

Anja Zupan¹

Dedna eliptocitoza

Hereditary Elliptocytosis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: eliptocitoza dedna, eritrocitna membrana, membranske beljakovine, eritrocitna deformabilnost, točkovna mutacija

Dedna eliptocitoza je klinično, biokemično in genetsko raznolika skupina bolezni rdečih krvnih celic. Označuje jo prisotnost podolgovatih ali eliptičnih eritrocitov v periferni krvni sliki. Eliptični fenotip je posledica različnih napak proteinov, ki tvorijo membranski skelet. Le-ta in pa molekule, ki ga vežejo na lipidni dvosloj, so odgovorni za obliko eritrocita in ustrezno stabilnost in deformabilnost njegove membrane. V članku bom poskušala povzeti dognanja na področju molekularne anatomije membrane in membranskega skeleta rdečih krvnih celic, mutacij genov strukturnih proteinov membranskega skeleta eliptocitov ter posledične spremembe teh proteinov in povezav med njimi, vplivov na mehanske lastnosti membrane in s tem na obliko celice.

ABSTRACT

KEY WORDS: elliptocytosis hereditary, erythrocyte membrane, membrane proteins, erythrocyte deformability, point mutation

Hereditary elliptocytosis is a clinically, biochemically and genetically heterogeneous group of inherited disorders of red blood cells. It is characterised by the presence of elongated, oval or elliptically shaped erythrocytes on the peripheral blood smear. The elliptocytic phenotype has been shown to result from various defects of proteins that constitute membrane skeletal network. This network and molecules that bind it to the lipid bilayer are responsible for the shape of red blood cell and the stability and deformability of its membrane. This article will concentrate on findings about molecular anatomy of erythrocyte membrane and membrane skeleton, mutations of genes for structural proteins of elliptocytic membrane skeleton and functional changes of these proteins and interactions among them, their influences on mechanical properties of the membrane and consequentially on the cellular shape.

¹ Anja Zupan, dr. med., Inštitut za biofiziko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana, Slovenija.

UVOD

Eritrocit v 120 dneh prepotuje približno 500 km in preživi več kot 500.000 srčnih ciklov. Ta, v neobremenjenem stanju diskoidna celica s premerom 7 μm , se mora v tkivih preriniti skozi kapilare širine 3 μm (1). Ustrezno stabilnost in elastično deformabilnost dajejo membrani eritrocita na notranji strani nje-nega fosfolipidnega dela ležeči membranski skelet in proteini, ki tvorijo navpično pove-zavo med obema.

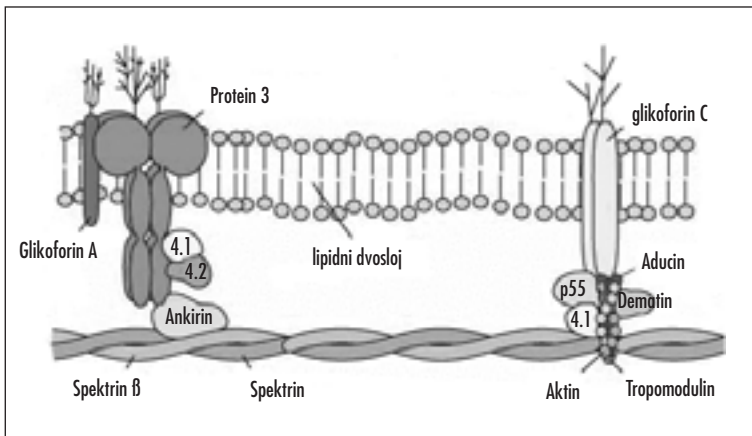
MOLEKULARNA ANATOMIJA MEMBRANSKEGA SKELETA

Notranja stran eritrocitne membrane je oblože-na z dvodimenzionalno raztegljivo mrežo membranskega skeleta, ki je sestavljena iz spektrina in povezovalnega kompleksa, ki ga tvorijo aktin, protein 4.1, tropomiozin, tropo-modulin, aducin, dematin itd. (2–5). Navpične povezave med membranskim skeletom in membrano tvorita ankirin, ki se veže na mem-branski protein 3 (anionski izmenjevalec), ter protein 4.1 s svojimi povezavami s proteinom 3 in z glikoforinom C, pri kateri v določeni meri sodeluje tudi protein p55 (6–8) (slika 1).

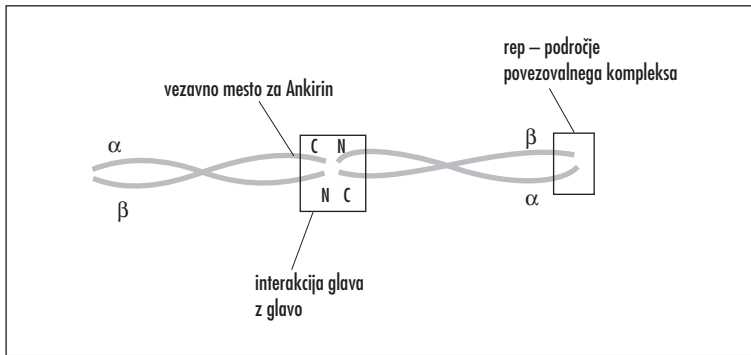
Spektrin

Spektrin je glavni sestavni del membranskega skeleta, saj predstavlja 25 % vseh membranskih proteinov in kar 75 % mase membranskega skeleta (1, 9). Je upogljiva molekula, sestav-

ljena iz dveh podenot: spektrina α z molekul-sko maso 280 kDa in spektrina β z molekulsko maso 246 kDa (10). Vsaka podenota je sestavljena iz serije ponovitev. Ponovitev je zgrajena iz zaporedja 106 aminokislin. Spektrin α tvori 22 takih ponovitev, spektrin β pa 17 ponovitev. Posamezna ponovitev se zloži v tri antiparalel-ne vijačnice, imenovane A, B in C. Ponovitve so med seboj povezane s kratkimi ravnimi odseki (11, 12). Podenoti spektrina α in β se med seboj povezujeta stran s stranjo z inte-rakcijami v antiparalelni poravnavi in tako tvorita spektrinski heterodimer dolžine približno 100 nm. Aminski konec spektrina α in karboksilni konec spektrina β predstavljata glavo heterodimera, na drugi strani je rep. Spektrinski heterodimeri sodelujejo v pove-zavah glava z glavo in tvorijo spektrinske tetramere (13) (slika 2). Področje povezave glava z glavo je podobno eni ponovitvi zapo-redja 106 aminokislin, kjer spektrin α prispeva eno, spektrin β pa dve vijačnici (14). Spektrin je v celicah prisoten predvsem v obliki tetrame-rov (15). Repi spektrinskih tetramerov skupaj z aktinom, proteinom 4.1, tropomiozinom, tropomodulinom, proteinom 4.9 in aducinom tvorijo povezovalne komplekse in tako obli-kujejo dvodimenzionalno šesterokotno mrežo membranskega skeleta (5, 16, 17) (slika 3). Aminokislinski ponovitvi 15 in 16 spektrina β vsebujeta vezavno mesto za ankirin, preko katerega je membranski skelet povezan z lipidnim dvoslojem (5) (slika 2).



Slika 1. Shematični prikaz membranskega skeleta in njegovih povezav z membrano.



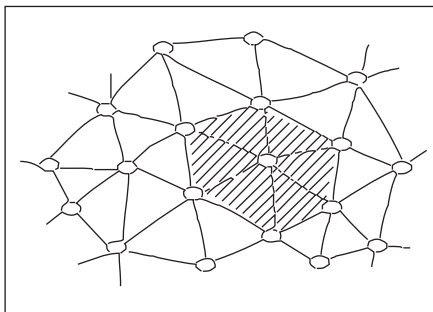
Slika 2. Shematični prikaz spektrinskega tetramera.

Povezovalni kompleksi

Kote šesterokotne mreže membranskega skeleta predstavljajo povezovalni kompleksi, sestavljeni iz kratkih aktinskih filamentov, 4 do 7 spektrinskih tetramerov, proteina 4.1, proteina 4.9, tropomiozina, tropomodulina in aducina (18–20).

Aktin

V eritrocitu je prisoten le β podtip aktina, ki se ureja v kratke, dvojnovijačne filamente, sestavljene iz 12 do 16 aktinskih monomerov. T. i. protofilamenti merijo v dolžino približno 30 do 40 nm in tvorijo ogrodje povezovalnega kompleksa. Stanje polimerizacije aktina v eritrocitu je funkcionalno pomembno za njegovo morfologijo. Nekateri kemijske spojine, ki zavirajo polimerizacijo aktina, namreč povečajo upogljivost membrane, medtem ko druge, ki polimerizacijo spodbudijo, povečajo njeno togost (10, 15, 21).



Slika 3. Šesterokotna mreža membranskega skeleta. Ravnne črte predstavljajo spektrinske tetramere, krogi pa povezovalne komplekse. Črtkano je ponazorjena šesterokotna oblika.

Tropomiozin in tropomodulin

Tropomiozin je dimer z molekulsko maso 60 kDa, sestavljen iz dveh polipeptidov. V vsaki od dveh zarez aktinske dvojne vijačnice leži po en tropomiozinski dimer. Verjetna vloga tropomiozina v eritrocitu je, da uravnoteži kratek aktinski filament.

Tropomodulin je protein globularne oblike z molekulsko maso 43 kDa, ki se veže na en konec tropomiozinske paličaste molekule. Verjetno sodeluje pri stabilizaciji aktinskega protofilamenta (15, 21).

Aducin

Aducin je heterodimer, sestavljen iz podenote α z molekulsko maso 103 kDa in podenote β z molekulsko maso 97 kDa. Veže se na aktin-spektrinski kompleks in spodbuja vezavo nadaljnjih spektrinskih tetramerov na aktin (15, 21).

Protein 4.1

Protein 4.1 ima molekulsko maso 80 kDa in je sestavljen iz štirih podenot. Pomembna je osrednja podenota z molekulsko maso 10 kDa, na kateri je vezavno mesto za podenoto β spektrinskega repa (15, 22). Tako vezan protein 4.1 močno zveča afiniteto vezave spektrin-aktin (23). Razen omenjenega posredovanja v vodoravnih povezavah membranskega skeleta sodeluje protein 4.1 s svojo podenoto z molekulsko maso 30 kDa tudi v navpičnih povezavah membranskega skeleta na transmembranske proteine. Veže se namreč na glikoforin C in protein 3 (7).

Protein 4.9 (dematin in p55)

Pas 4.9 na elektroforetičnem vzorcu je sestavljen iz *dematina*, ki ima podenoti z molekulskima masama 48 kDa in 52 kDa, in proteina z molekulsko maso 55 kDa, *p55*. Dematin veže aktin, *p55* pa sodeluje pri vezavi proteina 4.1 s transmembranskim proteinom glikoforinom C (8, 21).

Povezava membranski skelet-membrana

Pod membrano ležeča mreža membranskega skeleta je na lipidni dvosloj pritrjena preko ankirina in proteina 4.1, ki se vežeta na transmembranska proteina protein 3 in glikoforin C (4, 24) (slika 1).

Spektrin-ankirin-protein 3

Ankirin je sestavljen iz treh domen. Domena z vezavnim mestom za spektrin je velika 62 kDa in se veže s spektrinom β približno 20 nm stran od povezave glava z glavo spektrinskega tetramera. Regulatorna domena je velika 55 kDa in uravnava afiniteto vezave preostalih dveh domen za vezavo na ciljne proteine (10, 25, 26).

Domena z molekulsko maso 89 kDa, ki se veže na membrano (domena M), je sestavljena iz 24 v pare organiziranih zaporedij, ki se zložijo v 4 podenote s po 6 zaporedji (25). Prvo vezavno mesto za transmembranski protein 3 je na 2. podenoti domene M, drugo pa na 3. in 4. podenoti iste domene. Ker se protein 3 v membrani nahaja v obliki dimerov in ker ima ankirin dve vezavni mesti za protein 3, je mogoče, da ankirin poveže 2 dimera proteina 3 v tetramer (6) (slika 1).

Protein 3 je transmembranski protein z molekulsko maso 95 kDa, ki predstavlja 25 % vseh membranskih proteinov. Tvorita ga dve domeni, membranska, ki 14-krat prečka lipidni dvosloj, in citoplazemska domena z molekulsko maso 43 kDa, ki nosi vezavno mesto za ankirin in protein 4.1 (11, 27, 28). V tej povezavi sodeluje tudi protein 4.2 ali palidin, katerega natančna vloga pa ni povsem razjasnjena (29–31).

Povezave preko proteina 4.1

Struktura proteina 4.1 je bila opisana v prejšnjem odstavku. Poleg tega, da je ta protein

pomemben člen v vodoravnih povezavah membranskega skeleta, sodeluje tudi v povezavah membranskega skeleta na lipidni dvosloj (11, 32). S podenoto z MM 30 kDa se v 80 % veže na glikoforin C/D, bodisi neposredno bodisi preko proteina *p55* (33). Preostalih 20% proteina 4.1 se veže na protein 3 (34). Pri tem je vezava, pri kateri sodeluje *p55*, visokoafinitetna, ostali dve imata nizko afiniteto (7, 35).

Poleg obeh omenjenih povezav se skeletni proteini tudi neposredno vežejo na membranske fosfolipide. Dokazano je, da se spektrin in protein 4.1 vežeta na fosfatidilserinske mehurčke (36, 37). Te povezave ne le pripomorejo k uravnoteženju povezave membranski skelet-membrana, marveč sodelujejo tudi pri nesimetrični razporeditvi membranskih fosfolipidov med obema plastema membrane (11).

MOLEKULARNA PATOGENEZA IN GENETIKA

Zaradi kompleksne strukture membranskega skeleta se lahko napake pojavljajo v številnih proteinih, ki ga tvorijo, kar ima različne morfološke posledice. Na splošno velja, da spremembe v navpičnih povezavah vodijo k izgubljanju membranske površine in s tem do manjšega razmerja med površino in volumnom, posledica česar je sferocitoza. Napake, ki prizadenejo vodoravne povezave, pa povzročijo destabilizacijo membranskega skeleta in eliptično obliko celice (12).

Za sindrom dedne eliptocitoze (DE) so odgovorne kvalitativne in kvantitativne mutacije genov za spektrin α in β , protein 4.1 in glikoforin C. Zaradi različnih mutacij in možnosti kombinacij teh mutacij je klinična slika DE izredno raznolika, od asimptomatske oblike do hude, življenje ogrožajoče hemolitične anemije s poikilocitozo in fragmentacijo eritrocitov (38–40).

Spektrin

Večina mutacij, odgovornih za DE, so mutacije spektrina α in β , ki motijo normalno povezavo med glavama dveh spektrinskih heterodimerov. S tem je motena povezava dimerov v tetramere in porušena mehanika membranskega skeleta (41).

Spektrin α

Večina mutacij spektrina α je točkovnih, ki povzročijo zamenjavo ene aminokislina v nekaj ponovitvahaminskega konca te molekule, navadno v C-vijačnici posamezne ponovitve. Zaradi tega lahko pride do spremembe običajnega cepitvenega mesta pri tripsinski proteolizi, kar spremeni elektroforetični vzorec razcepov spektrina. Namesto odlomka z MM 80 kDa nastanejo odlomki, veliki 78, 74, 65 ali 46 do 50 kDa (42–44).

α^{LELY} je alel z nizko ekspresijo spektrina α . Nastane zaradi mutacije v intronu 45, ki povzroči preskok eksona 46. Spektrin α brez eksona 46 slabše tvori heterodimere in je bolj podvržen beljakovinski razgradnji. Ker v eritropoetskih celicah nastane 3 do 4-krat več spektrina α kot β , se bolezen ne izrazi. α^{LELY} je pravzaprav zelo pogosta mutacija in je prisotna pri 20 % človeške populacije. Če je poleg α^{LELY} prisotna na drugem kromosomu mutacija spektrina α , ki povzroča DE, pa to povzroči večjo vgradnjo mutiranega spektrina α v membranski skelet in s tem hujšo obliko bolezni (5, 38).

Spektrin β

Mutacije v odseku DNK, ki kodira karboksilni konec spektrina β , so skrajšanja ali točkovne mutacije, ki povzročijo motnjo v povezavi med glavama spektrinskih heterodimerov. Do skrajšanj, pri katerih manjka eno ali več fosforilacijskih mest na spektrinu β , pride zaradi insercij, delecij, nesmiselnih mutacij ali preskakovanj eksonov. Ker je spektrin α sintetiziranega veliko več kot spektrin β , zadnji odloča o količini vgrajenega spektrina v membranski skelet. Zato mutacije spektrina β včasih pripeljejo do fenotipa z značilnostmi sferocitoze in eliptocitoze (sferocitna DE). Tu je poleg motene povezave spektrinskih dimerov v membranskem skeletu prisotno tudi manjše število njih samih (41, 45).

Znane so tri točkovne mutacije, ki povzročijo zamenjavo ene aminokislina v vijačnici A ali B skupne $\alpha\beta$ -ponovitve. Vse tri odprejo cepitveno mesto na spektrinu α , kar povzroči tvorbo odlomka velikosti 74 kDa (41, 46).

Protein 4.1

Za del DE so krive mutacije, ki povzročijo pomanjkanje proteina 4.1 ali pa njegovo struk-

turno spremembo (47). Za pomanjkanje proteina 4.1 so krive bodisi točkovne mutacije ali delecije, ki spremenijo začetno mesto za translacijo in preprečijo prepisovanje proteina z mRNA (5, 48), bodisi delecija kodona, ki kodira aminokislino znotraj vezavnega mesta proteina 4.1 za spektrin, zaradi česar se protein 4.1 ne vgradi v membranski skelet in se posledično razgradi (49).

Strukturne spremembe proteina 4.1 nastanejo zaradi insercije ali delecije eksonov, ki kodirajo vezavno mesto za spektrin. Posledično nastaneta daljši ali krajši protein, katerih sposobnost vezave na spektrin je okrnjena (50).

Glikoforin C

Fenotip Leach zaznamuje popolna odsotnost glikoforina C. Značilno za nosilce Leach fenotipa je, da nimajo antigena krvne skupine Gerbich in da imajo eliptocitozo brez hemolize. Poleg popolne odsotnosti glikoforina C so v teh celicah odkrili tudi nižjo vsebnost proteina 4.1 in p55, kar naj bi bil vzrok za spremenjeno obliko celice (51).

DEFORMABILNOST IN OBLIKA ERITROCITOV PRI DE

Kot je že bilo omenjeno v uvodu, je v življenju eritrocita izražena velika potreba po prilagajanju oblike celice okoliščinam v krvnem obtoku.

Deformabilnost celice določajo tri komponente:

- **Celična geometrija:** Normalna bikonkavna oblika omogoča eritrocitu veliko razmerje med površino in prostornino, zaradi česar je mogoča linearna raztegnitev celice do 250 % njenega premera. Nasprotno pa povečanje površine membrane za 3–4 % že pripelje do razpada celice (4).
- **Viskoznost citoplazme** je odvisna od vsebnosti hemoglobina. Pri normalnih koncentracijah hemoglobina ima viskoznost citoplazme zanemarljiv vpliv na celično deformabilnost (52).
- **Mehanske lastnosti membrane** opredeljujeta dve lastnosti: deformacijski odziv membrane (upogib, povečanje površine itd.) ob delovanju določene sile nanjo in njena stabilnost. Manjša kot je sila, ki je potrebna, da se doseže določena sprememba oblike

membrane, večji je njen *deformacijski odziv*. *Stabilnost* je opredeljena kot največja mera deformacije, ki jo membrana še preneše. Večja sila bi povzročila nepovratno spremembo membrane eritrocita (53, 54). Normalni deformacijski odziv membrane omogoča eritrocitu prehod skozi kapilare, ki imajo manjši premer kot eritrocit sam, normalna stabilnost membrane pa mu omogoča kroženje brez fragmentacije (53).

Za spremenjeno deformabilnost in obliko eritrocitov pri DE so pomembne predvsem mehanske lastnosti membrane. Z ekstrakcijo membranskega skeleta eritrocitov z detergentom Triton X-100 pri bolniku z DE so namreč ugotovili, da ima izoliran membranski skelet ravno tako kot cela celica eliptično obliko. To nakazuje, da je vzrok za eliptično obliko pri DE v membranskem skeletu (55). S poskusom, kjer so eritrocitom dodajali 2,3-difosfoglicerat (2,3-DPG), so ugotovili, da imajo membrane zaradi zvišane koncentracije 2,3-DPG zmanjšan deformacijski odziv in zmanjšano stabilnost. 2,3-DPG zrahlja povezavo med spektrinom in proteinom 4.1. Z dodatkom tripsina, ki cepi oba omenjena proteina, so tudi ugotavljali zmanjšano stabilnost membrane (53). Delna odsotnost proteina 4.1 povzroči eliptocitozo, popolna odsotnost pri homozigotih z mutacijo tega proteina pa eliptocitozo in fragmentacijo eritrocitov. V poskusu z ektacitometrom, napravo za merjenje deformacijskega odziva in stabilnosti membrane, je bil deformacijski odziv membrane pri obeh zmanjšan. Po dodatku proteina 4.1 membranam bolnih celic je prišlo do porasta

deformacijskega odziva in stabilnosti teh membran (56). Pri eritrocitih bolnikov z DE, kjer je vzrok bolezni mutacija spektrina, ki moti normalno povezovanje spektrinskih dimerov v tetramere, so ugotovili, da je razmerje med spektrinskimi dimeri in tetrameri premo sorazmerno padcu deformacijskega odziva in stabilnosti membrane teh eritrocitov (53, 57). Zgoraj naštetih poskusi nakazujejo, da so vodoravne povezave med skeletnimi proteini pomembne za ustrezne mehanske lastnosti membrane, za deformabilnost in za obliko celice.

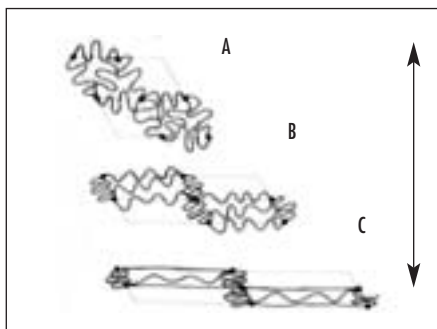
Model reverzibilne deformacije eritrocitne membrane

V naravnem, nedeformiranem stanju obstajajo spektrinske molekule v zviti konformaciji. Med povratno deformacijo pride do raztegnitve nekaterih spektrinskih tetramerov in do močnejšega skrčenja drugih, tako da pride do spremembe geometrične oblike celice, ne pa tudi do spremembe njene površine. Z večanjem deformacije postaja spektrinska mreža na nekaterih mestih vse bolj raztegnjena in nekatere spektrinske molekule dosežejo svoj maksimalni raztezek. To je tako imenovana mejna točka povratne deformacije (slika 4). Večje delovanje sile bi povzročilo pretrganje vodoravnih vezi membranskega skeleta (52). Za normalni deformacijski odziv membrane je torej nujno potrebna konformacijska prerazporeditev spektrinskih molekul. Pri strukturnih spremembah proteinov pri DE je normalna konformacijska prerazporeditev membranskega skeleta motena, zato je deformacijski odziv membrane manjši (4).

Kaj pa oblika?

Ob delovanju manjše sile za krajši čas se membrana obnaša kot elastično telo in po prenehanju delovanja sile zavzame prvotno obliko. Če pa je sila prevelika ali če traja predolgo, se membrana obnaša kot plastično telo in trajno spremeni obliko (52). Domnevno do tega pride zaradi strukturne prerazporeditve proteinov membranskega skeleta, kjer pride do pretrganja obstoječih vezi in vzpostavitve novih, ki celico obdržijo v deformiranem stanju (4, 14).

Predhodniki eritrocitov pri DE so okrogli in se po obliki ne razlikujejo od zdravih



Slika 4. Povratna deformacija (puščica) membranskega skeleta. A – nedeformirano stanje, B – raztegnitev enih in skrčenje drugih spektrinskih molekul, C – mejna točka reverzibilne deformacije.

eritrocitov. Eliptociti se oblikujejo v krvnem obtoku s staranjem celice in nastanejo iz diskocitov (58, 59). Eritrociti, ki so izpostavljeni strižnim silam *in vitro*, in eritrociti *in vivo* v krvnem obtoku zavzamejo eliptično ali padalu podobno obliko. Eritrociti pri zdravih ljudeh po prenehanju delovanja sile zavzamejo prvotno, bikonkavno obliko. Pri DE pa zaradi oslabljenih vodoravnih povezav med skeletnimi proteini ne pride le do konformacijske prerazporeditve proteinov, marveč tudi do strukturne prerazporeditve in celice tako obdržijo eliptično obliko (41). Če je sila prevelika ali če so normalne vodoravne povezave med proteini preveč oslABLJENE, pride ne le do eliptocitoze, marveč tudi do fragmentacije eritrocitov in poikilocitoze (60).

ZAKLJUČEK

Evolucijski razvoj je ustvaril membranski kompleks eritrocita, ki je visoko elastičen (100-krat mehkejši kot lateks primerljive debeline), hitro odziven na delujoče sile in sposoben velikih raztezkov brez fragmentacije (52). Domnevne

evolucijske napake, kot so genetske mutacije pri DE, so se selektivno obdržale v določenih predelih sveta (predvsem v Afriki), ki so endemični za malarijo. *In vitro* študije so pokazale manjšo invazijo in razmnoževanje plazmodija malarije v eritrocitih DE (38).

Torej, je DE bolezen ali naravna zaščita pred boleznijo? Zanimivo, kako lahko majhna stvar, kot je točkovna mutacija gena za spektrin in posledična minimalna sprememba tega proteina, popolnoma spremeni življenje človeku! Lahko ga reši Afričanu, ki bo zaradi tega laže prenašal okužbo z malarijo, ali zagreni in skrajša belcu, ki ga v naravnem okolju plazmodij malarije ne ogroža.

ZAHVALA

Članek je nastal kot plod enomesečnega dela na Inštitutu za biofiziko na Medicinski fakulteti v Ljubljani. Vsem, ki so mi pri delu pomagali, se iskreno zahvaljujem. Posebna zahvala gre prof. dr. Saši Svetini za vodenje, konstruktivne pogovore, spodbudo, koristne nasvete in popravke.

LITERATURA

1. Lux SE. Spectrin-actin membrane skeleton of normal and abnormal red blood cells. *Semin Hematol* 1979; 16 (1): 21-51.
2. Branton D. Erythrocyte membrane protein associations and erythrocyte shape. *Harvey Lect* 1981-82; 77: 23-42.
3. Gratzer WB. The red cell membrane and its cytoskeleton. *Biochem J* 1981; 198 (1): 1-8.
4. Liu SC, Derick LH. Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: structure-function relationships. *Semin Hematol* 1992; 29 (4): 231-43.
5. Tse WT, Lux SE. Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol* 1999; 104 (1): 2-13.
6. Michaely P, Bennett V. The ANK repeats of erythrocyte ankyrin form two distinct but cooperative binding sites for the erythrocyte anion exchanger. *J Biol Chem* 1995; 270 (37): 22050-7.
7. Hemming NJ, Anstee DJ, Staricoff MA, et al. Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte. *J Biol Chem* 1995; 270 (10): 5360-6.
8. Alloisio N, Dalla Venezia N, Rana A, et al. Evidence that red blood cell protein p55 may participate in the skeleton-membrane linkage that involves protein 4.1 and glycophorin C. *Blood* 1993; 82 (4): 1323-7.
9. Cohen CM. The molecular organization of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 1983; 20 (3): 141-58.
10. Terada N, Fujii Y, Ohno S. Three-dimensional ultrastructure of in situ membrane skeletons in human erythrocytes by quick-freezing and deep-etching method. *Histol Histopathol* 1996; 11 (3): 787-800.
11. Delaunay J, Alloisio N, Morlé L, et al. The red cell skeleton and its genetic disorders. *Mol Aspects Med* 1990; 11 (3): 161-241.
12. Iolascon A, Miraglia del Giudice E, Camaschella C. Molecular pathology of inherited erythrocyte membrane disorders: hereditary spherocytosis and elliptocytosis. *Haematologica* 1992; 77 (1): 60-72.
13. Bennett V. Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol Rev* 1990; 70 (4): 1029-65.
14. Palek J, Sahr KE. Mutations of the red blood cell membrane proteins: from clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. *Blood* 1992; 80 (2): 308-30.
15. Bennett V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta* 1989; 988 (1): 107-21.
16. Byers TJ, Branton D. Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82 (18): 6153-7.

17. Podgorski A, Elbaum D. properties of red cell membrane proteins: mechanism of spectrin and band 4.1 interaction. *Biochemistry* 1985; 24 (27): 7871-6.
18. Podgorski A, Alster P, Elbaum D. Interactions among red cell membrane proteins. *Biochemistry* 1988; 27 (2): 609-14.
19. Tsukita S, Tsukita S, Ishikawa H. Cytoskeletal network underlying the human erythrocyte membrane. *J Cell Biol* 1980; 85 (3): 567-76.
20. Ursitti JA, Pumplin DW, Wade JB, et al. Ultrastructure of the human erythrocyte cytoskeleton and its attachment to the membrane. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991; 19 (4): 227-43.
21. Gilligan DM, Bennett V. The junctional complex of the membrane skeleton. *Semin Hematol* 1993; 30 (1): 74-83.
22. Correas I, Leto TL, Speicher DW, et al. Identification of the functional site of erythrocyte protein 4.1 involved in spectrin-actin associations. *J Biol Chem* 1986; 261 (7): 3310-5.
23. Chien S, Sung LA. Molecular basis of red cell membrane rheology. *Biorheology* 1990; 27 (3-4): 327-44.
24. Pinder JC, Pekrun A, Maggs AM, et al. Interaction of the red cell membrane skeleton with the membrane. *Biochem Soc Trans* 1992; 20 (4): 774-6.
25. Rubtsov AM, Lopina OD. Ankyrins. *FEBS Lett* 2000; 482 (1-2): 1-5.
26. Weaver DC, Pasternack GR, Marchesi VT. The structural basis of ankyrin function. *J Biol Chem* 1984; 259 (10): 6170-5.
27. Soong CJ, Lu PW, Tao M. Analysis of band 3 cytoplasmic domain phosphorylation and association with ankyrin. *Arch Biochem Biophys* 1987; 254 (2): 509-17.
28. Pinder JC, Pekrun A, Maggs AM, Brain APR, Gratzer WB. Association state of human red blood cell band 3 and its interaction with ankyrin. *Blood* 1995; 85 (10): 2951-61.
29. Cohen CM, Dotimas E, Korsgren C. Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (pallidin). *Semin Hematol* 1993; 30 (2): 119-37.
30. Yawata Y. Red cell membrane protein band 4.2: phenotypic, genetic and electron microscopic aspects. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1204 (2): 131-148.
31. Yawata Y, Yawata A, Kanzaki A, et al. Electron microscopic evidence of impaired intramembrane particles and instability of the cytoskeletal network in band 4.2 deficiency in human red cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 1996; 33 (2): 95-105.
32. Workman RF, Low PS. Biochemical analysis of potential sites for protein 4.1-mediated anchoring of the spectrin-actin skeleton to the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1998; 273 (11): 6171-6.
33. Anderson RA, Lovrien RE. Glycophorin is linked by band 4.1 protein to the human erythrocyte membrane skeleton. *Nature* 1984; 307 (5952): 655-8.
34. Pasternack GR, Anderson RA, Leto TL, et al. Interactions between protein 4.1 and band 3. An alternative binding site for an element of the membrane skeleton. *J Biol Chem* 1985; 260 (6): 3676-83.
35. Von Rückmann B, Jöns T, Dölle F, et al. Cytoskeleton-membrane connections in the human erythrocyte membrane: band 4.1 binds to tetrameric band 3 protein. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1325 (2): 226-34.
36. Cohen AM, Liu SC, Lawler J, et al. Identification of the protein 4.1 binding site to phosphatidylserine vesicles. *Biochemistry* 1988; 27 (2): 614-9.
37. Rybicki AC, Heath R, Lubin B, et al. Human erythrocyte protein 4.1 is a phosphatidylserine binding protein. *J Clin Invest* 1988; 81 (1): 255-60.
38. Gallagher PG. Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R. *Semin Hematol* 2004; 41 (2): 142-64.
39. Palek J, Lambert S. Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 1990; 27 (4): 290-332.
40. Palek J, Lux SE. Red cell membrane skeletal defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. *Semin Hematol* 1983; 20 (3): 189-224.
41. Palek J, Jarolim P. Clinical Expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. *Semin Hematol* 1993; 30 (4): 249-83.
42. Parquet N, Devaux I, Boulanger L, et al. Identification of three novel spectrin alpha I/74 mutations in hereditary elliptocytosis: further support for a triple-stranded folding unit model of the spectrin heterodimer contact site. *Blood* 1994; 84 (1): 303-8.
43. Perrotta S, Miraglia del Giudice E, Alloisio N, et al. Mild elliptocytosis associated with the alpha 34 Arg → Trp mutation in spectrin Genova (alpha I/74). *Blood* 1994; 83 (11): 3346-9.
44. Gallagher PG, Tse WT, Coetzer T, et al. A common type of the spectrin alpha I 46-50a-kD peptide abnormality in hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis is associated with a mutation distant from the proteolytic cleavage site. Evidence for the functional importance of the triple helical model of spectrin. *J Clin Invest* 1992; 89 (3): 892-8.
45. Ohanian V, Evans JP, Gratzer WB. A case of elliptocytosis associated with a truncated spectrin chain. *Br J Haematol* 1985; 61 (1): 31-9.
46. Pothier B, Morlé L, Alloisio N, et al. Spectrin Nice (beta 220/216): a shortened beta-chain variant associated with an increase of the alpha I/74 fragment in a case of elliptocytosis. *Blood* 1987; 69 (6): 1759-65.

47. Tchernia G, Mohandas N, Shohet SB. Deficiency of skeletal membrane protein band 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosis. Implications for erythrocyte membrane stability. *J Clin Invest* 1981; 68 (2): 454-60.
48. Yawata A, Kanzaki A, Gilsanz F, et al. A markedly disrupted skeletal network with abnormally distributed intramembrane particles in complete protein 4.1 - deficient red blood cells (allele 4.1 Madrid): implications regarding a critical role of protein 4.1 in maintenance of the integrity of the red blood cell membrane. *Blood* 1997; 90 (6): 2471-81.
49. Lorenzo F, Dalla Venezia N, Morle L, et al. Protein 4.1 deficiency associated with an altered binding to the spectrin-actin complex of the red cell membrane skeleton. *J Clin Invest* 1994; 94 (4): 1651-6.
50. Marchesi SL, Conboy J, Agre P, et al. Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 in elliptocytosis. *J Clin Invest* 1990; 86 (2): 516-23.
51. Sondag D, Alloisio N, Blanchard D, et al. Gerbich reactivity in 4.1 (-) hereditary elliptocytosis and protein 4.1 level in blood group Gerbich deficiency. *Br J Haematol* 1987; 65 (1): 43-50.
52. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 1993; 30 (3): 171-92.
53. Chasis JA, Mohandas N. Erythrocyte Membrane Deformability and Stability: Two Distinct Membrane Properties That Are Independently Regulated by Skeletal Protein Associations. *J Cell Biol* 1986; 103 (2): 343-50.
54. Takakuwa Y, Ishibashi T, Mohandas N. Regulation of red cell membrane deformability and stability by skeletal protein network. *Biorheology* 1990; 27 (3-4): 357-65.
55. Tomaselli MB, John KM, Lux SE. Elliptical erythrocyte membrane skeletons and heat-sensitive spectrin in hereditary elliptocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78 (3): 1911-5.
56. Takakuwa Y, Tchernia G, Rossi M, et al. Restoration of Normal Membrane Stability to Unstable Protein 4.1-deficient Erythrocyte Membranes by Incorporation of Purified Protein 4.1. *J Clin Invest* 1986; 78 (1): 80-5.
57. Mohandas N. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1994; 23: 787-818.
58. Nash GB, Parmar J, Reid ME. Effects of deficiencies of glycoporphins C and D on the physical properties of the red cell. *Br J Haematol* 1990; 76 (2): 282-7.
59. Silveira P, Cynober T, Dhermy D, et al. Red blood cell abnormalities in hereditary elliptocytosis and their relevance to variable clinical expression. *Am J Clin Pathol* 1997; 108 (4): 391-9.
60. Palek J. Hereditary Elliptocytosis and Related Disorders. *Clin Haematol* 1985; 14 (1): 45-87.