

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

MEMBRÁNOVÉ STRUKTURY ERYTROCYTU

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR: Marie Platková

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

KONZULTANT: Mgr. Erika Roušarová

2015

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**THE STRUCTURE OF THE RED BLOOD CELL
MEMBRANE**

BACHELOR WORK

AUTHOR: Marie Platková

SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

CONSULTANT: Mgr. Erika Roušarová

2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Marie Platková**
Osobní číslo: **C12274**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Membránové struktury erytrocytů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na tematiku membránových struktur červených krvinek. V kompilační práci se nejprve zaměřte na stručný popis struktury a složení membrány erytrocytu, její funkci, tvar a fluiditu. Následně detailně popište několik vybraných membránových proteinů s uvedením jejich struktury a funkce. Kromě fyziologických funkcí se můžete případně zaměřit také na roli těchto struktur při daných onemocněních.
- 2) Ke zpracování kompilace využijte kromě recentních odborných knih také elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *WOSCI*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

Mgr. Erika Roušarová

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **12. prosince 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. července 2015**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2015

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 6. 2015

Marie Platková

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za zadání zajímavého tématu, cenné rady, vstřícnost při konzultacích a odborné vedení, které mi pomohlo při zpracování bakalářské práce.

Anotace

Tato práce je věnována membránovým strukturám erytrocytu. Zabývá se jak obecným uspořádáním membrány, tak i popisem jednotlivých částí a následně jejich strukturou a funkcí. Práce je především zaměřena na membránové proteiny. Závěr práce je věnován onemocněním, která vznikají v důsledku porušení integrity membrány.

Klíčová slova

Membrána, erytrocyt, membránové proteiny, poruchy membrány.

Annotation

This bachelor work is focused on description of membrane structure of the red blood cell. It deals with the basic structure of the membrane and on the other hand with describing individual parts of membrane, their structure and function, especially with respect to membrane proteins. The final part is dedicated to diseases, which are caused by disruption of the membrane.

Key words

Membrane, red blood cell, membrane proteins, membrane dysfunction.

Obsah

1. Úvod	10
2. Teoretická část	11
2.1 Historie objevu erytrocytu.....	11
2.2 Morfologie a fyziologické hodnoty erytrocytu	12
2.3 Membrána erytrocytu	13
2.3.1 Membránové lipidy	15
2.3.2 Fluidita membrány.....	17
2.3.3 Membránové proteiny.....	18
2.3.4 Periferní membránové proteiny	20
2.3.4.1 Spektrin	20
2.3.4.2 Aktin	23
2.3.4.3 Proužek 4.1	25
2.3.4.4 Proužek 4.2	26
2.3.4.5 Ankyrin	26
2.3.4.6 Adducin	27
2.3.4.7 Tropomodulin a tropomyosin.....	28
2.3.5 Integrální membránové proteiny	28
2.3.5.1 Proužek 3	28
2.3.5.2 Glykoforiny	30
2.3.5.3 Aquaporiny	31
2.4 Onemocnění spojené s membránou erytrocytu	32
2.4.1 Hereditární sférocytóza.....	32
2.4.2 Hereditární eliptocytóza	33
2.4.3 Hereditární stomatocytóza	35
3. Závěr	36
4. Seznam použité literatury	37

Seznam zkratk a symbolů

AQP	aquaporin
AMK	aminokyselina
B3	proužek 3 (<i>Band 3</i>)
CD47	transmembránový protein kódovaný genem CD47
CTD	C terminální konec (<i>Carboxyl Terminal Domain</i>)
FERM	<i>Four.one protein, Ezrin, Radixin, Moesin</i>
GLUT1	transportér pro glukózu (<i>Glucose Transporter 1</i>)
GPA	glykoforin A
GPB	glykoforin B
GPC	glykoforin C
HE	hereditární eliptocytóza
HS	hereditární sférocytóza
LW	Landsteiner-Weiner krevní skupina
MARCKS	<i>Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate</i>
OHS	hydratovaná hereditární stomatocytóza (<i>Overhydrated Hereditary Stomathocytosis</i>)
PC	fosfatidylcholin
PE	fosfatidylethanolamin
PI	fosfatidylinositol
PIP	fosfatidylinositol-monofosfát
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PS	fosfatidylserin
RBC	erytrocyt (<i>Red Blood Cell</i>)
RHAg	RH asociovaný glykoprotein
SABD	spektrin-aktin-vázající doména (<i>Spectrin-Actin-Binding-Domain</i>)
SAO	jihovýchodní asijská ovalocytóza (<i>South-east Asian Ovalocytosis</i>)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SM	sfingomyelin
XK	XK protein
4.1R	protein 4.1

1. Úvod

Erytrocyt je stále považován za relativně jednoduchý model buňky, snadno přístupné a navíc bezjaderné. Přestože byl dříve považován pouze za jakýsi biologický vak, vyplněný hemoglobinem, jehož jedinou funkcí je transport plynů mezi plícemi a tkáněmi, mnohými studiemi bylo prokázáno, že má vysoce komplexní strukturu srovnatelnou se strukturou membrán většiny eukaryotických buněk.^[1]

Právě díky snadné přístupnosti se erytrocyt stal modelovým systémem pro studium eukaryotických membrán, takže jeho obal patří k nejvíce prostudovaným membránám vůbec. Mechanická stabilita erytrocytární membrány je zásadní pro přežití a správnou funkci erytrocytů. Její poškození vede buď ke vzniku nejrůznějších onemocnění, mezi něž patří hereditární sférocytóza či eliptocytóza, které narušují správnou funkci erytrocytu, nebo k destrukci buňky samotné.

V této práci se pokusím přiblížit základní pohled na složení membrány, její strukturu, funkci a nejběžnější onemocnění vznikající v důsledku jejího narušení.

2. Teoretická část

2.1 Historie objevu erytrocytu

Poprvé byly erytrocyty (RBCs) pozorovány a popsány roku 1668 holandským biologem Janem Schwammerdamem, avšak jejich unikátní vlastnosti byly popsány až roku 1675 v díle *Philosophical Transaction of the Royal Society* holandského vědce Antonie van Leeuwenhoeka, který uvedl, že u zdravého člověka RBC dokážou měnit svůj kulatý tvar v oválný a tak procházet skrze úzké krevní kapiláry. Dalším vědcem, kterého je třeba zmínit, byl George Gulliver, který publikoval v roce 1862 dílo *Blood of Vertebrata* ve kterém uvedl, že se RBC skládá ze dvou naprosto odlišných částí - jedné membranózní, bezbarvé a nerozpustné ve vodě, a druhé viskózní, rozpustné ve vodě a obsahující barvivo.^[2]

Gorter a Grendel v roce 1924 provedli experiment, díky kterému jako první poskytli náhled na strukturu membrány jako takové. Ve svém díle uvedli: "*Proto se domníváme, že každý chromocyt je obklopen vrstvou lipidů, kde polární skupiny jsou lokalizovány na vnitřní a vnější straně.*"^[3]

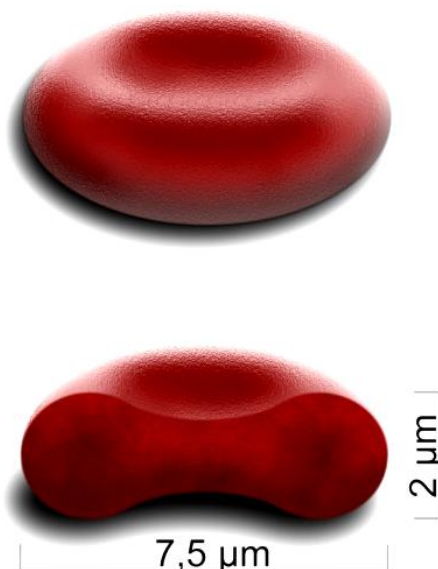
Současná představa o struktuře membrány je dána díky modelu Singera a Nicolsona z roku 1972, kteří membránu popsali pomocí fluidního modelu mozaiky. Pro popis svého modelu se přitom opírali o koncept z roku 1935 vytvořený Daniellii a Davsonem, kteří představili dvojvrstvu fosfolipidů jako základní stavební prvek biomembrán.^[4]

Výše jmenovaní vědci jsou jen hrstkou těch, kteří se významně podíleli na utváření modelu membrány RBC, jak jej známe dnes. Během více jak 40 let od přelomového objevu Singera a Nicolsona došlo k řadě úprav v původním pojetí stavby membrány.

2.2 Morfologie a fyziologické hodnoty erytrocytu

Zralý erytrocyt je jednou z nejspecializovanějších a zároveň nejjednodušších buněk lidského těla, dokonale přizpůsobený své funkci a to transportu dýchacích plynů mezi tkáněmi a plicními alveoly.^[5] Morfologicky se jedná o bezjadernou krevní buňku bikonkávního tvaru, skládající se v podstatě jen z membrány, obklopující roztok hemoglobinu, který tvoří přibližně 95 % nitrobuňčných bílkovin. Vzniká v kostní dřeni při procesu zvaném erythropoéza, při němž jsou veškeré organely, včetně jádra, z buňky odstraněny.

Denní produkce u dospělého člověka činí asi 200×10^9 erytrocytů. Délka života jednoho RBC se pohybuje okolo 120 dní, poté je erytrocyt odstraněn makrofágy ve slezině nebo játrech. Průměrná velikost erytrocytu činí asi 7,5 μm , tloušťka 2 μm u periferie a 1 μm ve středu (obr. 1). Povrch erytrocytu je cca 140 μm^2 .



Obr. 1: Erytrocyt - průřez a pohled shora.

Pro výměnu plynů mezi tkáněmi je bikonkávnní tvar důležitý, protože právě díky tomuto tvaru je dosaženo maximálního povrchu při zachování stejného objemu. To znamená, že bikonkávnní tvar zvětšuje povrch asi o 40 % proti kouli stejného objemu.^[2] Navíc tento tvar umožňuje reverzibilní deformaci RBC a tím jeho prostup i přes velmi úzké kapiláry. Deformabilita, tedy schopnost vydržet narušení a deformaci membrány a poté opětovný návrat do původního tvaru

bez fragmentace membrány či ztráty integrity, závisí na třech faktorech a to: geometrii, která je dána poměrem povrchu a objemu RBC, viskozitě buněčného obsahu a vnitřní elasticitě membrány RBC.^[6]

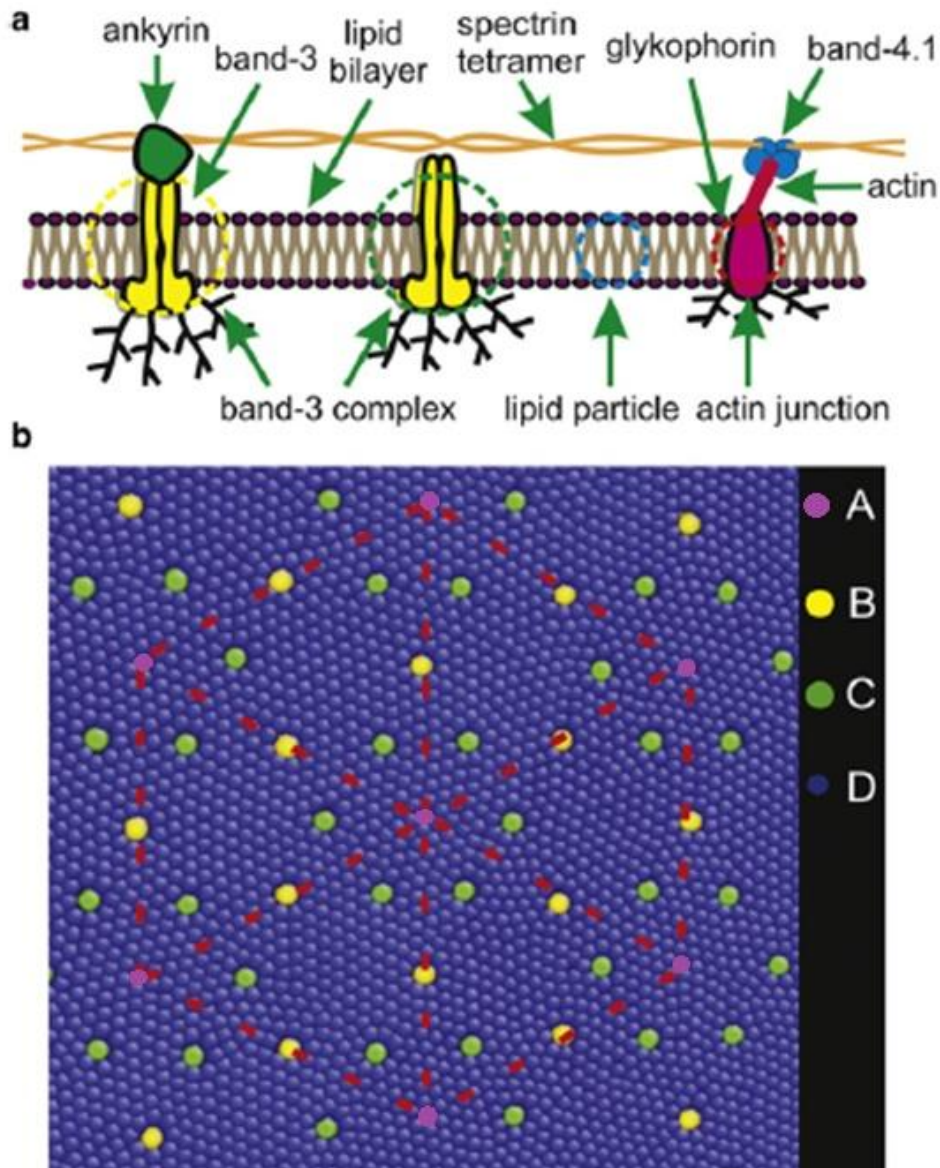
Pro udržení bikonkávního tvaru je nezbytné zachování izotonického prostředí, tj. 0,9% roztok NaCl. V hypotonickém prostředí, tj. roztoku, jehož osmotický tlak je nižší než v krevní plazmě, dochází k hemolýze erytrocytu. Naopak v hypertonickém prostředí se RBC smršťuje díky snaze vyrovnat osmotické tlaky vně a uvnitř buňky.

Za normálních okolností má zdravý dospělý muž koncentraci RBCs $4,2-5,8 \times 10^{12}$ /litr krve a žena $3,5-5,2 \times 10^{12}$ /litr krve. Počet RBC je u dospělého člověka poměrně stálá hodnota, mění se pouze v nepatrném rozmezí. Fyziologický střední objem RBC, neboli MCV je 82-100 fl a množství hemoglobinu v jednom RBC, čili MCH je 28-35 pg. Hodnoty lišící se od fyziologických poukazují na různé patologické stavy.

2.3 Membrána erytrocytu

Membrána RBC, složená z dvojvrstvy lipidů se zakotvenými integrálními proteiny a z cytoskeletální spektrinové sítě ležící pod lipidovou dvojvrstvou,^[7] je dynamickým systémem, tvořícím bariéru mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím.^[8] Je vybavena i četnými receptory a efektory, díky nimž může buňka reagovat na změny ve svém okolí. Dále je prostoupena vysoce selektivními kanály a pumpami, tvořenými molekulami proteinů, které umožňují import a export specifických látek.^[9]

Membrána RBC vykazuje unikátní vlastnosti - vysokou elasticitu, schopnost okamžité odpovědi na změnu povrchového napětí kapaliny, strukturní pevnost a odolnost vyšší než ocel.^[2] Díky strukturnímu uspořádání a vhodnému poměru mezi objemem a povrchem buňky^[10] je erytrocyt schopen během svého života v krevním oběhu lehce procházet skrze velmi úzké kapiláry mnohonásobně menší než je jeho průměr, a také vydržet velký rozdíl osmotických tlaků, jemuž je vystaven například v ledvinách. Lze tedy říci, že funkce RBC závisí na jeho mechanických vlastnostech.^[11]



Obr. 2: Dvousložkový model membrány erytrocytu: (a) Schéma membrány lidského erytrocytu. Zleva: první kroužek odpovídá komplexu proužku 3 spojeného se spektrinou pomocí ankyrinu. Druhý kroužek odpovídá volnému komplexu proužku 3, třetí lipidovým částicím a čtvrtý označuje aktinové uzly. (b) Model membrány lidského erytrocytu. A reprezentuje aktinové uzly, B komplexy proužku 3 spojené se spektrinou, C volné komplexy proužku 3 a D představuje lipidové částice. Přerušovaná červená čára značí hexagonální spektrinou síť. ^[15]

Procentuální zastoupení jednotlivých složek v RBC je přibližně 20 % (m/m) vody, 40 % proteinů, 35 % lipidů a 5 % uhlohydrátů.^[6] Cytoskelet je dvoudimenzionální síť spektrinových tetramerů a oligomerů zesíťovaných pomocí proteinu 4.1 a krátkých aktinových filament do hexagonální sítě. S membránou je spojen prostřednictvím vazeb spektrinu s ankyrinem, ankyrinu s proužkem 3

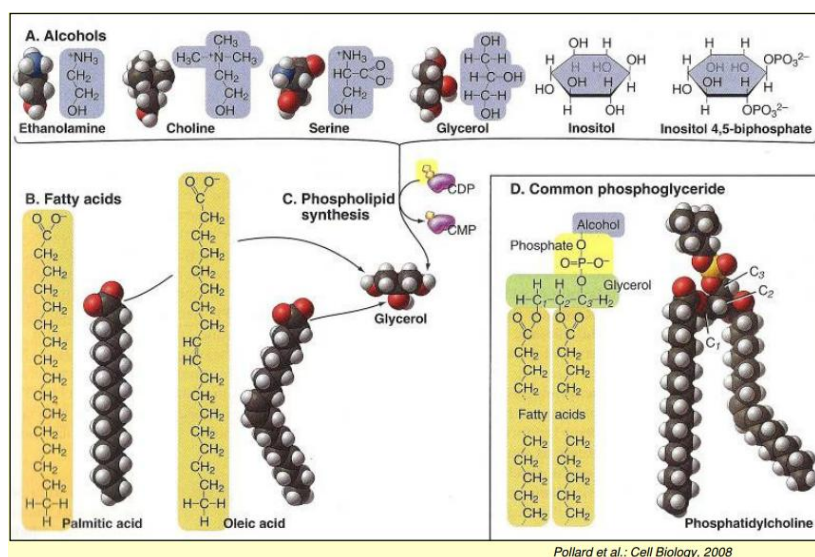
(B3) a také pomocí interakcí mezi proteinem 4.1 a glykoforinem C (obr. 2a). Membránový cytoskelet je hlavní determinantou udávající membráně tvar, sílu a flexibilitu. Pomáhá udržovat organizaci lipidů a integrálních proteinů, jejich lokalizaci a pohyblivost.^[12, 13]

Síla vazby mezi lipidovou dvojrstvou a cytoskeletem je nezbytná pro funkci buňky. Fixní povrch lipidové dvojrstvy erytrocytu striktně vymezuje jeho deformabilitu. Jestliže dojde ke ztrátě části povrchu lipidové dvojrstvy, deformabilita se sníží a při větší ztrátě povrchu, dojde dokonce k destrukci buňky samotné a následnému odstranění z oběhu.^[14]

2.3.1 Membránové lipidy

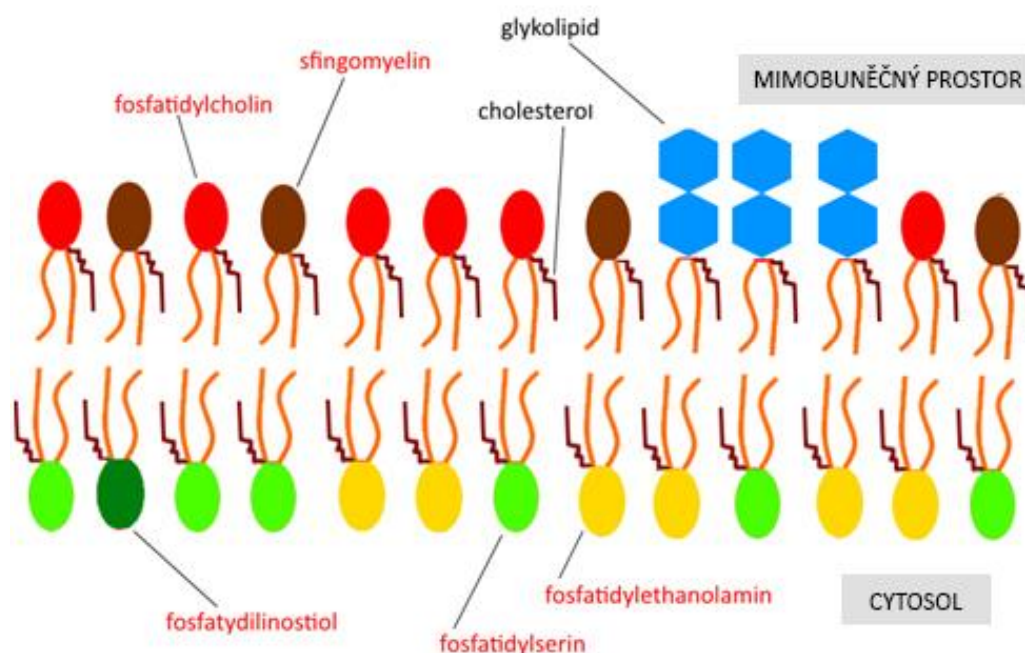
Všechny buněčné membrány jsou složeny z lipidů a proteinů a mají obecně stejnou strukturu. Lipidová část se skládá z milionů lipidových molekul, mezi něž patří fosfolipidy (obr. 3), sfingolipidy a cholesterol, uspořádaných do dvou těsně přiléhajících listů formujících lipidovou dvojrstvu.^[9] Lipidová dvojrstva je složena z ekvivalentního množství cholesterolu, distribuovaného v membráně rovnoměrně, a lipidů rozložených asymetricky.^[2]

Převládajícími lipidy v lidském RBC jsou: fosfatidylcholin (PC), fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylserin (PS) a sfingomyelin (SM). Menší část tvoří fosfatidylinositol (PI), fosfatidylinositol-monofosfát (PIP), fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) a další.^[6]



Obr. 3: Fosfolipidy; (A) alkoholy, (B) mastné kyseliny, (C) syntéza fosfolipidů, (D) příklad fosfolipidu.^[16]

Fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin a minoritní fosfatidylinositol jsou téměř výhradně lokalizovány ve vnitřní vrstvě, zatímco SM a PCH majoritně ve vnější vrstvě, jak je znázorněno na obrázku 4.^[2,14] Udržování asymetrického rozdělení fosfolipidů, zejména výhradní lokalizace PS ve vnitřní vrstvě, má několik důležitých funkčních významů. Makrofágy jsou schopny rozpoznat a fagocytovat ty červené krvinky, které obsahují větší část PS ve vnější vrstvě. Ztráta asymetrie vede k přesunu PS z vnitřní do vnější vrstvy a následnému odstranění RBC z cirkulace.^[17] Majoritní distribuce PS ve vnitřní vrstvě inhibuje adhezi normálních RBC na endoteliální buňky a umožňuje tak RBC hladký průchod krevním řečištěm.^[2,18]



Obr. 4: Asymetrické rozdělení fosfolipidů a glykolipidů v plazmatické membráně.

Membránové lipidy jsou amfipatické, což znamená, že obsahují hydrofilní a hydrofobní část.^[4] U fosfolipidů je hydrofilní hlava spojena se zbytkem molekuly přes fosfátovou skupinu. Nejčastějším fosfolipidem je fosfatidylcholin, který obsahuje molekulu cholinu připojenou k fosfátu v hydrofilní hlavě a dva uhlovodíkové řetězce mastných kyselin představující hydrofobní konce.^[9]

Uhlíkové řetězce mastných kyselin fosfolipidů dosahují různé délky, obvykle mezi 14 až 24 uhlíky, nejčastěji však mezi 16 až 18 uhlíky. Tyto řetězce pak mohou být nasycené i nenasycené.^[19] Rozdíly v délce a nasycenosti řetězců jsou velmi důležité, jelikož ovlivňují fluiditu.^[20]

Hydrofilní hlavy jsou v obou listech tvořících dvojvrstvu obráceny k vodnému prostředí, naproti tomu všechny hydrofobní konce jsou před vodným prostředím chráněny a leží jeden vedle druhého ve vnitřním prostoru lipidové dvojvrstvy (obr. 4).^[9] K formování lipidové dvojvrstvy dochází ve vodném prostředí spontánně.^[20] Polární skupiny interagují s vodou pomocí vodíkových můstků a elektrostatických interakcí, zatímco hydrofobní řetězce vytvářejí nepolární vrstvu vodu odpuzující.^[21]

Kromě majoritních fosfolipidů se v membráně vyskytují i glykolipidy, jejichž velká část je v RBC odvozena od aminoalkoholu sfingosinu. Majoritně jsou lokalizovány na extracelulární straně lipidové dvojvrstvy, ze které vyčnívá jejich sacharidová část do extracelulárního prostoru. Glykolipidy nesou na své molekule důležité antigeny, jmenovitě antigen A, B, H, Le^a a Le^b a mají řadu dalších důležitých funkcí.^[6]

2.3.2 Fluidita membrány

Jednou z nejdůležitějších vlastností lipidové dvojvrstvy je fluidita, tedy tekutost, nezbytná pro mnoho membránových funkcí.^[20] Lipidy ani bílkoviny nejsou vázány zcela pevně na jednom místě membrány a mohou se tedy v rámci své vrstvy membránou pohybovat. Pro pohyb mezi vrstvami slouží různé lipidové transportéry nezbytné pro udržení membránové asymetrie. Patří sem flipázy, neboli ATP-dependentní transportéry, které transportují fosfolipidy z vnější do vnitřní vrstvy,^[2] dále flopázy – ATP-independentní transportéry, přesouvající fosfolipidy pomalu, ale neustále do vnější vrstvy,^[22] a také *scrambleses* transportéry, ATP-independentní, schopné transportu lipidů v obou směrech.^[23] Flipáza je vysoce selektivní pro PS a primárně udržuje tento lipid na vnitřní straně membrány. Asymetrie je udržována kombinací aktivace těchto proteinů a fyziologických vlastností dvojvrstvy.^[23]

Fluidita membrány je dána několika faktory (tab. 1), a to typem cholesterolu (volný, esterifikovaný), třídou fosfolipidů, poměrem cholesterolu a fosfolipidů,

stupněm nasycení mastných kyselin a délkou uhlíkových řetězců.^[6] Spolu s růstem fluidity roste i permeabilita pro vodu a malé hydrofilní molekuly.^[9]

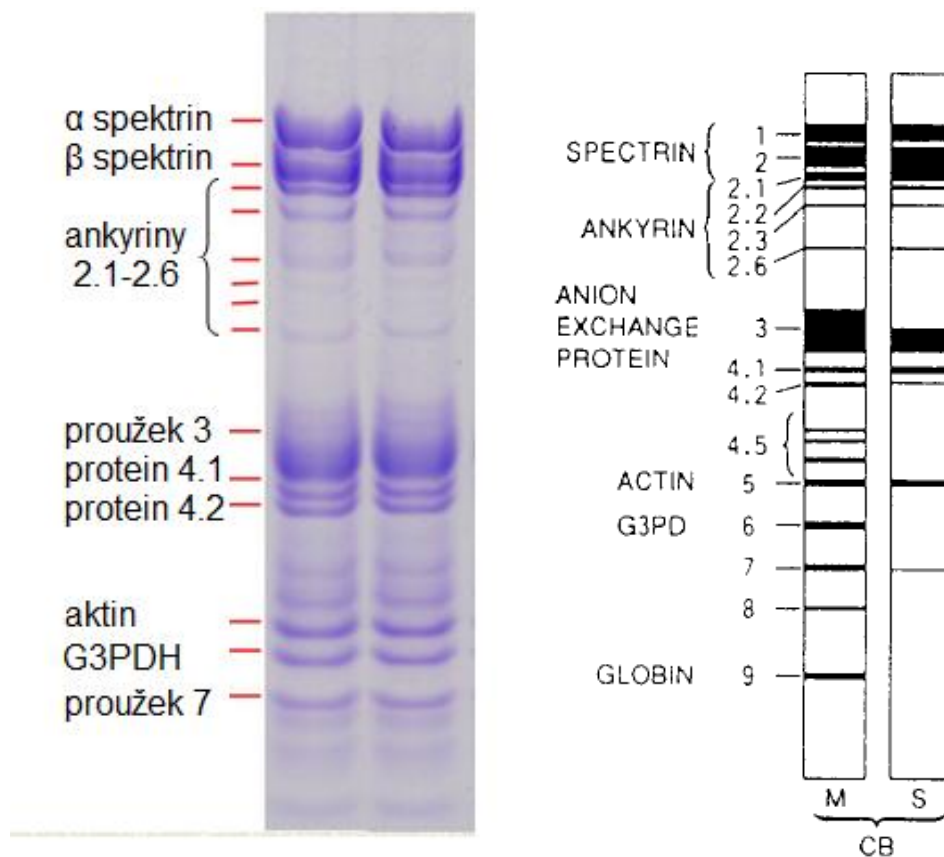
Tabulka 1: Faktory ovlivňující fluiditu membrány

Fluiditu zvyšují:	Fluiditu snižují:
Esterifikovaný cholesterol Fosfatidycholin Krátké uhlíkové řetězce Nižší stupeň nasycení MK	Volný cholesterol Sfingomyelin Fosfatidylethanolamin Delší uhlovodíkové řetězce Vyšší stupeň nasycení MK

2.3.3 Membránové proteiny

Průkopníkem při studiu membránových proteinů byli Fairbanks a kol.^[24], kteří roku 1971 použili pro rozdělení proteinů metodu SDS-PAGE neboli elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (obr. 5). Díky této metodě byly proteiny rozděleny do proužků podle své molekulové hmotnosti, a tak mohly být identifikovány. Jména těmto proteinům byla dána podle pořadí, v jakém se rozdělily na gelu a to následovně: nejpomalejší byl proužek 1 (α -spektrin), poté proužek 2 (β -spektrin), proužek 2.1 (ankyryn), proužek 3 (aniontový transportér), proužek 4.1 (protein 4.1), proužek 4.2 (protein 4.2), proužek 5 (aktin), proužek 6 (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza) a proužek 7 (aquaporin).^[6]

Membránové proteiny můžeme dělit do dvou skupin a to podle toho, jak snadno je lze z membrány odstranit (tab. 2). První skupinou jsou periferní proteiny, které byly původně funkčně definovány jako proteiny, jež mohou být z membrány odstraněny, aniž by došlo k porušení membránové mikrostruktury. K odstranění periferních proteinů je třeba pouze změnit pH či koncentraci solí, což je pravděpodobně způsobeno pouze částečným zanořením proteinů do membrán. Patří sem například α i β řetězce spektrinu.^[6] Periferní proteiny jsou prostřednictvím nekovalentních interakcí, elektrostatických či komplexních, navázány k integrálním součástem membrány.^[5]



Obr. 5: SDS PAGE: rozdělení proteinů membrány erytrocytu podle jejich molekulové hmotnosti a náboje: vlevo reálné rozdělení membránových proteinů na polyakrylamidovém gelu, ^[upraveno dle 25] vpravo rozdělní schematické. ^[6]

Druhou skupinu tvoří integrální proteiny, které nemohou být od lipidové části odděleny pouhou změnou iontové síly. Na jejich odstranění je zapotřebí agresivnějších prostředků, jako například detergentů, vyvázání Ca^{2+} pomocí komplexotvorných činidel, nebo zvýšení teploty za současného rozpuštění lipidové dvojvrstvy. Peptidové řetězce integrálních bílkovin většinou procházejí napříč lipidovou dvojvrstvou, často i několikrát. Do této skupiny patří glykoforiny a proužek 3. Část integrálních membránových proteinů představují také antigeny krevních skupin. ^[6,21]

Jiným možným dělením je dělení podle jejich funkce. První skupinou jsou proteiny tvořící cytoskelet - proužek 4.1, aktin, spektrin a další (tab. 2). Vzájemnou asociací vytvářejí cytoskeletální síť nacházející se pod lipidovou dvojvrstvou. Druhou skupinu tvoří integrální proteiny a třetí skupinou jsou kotvící proteiny, kam patří protein 4.2 a ankyrin. ^[6]

Tabulka 2: Dělení membránových proteinů

Periferní membránové proteiny		Integrální membránové proteiny
Skeletální proteiny	Kotvící proteiny	
Spektrin Protein 4.1 Aktin Adducin Tropomyozin Tropomodulin	Protein 4.2 Ankyrin	Proužek 3 Glykoforin A Glykoforin B Glykoforin C Aquaporin Antigeny krevních skupin

Čtvrtá skupina membránových proteinů jsou proteiny s transportní funkcí, kam patří proužek 3 (aniontový transportér), aquaporin 1 (transportér pro vodu), Glut1 (transportér pro glukózu a L-dehydroaskorbovou kyselinu), Kidd antigen (transportér pro močovinu), RhAG (transportér pro plyny), Na⁺-K⁺-ATPáza, Ca²⁺-ATPáza a různé kotransportéry pro ionty.^[2,23]

2.3.4 Periferní membránové proteiny

2.3.4.1 Spektrin

Prvním studovaným membránovým proteinem byl spektrin. Významným vědcem, který se jím zabýval již roku 1968, byl Marchesi.^[26] Do té doby bylo všeobecně uznávané, že membrána RBC se skládá pouze z jediného proteinu.^[6]

Spektrin je přítomen asi v počtu 2×10^5 kopií v jedné erytrocytární buňce a představuje tak 25-30 % všech membránových proteinů, a 75 % membránového cytoskeletu.^[6,27] Jakožto hlavní součást erytrocytárního cytoskeletu udává membráně integritu a flexibilitu.^[28] Skládá se ze dvou antiparalelních forem – α - a β -spektrinu. Unikátní struktura obou izoform je

dána triádami opakujících se helixů, složených ze 106 aminokyselinových zbytků, neboli repetic.^[29]

Repetice aminokyselin (AMKs) jsou vysoce uspořádané levotočivé závity, tvořené dvěma paralelními (A a C) a jedním antiparalelním (B) helixem. Helix A, složený z 28 AMK, se obrací a utváří tak 34 AMK dlouhý B-helix. Dalším otočením se vytváří C-helix o 31 AMK. Vazby mezi helixy jsou zprostředkovány pomocí hydrofobních a elektrostatických interakcí. Vlastnosti repetic, jejich relativní upořádání, orientace a konformační stabilita linkerů mezi nimi, jsou považovány za klíčové faktory strukturních a mechanických vlastností spektrinu.^[6,30] Dlouhá vlákna spektrinu vznikají přikládáním repetic k sobě. Jejich skládání probíhá spojením třetí šroubovice první repetice a první šroubovice druhé repetice,^[31] jak je znázorněno na obr. 6C.

α -spektrin se skládá z 20 plných repetic a jedné částečné lokalizované na N-konci (celkem 2429 AMK). β -spektrin se skládá z 16 plných repetic a jedné částečné na C-konci (celkem 2137 AMK).^[6,28] (obr. 6A)

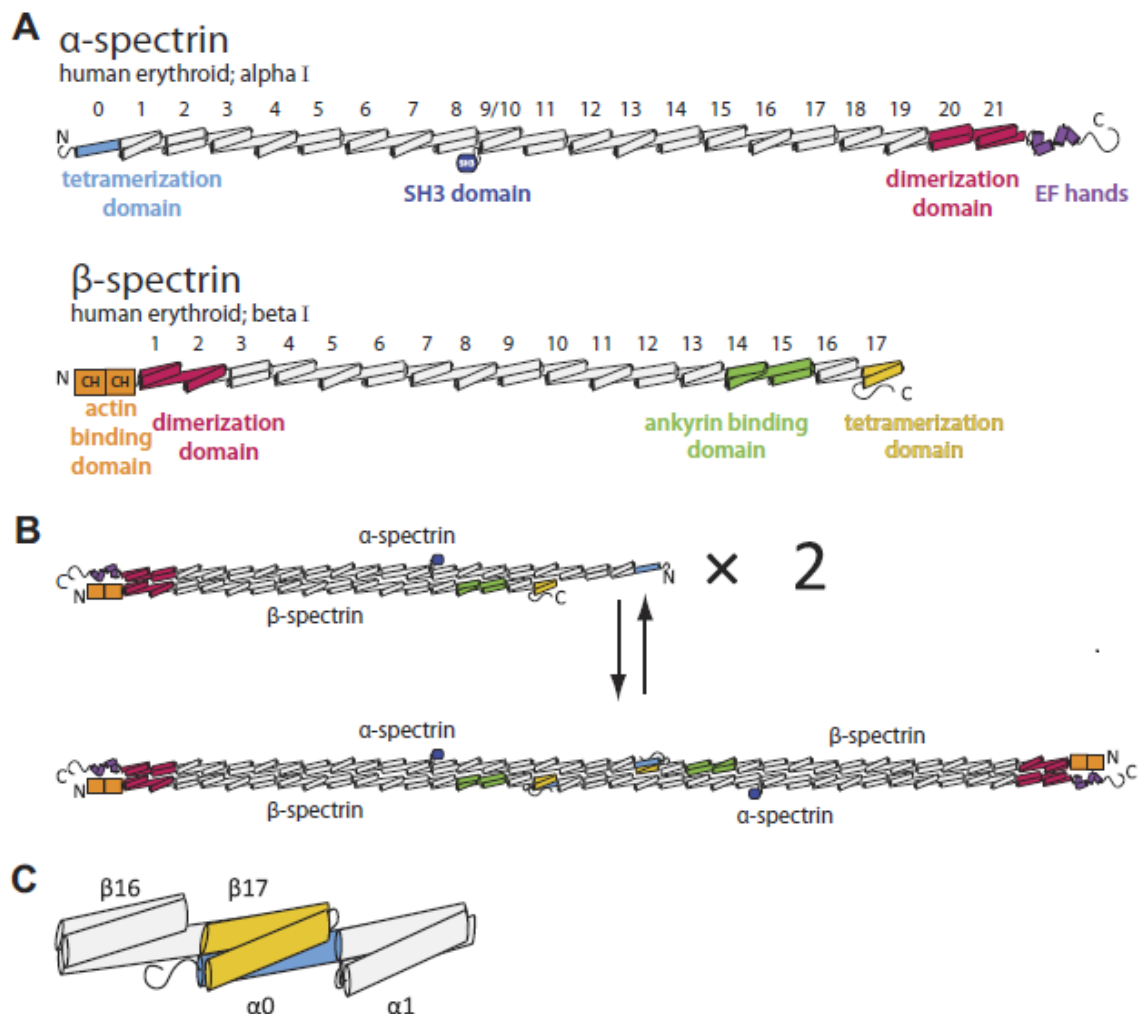
Řetězec α -spektrinu (280 kDa)^[32] lze rozdělit do pěti domén (řazeno od N-konce), a to: αI (segment 1-6: 80 kDa), αII (7-10, včetně SH3 segmentu: 46 kDa), αIII (segment 11-14: 52 kDa), αIV (segment 15-17: 41 kDa) a αV (18-21: 41 kDa).^[6,33]

β -spektrin (246 kDa) začíná nehomogenním NH_2 -koncem obsahujícím aktin-vázající doménu. Následuje 17 homogenních 106 AMK repetic.^[6,32] Vazebné místo pro ankyrin se nachází mezi 15. a 16. otočkou. β -spektrin je rozdělen do 4 domén (řazeno od C-konce): βI (segment 17 až po C-konec: 23 kDa), βII (segment 11-16: 65 kDa), βIII (8-10: 33 kDa) a βIV (1-7: 74 kDa).^[6,33]

Řetězce α - a β -spektrinu jsou nekovalentně asociovány do antiparalelního heterodimeru. Vazba probíhá mezi specifickou oblastí blízko C-konce α spektrinu a komplementární oblastí N-konce β -spektrinu.^[33] Těmito oblastmi jsou αV (segment 20-21) a βIV (segment 1-2) nazývané jako nukleační místa.^[17,28]

Stavba spektrinového vlákna začíná laterální heterodimerickou asociací N-konce α spektrinu prvního dimeru a C-konce β -spektrinu druhého dimeru.^[17] (obr. 6B) Tato „*head-to-head*“ interakce mezi dvěma α/β dimery vede k vytvoření tetrameru formujícího hexagonální základ spektrinové sítě. Tetramery spektrinu (obr. 6B) v RBC jsou složeny do řetězců o délce přibližně

75 nm, avšak při protažení mohou teoreticky dosáhnout téměř třínásobné délky, tedy asi 200 nm,^[7,28,34] což membráně dává značnou elasticitost.



Obr. 6: Schéma erytrocytárního spektrinu: (A) Izoformy spektrinu. (B) Asociace spektrinových vláken. (C) Detail spojení α -spektrinu (repetice 0-1) a β -spektrinu (repetice 16-17).^[28]

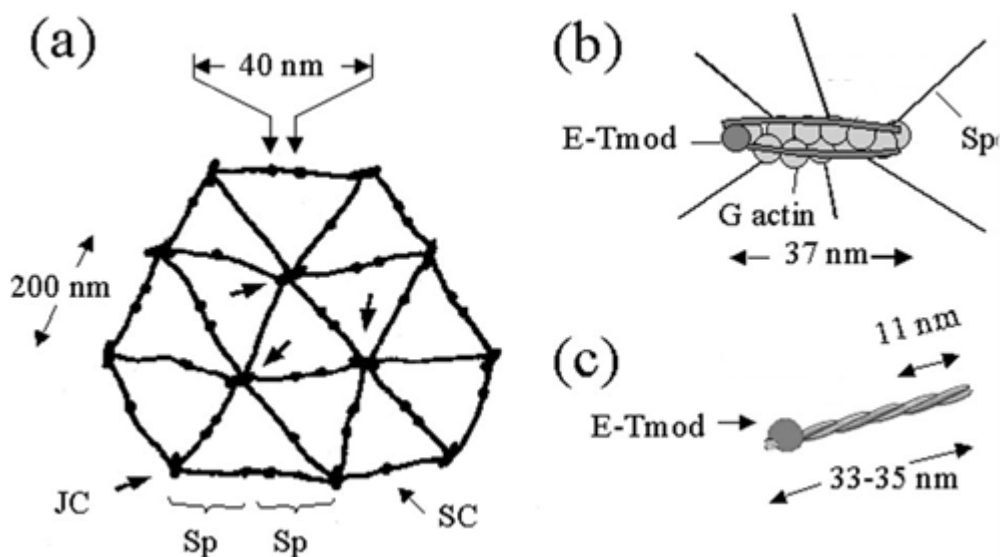
Strukturně se síť spektrinu (obr. 2b) skládá přibližně z $3,3 \times 10^4$ repetic. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že každá tato jednotka je viditelná jako malý paprskovitý hexagon (obr. 2b) tvořený 4.1R komplexem se šesti dlouhými α/β spektrinovými dimery vybíhajícími z centrálního krátkého aktinového protofilamentu, a ze šesti ankyrinových komplexů (obr. 11) skládajících se z ankyrinu, proužku 3 a proteinu 4.2. Poloměr hexagonů závisí na stupni protažení spektrinových dimerů. Ne všechny spektrinové dimery jsou spojeny s ankyrinovým komplexem, avšak

většina spektrinových tetramerů je asociována s jedním nebo dvěma ankyrinovými komplexy.^[35] Kromě hexagonů je ve spektrinové síti přítomno přibližně 3 % pentagonů a 8 % heptagonů.^[36]

Spektrin je klíčovou součástí cytoskeletální sítě, která reguluje tvar, membránovou deformabilitu,^[37] stabilitu a laterální pohyb proužku 3 jakožto integrálního proteinu.^[6] α - i β -spektrin mají vazebná místa pro PS, který interaguje s proteinem 4.1 a ankyrinem.^[38]

2.3.4.2 Aktin

Erytrocytární aktin je globulární protein o 43 kDa v buňce přítomen v počtu $4\text{-}5 \times 10^5$ kopií.^[6] Skládá se z 375 AMK-zbytků, poskládaných do dvou majoritních domén. Menší doména je rozdělena na subdomény 1 a 2, větší doména na subdomény 3 a 4. Aktin má tendenci se formovat do filamentózní struktury (F-aktinu), tvořené 14-16 aktinovými monomery, a formovat tak zřetelnou dvoušroubovici. Délka aktinových vláken v erytrocytární membráně je regulována tropomyosinem a činí přibližně 37 nm.^[39, 17]



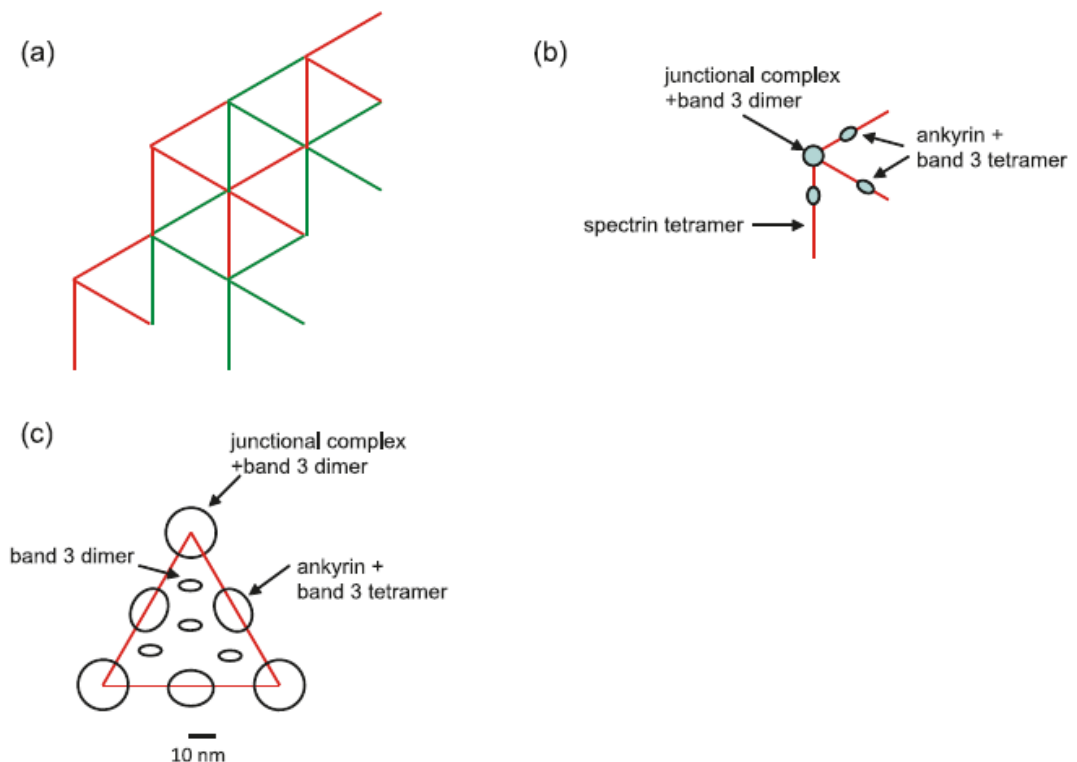
Obr. 7: Aktin: a) schéma hexagonální sítě, b) 4.1R komplex, c) vazba spektrinu s tropomodulinem. Sp = spektrin, JC = 4.1R komplex, SC = ankyrin komplex, E-Tmod = tropomodulin.^[39]

Aktin je důležitou součástí 4.1R komplexu (obr. 12), který se skládá z 15-20 aktinových molekul poskládaných do dvou vláken obtočených okolo dimeru tropomyosinu, následně překrytých tropomodulinem (obr. 12).^[34] Aktinová

vlákna interagují přímo s β -spektrinem a jsou stabilizovány pomocí spojení zprostředkovaného proteinem 4.1, který váže jak aktin, tak spektrin. F-aktin je většinou asociován se šesti α/β -spektrinovými heterodimery (obr. 7).^[17, 39]

4.1R komplex zahrnuje další aktin vázající proteiny, jakožto dematin a aktin svazující proteiny jako α - a β -adducin. 4.1R komplex je známý pro svou interakci s glykoforiny prostřednictvím proteinu p55 a proteinu 4.1. Množství těchto komplexů na jeden erytrocyt je asi 4×10^4 .^[34,39] Aktin interaguje s N-koncem β -spektrinových vláken pouze slabě, interakce jsou proto výrazně zvýšeny proteinem 4.1 (4.1R). Komplex spektrin-aktin-4.1R je klíčovým regulátorem mechanické stability membrány.^[17]

Cytoskelet membrány erytrocytu je tvořen hexagonální mříží (obr. 8a), složenou z jednotlivých elementů. Každý element obsahuje jeden 4.1R komplex, tři spektrinové tetramery, tři ankyriny, tři tetramery B3, jeden dimer B3 asociovaný s 4.1R komplexem (obr. 8b) a také čtyři volné dimery proužku 3, které lze vidět na obr 8c.^[34]

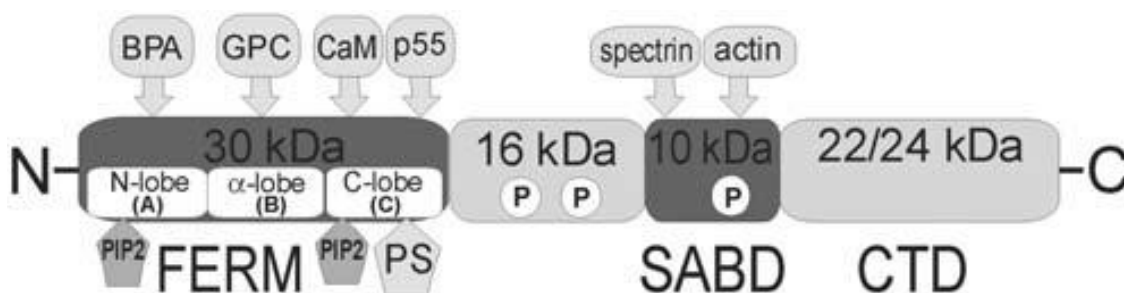


Obr. 8: Schéma 4.1R komplexu: a) hexagonální síť, b) složení elementu, c) 4.1R komplex s volnými B3 dimery.^[34]

2.3.4.3 Proužek 4.1

Protein 4.1 je fosfoprotein globulárního tvaru, přítomný na membráně v počtu asi 2×10^4 kopií. Jeho molekulová hmotnost se pohybuje mezi 78-80 kDa. Protein 4.1 se v membráně erythrocytu vyskytuje ve dvou formách lišících se molekulovou hmotností - protein 4.1a (80 kDa) a protein 4.1b (78 kDa).^[6] Rozdíl 2 kDa je výsledkem konverze asparaginu, neboli deamidace 2 asparaginových zbytků, která probíhá v průběhu stárnutí erythrocytů.^[6,41]

Protein 4.1 je multifunkční protein, který udržuje tvar erythrocytu a mechanické vlastnosti membrány, jako jsou deformabilita a stabilita,^[42] prostřednictvím laterálních interakcí se spektrinem, aktinem, glykoforinem C a proteinem p55. Afinita proteinu 4.1 k jiným membránovým proteinům je regulována působením kinázy a kalmodulinu- Ca^{2+} . 4.1R je také nezbytný pro vertikální spojení cytoskeletu a membrány prostřednictvím proužku 3 a glykoforinu C.^[41]



Obr. 9: Schéma domén proteinu 4.1: CTD = C-terminální část, FERM = 4.1-ezrin-radixin-moesin doména, SABD = spektrin-aktin-vázající doména, BPA = proužek 3, CaM = kalmodulin, GPC = glykoforin C, p55 = protein p55, P = fosfát.^[41]

Protein 4.1 se skládá ze čtyř domén, jak je znázorněno na obrázku 9. První doménou je FERM (zkratka odvozena od těchto proteinů: *four.one protein, ezrin, radixin, moesin*) o 30 kDa, umístěna na N-konci, která se skládá ze tří laloků A-C.^[42] Tato doména je zodpovědná za vazbu proteinu 4.1 k ostatním proteinům jako například glykoforinu A a C, proteinu p55 či kalmodulinu.^[43] Kromě toho se zde váže i PIP2 či PS.^[42] Druhou doménou je 16 kDa doména poskytující spojení mezi první a třetí neboli SABD doménou, tedy *spectrin-actin-binding-domain*, o molekulové hmotnosti 10 kDa, která váže spektrin a aktin. Čtvrtou je 22/24 kDa CTD doména (*carboxyl terminal domain*) tedy C-konec.^[41]

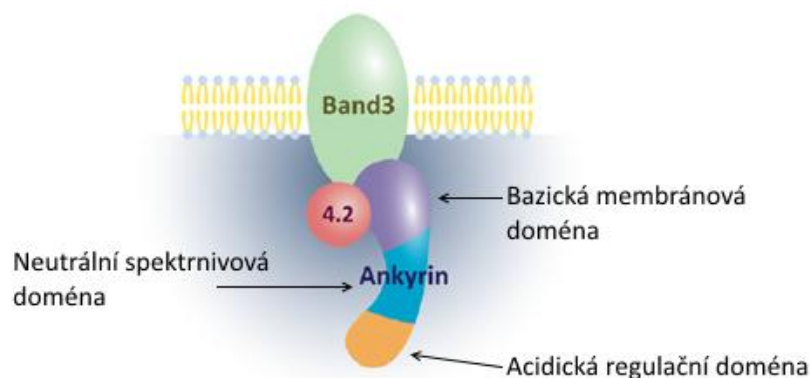
2.3.4.4 Proužek 4.2

Protein 4.2 patří mezi periferní membránové proteiny. V jedné erytrocytární buňce je přítomen v počtu asi $2,5 \times 10^5$ kopií,^[6] představuje tak tedy asi 5 % membránových proteinů. Jeho molekulová hmotnost činí 72 kDa.^[44]

Přesná role proteinu 4.2 zatím nebyla zjištěna. Bylo ovšem prokázáno, že protein 4.2 se váže na N-konec cytoplazmatické domény proužku 3, což má základní význam při udržování strukturní integrity membrány, a také interaguje s ankyrinem, proteinem 4.1 a spektrinem.^[40]

2.3.4.5 Ankyrin

Ankyrin je protein o molekulové hmotnosti 210 kDa, který je v membráně RBC přítomen v počtu asi $1,25 \times 10^5$ kopií.^[40] Erytrocytární ankyrin lze dělit do tří domén: bazické membránové (89 kDa) na N-konci (AMK 2-827), neutrální spektrínové (62 kDa, AMK 828-1382) a acidické regulační (55 kDa, AMK 1383-1881) domény na C-konci (obr. 10)^[6] Předpokládá se, že ankyrin má klíčovou roli při udržování integrity membrány skrze interakce se spektrinem a proužkem 3. Defekty v jeho struktuře jsou nejčastější příčinou hereditární sférocytózy.^[40]



Obr. 10: Asociace ankyrinu k B3 a proteinu 4.2: N-konce ankyrinu, obsahující vazebné místo pro B3 (fialová barva), je vázán s B3 (zelená) a proteinem 4.2 (červená).^[45]

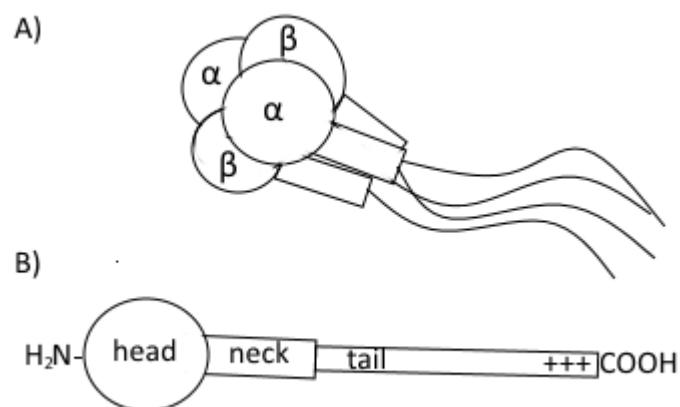
Membránová doména obsahuje krátké ankyrinové repetice poskládané do struktury podobné solenoidu.^[45] Tato doména je místem vazby B3, která probíhá prostřednictvím AMK-zbytku 175-185 její β -smyčky.^[40] Ankyrin má dvě vazebná místa pro proužek 3, a jelikož B3 je v membráně přítomen především

jako dimer, jsou tato vazebná místa schopna interagovat se čtyřmi molekulami proužku 3.^[6] Spektrínová doména, nebo také centrální doména, je lokalizovaná mezi AMK-zbytkem 828 a 1386 a interaguje s β -spektrínovou repeticí 14 a 15 na C-konci.^[29, 45] Přestože ankyrin obsahuje dvě vazebná místa pro spektrín, každý tetramer spektrínu se váže pouze s jedním tímto místem. Regulační doména v blízkosti C-konce obsahuje tzv. regulační oblast, která zvyšuje či snižuje míru interakce ankyrinu se spektrínem a proužkem 3.^[6]

2.3.4.6 Adducin

Adducin je periferní membránový protein vyskytující se v membráně RBC jako heterodimer a heterotetramer v počtu asi 3×10^4 kopií na jednu buňku.^[46] Skládá se ze dvou podjednotek (α , β), z nichž každá obsahuje C-konec, střední část a N-konec (obr. 11). C-konec je důležitý pro vazbu proužku 3, obsahuje také MARCKS (*Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate*) doménu, účastnící se protein-protein interakcí a membránové regulace.^[47]

Adducin má v membráně několik funkcí. Zaprvé utváří spojení mezi spektrín-aktinovým 4.1R komplexem a proužkem 3. Porušení tohoto spojení vedou k nestabilitě membrány a její spontánní fragmentaci. Zadruhé stabilizuje asociace mezi aktinem a spektrínem a tak zajišťuje mechanickou stabilitu membrány během života erytrocytu v krevním oběhu. Zatřetí má regulační funkci, zodpovídá například za morfologii membrány.^[46, 48]



Obr. 11: Schéma erytrocytárního heterodimeru aducinu: A) podjednotky aducinu, B) stavba jedné podjednotky; +++ označuje MARCKS doménu.

2.3.4.7 Tropomodulin a tropomyosin

Tropomodulin a tropomyosin patří mezi membránové proteiny tvořící cytoskelet.^[2] Tropomodulin, protein o molekulové hmotnosti 41 kDa, váže tropomyosin v poměru 2:1 a kryje konce aktinových protofilament a reguluje jejich délku. Skládá se z flexibilního N-konce a samostatného C-konce.^[2,49] V RBC je přítomen v počtu 3×10^4 kopií.^[34] Tropomyosin je heterodimer o dvou podjednotkách - 27 kDa a 29 kDa. V buňce je přítomen v počtu asi 8×10^4 kopií.^[6]

2.3.5 Integrované membránové proteiny

Integrované membránové proteiny mají různorodé funkce, slouží jako transportéry pro kationty, močovinu či vodu, nebo jako adhezivní proteiny účastnící se interakcí RBC s jinými krevními či endotelovými buňkami.^[17]

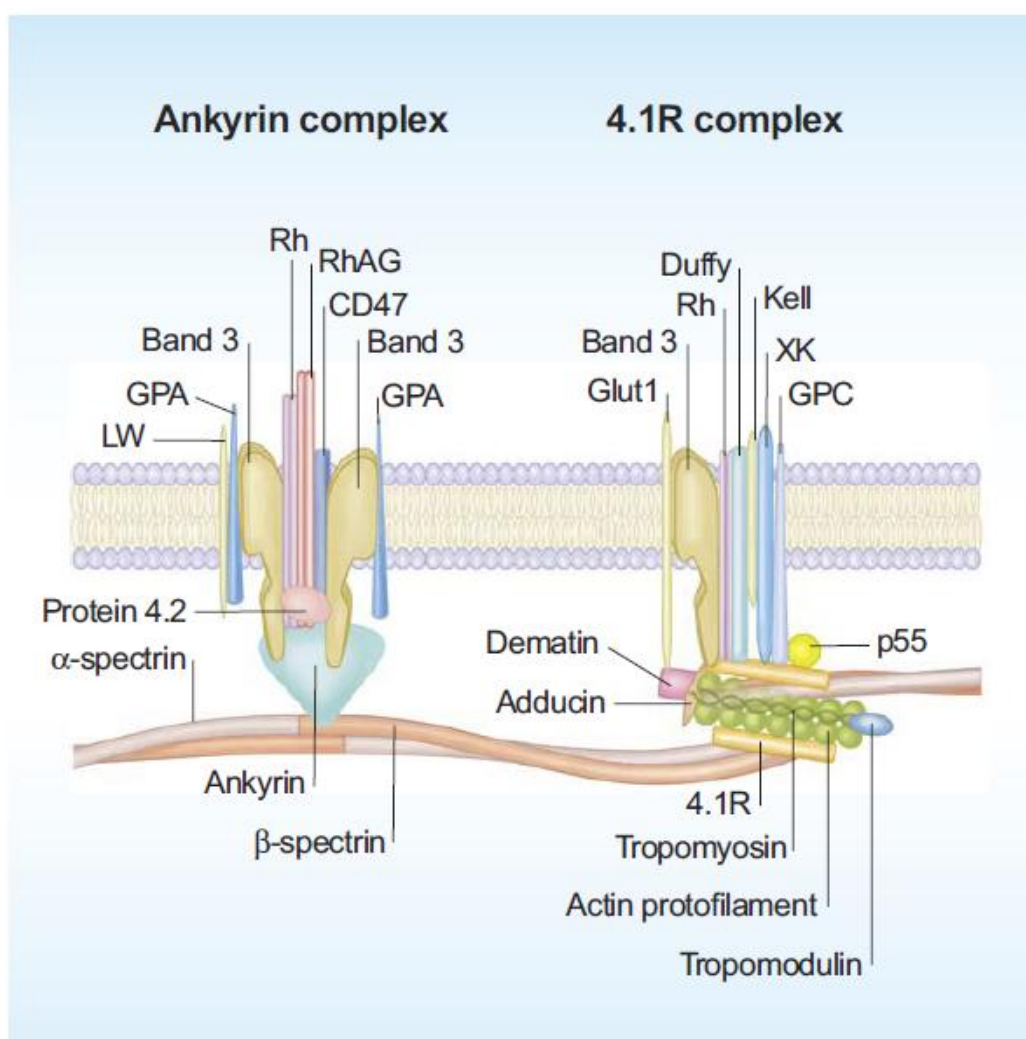
2.3.5.1 Proužek 3

Proužek 3 (B3), jiným názvem *anion exchanger 1*, je důležitou strukturní součástí RBC představující asi 25 % povrchu membrány.^[50] V erytrocytární membráně je přítomen buď jako dimer (60 %; $3,6 \times 10^5$ kopií), nebo tetramer (40 %; $1,2 \times 10^6$ kopií).^[34]

Proužek 3 je důležitý pro mnoho fyziologických procesů, zejména pro transport CO_2 krví, udržení intracelulárního pH a také pro mechanickou stabilitu membrány.^[51] Jelikož rozpustnost CO_2 v krvi je poměrně nízká, jsou jeho molekuly, které difundují do RBC, konvertovány na HCO_3^- pomocí karboanhydrázy II,^[52] která je vázána na C-konci proužku 3.^[53] Hydrogenuhličitanový iont je poté transportován ven z buňky pomocí B3 výměnou za chloridový anion. V plicích funguje tento proces opačně díky tlakovému gradientu CO_2 mezi krví a plicními alveoly. Rychlost této výměny je asi 10^5 monovalentních aniontů za sekundu.^[52]

Strukturně se jedná o 911 AMK dlouhý membránový transportní protein, který zajišťuje výměnu chloridových a hydrogenuhličitanových iontů.^[51] Aktivní formou B3 je dimer, ve kterém je každý z monomerů rozdělen do dvou oblastí: hydrofobní oblasti a hydrofilní oblasti, která se dále dělí na N-konec a C-konec.^[50] Cytoplazmatický N-konec, tedy AMK 1-359, o molekulové

hmotnosti 40 kDa^[53] je zodpovědný za asociaci B3 s cytoskeletem^[54] prostřednictvím vazeb s periferními membránovými proteiny ankyrinem, proteinem 4.1, proteinem 4.2 a adducinem.^[55] N-konec je také místem, kde probíhá kompetitivní vazba deoxyhemoglobinu a několika glykolytických enzymů.^[51, 55, 56] Membránový C-konec, tedy AMK 360-911, o molekulové hmotnosti 55 kDa^[53] se skládá z 12-14 transmembránových segmentů s krátkými AMK-řetězci o 33 AMK, mající klíčovou roli v regulaci výměny plynů díky výměně chloridů a hydrogenuhličitanových iontů napříč membránou.^[54] Tento tzv. chloridový shift vede ke snížení pH a napomáhá tak uvolnění O₂ z hemoglobinu.^[53]



Obr. 12: Komplex ankyrinu a 4.1R spojovací komplex: ^[2] LW = Landsteiner-Weiner krevní skupina, GPA = glykoforin A, CD47 = transmembránový protein kódovaný genem CD47, Rh = Rh faktor, RhAg = Rh asociovaný glykoprotein, Glut1 = glukózový transportér, Duffy = krevní skupina Duffy, Kell = krevní skupina Kell, XK = XK protein, GPC = glykoforin C, p55 = protein p55, 4.1.R = protein 4.1.

V erytrocytární membráně se proužek 3 nachází jako vyšší forma oligomerů, nejčastěji dimerů (60 %), tetramerů (40 %) a větších agregátů.^[51] Právě tetramer váže protein 4.2 a ankyrin.^[57] B3 také interaguje s integrálními membránovými proteiny jako například s glykoforinem A nebo s Rh komplexem.^[51] Rh komplex představuje další důležitou interakci mezi membránou a spektrínovým cytoskeletem. Skládá se z Rh polypeptidů, CD47, LW a glykoforinu B.^[57]

Proužek 3 je důležitou součástí dvou hlavních multiproteinových komplexů – ankyrin a 4.1R spojovacího komplexu, jak je znázorněno na obrázku 12, které slouží jako místo vertikálního spojení mezi plazmatickou membránou a spektrínovým cytoskeletem.^[54]

Proužek 3 slouží také jako kotva, spojující rozpustné cytoplazmatické proteiny a složky cytoskeletu. Spektrín se k B3 váže pomocí ankyrinu a proteinu 4.1 (obr. 12). Tyto interakce s cytoskeletem činí B3 nezbytným pro udržení tvaru RBC a jeho mechanické síly.^[52]

Proužek 3 také působí jako antigen procesu stárnutí pro poškozené a staré RBC. Shlukování B3 v membráně spustí proces navázání protilátek proti extracelulární části proteinu a způsobí tak odstranění starých a poškozených RBC.^[52] Specifické mutace B3 vedou k hereditární sférocytóze či stomatocytóze.^[54] Proužek 3 nese antigeny krevní skupiny Diego.^[58]

2.3.5.2 Glykoforiny

Glykoforiny jsou skupinou pěti integrálních membránových proteinů. Patří sem glykoforin A, B, C, D a E^[6] a všechny se skládají ze tří částí. První částí je cytoplazmatická doména na C-konci, která je zanořena do cytosolu.^[51] Další část tvoří hydrofóbní doména, která existuje jako šroubovice klenoucí se lipidovou dvojvrstvou, a třetí část tvoří N-konec, což je silně glykosylovaná extracelulární doména, která je umístěna na povrchu buňky.^[58]

Glykoforin A (GPA) je hlavní sialoglykoprotein o molekulové hmotnosti 36 kDa. Vyšší podíl kyseliny sialové má za následek negativní náboj membrány erytrocytu. Skládá se ze 131 aminokyselin: 70 extracelulárních, 22 transmembránových a 39 cytoplazmatických.^[58] Řadí se mezi integrální membránové proteiny.^[59] V membráně je přítomen ve stejném počtu jako

proužek 3 tedy 10^6 kopií na erytrocyt.^[57] GPA obsahuje transmembránovou doménu, která asociací vytváří jeho symetrický dimer.^[60]

Hlavní funkcí GPA je minimalizovat vzájemné interakce mezi erytrocyty a zabránit tak jejich agregaci v cirkulaci. Sialová kyselina také slouží jako ligand pro viry, bakterie a parazity.^[58] Glykoforin A funguje jako antigen krevní skupiny MNS.^[61]

Přibližně 50 % glykoforinu B je tvořeno oligosacharidy.^[6] V erytrocytární buňce je přítomen v počtu 2×10^5 kopií. Glykoforin C (GPC) je glykoprotein o 128 AMK a molekulové hmotnosti 32 kDa. V membráně RBC je přítomen v počtu 143×10^3 kopií. GPC je funkčně velmi důležitý, neboť jeho cytoplazmatický konec váže protein 4.1 a p55, což vede k zanoření cytoskeletální sítě do membrány, a má tedy rozhodující vliv při udržování stability, deformability a tvaru membrány.^[6]

2.3.5.3 Aquaporiny

Aquaporiny (AQPs) jsou skupinou integrálních membránových proteinů. Slouží jako kanály propustné pro vodu, avšak nepropustné pro jiné roztoky nebo nabitě molekuly. Hrají tedy důležitou roli při transportu vody napříč membránou.^[6] Lidský erytrocyt obsahuje přibližně $4-5 \times 10^4$ molekul AQP.^[62]

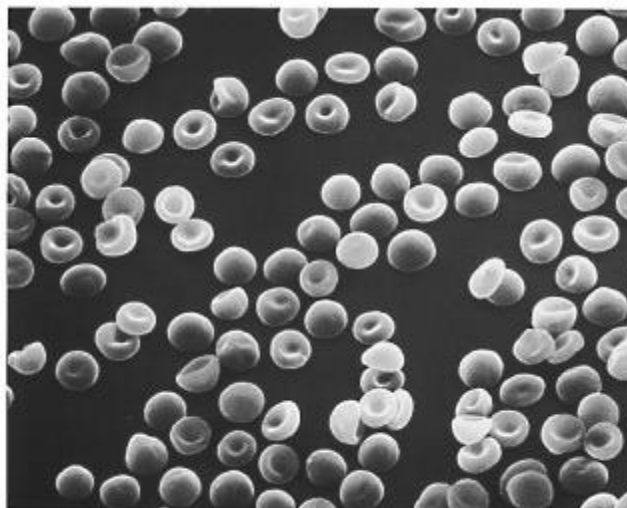
Aquaporin má strukturu tetrameru, kde je každá podjednotka individuálním transportérem tvořeným šesti transmembránovými α -šroubovicemi, které obklopují jeden úzký vodní kanál vedoucí skrze membránu.^[63] AQP je nezbytný pro vyrovnávání rapidních změn osmotického tlaku při průchodu erytrocytu krevním řečištěm. Původní název AQP je *CHIP28* odvozený od jeho funkce a molekulové hmotnosti, tedy *Channel-like Integral Protein of 28 kDa*.^[6] AQP nese antigeny krevní skupiny Colton (Co^a a Co^b).^[62]

2.4 Onemocnění spojená s poruchou membrány erythrocytu

2.4.1 Hereditární sférocytóza

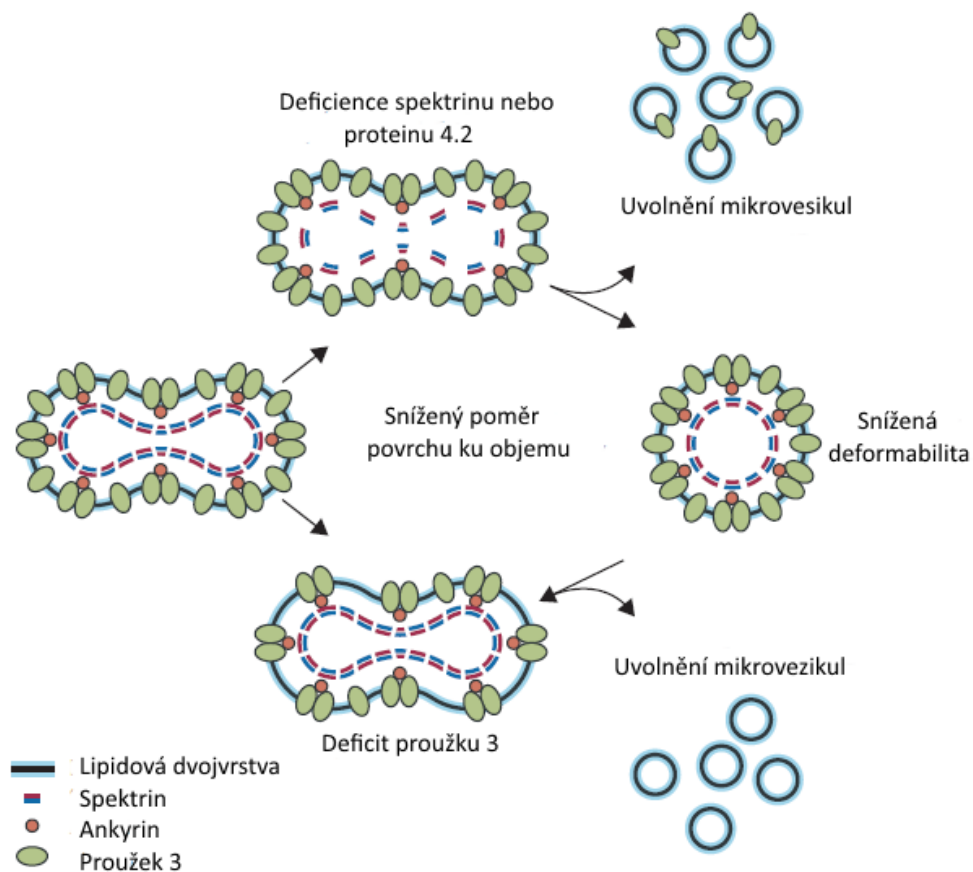
Hereditární sférocytóza patří do skupiny heterogenních dědičných onemocnění charakteristických přítomností erythrocytů sférického tvaru, neboli sférocytů (obr. 13), v periferním krevním nátěru.^[64] Dědičnost je v 75 % případech autozomálně dominantní. Ve zbylých 25 % případů se onemocnění objevuje spontánně bez předchozího výskytu v rodině.^[65] Hereditární sférocytóza je nejčastějším dědičným onemocněním hemolytickou anémií ve střední a severní Evropě. Prevalence je asi 1-5 případů na 1×10^4 obyvatel v Evropě.^[67]

Nejčastějšími příznaky jsou bledost způsobená anémií, žloutenka v důsledku hyperbilirubinémie a splenomegalie díky zvýšenému vychytávání vadných erythrocytů ve slezině.^[66] Typickým klinickým obrazem je zvýšená hemolýza a také erythropoéza jako důsledek kompenzačních mechanismů. Stěžejním je ovšem nález sférocytů v periferním krevním nátěru.^[6] V průběhu onemocnění se mohou vyskytnout dvě výrazné komplikace a to - zhoršení anémie a tvorba biliárních kamenů.^[68]



Obr. 13: Hereditární sférocytóza.^[6]

Příčinou tohoto onemocnění je defekt ve vertikální interakci proteinů spojujících cytoskelet s membránou erythrocytu.^[13] Mezi tyto proteiny zajišťující vertikální interakci patří ankyrin, proužek 3, protein 4.2 a spektrin. Většinou se jedná o mutace genů kódujících tyto strukturní proteiny, především spektrin.^[67]



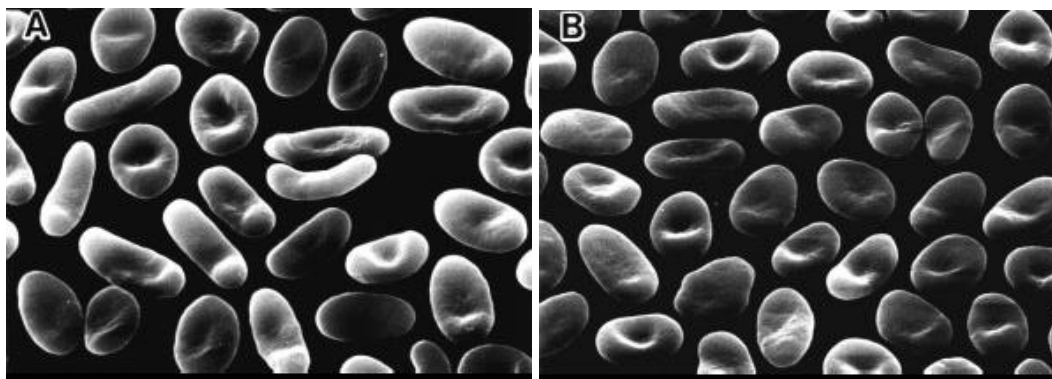
Obr. 14: Fyziologický efekt hereditární sférocytózy. [upraveno dle 69]

Defekty vedou k nestabilitě lipidové dvojvrstvy a ke snížené deformabilitě membrány a k následné tvorbě vezikul odškrcujících se od membrány (obr. 14) a tak ke vzniku sférocytů v důsledku ztráty povrchu membrány vůči objemu erythrocytu.^[65, 66] Dalšími ztrátami membránového materiálu dochází ke vzniku mikrosférocytu, který není schopen projít přes slezinné sinusy, tudíž ve slezině uvízne a je fagocytován buňkami monocyt-makrofágového systému.^[68]

2.4.2 Hereditární eliptocytóza

Hereditární eliptocytóza (HE) je dalším onemocněním vznikajícím v důsledku defektu membrány způsobeného mutací genů kódujících membránové či skeletální proteiny, což má za příčinu změny funkcí a snížení deformability membrány.^[66] HE je heterogenní skupinou autozomálně dominantních membránových poruch.^[68] Prevalence HE v USA je 3-5 lidí z 1×10^4 .^[6]

HE je způsobena defekty v horizontální interakci proteinů spojujících membránu s cytoskeletem včetně interakcí spektrinových dimerů a interakcí spektrin-aktin-protein 4.1.^[13] Zmutovanými geny jsou tedy geny kódující protein 4.1, α -spektrin nebo β -spektrin.^[66] Oslabení vazeb heterodimerů spektrinu vedou k reorganizaci cytoskeletu a opakovaný průchod krevními kapilárami o malém průsvitu může vést k trvalé elongaci RBC.^[68]



Obr. 15: Hereditární eliptocytóza: A) eliptocyty doutníkového tvaru, B) ovalocyty.^[6]

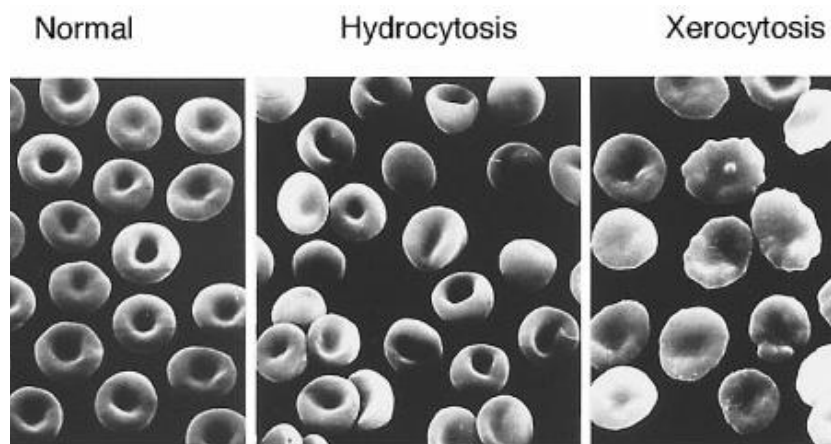
Hereditární eliptocytóza je charakteristická přítomností eliptických erytrocytů připomínajících doutníky (obr. 15A) v periferním krevním nátěru. Klinické příznaky HE jsou různorodé, počínaje asymptomatickým nosičstvím,^[65] až po život ohrožující anémii. Navíc příznaky jsou pro každého pacienta ve stejném stádiu choroby různé.^[65]

Těžkou, ale vzácnou formou HE je hereditární pyropoikilocytóza. Jedinci postižení tímto onemocněním mají erytrocyty mnohem náchylnější k teplu. Při zahřátí dochází k jejich fragmentaci a ke vzniku nepravidelného tvaru membrány.^[6]

Další formou HE je hereditární ovalocytóza (obr. 15B) známá také pod názvem *South-east Asian Ovalocytosis* (SAO). Toto onemocnění je rozšířené především v oblastech s výskytem malárie, jako je Indonésie, Filipíny, Malajsie či jih Thajska. SAO je výsledkem mutace genů kódujících proužek 3, konkrétně delece 27 nukleotidů kódujících AMK 400 až 408 proužku 3.^[66] Dědičnost je autozomálně dominantní. V periferním krevním nátěru jsou přítomny typické ovalocyty s charakteristickými zářezy. SAO je většinou asymptomatická, někdy ovšem doprovázená mírnou hemolýzou.^[65]

2.4.3 Hereditární stomatocytóza

Hereditární stomatocytóza je vzácnou formou defektů membrány erytrocytu, kdy většinou jsou defektní geny kódující protein 4.2. Dědičnost je autozomálně dominantní.^[66] Stomatocytóza je charakteristická širokou příčnou štěrbinou na erytrocytu viditelnou v periferním nátěru krve.^[6] Tyto erytrocyty se nazývají stomatocyty. Toto onemocnění je charakteristické zvýšenou permeabilitou membrány, což vede ke značným změnám objemu erytrocytu, který může být jak zvýšen, tak snížen.^[68]



Obr. 16: Hereditární stomatocytóza- elektronová mikroskopie: zleva- normální RBC, erytrocyty při hyperhydratované hereditární stomatocytóze, erytrocyty při dehydratované hereditární stomatocytóze.^[6]

Podle změn objemu se hereditární stomatocytóza dělí do dvou forem: xerocytózy neboli dehydratované hereditární stomatocytózy, kdy je objem erytrocytu snížen a druhou formou je hyperhydratovaná hereditární stomatocytóza. Oba typy jsou charakteristické únikem univalentních kationtů Na^+ a K^+ , což vede ke změně intracelulárního obsahu kationtů a tím ke změně objemu erytrocytu.^[66,68]

Častěji se vyskytuje dehydratovaná hereditární stomatocytóza, která vzniká díky ztrátě kationtů, především K^+ , a vody, což vede k dehydrataci buňky. V důsledku těchto změn dochází ke snížení MCHC. Naproti tomu při hyperhydratované hereditární stomatocytóze je hydratace buňky zvýšena kvůli úniku příslušných iontů. Tato forma je ovšem velmi vzácná.^[66]

3. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo podat základní pohled na strukturu membrány erytrocytu jako celku a seznámit se s nejčastějšími onemocněními vznikajícími v důsledku jejího defektu. Erytrocytární membrána je příkladem rozmanitosti a složitosti přírody, kde i miniaturní buňka, na první pohled velmi jednoduchá, je složitým komplexem vzájemně propojených proteinů a lipidů s mimořádnými vlastnostmi jako je vysoká elastičnost a strukturální odolnost vyšší než u oceli.

Ačkoliv se o existenci erytrocytu ví již několik století a stejnou dobu probíhají výzkumy v této oblasti, dle mého názoru je struktura erytrocytu stále aktuálním tématem a vědci celého světa mají ještě mnoho práce před sebou, než bude přesná struktura a funkce membrány erytrocytu plně pochopena.

4. Seznam použité literatury

1. MOUREK, J., POKORNÝ, J., LANGMEIER, M., ZVOLSKÝ, P.: *MEMBRÁNY IV: Specifické vlastnosti buněčné membrány ve vztahu k neuropsychickým poruchám*. Česká a slovenská psychiatrie, **2007**, vol. 103, issue 8, p. 402-407.
2. MOHANDAS, N., GALLAGHER, P. G.: *Red cell membrane: past, present, and future*. Blood, **2008**, vol. 112, issue 10, p. 3939-3948, DOI: 10.1182/blood-2008-07-161166.
3. GORTER, E., GREDEL, F.: *On biomolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood*. Journal of Experimental Medicine, **1925**, vol. 41, issue 4, DOI: 10.1084/jem.41.4.439. (abstrakt).
4. GOŇI, F. M.: *The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, **2014**, vol. 1838, issue 6, p. 1467-1476, DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.01.006.
5. NICOLSON, G. L., SINGER, S. J, et al.: *The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, **2014**, vol. 1838, issue 6, p. 1451–1466, DOI: 10.1007/978-1-4613-0515-6_12.
6. YAWATA, Y.: *Cell membrane: the red blood cell as a model*. Weinheim: Wiley-VCH, **2003**, 439 p., ISBN 35-273-0463-0.
7. CZERWINSKA, J, RIEGER M., UEHLINGER. E. U: *Dynamics of red blood cells in microporous membranes*. Biomicrofluidics, **2014**, vol. 8, issue 4, p. 29-41, DOI: 10.1007/978-3-642-74194-4_3.
8. HEAD, B. P., PATEL, H. H., INSEL, P. A.: *Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, **2014**, vol. 1838, issue 2, p. 532-545, DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.07.018.

9. ALBERTS, B.: *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 1998, 630 p., 2nd ed., Ústí nad Labem: Espero, ISBN 80-902-9062-0.
10. SVETINA, S.: *Red blood cell shape and deformability in the context of the functional evolution of its membrane structure*. Cellular and Molecular Biology Letters, 2012, vol. 17, issue 2, DOI: 10.2478/s11658-012-0001-z.
11. GIRASOLE, M., DINARELLI S., BOUMIS, G.: *Structure and function in native and pathological erythrocytes: A quantitative view from the nanoscale*. Micron, 2012, vol. 43, issue 12, p. 1273-1286. DOI: 10.1016/j.micron.2012.03.019.
12. TSE, W. T., LUX, S. E.: *Hereditary Spherocytosis and Hereditary Elliptocytosis*. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, DOI: 10.1036/ommbid.216.
13. LI, H., LYKOTRAFITIS, G.: *Erythrocyte Membrane Model with Explicit Description of the Lipid Bilayer and the Spectrin Network*. Biophysical Journal, 2014, vol. 107, issue 3, p. 642-653, DOI: 10.1016/j.bpj.2014.06.031.
14. HWANG, W. C., WAUGH, R. E.: *Energy of dissociation of lipid bilayer from the membrane skeleton of red blood cells*. Biophysical Journal, 1997, vol. 72, issue 6, p. 2669-2678, DOI: 10.1016/s0006-3495(97)78910-0.
15. LI, H., LYKOTRAFITIS, G.: *Two-Component Coarse-Grained Molecular-Dynamics Model for the Human Erythrocyte Membrane*. Biophysical Journal, 2012, vol. 102, issue 1, p. 75-84, DOI: 10.1016/j.bpj.2011.11.4012.
16. POLLARD, T. D., EARNSHAW, W. C., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.: *Cell biology*. 2nd ed., Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2008, p. 905, ISBN 978-141-6022-558.
17. AN, X., MOHANDAS, N.: *Disorders of red cell membrane*. British Journal of Haematology, 2008, DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07091.x.
18. SETTY, B. N. Y., LUTZ, U. H.: *Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion: role of phosphatidylserine-exposed sickle red blood cells*. Blood, 2002, vol. 99, issue 5, p. 1564-1571, DOI: 10.3410/f.1060802.512731.

19. SPENGLER, M. I., BERTOLUZZO, S. M.: *Study on membrane fluidity and erythrocyte aggregation in equine, bovine and human species*. Clinical Hemorheology and Microcirculation, **2008**, vol. 38, issue 3, p. 171-176.
20. ALBERTS, B.: *Molecular Biology of the Cell*. 3rd Ed., New York: Garland Publishing, Inc., **1994**, 1293 p., ISBN 08-153-1619-4.
21. KODÍČEK, M., KARPENKO, V.: *Biofyzikální chemie*. 3rd Ed., opr. a rozš., Praha: Academia, **2013**, 423 p., ISBN 978-80-200-2241-7.
22. MANNO, S., TAKAKUWA Y., MOHANDAS N., et al.: *Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability*. Proceedings of the National Academy of Science USA, **2002**, vol. 99, issue 4, p. 1943-1948, DOI: 10.1007/978-1-4613-0935-2_3.
23. DALEKE, D. L.: *Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry*. The Journal of Lipid Research, **2003**, vol. 44, issue 2, p. 233-242, DOI: 10.1194/jlr.R200019-JLR200.
24. FAIRBANKS, G., STECK, T. L., WALLACH, D. F. H.: *Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane*. Biochemistry, **1971**, vol.10, issue 13, p. 2606-2617, DOI: 10.1021/bi00789a030.
25. <http://www-3.unipv.it/bioscipv/sds-page.htm> (16. 3. 2015).
26. MARCHESI, V. T. a E. STEERS.: *Selective Solubilization of a Protein Component of the Red Cell Membrane*. Science. **1968**, vol. 159, issue 3811, p. 203-204, DOI: 10.1126/science.159.3811.203. (abstrakt).
27. BENNETT, V., LAMBERT, S.: *The spectrin skeleton: from red cells to brain*. Journal of Clinical Investigation, **1991**, vol. 87, issue 5, p. 1483-1489, DOI: 10.1172/jci115157.
28. IPSARO, J. J., HARPER, S. L., MESSICK, T. E., MARMORSTEIN R., et al.: *Crystal structure and functional interpretation of the erythrocyte spectrin tetramerization domain complex: A Single Unit of Protein Network Coupled with Lipid Bilayer*. Blood, **2010**, vol. 115, issue 23, p. 4843-4852, DOI: 10.1182/blood-2010-01-261396.

29. AN, X., GUO X., ZHANG X., et al: *Conformational Stabilities of the Structural Repeats of Erythroid Spectrin and Their Functional Implications: from red cells to brain.*, Journal of Biological Chemistry, **2006**, vol. 281, issue 15, p. 10527-10532, DOI: 10.1074/jbc.M513725200.
30. CZOGALLA, A., JASZEWSKI A. R., et al.: *Structural insight into an ankyrin-sensitive lipid-binding site of erythroid β -spectrin: from red cells to brain.* Molecular Membrane Biology, **2007**, vol. 24, issue 3, p. 215-224, DOI: 10.1080/09687860601102427.
31. NICOLAS, A., DELALANDE, O., HUBERT J. F., RUMEUR, E.: *The spectrin family of proteins: A unique coiled-coil fold for various molecular surface properties.* Journal of Structural Biology, **2014**, vol. 186, issue 3, p. 392-401, DOI: 10.1016/j.jsb.2014.03.011.
32. LI, J., DAO, M., LIM, C. T., SURESH, S.: *Spectrin-Level Modeling of the Cytoskeleton and Optical Tweezers Stretching of the Erythrocyte.* Biophysical Journal, **2005**, vol. 88, issue 5, p. 3707-3719, DOI: 10.1529/biophysj.104.047332.
33. GALLUZZI, L., NICOLAS, G., PAIARDINI, M., MAGNANI. et al.: *Identification of ubiquitinated repeats in human erythroid α -spectrin.* European Journal of Biochemistry, **2000**, vol. 267, issue 9, p. 2812-2819, DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01322.x.
34. BURTON, N. M., BRUCE, L. J.: *Modelling the structure of the red cell membrane.* Biochemistry and Cell Biology, **2011**, vol. 89, issue 2, p. 200-215, DOI: 10.1139/O10-154.
35. ZHU, Q., VERA, C., ASARO J. R., SCHE P., et al.: *A Hybrid Model for Erythrocyte Membrane: A Single Unit of Protein Network Coupled with Lipid Bilayer.* Biophysical Journal, **2007**, vol. 93, issue 2, p. 386-400, DOI: 10.1529/biophysj.106.094383.
36. LIU, S. C., *Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton.* The Journal of Cell Biology, **1987**, vol. 104, issue 3, p. 527-536, DOI: 10.1083/jcb.104.3.527.

37. ZHANG, R., ZHANG, CH., ZHAO, Q., et al.: *Spectrin: Structure, function and disease*. Science China Life Sciences, **2013**, vol. 56, issue 12, p. 1076-1085, DOI: 10.1007/s11427-013-4575-0.
38. AN, X., GUO, X., SUM, H., MORROW, J., et al.: *Phosphatidylserine Binding Sites in Erythroid Spectrin: Location and Implications for Membrane Stability*. Biochemistry, **2004**, vol. 43, issue 2, p. 310-315, DOI: 10.1021/bi035653h.
39. SUNG, L. A., VERA, C.: *Protofilament and Hexagon: A Three-Dimensional Mechanical Model for the Junctional Complex in the Erythrocyte Membrane Skeleton*. Annals of Biomedical Engineering, **2003**, vol 31, p. 1314-1326, DOI: 10.1114/1.1635820.
40. SATCHWELL, T. J., SHOEMARK D. K., SESSIONS R. B., TOYE, A. M.: *Protein 4.2: A complex linker*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, **2009**, vol. 42, p. 201-210, DOI: 10.1016/j.bcmed.2009.01.005.
41. DIAKOWSKI, W., GRZYBEK, M., SIKORSKI, A. F.: *Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily*. Folia Histochemica et Cytobiologica, **2006**, p. 231-48.
42. AN, X., ZHANG X., DEBNATH G., BAINES A. J., et al.: *Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphate (PIP 2) Differentially Regulates the Interaction of Human Erythrocyte Protein 4.1 (4.1R) with Membrane Proteins*. Biochemistry, **2006**, vol. 45, issue 18, p. 5725-5732, DOI: 10.1021/bi060015v.
43. CHISHTI, A. H., KIM, A. C., MARFATIA S. M., et al.: *The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane*. Trends in Biochemical Sciences, **1998**, vol. 23, p. 281-282, DOI: 10.1016/S0968-0004(98)01237-7.
44. MANDAL, D., MOITRA, P. K., BASU, J.: *Mapping of a spectrin-binding domain of human erythrocyte membrane protein 4.2*. Biochemical Journal, **2002**, vol. 364, issue 3, DOI: 10.1042/bj20020195.
45. KÜMPORNSIN, K., JIEMSUP, S., YONGKIETTRAKUL, S., CHOOKAJORN, T.: *Characterization of band 3–ankyrin–Protein 4.2 complex by biochemical*

- and mass spectrometry approaches*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **2011**, vol. 406, issue 3, p. 332-335, DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.026.
46. FRANCO, T., LOW, P. S.: *Erythrocyte adducin: A structural regulator of the red blood cell membrane*. Transfusion Clinique et Biologique, **2010**, vol. 17, p. 87-94, DOI: 10.1016/j.tracli.2010.05.008.
47. MATSUOKA, Y., LI, X., BENNETT, V., ZHANG, Y.: *Adducin: structure, function and regulation*. Cellular and Molecular Life Sciences, **2000**, vol. 57, p. 884-895, DOI: 10.14711/thesis-b1255106.
48. ANONG, W. A., FRANCO, T., CHU, H., WEIS, T. L., et al.: *Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion*. Blood, **2009**, vol. 114, p. 1904-1912, DOI: 10.1182/blood-2009-02-203216.
49. YAO, W., SUNG, L. A.: *Erythrocyte Tropomodulin Isoforms with and without the N-terminal Actin-binding Domain*. Journal of Biological Chemistry, **2010**, vol. 285, p. 31408-31417, DOI: 10.1074/jbc.M110.130278.
50. CASELLA, S., PICCIONE, D., IELATI, S., BOCCHINO, E. G., et al.: *Sulfate influx on band 3 protein of equine erythrocyte membrane (Equus caballus) using different experimental temperatures and buffer solutions*. Cell biochemistry and function, **2013**, vol. 31, p. 333-337, DOI: 10.1002/cbf.2904.
51. VAN DEN AKKER, E., SATCHWELL, T. J., WILLIAMSON, R. C., TOYE, A. M.: *Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, **2010**, vol. 45, issue 1, p. 1-8, DOI: 10.1016/j.bcmd.2010.02.019.
52. WANG, D. N.: *Band 3 protein: Structure, flexibility and function*. FEBS Letters, **1994**, vol. 346, issue 1, p. 26-31, DOI: 10.1016/0014-5793(94)00468-4.
53. YAMAGUCHI, T., IKEDA, Y., ABE, Y., KUMA, H. et al.: *Structure of the Membrane Domain of Human Erythrocyte Anion Exchanger 1 Revealed by*

- Electron Crystallography*. Journal of Molecular Biology, **2010**, vol. 397, issue 1, p. 179-189, DOI: 10.1016/j.jmb.2010.01.027.
54. SATCHWELL, T. J., HAWLEY, B. R., BELL, A. J., RIBEIRO, M. L., et al.: *The cytoskeletal binding domain of band 3 is required for multiprotein complex formation and retention during erythropoiesis*. Haematologica, **2014**, vol. 100, issue 1, p. 133-142, DOI: 10.3324/haematol.2014.114538.
55. WU, F., SATCHWELL, T. J., TOYE, A. M.: *Anion exchanger 1 in red blood cells and kidney*. Biochemistry and Cell Biology, **2011**, vol. 89, issue 2, p. 106-114, DOI: 10.1139/O10-146.
56. RÜCKMANN, B., SCHUBERT, D.: *The complex of band 3 protein of the human erythrocyte membrane and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, **2002**, vol. 1559, issue 1, p. 43-55, DOI: 10.1016/s0005-2736(01)00435-7.
57. WILLIAMSON, R. C., TOYE, A. M.: *Glycophorin A: Band 3 aid*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, **2008**, vol. 41, issue 1, p. 35-43, DOI: 10.1016/j.bcmed.2008.01.001.
58. POOLE, J.: *Red cell antigens on band 3 and glycophorin A*. Blood Reviews, **2000**, vol. 14, issue 1, p. 31-43, DOI: 10.1054/blre.1999.0124.
59. YOUNG, M. T., TANNER, M. J. A.: *Distinct Regions of Human Glycophorin A Enhance Human Red Cell Anion Exchanger (Band 3; AE1) Transport Function and Surface Trafficking*. Journal of Biological Chemistry, **2003**, vol. 278, issue 35, p. 32954-32961, DOI: 10.1074/jbc.M302527200.
60. DOURA, A. K., FLEMING, K., G.: *Complex Interactions at the Helix–Helix Interface Stabilize the Glycophorin A Transmembrane Dimer*. Journal of Molecular Biology, **2004**, vol. 343, issue 5, p. 1487-1497, DOI: 10.1016/j.jmb.2004.09.011.
61. AOKI, T., CHIMURA, K., NAKAO, N., MIZUNO, Y.: *Isolation and Characterization of Glycophorin from Carp Red Blood Cell Membranes*. Membranes, **2014**, vol. 4, issue 3, p. 491-508, DOI: 10.3390/membranes4030491.

62. CHO, M. R., KNOWLES, D. W., SMITH, B. L., MOULDS, J. J., et al.: *Membrane Dynamics of the Water Transport Protein Aquaporin-1 in Intact Human Red Cells*. Biophysical Journal, **1999**, vol. 76, issue 2, p. 167-172, DOI: 10.1007/978-1-4615-1203-5_23.
63. TÖRNROTH-HORSEFIELD, S., HEDFALK, K., FISCHER, G., LINDKVIST-PETERSSON, K., et al.: *Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation*. FEBS Letters, **2010**, vol. 584, issue 12, p. 2580-2588, DOI: 10.1016/j.febslet.2010.04.037.
64. PERROTTA, S., GALLAGHER, P. G., MOHANDAS N.: *Hereditary spherocytosis*. Lancet, **2008**, vol. 372, p. 1411-26.
65. IOLASCON, A., PISCOPO, C., BOSCHETTO, L., *Red blood membrane disorders in pediatrics*, Pediatric annals, **2008**, vol. 37, issue 5, p. 295-301.
66. DA COSTA, L., GALIMAND, J., FENNETEAU, O., MOHANDAS, N.: *Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders*. Blood Reviews, **2013**, vol. 27, issue 4, p. 167-178, DOI: 10.1016/j.blre.2013.04.003.
67. DEBAUGNIES, F., COTTON, F., BOUTIQUE, CH., GULBIS, B.: *Erythrocyte membrane protein analysis by sodium dodecyl sulphate-capillary gel electrophoresis in the diagnosis of hereditary spherocytosis*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, **2011**, vol. 49, issue 3, p. 485-492, DOI: 10.1515/CCLM.2011.066.
68. PENKA, M., SLAVÍČKOVÁ, E.: *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1st Ed., Praha: Grada Publishing, a.s, **2011**, ISBN 978-802-4734-590.
69. PERROTTA, S., GALLAGHER, P. G., MOHANDAS, N.: *Hereditary spherocytosis*. Lancet, **2008**, vol. 372, p. 1411-1425.