

Een familie met hereditaire elliptocytose: meer klinische klachten door een derde mutatie in Exon 6 van het α -spectrine gen

J. POSTMA¹, A. SPAANS¹, M. HARDEMAN², M. VEUGER¹ en P. FRANCK¹

Het membraan van erythrocyten is opgebouwd uit een dubbele laag van fosfolipiden en cholesterol waarin integrale eiwitten zijn opgenomen. Dit membraan wordt ondersteund door een zogenaamd membraanskelet. Het membraanskelet is niet alleen verantwoordelijk voor de stevigheid maar ook voor de mate van vervormbaarheid van de cellen. De erythrocyt heeft in de grote vaten een karakteristieke discoïde vorm. Een groot deel van zijn bestaan bevindt de cel zich echter in haarvaten met een diameter die een derde is van de cel zelf. De flexibiliteit van het membraanskelet is dan ook groot om deze reversibele celvorming mogelijk te maken. Het membraanskelet is samengesteld uit verschillende eiwitten die aan de binnenzijde van het membraan een netwerk vormen. Spectrine is hiervan het meest prominente eiwit. Het is opgebouwd uit twee langgestrekte moleculen, α en β spectrine, die als een dimeer in elkaar zijn gevlochten. De dimeren gaan via een kopstaart interactie een onderlinge binding aan, waardoor een tetrameer ontstaat. Deze tetrameren zijn op hun beurt weer gekoppeld aan enerzijds het actine / tropomyosine / glycoforine C complex en anderzijds het band 3, ankyrine en band 4.2 complex. Het netwerk is aan de membraan fosfolipiden bilaag gekoppeld door de integrale membraaneiwitten band 3 en glycoforine C (1).

Hereditaire elliptocytose (HE, figuur 1) ontstaat voornamelijk door mutaties in het α spectrine-gen, resulterend in een elliptocytair celvorm met een verminderde vervormbaarheid en verkorte levensduur. De meeste mutaties bij HE zijn gelegen in de kop-staart koppeling binnen de α en β spectrine dimeren. Heterozygote HE mutaties geven geen of nauwelijks klinische klachten aangezien α spectrine in een viervoudige overmaat wordt gesynthetiseerd ten opzichte van β spectrine. Bij heterozygote aanwezigheid is er genoeg normaal wild type α spectrine (wt α) voorhanden, dat wordt ingebouwd in het membraanskelet om een stabiele cel te vormen met een relatief normale levensduur.

Bij Hereditaire Pyropoikilocytose (HPP, figuur 1) met zijn bizarre vormen is er naast de HE mutatie nog een tweede mutatie in het α spectrine aanwezig. Deze mutatie heet Lely (Low expression Lyon). Hierbij ontstaat een synthesesdefect van het α spectrine en wordt minder bruikbaar eiwit aangemaakt (3). Als de Lely

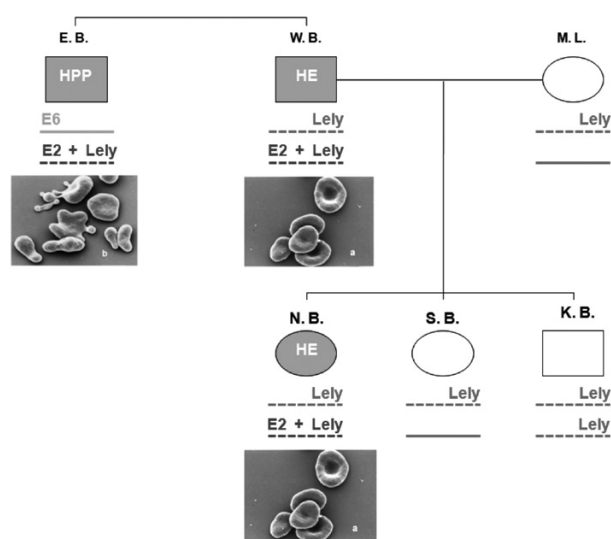
mutatie in trans op het gen ligt t.o.v. de heterozygote HE mutatie dan is de expressie van het wt α spectrine eiwit verminderd. Hierdoor zal de inbouw van het afwijkende HE α spectrine in het membraanskelet op de voorgrond treden. De relatief versterkte expressie van het HE gemuteerde α spectrine resulteert in het instabiele membraanskelet bij HPP. De instabiliteit is zo groot dat het membraanskelet desintegreert. Het gevolg hiervan is een afsplitsing van grote en kleine fragmenten van de cel en een bonte verzameling van poikilocyten (figuur 1).

We onderzochten een familie waarin zowel HE als HPP werd aangetroffen. De expressie van de verschillende HE mutaties en Lely mutatie leverde een onverwacht resultaat en verklaring voor de gevonden erfelijke vormveranderingen van de rode bloedcellen in deze familie.

Methode

De vervormbaarheid van erythrocyten (2) wordt gemeten met behulp van de ektacytometer LoRRca Maxsis Osmoscan van Mechatronics (Hoorn).

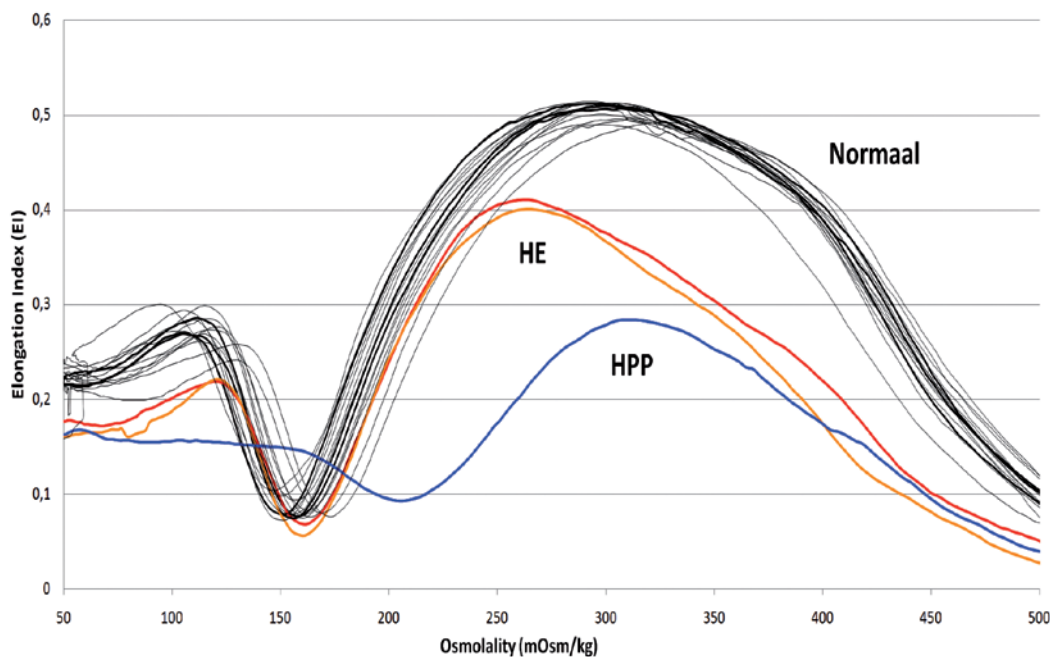
HE- en Lely mutatieonderzoek van het α -spectrine gen is uitgevoerd met behulp van moleculair biologische technieken. DNA is geïsoleerd uit buffy coat / witte bloedcellen afkomstig uit perifeer bloed geïsoleerd met behulp van QIAGEN DNA isolatie kit (Venlo).



Figuur 1. Aanwezigheid van drie mutaties in α spectrine binnen de familie B., die leiden tot Hereditary Elliptocytose (HE) of Hereditary Pyropoikilocytose (HPP). Het betreft de HE mutaties in Exon 2 (59 G/A) en Exon 6 (103 T/C). Daarnaast is de Lely (Low Expression Lyon) mutatie aanwezig, die leidt tot een verminderde expressie / synthese van α spectrine.

HagaZiekenhuis¹, Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Den Haag en Academisch Medisch Centrum², Laboratorium voor Hemoreologie, Amsterdam

E-mail: p.franck@hagaziekenhuis.nl



Figuur 2. Vervormbaarheids curven van rode bloedcellen van de familie B. gemeten met behulp van een ektacytometer. Normale cellen inclusief de familieleden M.L., S.B. en K.B. (zwart), HE cellen van broer W. (rood) en zijn dochter N. (oranje) en HPP cellen van broer E. (blauw). Als maat voor deze vervormbaarheid wordt de rekbaarheid / Elongation Index (EI) van de cel onder veranderende osmotische omstandigheden / osmolaliteit (50 – 500 mOsm/kg) in een viskeus PVP medium gemeten, waarbij de aangebrachte shear stress op de cellen constant is.

De Lely mutatie (3) wordt aangetoond door een PCR van Exon 40 van het α spectrine gen gevolgd door RFLP (restriction fragment length polymorfism) en detectie via agarose gel electroforese. De HE mutaties zijn aangetoond door een PCR van de Exonen 2 t/m 6 van het α spectrine gen, gevolgd door DNA sequencing met behulp van de ABI- Prism 310 genetic analyzer van Applied Biosystems (Nieuwerkerk aan de IJssel).

Resultaten

De familie B. is onderzocht op de aanwezigheid van HE dan wel HPP. Broer E. heeft klinische klachten, een HPP bloedbeeld en een typische ektacytometrische vervormbaarheidscurve passend bij HPP (figuur 1 en 2).

Broer W. en zijn dochter N. hebben geen klinische klachten maar wel een elliptocytair bloedbeeld en een vervormbaarheid passend bij HE (figuur 1 en 2).

Bij alle aangedane individuen is dezelfde heterozygote HE mutatie in Exon 2 (59 G/A) aanwezig. Daarnaast is bij deze personen ook de Lely mutatie aangetoond. Bij broer E. is dit een heterozygote mutatie, terwijl bij broer W. en zijn dochter N. dit een homozygote mutatie betreft. Naast deze HE / Exon 2 (59 G/A) en Lely mutatie is bij broer E. een derde mutatie in Exon 6 (103 T/C) aangetroffen (figuur 1).

Conclusie

De combinatie HE / Exon 2 mutatie en Lely mutatie leidt normaliter tot HPP (3). In geval van broer W. en zijn dochter N. is dit echter niet het geval. Zij hebben een zeer milde vorm van HE. De verklaring hiervoor is, dat de heterozygote HE / Exon 2 mutatie en de Lely mutatie in cis met elkaar liggen op één allel, in plaats van in trans op twee verschillende allelen van het α spectrine gen (figuur 1). Het resultaat hiervan is, dat HE / Exon 2 gemuteerde α spectrine door de Lely mu-

tatie (in cis) minder tot expressie komt. De Lely mutatie is bij beiden homozygoot aanwezig. Dit betekent, dat de andere Lely mutatie (in trans) ook voor een verminderde aanmaak van normaal wt α spectrine zorgt. Het α spectrine van beide allelen wordt dus minder aangemaakt. De Exon 2 mutatie van α spectrine bevindt zich in het eerste N- terminale deel van het α spectrine dat een kop-staart koppeling met β spectrine aangaat. De inbouw van het intacte wt α spectrine vindt preferentieel plaats ten opzichte van het HE/ Exon 2 gemuteerde α spectrine. Een relatief stevig membraanskelet wordt gevormd, waardoor slechts een milde vorm van elliptocytose ontstaat.

De heterozygote HE / Exon 2 mutatie en de Lely mutatie (in cis) zijn ook bij broer E. aangetoond, maar toch heeft hij HPP. Dit wordt toegeschreven aan een extra derde mutatie in het α spectrine gen en wel in Exon 6 (103 T/C). Deze HE / Exon 6 mutatie staat in trans met de (cis) combinatie HE / Exon 2 en Lely-mutatie. De Lely mutatie in cis zorgt bij broer E. net als bij broer W. ervoor, dat het HE / Exon 2 gemuteerde α spectrine minder tot expressie komt. Hierdoor komt echter bij broer E. relatief meer van het HE / Exon 6 gemuteerde α spectrine beschikbaar voor de dimerisatie met β spectrine. Door de inbouw hiervan ontstaat wel een instabiel membraanskelet, met alsnog een HPP tot gevolg.

Referenties

1. Gallagher PG. Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R. *Semin Hematol.* 2004; 41: 142-164.
2. Clark MR, Mohandas N., Shohet SB. Osmotic gradient ektacytometry: Comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood.* 1983; 61: 899-910.
3. Marechal J, Willemotte R, Kanzaki A, Dhermy D, Garbarz M, Galand C, Tang TK, Yawata Y, Delaunay J. Ethnic distribution of allele LELY, a low-expression allele of red-cell spectrin alpha gene. *Br J Haematol.* 1995; 90: 553-556.