

(Diagnostiek van) hemolytische anemieën als gevolg van een membraandefect

(Diagnosis of) hemolytic anemia with a membrane defect

dr. P.F.H. Franck¹ en dr. P. Wijermans²

Samenvatting

Hemolytische anemieën met een membraandefect zijn meestal mild van aard. Het stellen van de diagnose is lastig met behulp van gangbare hemolyseparameters. De toepassing van de ektacytometer vereenvoudigt dit aanmerkelijk. Aan de hand van de typische vervormbaarheidscurves van de erythrocyten worden de verschillende hemolytische anemieën eenduidig vastgesteld. Andere specifieke diagnostische bepalingen zijn ongevoelig of niet discriminerend genoeg voor de verschillende membraanstoornissen. Mutaties binnen hereditaire sferocytose (HS) zijn veelvuldig, vaak uniek en diffuus verdeeld

over meerdere membraaneiwitten, waaronder ankyrine, band 3, α - en β -spectrine en proteïne 4.2. De mutaties binnen hereditaire elliptocytose (HE) en hereditaire pyropoikilocytose (HPP) zijn relatief makkelijk te vinden, aangezien zij voornamelijk aan de uiteinden van α - en β -spectrine voorkomen. Voor 'Southeast Asian'-ovalocytose (SAO) is slechts 1 mutatie in band 3 bekend. Bij hereditaire stomatocytose (HSt) is een aantal mutaties bekend in eiwitten die betrokken zijn bij het ionentransport over de membraan.

(*Ned Tijdschr Hematol* 2014;11:13-21)

Summary

Hemolytic anemias with a membrane defect are usually mild. Therefore, the diagnosis is difficult to establish by conventional hemolytic parameters. The application of the ektacytometer simplifies the diagnosis considerably. On the basis of typical deformability curves of erythrocytes, the different hemolytic anemias can unambiguously be determined. Other specific diagnostic tests are insensitive or not discriminatory for the various membrane disorders. Mutations in hereditary spherocytosis (HS) are often unique and diffusely distributed over several membrane proteins,

including ankyrin, band 3, α and β spectrin and protein 4.2 are difficult to determine. The mutations within hereditary elliptocytosis (HE) and hereditary pyropoikilocytosis (HPP) are relatively easy to find, since they concentrate mainly at the ends of α and β spectrin. For Southeast Asian ovalocytosis (SAO) only 1 mutation is known in band 3. In case of hereditary stomatocytosis (HSt) some mutations are known in proteins involved in the ion transport across the membrane.

Inleiding

Hemolytische anemieën met een membraandefect zijn meestal mild van aard en de lichte hemolyse is vaak goed

gecompenseerd tot een normaal hemoglobinegehalte. Dit maakt het lastig om deze diagnose te stellen. Wij staan in dit artikel uitvoerig stil bij de mogelijkheden om deze

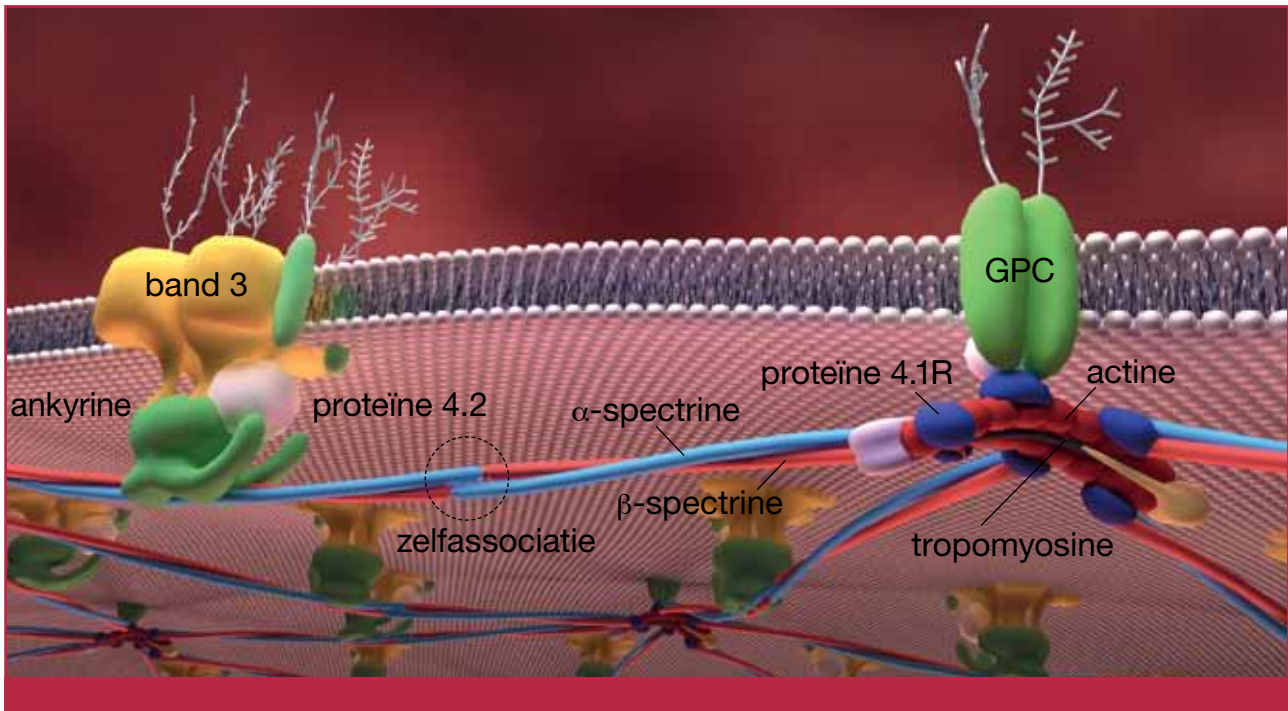
¹klinisch chemicus, Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, LabWest en HagaZiekenhuis, ²hematoloog, afdeling Hematologie, HagaZiekenhuis. Correspondentie graag richten aan dhr. dr. P.F.H. Franck, klinisch chemicus, LabWest locatie HagaZiekenhuis, Leyweg 275, 2545 CH Den Haag, tel.: 070 210 25 60, e-mailadres: p.franck@labwest.nl

www.sferocytose.nl en www.elliptocytose.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: band 3-eiwit, ektacytometer, elliptocytose, hemolytische anemie, hereditaire sferocytose, membraanskelet, ovalocytose, spectrine, stomatocytose.

Keywords: band 3 protein, ektacytometer, elliptocytosis, hemolytic anemia, hereditary spherocytosis, membrane skeleton, ovalocytosis, spectrin, stomatocytosis.



Figuur 1. Schematische opbouw van de membraan van de rode bloedcel en zijn membraanskelet als een netwerk van eiwitten (illustratie: Marco Jansen/Kiss the Frog bv).

erfelijke hemolytische anemieën makkelijker te diagnosticeren.

De bekendste vormen zijn hereditaire sferocytose (HS) en hereditaire elliptocytose (HE). Zij komen relatief vaak voor in Nederland. Daarnaast bestaan er exclusievere vormen zoals 'Southeast Asian'-ovalocytose (SAO) en hereditaire stomatocytose (HSt).

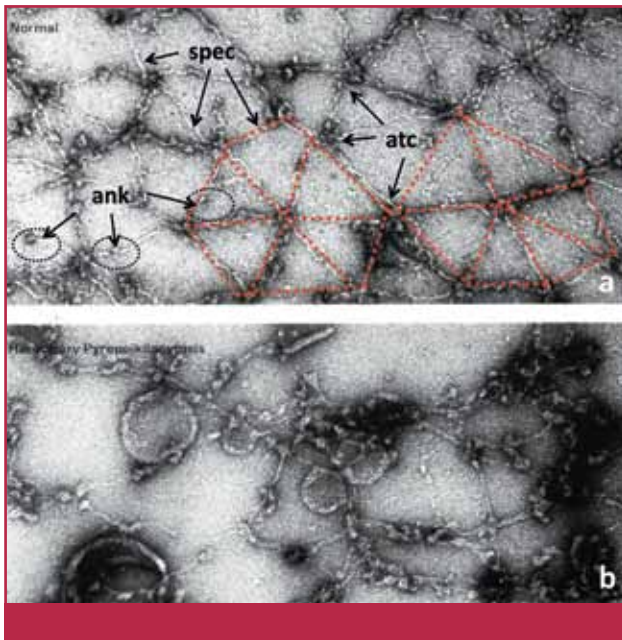
Het Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium (KCHL) en de afdeling Hematologie van het HagaZiekenhuis en LabWest hebben zich toegelegd op het onderzoeken van deze vormen van hemolytische anemieën met afwijkingen in de membraan van de erythrocyt. Er zijn diagnostische technieken opgezet op het gebied van de vervormbaarheid van de erythrocyten, eiwit- en DNA-analyse van de belangrijkste membraaneiwitten.^{1,2}

Membraanskelet

De membraan van erythrocyten is opgebouwd uit een dubbele laag van fosfolipiden en cholesterol. Hierin is een aantal transmembraaneiwitten opgenomen, waaronder band 3, glycoforines en andere glycoproteïnen. Deze dunne fragiele membraanbilaag wordt aan de binnenzijde ondersteund door een membraanskelet (zie *Figuur 1* en *2*, pagina 15). Naast versteviging is dit membraanskelet verantwoordelijk voor de flexibiliteit van de cel. De erythrocyt heeft in de grote vaten een discoïde

vorm. Een groot deel van zijn bestaan bevindt de cel zich echter in haarvaten met een diameter die eenderde is van die van de rode bloedcel zelf. De vervormbaarheid van de cel is dan ook groot.

Het membraanskelet is opgebouwd uit eiwitten, waarvan spectrine het belangrijkste is. Spectrine bestaat uit 2 langgerekte moleculen α - en β -spectrine die als een dimeer in elkaar zijn gevlochten. Zij gaan via een kop-kop-interactie/'zelfassociatie' een onderlinge binding aan, waardoor een tetramere structuur ontstaat (zie *Figuur 1*). Deze tetrameren zijn op hun beurt weer gekoppeld aan het actine/tropomyosinecomplex. Dit complex vormt het verbindingspunt voor meerdere spectrinetetrameren. Hierdoor ontstaat een hexagonaal netwerk aan de binnenzijde van het membraan (zie *Figuur 2a*, pagina 15). Het skelet is gekoppeld aan de membraanbilaag via het eiwit band 3, dat een integraal onderdeel hiervan is. De binding gaat via ankyrine, versterkt door proteïne 4.2. Het membraanskelet wordt ook via het actine/tropomyosinecomplex en proteïne 4.1R gebonden aan het integrale membraaneiwit glycoforine-C (GPC; zie *Figuur 1*). De hematologische afwijkingen worden ingedeeld naar de morfologie van de cellen (zie *Figuur 3*, pagina 15). Het idee bestaat, dat de langwerpige elliptocytair veranderingen ontstaan door mutaties in de eiwitten, die de interactie in het horizontale vlak van het celmembraan

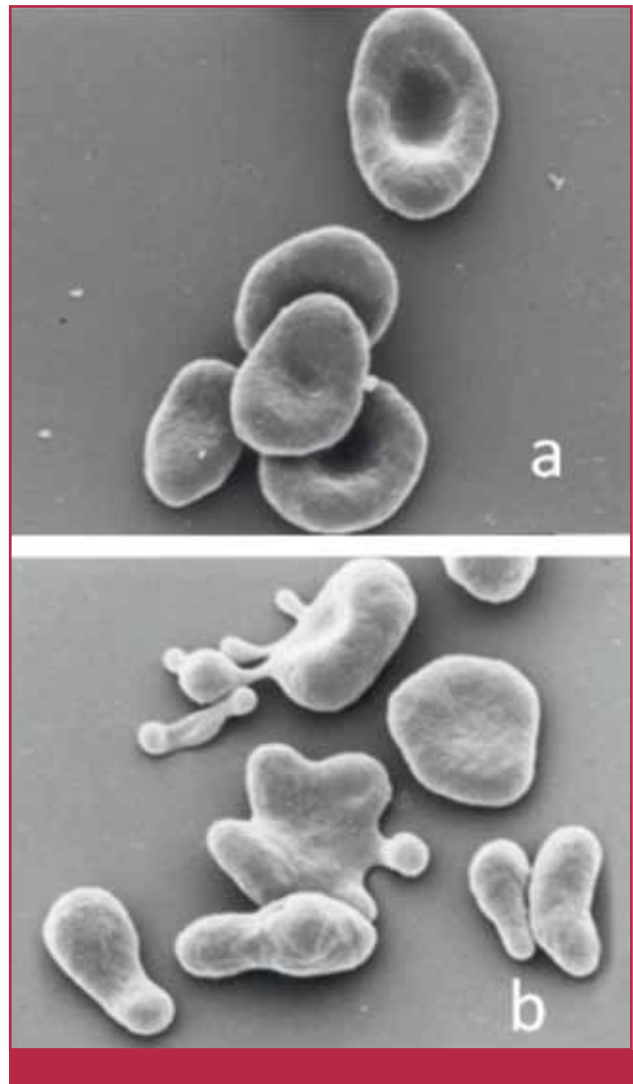


Figuur 2. Elektronenmicroscopische opname van het membraanskelet aan de cytoplasmatische binnenzijde van de erythrocytenmembraan. Een intact hexagonaal netwerk (rood) is zichtbaar bij normale erythrocyten (a), terwijl bij HPP-cellen (b) dit netwerk verloren is gegaan. Spectrine-tetrameren (spec) zijn als witte draadvormige structuren te zien. In deze draadvormige structuren zijn ook de kleine ronde ankyrine (ank)-moleculen zichtbaar, waarmee het netwerk aan de membraan is verankerd. Het actine/tropomyosinecomplex (atc) dient als aangrijpingspunt voor 6 spectrinetetrameren, waardoor het hexagonale netwerk ontstaat (naar Liu SC, Derick LH, Agre P et al. *Alteration of the erythrocyte membrane skeletal ultrastructure in hereditary spherocytosis, hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis.* Blood 1990;76:198-205).

beïnvloeden, in het bijzonder de moleculen α - en β -spectrine.^{1,3,4} De bolvorm van de sferocyten wordt dan veroorzaakt door mutaties in de eiwitten band 3, ankyrine en proteïne 4.2, die betrokken zijn bij de verticale interacties (zie *Figuur 1*, pagina 14).

Lastige diagnostiek

Het beloop van hemolytische anemieën met een membraandefect is dan wel mild, maar kan net als andere chronische anemieën worden gecompliceerd door een exacerbatie met een aplastische, hemolytische of megaloblastaire oorsprong. Dit wordt vaak uitgelokt door een virusinfectie (bijvoorbeeld parvovirus B19) of een foliumzuurtekort bij zwangerschap, groeiende kinderen of ouderen.^{3,5}

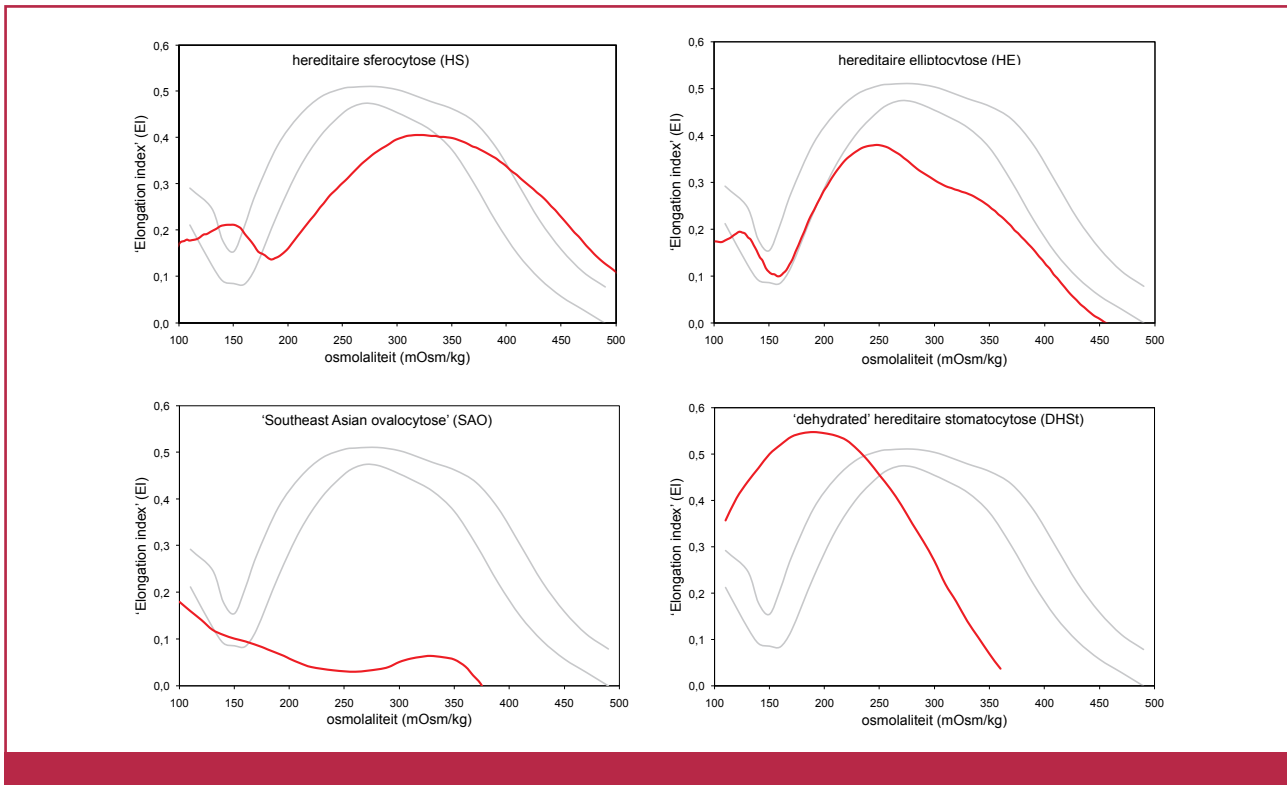


Figuur 3. Elektronenmicroscopische opnamen van erythrocyten van patiënten met hereditaire elliptocytose (a) en hereditaire pyropoikilocytose (b).

Onderzoek naar algemene hemolyseparameters zoals hemoglobine, aantal erythrocyten, morfologie, verhoogd aantal reticulocyten, verhoogde LDH-activiteit, verhoogd bilirubine- of verlaagd haptoglobinegehalte geven dikwijls een beeld dat er sprake is van hemolyse, maar zonder een aanwijsbare oorzaak. Gericht onderzoek door middel van osmotische resistentie (OR) of kwantitatieve bepalingen van membraaneiwitten is ongevoelig.⁵

Meting van vervormbaarheid van erythrocyten met de ektacytometer

Een uitkomst in de diagnostiek van hemolytische anemieën met een membraandefect biedt onderzoek met behulp van een zogenoemde ektacytometer van Siemens/Technicon (Den Haag) of de LoRRca Maxis Osmoscan



Figuur 4. Typische voorbeelden van (osmotische gradiënt ektacytometrie) vervormbaarheidscurves (rood) van hereditaire sferocytose (HS), hereditaire elliptocytose (HE), 'Southeast Asian' ovalocytose (SAO) en 'dehydrated' hereditaire stomatocytose (DHSt). De curves van normale erythrocyten zijn als gebied tussen de boven- en ondergrens (grijs) weergegeven. De vervormbaarheid is uitgedrukt als 'Elongation index' (y-as) bij verschillende osmolaliteiten van het PVP-medium (mOsm/kg, x-as) en wel bij een constante 'shear stress'.

van Mechatronics (Hoorn). Bij dit onderzoek wordt gekeken naar de vervormbaarheid van de erythrocyt. Dit wordt gemeten door 'shear stress' op de erythrocyten uit te oefenen en wel in een viskeus medium van polyvinylpyrrolidone (PVP). Onder deze omstandigheden verandert de erythrocyt in een iso-osmolaire omgeving van zijn discoïde in een langgerekte 'sigaar'-vorm. Door variatie van de osmolaliteit in het medium (50-500 mOsm/kg) tijdens de meting, vindt voortdurend een vormverandering plaats.⁶⁻⁹ Aan de hand van het diffractiepatroon van het uitgezonden laserlicht op de cellen wordt dit vormingsproces gevolgd. Het vermogen van de erythrocyt om de langgerekte vorm aan te nemen wordt uitgedrukt in de 'Deformability Index' (DI) of 'Elongation Index' (EI).^{6,10} Door deze EI (y-as) uit te zetten tegen de osmolaliteit van het PVP-medium (x-as) onder constante 'shear stress', worden karakteristieke vervormbaarheidscurves gevonden voor de verschillende hemolytische anemieën met een membraandefect (zie *Figuur 4*).

Is het type hemolytische anemie aan de hand van het specifieke ektacytometrische vervormbaarheidspatroon

vastgesteld, dan kunnen we verder gaan met de analyse van de gemuteerde eiwitten en/of het DNA.

Sferocytose

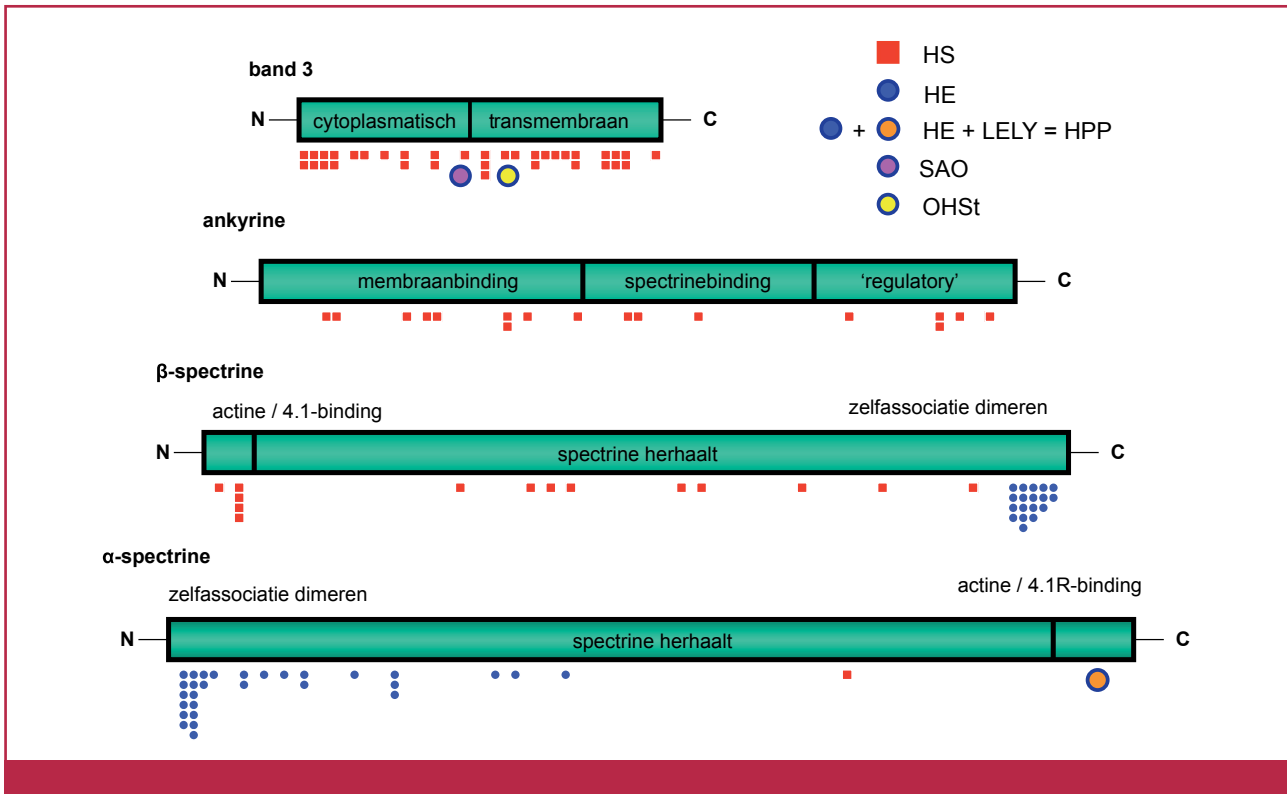
Sferocytose is de meest voorkomende erfelijke hemolytische anemie met een membraandefect binnen het kaukasische ras. Het komt 1:1.000-2.500 individuen voor. Naast het kaukasische ras worden alleen patiënten uit Japan beschreven.^{3,5} Het beloop is vaak mild tot matig (60-70%). Ernstige, transfusieafhankelijke patiënten (3-5%) worden gekenmerkt door anemie, splenomegalie, hyperbilirubinemie, galstenen, reticulocytose en eventueel ijzerstapeling bij frequente transfusies. Splenomegalie komt vaker voor bij sferocytose dan bij andere vormen van anemieën met een membraandefect. In ernstige gevallen is op geleide van de kliniek een splenectomie geïndiceerd. Het is een effectieve therapie, waarbij de anemie en galstenen afnemen en de levensduur van de erythrocyt significant wordt verlengd.^{5,11} Het verhoogde risico op levensbedreigende sepsis en vasculaire complicaties moet daarbij worden meegenomen.¹¹

Tabel 1. Overzicht van de verschillende hemolytische anemieën als gevolg van een membraandefect.

Naam	Incidentie	Morfologie	Afwijking membraaneiwitten	DNA-mutatie	Diagnostische bepalingen
Sferocytose (HS)	1:1.000-2.500 kaukasische ras	sferocyten	ankyrine: 40-60% kaukasische ras ankyrine: 5-10% Japan band 3: 20-35% α -spectrine: <5% β -spectrine: 15-30% proteïne 4.2: <5% kaukasische ras proteïne 4.2: 45-50% Japan	groot aantal mutaties veel de-novo-mutaties en diffuus verdeeld over allelen ANK1, SLC4A1, SPTA1, SPTB of EPB42	Ekta/Elmax: verlaagd Ekta/Omin: verhoogd curve naar rechts verschoven Osm Res: verlaagd EMA-kleuring: verlaagd eiwit: kwantitatief wisselend
Elliptocytose (HE)	1:2.000-4.000 kaukasische ras malaria-endemisch West-Afrika 1:50	elliptocyten	α -spectrine: N-terminaal β -spectrine: C-terminaal 'self-association site' proteïne 4.2	α -spectrine/exon 2-11 α -spectrine/exon 38-48 weinig de-novo-mutaties, wijst op 'founder effect'	Ekta/Elmax: verlaagd Ekta/Omin: normaal bifasische curve Osm Res: normaal EMA-kleuring: normaal eiwit: kwalitatief
LELY-polymorfisme	10% homozygoot 40% heterozygoot kaukasische ras	discocyten	α -spectrine C-terminaal 'nucleation site' 50% non-functioneel eiwit	α -spectrine exon 40 en 46	Ekta/Elmax: verlaagd Ekta/Omin: normaal Osm Res: normaal EMA-kleuring: onbekend eiwit: kwalitatief
Pyropoikilocytose (HPP)	onbekend	poikilocyten fragmentocyten microcyten	dubbele kwalitatieve afwijking van α - of β -spectrine HE en α -spectrine LELY	HE-mutaties in combi- natie met LELY-mutaties 'compound' heterozy- gotie 'low expression' over- erving	Ekta/Elmax: verlaagd Ekta/Omin: verhoogd curve rechts verschoven en bifasisch Osm Res: verlaagd EMA-kleuring: verlaagd eiwit: kwantitatief wisselend
Ovalocytose (SAO)	Zuidoost-Azië 30% genfre- quentie NB: Indische Nederlanders	ovalocyten kenmerkende transverse ruggen	band 3-deletie 9 aminozuren met confirmatieverandering en verstard membraanskeletnetwerk karakteristieke afwijkende afbraak van band 3 bij 'limited tryptic digestion'	band 3 exon 11 deletie van 27 base-paren unieke mutatie uitsluitend heterozygote overerving	Ekta/Elmax: extreem verlaagd Ekta/Omin: verhoogd zeer vlakke curve Osm Res: verhoogd EMA-kleuring: verlaagd Eiwit: kwalitatief
Stomatocytose (HSt)					DHSt: Ekta/Elmax: verhoogd Ekta/Omin: verlaagd curve naar links verschoven Osm Res: verhoogd EMA-kleuring: verhoogd Eiwit: kwalitatief OHSt: Ekta/Elmax: verhoogd Ekta/Omin: verhoogd curve naar links verschoven Osm Res: verlaagd EMA-kleuring: verhoogd Eiwit: kwalitatief
DHSt 'dehydrated'	onbekend	stomatocyten macrocyten	kationtransporteiwitten	gen gedeeltelijk bekend cosegregatie <i>PIEZO 1</i> - gen, regulatoractiviteit cationen-kanaal	
OHSt 'overhydrated'	onbekend	stomatocyten macrocyten	band 3-gestoord aniontransport RhAG-gestoord ammonium- transport GLUT1-gestoord glucosetransport	band 3	

De bolle vorm van de erythrocyten is karakteristiek voor HS, maar niet altijd zichtbaar onder de microscoop. Een verlaagde osmotische resistentie (OR) is een diagnostisch kenmerk voor sferocyten, maar de sensitiviteit van 70-80% is matig. De verlaagde OR kan ontstaan door verlies aan membraanoppervlak in de vorm van vesicles, waarbij de oppervlak-volumeverhouding verkleint met de bolle vorm als gevolg.³ Dit verlies aan

membraan kan gepaard gaan met het verlies van membraanskelet-eiwitten waaronder band 3, spectrine en ankyrine. Aan de hand van SDS-PAGE van de membraaneiwitten kan men de hoeveelheid van de individuele eiwitten aantonen.⁵ Daarnaast wordt via RIA/ELISA-technieken de hoeveelheid eiwit van met name spectrine gekwantificeerd.^{5,12} Alle bekende eiwitbepalingstechnieken hebben een beperkte gevoeligheid van 70-80%.¹³



Figuur 5. Schematische weergave van mutaties in de eiwitten van het membraanskelet van erythrocyten met hereditaire sferocytose (HS), hereditaire elliptocytose (HE), hereditaire pyropoikilocytose (HPP=HE+LELY), ‘Southeast Asian’-ovalocytose (SAO) en ‘overhydrated’ hereditaire stomatocytose (OHSt) (naar Tse WT, Lux, SE. Red blood cell membrane disorders. Br J Haematol 1999;104:2-13).

Andere technieken, zoals de flowcytometrische bepaling met behulp van eosin-5-maleimide (EMA), zijn beter met een hogere sensitiviteit (89%) en specificiteit (96%).^{13,14} Mutaties in verschillende membraaneiwwitten kunnen leiden tot sferocytose. De klinische heterogeniteit kan worden verklaard door de grote variatie in deze genetische veranderingen, waaronder deleties, nonsens-, nul- of ‘low expression’-mutaties. Dikwijls zijn ze uniek en de novo ontstaan en diffuus verspreid over de gehele lengte van de genen (zie Tabel 1 en Figuur 5). De meest getroffen eiwitten zijn ankyrine (40-60% kaukasische ras en 5-10% in Japan), band 3 (20-35%), α -spectrine (<5%), β -spectrine (15-30%) en proteïne 4.2 (<5% kaukasische ras, maar 45-50% van de Japanse bevolking).^{5,11} De genen van deze eiwitten zijn groot en het is arbeidsintensief om mutaties rechtstreeks via DNA-‘sequencing’ te achterhalen. Daarnaast zijn zij vaak slechts bij 1 patiënt/familie aanwezig (zie Figuur 5). Recentelijk is wel een veelbelovende techniek geïntroduceerd, waarmee tegelijkertijd via parallele DNA-‘sequencing’ de grote genen van de membraanskelet-eiwitten zijn onderzocht en mutaties zijn gevonden bij 80% van de

patiënten met een membraandefect.¹⁵ Veranderingen in de vervormbaarheid van de erythrocyten geven ons echter op eenvoudige wijze een eenduidig resultaat (zie Figuur 4, pagina 16). Het is de meest gevoelige bepaling voor de diagnose HS.^{5,7} Coombs-positieve sferocyten die zijn ontstaan door membraanverlies als gevolg van autoantistoffen bij een auto-immuun hemolytische anemie (AIHA) moeten bij de diagnostiek van HS worden meegenomen. Zij hebben eveneens een afwijkende vervormbaarheidscurve in de ektacytometer die is gerelateerd aan de verkleinde oppervlak-volumeverhouding, die echter verdwijnt na het opheffen van de auto-immuunrespons.^{5,16} Het onderzoek met behulp van een directe antiglobulinetest (DAT) moet deze verworven vorm van hemolyse al dan niet uitsluiten.

Elliptocytose

HE heeft een wereldwijde verspreiding, maar is meer aanwezig in malaria-endemische gebieden. De malaria-parasiet kan, zoals bij andere erfelijke hemolytische anemieën, niet in de verzwakte erythrocyt overleven. In

West-Afrika kan de incidentie oplopen tot 1:50, terwijl die wereldwijd 1:2.000-4.000 wordt geschat.^{3,4}

Bij elliptocytose (zie *Figuur 3a*, pagina 15) is meestal sprake van een asymptomatisch beloop met een goed gecompenseerde anemie. Miltexstirpatie is zelden geïndiceerd. Slechts 10% van de patiënten ontwikkelt een matige tot ernstige anemie. Deze patiënten zijn veelal homozygoot of 'compound'-heterozygoot voor een mutatie in spectrine, waaronder de ernstige variant pyropoikilocytose (zie *Figuur 3b*, pagina 15).

Elliptocyten ontstaan, omdat de mutaties in de eiwit-interactie binnen het membraanskelet in de horizontale richting afwijkend zijn (zie *Figuur 1*, pagina 14). Zij worden als discocyten in het beenmerg gevormd, maar krijgen hun langwerpige vorm nadat zij in de circulatie verschijnen. De cellen passeren de nauwe haarvaten en worden dan in hun elliptocytair vorm geduwd (zie *Figuur 3a*). Het betreffen mutaties, die dikwijls gelokaliseerd zijn in 'hot spot'-gebieden binnen zowel α -spectrine (exonen 2-11) als β -spectrine (exonen 38-48), en wel respectievelijk in de N- en C-terminale uiteinden van beide moleculen. Via deze terminale delen vindt de 'zelfassociatie' van de spectrinedimeren tot -tetrameren plaats (zie *Figuur 1* en *Figuur 5*, pagina 18). In tegenstelling tot HS zijn de mutaties van HE relatief beperkt en komen bij personen met een vergelijkbare genetische achtergrond voor. Er zijn weinig de-novo-mutaties bekend, hetgeen wijst op een gerichte afstamming/'founder effect' voor deze mutaties.³

De diagnostiek op basis van morfologie is onvoldoende. Elliptocyten worden regelmatig als artefact gezien als gevolg van het uitstrijken van normaal bloed. Daarnaast zijn zij niet altijd aanwezig bij een bewezen vorm van elliptocytose.

De veranderde vervormbaarheid van elliptocyten in de ektacytometer wordt gekenmerkt door een bifasische curve (zie *Figuur 4*, pagina 16). Bij asymptomatische heterozygote HE-dragers wordt eveneens deze afwijkende curve gezien, maar wel minder uitgesproken.² Gezien het feit dat veel mutaties in 'hot spots' in het 'zelfassociatie'-gebied van de spectrinedimeren aanwezig zijn (zie *Figuur 1* en *Figuur 5*), is het opsporen van HE-mutatie via DNA-'sequencing' eenvoudiger.²

'Low expression'-Lyon-polymorfisme en hereditaire pyropoikilocytose

Naast deze kwalitatieve verandering in de gemuteerde eiwitten bestaan er vormen van HE met een gereduceerde kwantitatieve synthese van membraanskelet-

eiwitten. Zij zorgen voor een verlaagde concentratie van die eiwitten, in het bijzonder α -spectrine. Zij spelen bij zowel HE als HS een rol. Het is vergelijkbaar met de gereduceerde synthese van de globineketens bij thalassemie. Bij hemolytische anemieën met een membraandefect worden ze 'low expression'-genen van α -spectrine genoemd.

Bij HS zijn deze bij zeldzame gevallen beschreven als α -spectrine 'low expression Prague' (LEPRA). Bij HE speelt α -spectrine 'low expression Lyon' (LELY) een prominentere rol. LELY in combinatie met HE levert een anemie die bekend staat als hereditaire pyropoikilocytose (HPP). Hierbij worden naast elliptocyten ook poikilocyten, fragmentocyten en microcyten gezien (zie *Figuur 3b*). De naam is afgeleid van de eigenschap dat dit proces wordt versterkt door verhitting van de cellen.¹⁷

LELY is geen zeldzame mutatie maar een polymorfisme, dat bij 50% (10% homozygoot en 40% heterozygoot) van de kaukasische bevolking wordt aangetroffen.¹⁸ De mutatie is gelegen in het C-terminale deel van α -spectrine in de 'nucleation site' en raakt zowel exon 40 als exon 46 in het DNA (zie *Figuur 5*). Van het gesynthetiseerde α -spectrine is 50% niet functioneel en wordt niet in het membraanskelet opgenomen.¹⁹ Bij homozygoot LELY-dragerschap is dit geen probleem, omdat α -spectrine in een viervoudige overmaat wordt gesynthetiseerd ten opzichte van β -spectrine. Ondanks een verminderde expressie van 50% wordt het resterende functionele α -spectrine nog steeds in een dubbele overmaat aangemaakt. Het LELY-polymorfisme verloopt asymptomatisch.

In het geval van een heterozygote HE-overerving van α -spectrine is dit anders. De combinatie van α -spectrine-LELY, gelegen op het eerste allel, in trans met een heterozygote HE-mutatie in het tweede allel, zorgt dat een asymptomatische HE-mutatie alsnog tot expressie komt. Het α -spectrine-LELY is niet in staat om het heterozygote HE- α -spectrine te compenseren. De overmaat aan intact α -spectrine is verdwenen. Naast intact α -spectrine is een dubbele hoeveelheid aan HE-gemuteerd α -spectrine ontstaan en ingebouwd.^{2,8,19} De inbouw van dit HE- α -spectrine leidt tot het uiteenvallen van het membraanskelet (zie *Figuur 2b*, pagina 15) met fragmentocyten en poikilocytose (zie *Figuur 3b*) als gevolg. Het leidt vaak tot een ernstige anemie met hepatosplenomegalie, waarbij de milt moet worden verwijderd.³

'Southeast Asian'-ovalocytose

'Southeast Asian'-ovalocytose (SAO) komt voor bij mensen afkomstig uit Zuidoost-Azië (Maleisië, Filip-

Aanwijzingen voor de praktijk

1. Erfelijke hemolytische anemieën komen in Nederland steeds vaker voor, gezien de toename van allochtone patiënten die afkomstig zijn uit malaria-endemische gebieden. Bij de differentiaaldiagnose wordt gedacht aan patiënten met een hemoglobinepathie of een enzymdeficiëntie. Hemolytische anemieën met een membraandefect vinden dikwijls ook hun oorsprong in deze gebieden, zoals West-Afrika (elliptocytose) en Zuidoost-Azië (SAO). Betrek deze vormen van hemolytische anemie in de differentiaaldiagnose.
2. De prevalentie van sferocytose (1:1.000-2.500) bij het kaukasische ras is relatief hoog. Denk bij een onbegrepen milde anemie aan deze vorm van hemolytische anemie. Sluit een auto-immuunhemolytische anemie hierbij uit.
3. Stomatocytose is een zeldzame vorm van een hemolytische anemie met een membraandefect, waarbij in het algemeen een contra-indicatie voor splenectomie bestaat. Dit in tegenstelling tot andere vormen van hemolytische anemie.
4. Het onderzoeken van familieleden bij deze erfelijke vormen van hemolyse maken de diagnose makkelijker.
5. Het stellen van de diagnose 'hemolytische anemie' als gevolg van een membraandefect wordt aanmerkelijk vereenvoudigd door gebruik te maken van de ektacytometer. Aan de hand van de typische vervormbaarheidscurves worden de verschillende vormen eenduidig vastgesteld.

pijnen, Indonesië, Papoea-Nieuw-Guinea). Er komen populaties voor waarvan de genfrequentie van het gemuteerde eiwit 30% bedraagt. De dragers van het gen zijn eveneens beschermd tegen malaria, waaronder *Plasmodium falciparum* en *vivax*, maar ook *Plasmodium knowlesi*.²⁰ Ovalocytose wordt ook wel tot elliptocytose gerekend. De langwerpige vorm is echter de enige overeenkomst tussen beide afwijkingen. Buiten de ovale vorm zijn de cellen aan karakteristieke transversale ruggen te herkennen. Ovalocyten hebben een unieke mutatie in het gen voor het eiwit band 3 (zie *Figuur 5*). Hierbij is een deletie van 9 aminozuren ontstaan op het grensvlak van het cytoplasmatisch en het transmembraandomein van band 3.²⁰⁻²² Deze deletie is aangetoond via zowel eiwitanalyse (SDS-PAGE) als DNA-analyse ('sequencing'), met uitsluitend een heterozygote overerving.²⁰ Kennelijk is de homozygote vorm niet levensvatbaar.

Ovalocyten worden gekenmerkt door hun extreme osmotische stabiliteit en inflexibiliteit. De ektacytometer laat een profiel zien dat op een zeer onvervormbare cel wijst (zie *Figuur 4*). De rigide membraan ontstaat door structuurverandering van het gemuteerde integrale membraaneiwit band 3. De vrije mobiliteit van band 3 in de membraanbilaag is verdwenen door sterische hindering aan de cytoplasmatische zijde van de cel. Het gemuteerde molecuul raakt verstrikt in het onderliggende membraanskelet en zorgt voor een fixatie waarbij de

flexibiliteit van het celmembraan verloren gaat.²² De rigide membraanstructuur kan aanleiding geven tot occlusie in de haarvaten van onder andere de ogen met preretinale neovascularisatie als gevolg. Dit proces is welbekend bij sikkelcelziekte.²³

Stomatocytose

Stomatocytose bestaat uit een groep van membraanafwijkingen waarbij de Na^+/K^+ -permeabiliteit is verstoord. Deze verandering van kationtransport zorgt eveneens voor een gestoorde hydratatie van de cel. De oorzaak van dit gestoorde kationtransport is heel divers. De typische macrocytaire stomatocyt kan ontstaan doordat het volume toeneemt, maar het membraanoppervlak gelijk blijft. Ze zijn ingedeeld naar typen met een overmaat aan water in de cel, 'overhydrated hereditary stomatocytosis' (OHSt) en gedehydrateerde cellen bij 'dehydrated hereditary stomatocytosis' (DHSt), ook wel xerocytose genoemd.^{9,24,25}

Bij OHSt is er een toename van natrium en water in de cel. Het beloop is mild en goed gecompenseerd. De stomatocyten met hun toegenomen bolvorm worden door miltsequestratie weggevangen. In het geval van erfelijke sferocytose (HS) kan splenectomie een voordeel hebben, maar bij HSt bestaat er een contra-indicatie vanwege het verhoogde risico op veneuze trombo-embolische complicaties. De verklaring hiervoor is niet duidelijk.^{9,25}

Mutaties bij OHSt zijn in het transmembrane deel van band 3 ontdekt. Fouten in de vouwstructuur door de laag heen zijn de oorzaak van een gestoorde permeabiliteit. Band 3 is naast de verankering van het membraanskelet ook verantwoordelijk voor het anionentransport ($\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$) over de membraan. Mogelijk wordt het verstoorde kationentransport bij OHSt veroorzaakt door een verstoord anionentransport. Mutaties in het 'Rh associated glycoprotein' (RhAG) en de glucosetransporter GLUT1, die respectievelijk betrokken zijn bij het ammonium/gas- en het glucosetransport over de membraan, spelen ook een rol.²⁴

De meest voorkomende vorm van stomatocytose is gehydrateerde DHSt met een kationlekage van in het bijzonder K^+ . Dit heeft een dehydratie van de cellen tot gevolg. Het gen defect voor DHSt is gedeeltelijk bekend. Genlinkage-analyse laat binnen families met DHSt een cosegregatie zien met mutaties binnen het *PIEZO1*-gen. Dit gen staat voor een eiwit dat recentelijk is ontdekt als regulator van de activiteit van een kationenkanaal.²⁵

De diagnostiek voor stomatocytose is lastig met klassieke technieken. Mogelijk is naast veranderde morfologie en de afwijkende RBC-indices, zoals verlaagd hemoglobine, verhoogd MCV, MCHC (verhoogd bij DHSt en verlaagd bij OHSt), een (pseudo)hyperkaliëmie zichtbaar.^{9,25} De osmotische resistentie van de cellen volgen de hydratiestatus van de cellen, waarbij OHSt een verlaagde en DHSt een verhoogde osmotische resistentie laten zien. Dit laatste fenomeen is duidelijk zichtbaar in de ektacytometrische metingen (zie *Figuur 4*, pagina 16). Het is de enige directe en betrouwbare bepaling om deze anemie met probleem in de celhydratie te testen.^{9,26}

Referenties

1. Franck PF. Moleculair biologische diagnostiek van hemolytische anemieën met een membraan defect. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2002;27:190-1.
2. Postma C, Spaans A, Hardeman M, et al. Een familie met hereditaire elliptocytose: meer klinische klachten door een derde mutatie in Exon 6 van het α -spectrine gen. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2011;36:265-6.
3. Gallagher PG. Red cell membrane disorders. *ASH educational Book* 2005;2005:13-8.
4. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 2008;112:3939-48.
5. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet* 2008;372:1411-26.
6. Clark MR, Mohandas N, Shohet SB. Osmotic gradient ektacytometry. Comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood* 1983;61:899-910.
7. Cynober TH, Mohandas N, Tchermia G. Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: relevance to diagnosis and understanding of variable expression of clinical severity. *J Lab Clin Med* 1996;128:259-69.

8. Silveira P, Cynober T, Dherny D, et al. Red blood cell abnormalities in hereditary elliptocytosis and their relevance to variable clinical expression. *Am J Pathol* 1997;108:391-9.
9. Delaunay J. The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations. *Seminars Hematol* 2004;41:165-72.
10. Bessis M, Mohandas N, Eo C. Automated ektacytometry. A new method of measuring red cell deformability and red cell indices. *Blood Cells* 1980;6:315-27.
11. Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. *Br J Hematology* 2011;153:37-49.
12. Van Zwieten R, Bolscher BG, Schouten-Van Meeteren AY, et al. Bepaling van spectrine in erythrocyten: een belangrijk hulpmiddel bij de diagnostiek van hereditaire sferocytose. *Ned Tijdschr Geneesk* 1995;139:2256-61.
13. Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, et al. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. *Haematol* 2012;97:516-23.
14. Girodon F, Garçon L, Bergoin E, et al. Usefulness of the eosin-5'-maleimide cytometric method as a first-line screening test for the diagnosis of hereditary spherocytosis: comparison with ektacytometry and protein electrophoresis. *Br J Haematol* 2008;140:468-70.
15. Van der Zwaag B, Van Wijk R, Elferink MG, et al. Massively parallel sequencing identifies the large majority of mutations causing red blood cell membrane disorders. *Eur J Hum Genet* 2013;21(Suppl 2):350.
16. Da Costa L, Mohandas N, Sorette M, et al. Temporal differences in membrane loss lead to distinct reticulocyte features in hereditary spherocytosis and in immune hemolytic anemia. *Blood* 2001;98:2894-9.
17. Franck PF, Op den Kamp JA, Lubin B, et al. Abnormal transbilayer mobility of phosphatidylcholine in hereditary pyropoikilocytosis reflects the increased heat sensitivity of membrane skeleton. *Biochimica Biophysica Acta* 1985;815:259-67.
18. Marechal J, Wilmotte R, Kanzaki A. Ethnic distribution of allele LELY, a low-expression allele of red-cell spectrin alpha gene. *Br J Haematol* 1995;90:553.
19. Wilmotte R, Harper SL, Ursitti JA, et al. The exon 46-encoded sequence is essential for stability of human erythroid α -spectrin and heterodimer formation. *Blood* 1997;90:4188-96.
20. 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;88:11022-6.
21. Liu SU, Zhai S, Palek J, et al. Molecular defect of the band 3 protein in Southeast Asian ovalocytosis. *N Engl J Med* 1990;323:1530-8.
22. 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;89:686-92.
23. Van de Loosdrecht AA, Franck PF, Renardel De Lavalette WW, et al. Preretinal neovascularization in South-east Asian ovalocytosis. *Br J Hematology* 2000;110:1012-4.
24. Flatt JF, Guizouarn H, Burton NM, et al. Stomatin-deficient cryohydrocytosis results from mutations in *SLC2A1*: a novel form of GLUT1 deficiency syndrome. *Blood* 2011;118: 5267-77.
25. Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, et al. Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in *PIEZO1*. *Blood* 2013;121:3925-35.
26. Vlasveld LT, Franck PF, Castel A. A patient with haemolytic anaemia diagnosed after thirty years. *Neth J Med* 2009;67:310-1.

Ontvangen 17 september 2012, geaccepteerd 2 juli 2013.