistentie verlaagd is, de Coombstest negatief en het spectrinegehalte normaal, dan kan het een HS-patiënt betreffen, maar dan dient eerst uitgesloten te worden dat er andere oorzaken zijn voor de verlaagde osmotische resistentie.

Dankbetuiging

De spectrinebepaling werd opgezet door Dr. B.G.J.M. Bolscher, Ing. R. van Zwieten, B. Jahangier en E. Clifford (CLB, Amsterdam). De validatie van de bepaling werd uitgevoerd in samenwerking met Drs. A.Y.N. Schouten-van Meeteren, kinderarts, Academisch Ziekenhuis van de Vrije Universiteit, Amsterdam, en Dr. J.J.M.L. Hoffmann, klinisch-chemicus, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven. Figuur 3 kwam tot stand met medewerking van H. Vuil.

Literatuur

1. Liu S-C, Derick LH. Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton. Structure-function relationships. *Semin Hematol* 1992; 29: 231-243.
2. Conboy JG. Structure, function and molecular genetics of erythroid membrane skeletal protein 4.1 in normal and abnormal red blood cells. *Semin Hematol* 1993; 30: 58-73.
3. Palek J, Jarolim P. Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. *Semin Hematol* 1993; 30: 249-283.
4. Facer CA. Malaria, hereditary elliptocytosis, and pyropoikilocytosis. *Lancet* 1989; 1: 8643 (letter).
5. Palek J. Hereditary elliptocytosis and related disorders. *Clin Haematol* 1985; 14: 45-87.
6. Nurse GT, Coetzer TL, Palek J. The elliptocytoses, ovalocytosis and related disorders. *Baillières Clin Haematol* 1992; 5: 187-207.
7. Delaunay J, Dhermy D. Mutations involving the spectrin heterodimer contact site: Clinical expression and alterations in specific function. *Semin Hematol* 1993; 30: 21-33.
8. Cartron J-P, Le Van Kim C, Colin Y. Glycophorin C and related glycoproteins. Structure, function and regulation. *Semin Hematol* 1993; 30: 152-168.
9. 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.

10. Morton NE, MacKinney AA, Kosower N, Schilling RF, Gray MP. Genetics of spherocytosis. *Am J Hum Genet* 1962; 14: 170-184.
11. Becker PS, Lux SE. Disorders of the red cell membrane. In: *Hematology of Infancy and Childhood*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992; 1: 529-633.
12. Bux MJL, Breed WPM, Hoffmann JJML. Comparison of acidified glycerol lysis test, Pink test and osmotic fragility test in hereditary spherocytosis: effect of incubation. *Eur J Haematol* 1988; 40: 227-231.
13. Hanspal M, Yoon S-H, Yu H, Hanspal JS, Lambert S, Palek J, Prchal JT. Molecular basis of spectrin and ankyrin deficiencies in severe hereditary spherocytosis: Evidence implicating a primary defect of ankyrin. *Blood* 1991; 77: 165-173.
14. Jarolim P, Ruff P, Coetzer TL, Prchal JT, Ballas SK, Poon M-C, Brabec V, Palek. A subset of patients with dominantly inherited hereditary spherocytosis has a marked deficiency of the band 3 protein. *Blood* 1990; 76: 37a (suppl 1) (abstr).
15. Bouhassira EE, Schwartz RS, Yawata Y, Ata K, Kanzaki A, Qiu JJ-H, Nagel RL, Rybicki AC. An alanine-to-threonine substitution in protein 4.2 cDNA associated with a Japanese form of hereditary hemolytic anemia (protein 4.2^{NIPPON}). *Blood* 1992; 79: 1846-1854.
16. Van Zwieten R, Bolscher B, Veerman AJP, Hoffmann JJ, Roos D. Bepaling van het spectrinegehalte in erythrocyten: een belangrijk hulpmiddel bij de diagnostiek van Hereditaire Sferocytose. *Ned Tijdschr Geneesk* 1995; 139: 2256-2261.
17. Agre P, Casella JF, Zinkham WH, McMillan C, Bennett V. Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. *Nature* 1985; 314: 380-383.
18. Eber SW, Ambrust R, Schröter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: Relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility, and autohemolysis. *J Pediatrics* 1990; 117: 409-416.

Summary

Roos D. Molecular diagnostics of erythrocytic cytoskeleton disorders. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 120-126.

For the stability of the red blood cell, the integrity of the spectrin-actin network as well as the connection of this cytoskeleton to the plasma membrane is essential. Mutations that weaken the cytoskeleton cause elliptocyte formation and decreased survival of the erythrocytes, a condition known as Hereditary Elliptocytosis. These mutations are found primarily in α - and β -spectrin, and affect the head-tail coupling of these structural erythrocyte proteins. Permanent cell deformation will then occur. Mutations that weaken the interaction between the plasma membrane and the cytoskeleton lead to formation and loss of phospholipid microvesicles, thus causing formation of spherocytes. The molecular origin of this condition of Hereditary Spherocytosis is strongly heterogeneous: mutations in α - or β -spectrin or in ankyrin can lead to decreased expression of spectrin in the cell, thus inducing the disease. Determination of the erythrocyte spectrin content is a reliable test for the diagnosis of Hereditary Spherocytosis, with only few patients being missed.

Key-words: Hereditary Spherocytosis, Hereditary Elliptocytosis, Hereditary Pyropoikilocytosis, spectrin, red blood cells, cytoskeleton, anemia.

Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 126-131

Computer-aided parenteral nutrition in intensive care: the role of the clinical chemist in the teaching and solution of the problem

A. JABOR¹, A. KAZDA² and P. WAGNER³

Clinical chemists and pharmacists are - among other specialists - members of nutritional support teams in many hospitals throughout the world. We describe a multilevel system for computer-aided parenteral nutrition. The aim of the system is to support the work of the clinical chemist in nutritional support teams, and to serve as an educational tool. Common knowledge is transformed into supporting programs and educational systems within one logical frame. The problem of computer-aided nutrition is structured into several levels, the results of which are supervised

by medically educated clinical chemists serving as a human interface. The first level of the system comprises the computer-assisted interpretation of laboratory data in the areas with complicated pathophysiology. At the second level, the computer-aided proposal of nutritional components is modelled, and the result is checked by the physician. Then the automatic system based on the SIMPLEX method converts the proposal of nutritional components into the optimal set of nutritional products, i.e. computer-modelled optimal prescription. This step is again reviewed (and/or corrected, if necessary) by the physician. The result of the final level is time-specification for the application of the nutritional products (flasks or bags). Every level is supplied with an educational support system, in which all steps are properly described and elucidated. The system is incorporated into the information system of intensive care units.

Department of clinical biochemistry, Hospital Kladno¹, Kladno, Czech Republic; Chair of clinical biochemistry, Postgraduate medical school², Prague, Czech Republic and Department of clinical biochemistry³, University Hospital Bulovka, Prague, Czech Republic

Address Correspondence to: Dr. Antonín Jabor, Department of clinical biochemistry, Hospital Kladno, CZ-27259 Kladno, Czech Republic
Received: 04.10.95

Keywords: computer-aided nutrition; goal programming; education; computer-aided interpretation